

PHÂN TÍCH SỰ ĐA DẠNG VÀ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LILY TRỒNG TẠI VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ ISSR

Bùi Thị Thu Hương^{1,2}, Chu Hoàng Hà¹, Lê Trần Bình¹, Đặng Văn Đông³, Trịnh Khắc Quang³

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Bộ Giáo dục và Đào tạo

³Viện Nghiên cứu Rau quả, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài: 11.02.2014

Ngày nhận đăng: 31.3.2014

TÓM TẮT

Lily, *Lilium*, là một trong các loại hoa đẹp và đang được ưa chuộng bậc nhất trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Với nhu cầu ngày càng cao về chủng loại, màu sắc, các nhà khoa học đã và đang liên tục tiến hành chọn, tạo giống hoa lily mới từ tập đoàn giống sẵn có Việt Nam cũng đã tiến hành công việc này ở những bước khởi đầu như thu thập, khảo nghiệm giống tại thực địa, tuy nhiên chưa có công trình hoàn chỉnh công bố việc đánh giá sự đa dạng của các giống lily trong nước và giống nhập nội để phục vụ cho công tác lai tạo giống mới. Vì vậy, báo cáo này trình bày một số kết quả quan trọng trong nghiên cứu đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền của 11 giống hoa lily nhập nội và 2 giống lily địa phương bằng chỉ thị phân tử ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Nghiên cứu cho thấy giá trị PIC (hệ số đa dạng di truyền) giữa các locus của các mẫu nghiên cứu dao động từ 0,6954 (ISSR 5) đến 0,886 (ISSR 56), trung bình đạt 0,82. Kết quả điện di sản phẩm PCR đã thu được 574 phân đoạn đa hình (trung bình 52 phân đoạn DNA/mẫu) trong tổng số 613 phân đoạn thu được. Hệ số tương đồng di truyền giữa các giống nghiên cứu dao động 0,3 - 0,79. 13 giống lily nghiên cứu đã được phân loại thành ba nhóm dựa trên hệ số tương đồng và chia thành 4 nhóm dựa trên tọa độ khi phân tích PCA (Principal Coordinate Analysis).

Từ khóa: Đa hình DNA, ISSR, lily, mối quan hệ di truyền

MỞ ĐẦU

Trên thế giới, hiện nay thị trường hoa lily ngày càng sôi động, không chỉ số lượng hoa sản xuất lớn mà còn chủng loại hoa khá đa dạng và phong phú. Hoa lily hiện đang là một trong 6 loài hoa phổ biến và có giá trị kinh tế nhất (hồng, phông, cúc, lay ơn, đồng tiền, lily), do vẻ đẹp và hương thơm quyến rũ. Những vùng sản xuất hoa lớn trên thế giới bao gồm các nước ở Châu Âu như Hà Lan, Pháp, Bỉ, Đức, Ý...; các nước ở Bắc Mỹ như Mỹ, Canada...; một số nước ở Châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Đài Loan... Ở Việt Nam, lily mới được trồng thành hàng hóa ở một số vùng có nghề trồng hoa phát triển như Đà Lạt, Hồ Chí Minh, Hà Nội, Sapa. Tuy nhiên, so với các chủng loại hoa khác thì loại hoa này chiếm một diện tích còn quá nhỏ, chất lượng chưa cao.

Lily thuộc họ *Lilium*, gồm khoảng 100 loài phân bố nhiều nơi trên lục địa Âu-Á và Bắc Mỹ. Phần lớn các loài lily có nguồn gốc từ Đông Nam Á (Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc), số khác đến từ Bắc Mỹ, còn lại là từ Châu Âu (Woodcock, Stearn, 1950). Hệ gen của

lily là một trong những hệ gen lớn nhất trong các loài thực vật và sự khác biệt về kích thước hệ gen giữa các loài lily cũng rất lớn (Siljak *et al.*, 2003). Ví dụ, kích thước DNA genome của *L. heuryn* gồm 32 triệu cặp base, trong khi một số loài khác con số này có thể lên đến 100 triệu cặp base (Bennet, Smith, 1976; Sentry, Smyth, 1989). Chính vì thế, chúng có nhiều đặc điểm hình thái cấu trúc rất khác nhau. Xấp xỉ 100 loài lily đã tạo ra sự đa dạng di truyền lớn biểu hiện qua hình thái, kích thước, các đặc tính sinh trưởng... Kỹ thuật phân tử đã và đang trợ giúp cho các nhà khoa học phân loại một cách chính xác hơn các dòng/giống lily (Persson *et al.*, 1998; Wen, Hsiao, 2001). Các chỉ thị DNA đã được chứng minh là có giá trị trong các chương trình chọn, tạo giống cây trồng, đặc biệt là trong nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền và lập bản đồ gen. Các chỉ thị DNA thông thường dựa vào phương pháp PCR như các chỉ thị RAPD, AFLP, SSR (Staub *et al.*, 1996; Gupta, Varshney, 2000). Tuy nhiên, có nhiều hạn chế khi sử dụng các chỉ thị này như sự tạo thành sản phẩm không ổn định khi sử dụng RAPD, giá thành cao khi sử dụng AFLP và phải biết trước trình tự vùng biến để phát triển các

mỗi đa dạng SSR đặc hiệu cho từng loài. Trong khi đó, ISSR – PCR là một kỹ thuật có thể vượt qua các giới hạn mà các kỹ thuật trên gặp phải (Zietki *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1993). Kỹ thuật ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) dựa trên phương pháp PCR nhằm nhân các đoạn trình tự không lặp ở giữa hai trình tự lặp lại xác định giống nhau nhưng ngược hướng. Các đoạn trình tự ngắn (microsatellites) dài khoảng 16-25 bp đóng vai trò như mồi đơn trong phản ứng PCR nhằm nhân các các đoạn *locus* khác nhau nằm giữa mỗi ISSR. Các mồi này có thể lặp lại hai, ba, bốn, năm lần và có thể không cần trình tự “mỏ neo” ở một hoặc cả hai đầu của mồi (Gupta *et al.*, 1994, Meyer *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994).

Hiện nay, với chi *Lilium*, các nhà khoa học đã sử dụng một số kỹ thuật sinh học phân tử như RAPD, ISSR, SSR để xác định quan hệ di truyền của cây trồng nhằm tạo cơ sở khoa học cho công tác chọn tạo giống. Tuy nhiên, cho đến nay, số công trình nghiên cứu hệ gen *Lilium* sử dụng chỉ thị phân tử ISSR không nhiều. Masumi *et al* (2002) đã sử dụng 63 chỉ thị ISSR dạng “mỏ neo (3'- anchored)” ở đầu 3' để đánh giá sự đa dạng giữa hai các dòng lai của giống lily “Montreux” và “Connecticut King”. Kết quả cho thấy có 33 chỉ thị trong tổng số 63 chỉ thị cho sự đa dạng các phân đoạn DNA đạt tỷ lệ 52%. Năm 2011, Guo đã công bố kết quả nghiên cứu tính đa dạng di truyền

của 648 mẫu thuộc giống *Lilium tsingtauense* phân bố ở Trung Quốc và Hàn Quốc dựa vào chỉ thị ISSR và các đặc điểm hình thái của chúng. Nhà khoa học này đã sử dụng 6 mồi ISