

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG VÀ MỐI TƯƠNG QUAN DI TRUYỀN CÁC GIỐNG HOA SALEM (*LIMONIUM SINUATUM* L.) TẠI LÂM ĐỒNG BẰNG KỸ THUẬT RAPD-PCR

Lê Văn Thức¹, Lê Đức Hưng¹, Lê Thị Thùy Linh¹, Hán Huỳnh Điện¹, Lê Thị Bích Thy¹, Trần Quế¹, Hoàng Lê Lan Anh², Hoàng Thanh Tùng², Dương Tấn Nhựt²✉

¹Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 07.8.2019

Ngày nhận đăng: 26.10.2019

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 12 giống hoa salem đã được thu thập từ các vùng trồng hoa nổi tiếng tại Lâm Đồng (Vạn Thành, Thái Phiên, Đa Thiện, Hà Đông và Trại Mát). Mẫu lá non của các giống có hoa sau 45 ngày trồng tại vườn thực nghiệm được thu nhận để tách chiết DNA và phân tích sự tương quan di truyền bằng chỉ thị RAPD với 13 primer ngẫu nhiên. Kết quả ghi nhận được cho thấy, trong tổng số 145 băng RAPD thu được có 133 băng đa hình (91,72%) và 12 băng đồng hình (8,28%). Trong đó, primer OPB-03 có tổng số băng khuếch đại cao nhất là 17 băng (16 băng đa hình); hệ số khác biệt di truyền dao động từ 0,30 đến 0,90, trung bình đạt 0,55. Kết quả phân tích cây phân nhóm di truyền bằng phần mềm NTSYS_{pc} 2.1 chỉ ra rằng, 12 giống hoa salem được chia thành 4 nhóm lớn: nhóm I gồm 3 giống (hồng, hồng đậm và hồng cánh sen); nhóm II gồm 2 giống (tím xanh và tím mới); nhóm III gồm 6 giống (hồng phấn, tím cũ, trắng mới, trắng cũ, vàng mơ và tím hạt); nhóm IV chỉ có 1 giống (vàng hạt). Kết quả này không những là cơ sở dữ liệu quan trọng trong công tác bảo tồn nguồn gen salem mà còn cung cấp những thông tin cần thiết để chọn tạo giống đột biến loài hoa này trong thời gian tới.

Từ khóa: chỉ thị phân tử, đa dạng di truyền, mối, RAPD-PCR, salem

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa salem (*Limonium sinuatum* L.), tên tiếng Anh là statice hay olympus, thuộc họ Đuôi công (Plumbaginaceae), có xuất xứ từ Địa Trung Hải và phân bố khắp châu Âu, châu Á, châu Phi, châu Úc và Bắc Mỹ (Igawa *et al.*, 2002). Salem có mặt ở Lâm Đồng từ trước năm 1975, loại hoa này ưa khí hậu ôn hòa và được trồng quanh năm tại Đà Lạt. Trên thế giới, đây là một trong những loại hoa được sử dụng rộng rãi và phổ biến nhất (Bateman, 2013). Ngoài ra, hoa salem khi khô gần như không bị mất màu nên được sử dụng rộng rãi trong ngành hoa khô (Dole, Wilkins, 2005). Trong những năm gần

đây, các nhà khoa học đã tiếp cận với nhiều cách khác nhau để xây dựng quy trình nhân và sản xuất giống như: nuôi cấy mô tế bào để khảo sát khả năng tái sinh (Igawa *et al.*, 2002), loại bỏ vi khuẩn ký sinh gây hoại tử ở lá trong vi nhân giống (Tsu-Hwie *et al.*, 2005), tối ưu mật độ và hàm lượng nitơ tổng kích thích sự tăng trưởng và ra hoa (Jain *et al.*, 2018) hay tạo cây lai giữa 2 loài *Limonium perezii* và *L. sinuatum* (Morgan *et al.*, 1998), cũng như những nghiên cứu trong nước về nhân giống *in vitro* của Nguyễn Thị Huyền Trang và Lê Thị Thủy Tiên (2012). Tuy nhiên, chưa có bất kỳ báo cáo nào đề cập đến vấn đề xác định di truyền giữa các giống salem dựa vào chỉ thị phân tử DNA.

Ngoài ra, salem cũng là một trong số 11 loài hoa được gắn nhãn thương hiệu hoa Đà Lạt - Lâm Đồng nên việc xây dựng cơ sở dữ liệu di truyền hỗ trợ trong việc bảo tồn và phát triển theo hướng bền vững là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật đa hình DNA khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) dựa trên chuỗi phản ứng polymerase (PCR) để phân tích sự tương quan di truyền giữa các giống salem tại Lâm Đồng. Trên cơ sở đó, việc xác định sự tương quan di truyền sẽ là tư liệu quan trọng cho các nhà nghiên cứu di truyền và lai tạo giống. Đặc biệt, kết quả này cũng sẽ là tiền đề cho nhóm nghiên cứu trong việc lựa chọn giống nào ưu tiên sử dụng để gây tạo đột biến bằng bức xạ ion hóa giúp gia tăng phổ đột biến

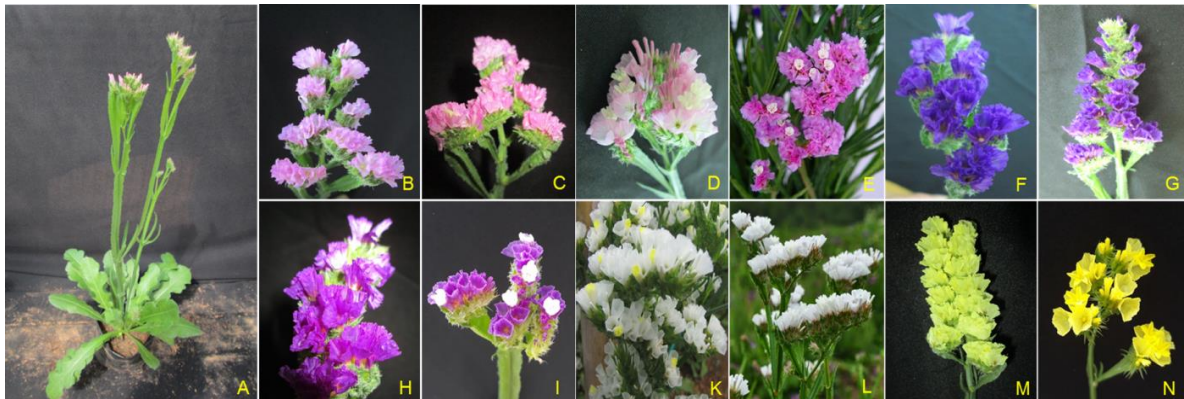
và tăng tính định hướng trong chọn lọc giống mới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thực vật

Các giống hoa salem được thu thập từ các vùng trồng hoa nổi tiếng tại Lâm Đồng (Vạn Thành, Thái Phiên, Đa Thiện, Hà Đông và Trại Mát) và trồng cách ly tại vườn thực nghiệm Viện Nghiên cứu hạt nhân (Bảng 1). Sau đó, tiến hành lấy mẫu lá non từ các cây giống đã có hoa (khoảng 45 ngày tuổi) để thực hiện quy trình ly trích DNA và phân tích di truyền (Hình 1).



Hình 1. Các giống hoa salem sử dụng trong nghiên cứu. A: Cây hoa salem 45 ngày tuổi; B: Hồng; C: Hồng đậm; D: Hồng phấn; E: Hồng cánh sen; F: Tím xanh; G: Tím mới; H: Tím cũ; I: Tím hạt; K: Trắng mới; L: Trắng cũ; M: Vàng mơ; N: Vàng hạt.

Bảng 1. Danh sách các giống hoa salem thu thập từ các vùng trồng khác nhau.

STT	Tên giống	Địa điểm lấy mẫu	Ký hiệu
1	Hồng (Rose Pink)	Trại Mát	RP
2	Hồng đậm (Dark Pink)	Vạn Thành	DP
3	Hồng phấn (Light Pink)	Thái Phiên	LP
4	Hồng cánh sen (Pure magenta)	Thái Phiên	PM
5	Tím xanh (Blue Violet)	Đa Thiện	BV
6	Tím mới (New Violet)	Vạn Thành	NV
7	Tím cũ (Old Violet)	Hà Đông	OV
8	Tím hạt (Light Violet)	Đa Thiện	LV
9	Trắng mới (New White)	Thái Phiên	NW
10	Trắng cũ (Old White)	Vạn Thành	OW
11	Vàng mơ (Light Yellow)	Hà Đông	LY
12	Vàng hạt (Cadimi Yellow)	Trại Mát	CY

Hóa chất

Hóa chất ly trích: CTAB (2% w/v), 1,4 M NaCl, 100 mM Tris (pH 8,0), 20 mM EDTA, chloroform, isopropanol, phenol, isoamyl alcohol, SDS 1% (w/v) (Bio Basic Canada Inc.)

Hóa chất chạy RAPD-PCR và điện di: Master mix 2X, primer, DEPC, agarose, GelRed DNA loading buffer, TBE 0,5X, 1kb DNA Ladder, 100bp DNA Ladder (Bioline -Anh).

Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

Quy trình tách chiết DNA tổng số dựa trên phương pháp của Doyle và Doyle (1990) và cải tiến theo Clarke (2009). DNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%, đồng thời độ tinh sạch của DNA được kiểm tra và định lượng trên máy đo quang phổ BioDrop (Anh).

Phân tích bằng chỉ thị RAPD-PCR

Tổng số 13 primer RAPD được sử dụng trong nghiên cứu thuộc nhóm primer OPA, OPB, OPE do hãng Operon cung cấp (Bảng 2).

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR ProFlex™ 3 × 32-well - Applied Biosystems (Mỹ), với thành phần phản ứng RAPD-PCR bao gồm MasterMix 1X, primer 0,8 μM, nồng độ DNA mẫu 50 ng/μl và nước tinh khiết thêm cho đủ 12,5 μl.

Chu trình nhiệt bao gồm các bước: (1) Biến tính ở 94°C trong 5 phút (1 chu kỳ); (2) Biến tính ở 94°C trong 1 phút (40 chu kỳ); (3) Gắn môi với nhiệt độ theo Tm của primer trong 1 phút (40 chu kỳ); (4) Bắt cặp ở 72°C trong 2 phút (40 chu kỳ); (5) Tổng hợp ở 72°C trong 10 phút (1 chu kỳ); (6) Bảo quản ở nhiệt độ 4°C với thời gian ∞.

Bảng 2. Tên và trình tự các primer sử dụng.

STT	Tên primer	Trình tự
1	OPA-07	5' – GAAACGGGTG – 3'
2	OPA-08	5' – GTGACGTAGG – 3'
3	OPA-10	5' – GTGATCGCAG – 3'
4	OPA-12	5' – TCGGCGATAG – 3'
5	OPA-15	5' – TTCCGAACCC – 3'
6	OPA-19	5' – CAAACGTCCG – 3'
7	OPA-20	5' – GTTGCGATCC – 3'
8	OPB-03	5' – CATCCCCCTG – 3'
9	OPB-04	5' – GGACTGGAGT – 3'
10	OPB-12	5' – CCTTGACGCA – 3'
11	OPB-19	5' – ACCCCCGAAG – 3'
12	OPE-14	5' – TGCGGCTGAG – 3'
13	OPE-18	5' – GGACTGCAGA – 3'

Điện di trên gel agarose

Sản phẩm RAPD-PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% trên máy Cleaver CS-300V với mức công suất 100V trong 80 phút và đọc kết quả trên máy UVP - PhotoDoc-It (Mỹ). Kích thước sản phẩm khuếch đại được so sánh với thang DNA chuẩn 1Kb.

Xử lý số liệu

Các số liệu được mã hóa theo hệ nhị phân 0 và 1 theo nguyên tắc (số 1 - có xuất hiện phân đoạn DNA trên gel; số 0 - không xuất hiện phân đoạn DNA trên gel). Các số liệu được xử lý theo chương trình Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1

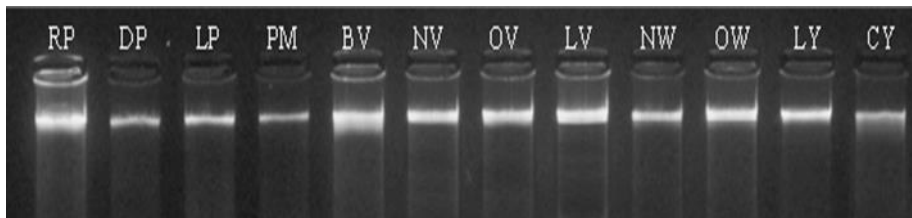
(NTSYS-pc) để xác định hệ số tương đồng di truyền và xây dựng cây quan hệ phát sinh (Rohlf, 2000).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số

Kết quả tách chiết DNA tổng số của 12 mẫu khảo sát được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di cho thấy, chất lượng băng DNA tổng số có vết sáng rõ và đồng đều, không bị đứt gãy và không xuất hiện vết sáng dưới kéo dài (Hình 2). Điều đó chứng tỏ, các mẫu DNA tách chiết có độ tinh sạch cao.

Bên cạnh đó, kết quả đo giá trị quang phổ hấp thụ OD và định lượng nồng độ dung dịch DNA cho thấy, tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} trên tất cả các mẫu salem nghiên cứu nằm trong khoảng 1,72 - 2,00 (Bảng 3). Từ các phân tích kể trên cho thấy, DNA đảm bảo chất lượng và nằm trong giới hạn cho phép theo như khuyến cáo của Kumar và Gurusubramanian (2011), tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} không được nhỏ hơn 1,6. Như vậy, phương pháp tách chiết DNA được sử dụng trong nghiên cứu là phù hợp với đối tượng cây salem. DNA tách chiết đảm bảo độ tinh sạch để thực hiện phản ứng RAPD-PCR trong phân tích di truyền.



Hình 2. Kết quả điện di DNA tổng số của 12 mẫu salem nghiên cứu. Tên mẫu giống tương ứng: RP (Hồng), DP (Hồng đậm), LP (Hồng phấn), PM (Hồng cánh sen), BV (Tím xanh), NV (Tím mới), OV (Tím cũ), LV (Tím hạt), NW (Trắng mới), OW (Trắng cũ), LY (Vàng mới), CY (Vàng hạt).

Bảng 3. Chất lượng DNA tổng số tách chiết từ các mẫu nghiên cứu.

Kí hiệu mẫu	OD_{260nm}	OD_{280nm}	Tỷ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm}	Nồng độ DNA ($\mu g/ml$)
RP	0,81	0,45	1,80	905,30
DP	0,57	0,30	1,90	581,70
LP	0,58	0,31	1,87	601,20
PM	0,55	0,28	1,96	538,50
BV	0,82	0,41	2,00	1059,40
NV	0,71	0,38	1,87	811,30
OV	0,75	0,43	1,74	793,50
LV	0,68	0,35	1,94	750,10
NW	0,56	0,31	1,81	683,50
OW	0,91	0,53	1,72	865,40
LY	0,85	0,43	1,98	902,30
CY	0,66	0,36	1,83	541,20

Kết quả phân tích RAPD-PCR

Kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR cho

thấy, 13 primer đều cho sản phẩm khuếch đại tốt trên tất cả 12 mẫu salem nghiên cứu (Bảng 4).

Tổng số sản phẩm khuếch đại là 145 băng DNA, kích thước các băng dao động trong khoảng 120bp - 4000bp, trung bình 11,2 băng/primer. Trong đó, 133 băng DNA đa hình (91,72%). Primer OPB-03 cho tổng sản phẩm khuếch đại cao nhất là 17 band DNA, primer OPB-19 thấp nhất là 6 băng DNA (Bảng 4). Các primer (OPA-07, OPA-08, OPA-10, OPA-12 và OPB-12) có tỷ lệ băng đa hình cao nhất đạt 100% và 2 primer (OPB-19 và OPE-18) có tỷ lệ băng đa hình thấp nhất (66,67% và 57,14%; tương ứng) (Bảng 4). Sự đa hình là sự khác biệt về kích thước các băng DNA thể hiện trên gel điện di, là cơ sở để phân tích mối tương quan di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu.

Sản phẩm khuếch đại được tạo ra từ primer OPA-10 là 15 băng với tỷ lệ đa hình đạt 100% (Bảng 4). Trong đó, băng đa hình 250bp chỉ xuất hiện ở mẫu CY (Vàng hạt); băng đa hình 600bp chỉ xuất hiện ở mẫu LP (Hồng phấn); băng đa hình 700bp chỉ xuất hiện ở mẫu LY (Vàng mơ); và băng đa hình 800bp xuất hiện ở hai mẫu RP (Hồng) và PM (Hồng cánh sen)

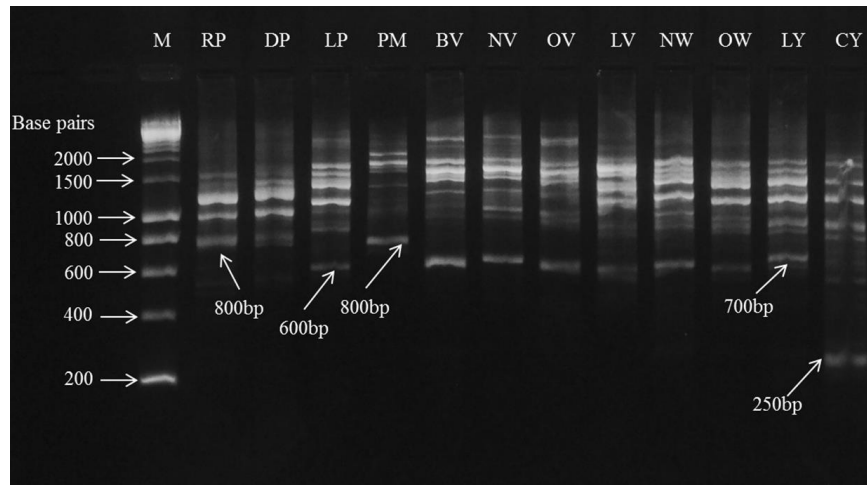
(Hình 3). Kết quả này cho thấy, băng đa hình 250bp có thể là chỉ thị đặc trưng cho mẫu salem vàng hạt, tương tự như vậy với kích thước 600bp và 700bp lần lượt đặc trưng cho mẫu hồng phấn và vàng mơ, còn mẫu hồng và hồng phấn đặc trưng bởi đoạn khuếch đại có kích thước 800 bp.

Số sản phẩm khuếch đại được tạo ra từ primer OPB-19 là thấp nhất (6 băng), kích thước trong khoảng 650bp - 1600bp (Hình 4).

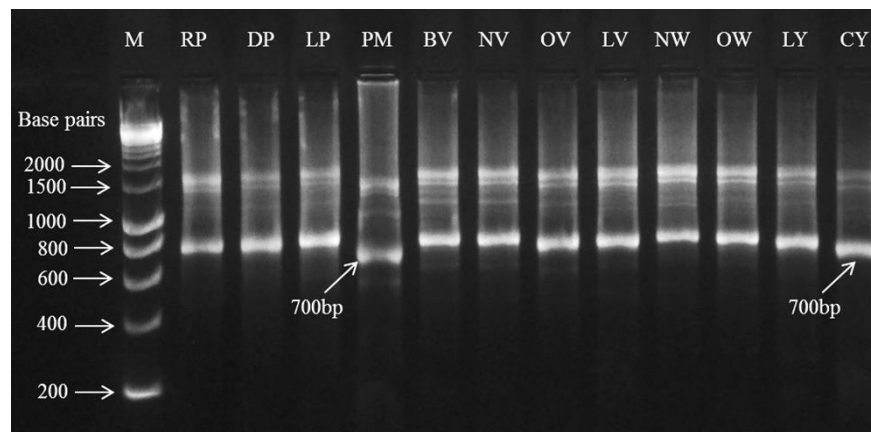
Băng đơn hình có kích thước 1400bp và 1500bp thì xuất hiện hầu hết các mẫu. Trong khi đó, băng đa hình 700bp chỉ xuất hiện ở mẫu PM (Hồng cánh sen) và CY (Vàng hạt). Như vậy, băng đa hình 700bp cũng là chỉ thị đặc trưng cho mẫu salem hồng cánh sen và vàng hạt. Bên cạnh đó, vẫn còn xuất hiện một số băng không tách rõ, băng mờ, nguyên nhân có thể là do trong quá trình điện di xuất hiện những băng có kích thước gần bằng nhau nên các vệt sáng hiển thị chồng lên nhau, gây khó khăn trong việc phân tích.

Bảng 4. Số sản phẩm khuếch đại của 13 primer RAPD sử dụng trong phân tích các mẫu salem.

STT	Tên primer	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (%)
1	OPA-07	12	12	100,00
2	OPA-08	11	11	100,00
3	OPA-10	15	15	100,00
4	OPA-12	11	11	100,00
5	OPA-15	13	12	92,31
6	OPA-19	10	9	90,00
7	OPA-20	7	6	85,71
8	OPB-03	17	16	94,12
9	OPB-04	16	15	93,75
10	OPB-12	13	13	100,00
11	OPB-19	6	4	66,67
12	OPE-14	7	5	71,43
13	OPE-18	7	4	57,14
Tổng số phân đoạn		145	133	-
Tỷ lệ trung bình phân đoạn đa hình (%)		-	-	88,55



Hình 3. Kết quả điện di RAPD-PCR của primer OPA -10 với 12 mẫu DNA salem nghiên cứu. Tên mẫu giống tương ứng: RP (Hồng), DP (Hồng đậm), LP (Hồng phấn), PM (Hồng cánh sen), BV (Tím xanh), NV (Tím mới), OV (Tím cũ), LV (Tím hạt), NW (Trắng mới), OW (Trắng cũ), LY (Vàng mơ), CY (Vàng hạt); M: Marker DNA 1Kb.

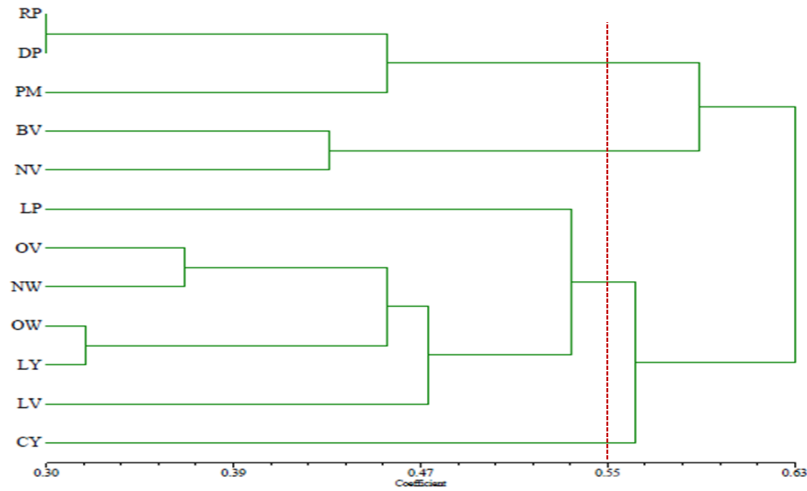


Hình 4. Kết quả điện di RAPD-PCR của primer OPB-19 với 12 mẫu DNA salem nghiên cứu. Tên mẫu giống tương ứng: RP (Hồng), DP (Hồng đậm), LP (Hồng phấn), PM (Hồng cánh sen), BV (Tím xanh), NV (Tím mới), OV (Tím cũ), LV (Tím hạt), NW (Trắng mới), OW (Trắng cũ), LY (Vàng mơ), CY (Vàng hạt); M: Marker DNA 1Kb.

Mối tương quan di truyền của các mẫu salem

Từ kết quả của phản ứng RAPD-PCR, xác định mức độ đa dạng di truyền của các giống hoa salem bằng cách so sánh các phân đoạn DNA trên ảnh điện di, từ đó, xây dựng sơ đồ cây di truyền và sơ đồ phân nhóm biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa chúng thông qua phần mềm NTSYS_{pc} 2.1. Kết quả thu được cho thấy, hệ số khác biệt di truyền giữa các giống salem nghiên cứu biến thiên từ 0,30 đến 0,63 (Hình 5) và giá

trị hệ số khác biệt di truyền trung bình là 0,55 (Bảng 5). Cây quan hệ di truyền đã chia các giống hoa salem thành 4 nhóm chính. Nhóm I gồm 3 giống: RP (Hồng), Hồng đậm (DP) và Hồng cánh sen (PM); nhóm II gồm 2 giống: BV (Tím xanh) và NV (Tím mới); nhóm III gồm 6 giống: LP (Hồng phấn), OV (Tím cũ), NW (Trắng mới), OW (Trắng cũ), LY (Vàng mơ), LV (Tím hạt); nhóm IV chỉ có 1 giống CY (Vàng hạt).



Hình 5. Cây quan hệ di truyền của 12 mẫu giống salem. Tên mẫu giống tương ứng: RP (Hồng), DP (Hồng đậm), LP (Hồng phấn), PM (Hồng cánh sen), BV (Tím xanh), NV (Tím mới), OV (Tím cũ), LV (Tím hạt), NW (Trắng mới), OW (Trắng cũ), LY (Vàng mới), CY (Vàng hạt).

Bảng 5. Sự tương quan di truyền của các giống salem.

Giống	RP	DP	LP	PM	BV	NV	OV	LV	NW	OW	LY	CY
RP	---											
DP	0,30	---										
LP	0,50	0,62	---									
PM	0,52	0,39	0,57	---								
BV	0,66	0,62	0,47	0,44	---							
NV	0,65	0,67	0,63	0,52	0,43	---						
OV	0,51	0,47	0,55	0,47	0,57	0,59	---					
LV	0,64	0,58	0,59	0,48	0,64	0,75	0,54	---				
NW	0,59	0,56	0,51	0,50	0,61	0,66	0,36	0,42	---			
OW	0,72	0,62	0,45	0,57	0,72	0,78	0,51	0,40	0,32	---		
LY	0,82	0,70	0,57	0,77	0,68	0,90	0,54	0,52	0,45	0,32	---	
CY	0,59	0,76	0,54	0,70	0,71	0,75	0,68	0,57	0,50	0,54	0,55	---
TB	0,59	0,60	0,54	0,55	0,62	0,74	0,53	0,48	0,42	0,43	0,55	0,55

Dựa vào đặc điểm nhận dạng về hình thái và màu sắc hoa kết hợp với kết quả phân tích di truyền, chúng ta có thể thấy rằng, sự tương quan di truyền giữa các giống hoa salem có màu (hồng, hồng cánh sen, hồng đậm) thì màu hồng và hồng đậm có hệ số tương đồng di truyền là gần nhất (0,30) (Bảng 5). Căn cứ trên địa điểm lấy mẫu, màu hồng (Trại Mát) và hồng đậm (Vạn Thành) thì hai khu vực này có biên nhiệt

độ ngày và đêm khác nhau có thể ảnh hưởng đến độ đậm nhạt của màu hoa (dạng thường biến thay đổi theo điều kiện môi trường), nên hai giống này có thể có chung nguồn gốc. Trong khi đó, hệ số tương đồng của giống hồng phấn lại khá xa so với ba giống hồng, hồng đậm và hồng cánh sen (0,50; 0,62 và 0,57; tương ứng). Điều này cho thấy, giống hồng phấn có thể là một giống khác so với ba giống màu hồng còn

lại sự khác biệt di truyền lớn nhất được tìm thấy trong nghiên cứu này là giữa hai giống (tím mới và vàng mơ) với hệ số khác biệt di truyền là 0,90 (Bảng 5).

Hệ số khác biệt di truyền giữa hai giống BV (tím xanh) và NV (tím mới) là 0,43, nằm trong phân nhóm II, có hệ số tương đồng khác xa so với các màu tím khác trong phân nhóm III. Kết quả này cho thấy, nếu xét riêng về màu sắc thì chưa thể khẳng định những giống có phổ màu tương đồng thì chúng có quan hệ di truyền gần nhau. Đặc biệt, cây phân nhóm di truyền đối với hai giống salem vàng cũng minh chứng rõ hơn cho điều này, giống vàng mơ nằm trong phân nhóm III và vàng hạt lại nằm trong phân nhóm IV, với hệ số khác biệt di truyền là 0,55 (Bảng 5 và Hình 5).

Khi so sánh với một số nghiên cứu trên chi *Limonium* cho thấy, đối với loài *Limonium dufourii* sử dụng 12 primer RAPD để phân tích 165 cá thể đã thu được 124 băng với 33 băng đa hình (đạt 26,61%) (Palacios, Gonzales, 1997). Ngoài ra, nghiên cứu của Ding và đồng tác giả (2013) trên loài *Limonium sinense* sử dụng 30 primer RAPD cũng cho thấy, tổng số phân đoạn thu được là 228, trong đó phân đoạn đa hình là 174 (76,32%). Như vậy, trong kết quả phân tích RAPD của các mẫu salem (*Limonium sinuatum* L.) tại Lâm Đồng đã cho số phân đoạn đa hình là (91,72%), cao hơn so với kết quả nghiên cứu của hai loài trên. Bên cạnh đó, báo cáo của Ding và đồng tác giả (2013) khi phân tích mức độ đa dạng di truyền loài *Limonium sinense* sử dụng đồng thời kỹ thuật RAPD, ISSR, AFLP cũng đã xác định tính đa dạng di truyền giữa các giống trong loài này là khá cao và mức độ phân bố theo vùng địa lý không ảnh hưởng nhiều đến sự khác biệt di truyền. Trên cơ sở đó, cộng với kết quả phân tích hệ số tương đồng di truyền giữa các giống salem biến thiên từ 0,30 đến 0,90, trung bình đạt 0,55 càng chứng tỏ các giống salem tại Lâm Đồng có hệ số tương đồng di truyền khá rộng.

Như vậy, căn cứ trên kết quả cây quan hệ di truyền (Hình 5) và số liệu sự tương quan di truyền (Bảng 5) đã làm sáng tỏ tính đa dạng di

truyền của các giống salem tại Lâm Đồng. Kết quả này sẽ là cơ sở khoa học quan trọng giúp cho các nhà lai tạo giống có thêm cơ sở để lựa chọn tổ hợp lai nhằm gia tăng tính định hướng trong nghiên cứu giống mới. Bên cạnh đó, kết quả này cũng là cơ sở dữ liệu để phân loại, bảo tồn nguồn gen salem tại Lâm Đồng. Đồng thời, việc xác định rõ sự tương quan di truyền giữa các màu hoa salem sẽ tiệm cận trong công tác lựa chọn vật liệu (nguồn giống ban đầu) để gây tạo đột biến giống bằng bức xạ ion hóa hoặc hỗ trợ cho các nghiên cứu di truyền liên quan khác.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã thiết lập được thành phần và điều kiện cho phản ứng RAPD-PCR trên cây salem Lâm Đồng. Tổng số 13 primer RAPD đã được sử dụng hiệu quả để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 12 mẫu giống salem, tần suất xuất hiện băng đa hình trung bình khá cao (11,2 băng/primer), trong đó, primer OPB-03 cho tổng sản phẩm khuếch đại cao nhất (17 băng). Sự khác biệt di truyền lớn nhất được tìm thấy giữa hai giống vàng mơ và tím mới. Cây quan hệ di truyền chia 12 giống salem thành 4 nhóm lớn. Như vậy, các giống salem tại Lâm Đồng có hệ số tương đồng di truyền khá rộng, sự đa dạng này là nguồn vật liệu phong phú cho các nghiên cứu di truyền chuyên sâu.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở của Viện Năng lượng nguyên tử Việt Nam (Mã số CS/18/01-01).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bateman D (2013) *Flora - The Gardener's Bible*. New Zealand ISBN 978-1-74048-017-8.
- Clarke JD (2009) Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols* 3: 5177-5178.
- Ding G, Zhang D, Yu Y, Zhao L, Zhang B (2013) Analysis of genetic variability and population structure of the endemic medicinal *Limonium*

- sinense* using molecular markers. *Gene* 520: 189-193.
- Dole JM, Wilkins HF (2005) *Floriculture Principles and Species*. Pearson Prentice Hall, USA.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Igawa T, Hoshina Y, Mii M (2002) Efficient plant regeneration from cell cultures of ornamental statice *Limonium sinuatum* Mill. *In Vitro Cell Dev Plants* 38: 157-162.
- Jain R, Singh MK, Kishan S, Mahalakshmi, Reddy V, Janakiram T, Prabhat K, Rohit P (2018) Optimization of spacing and nitrogen dose for growth and flowering of statice (*Limonium sinuatum*). *Ind J Agr Sci* 88(7): 1108-1114.
- Kumar SN, Gurusubramanian G (2011) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis* 11(3): 116-124.
- Morgan ER, Burge GK, Seelye JF, Hopping ME, Grant JE (1998) Production of interspecific hybrids between *Limonium perezii* (Stapf) Hubb. and *Limonium sinuatum* (L.) Mill. *Euphytica* 102: 109-115.
- Nguyễn Thị Huyền Trang, Lê Thị Thủy Tiên (2012) Tăng hệ số nhân nhanh chồi cây hoa salem tím (*Limonium sinuatum* L. Mill) bằng cách sử dụng kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và adenine trong nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Sinh học* 34(3SE): 219-226.
- Palacios C, Gonzales CF (1997) Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* 6: 1107-1121.
- Rohlf FJ (2000) *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1*. Exeter Publishing Setauket, New York, USA.
- Tsu-Hwie AL, Nai-Wen H, Rey-Yuh W (2005) Control of leaf-tip necrosis of micropropagated ornamental Satice by elimination of endophytic bacteria. *In Vitro Cell Dev Plants* 41: 546-549.

ANALYZING GENETIC DIVERSITY AND CORRELATION OF STATICE (*Limonium sinuatum* L.) VARIETIES IN LAM DONG USING RAPD-PCR TECHNIQUE

Le Van Thuc¹, Le Duc Hung¹, Le Thi Thuy Linh¹, Han Huynh Dien¹, Le Thi Bich Thy¹, Tran Que¹, Hoang Le Lan Anh², Hoang Thanh Tung², Duong Tan Nhut²

¹Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

In this study, 12 varieties of statice (*Limonium sinuatum* L.) were collected from famous flower growing areas (Van Thanh, Thai Phien, Da Thien, Ha Dong and Trai Mat) in Lam Dong. Young foliage of flowering cultivars after 45 days of planting at the experimental site was collected for DNA extraction and genetic correlation analysis using RAPD with 13 random primers. Results showed that out of 145 RAPD bands, there were 133 polymorphic bands (91.72%) and 12 monomorphic bands (8.28%). Of which, the OPB-03 primer has the highest number of amplifiers, which is 17 bands (with 16 polymorphic bands); the genetic difference coefficients ranged from 0.30 to 0.90, mean 0.55. The results of the genetic sequence analysis using NTSYSpc 2.1 showed that 12 varieties of statice were divided into 4 groups: group I consisting of 3 varieties (rose pink, dark pink and pure magenta); Group II including 2 varieties (blue violet and new violet); Group III including 6 varieties (light pink, old violet, new white, old white, light yellow and light violet); Group IV consisting only 1 variety (cadimi yellow). This result is an important database in the conservation of statice genetic resources, as well as provides the necessary information to select mutant breeding of this species in the coming time.

Keywords: genetic diversity, *Limonium sinuatum* L., molecular marker, primer, RAPD-PCR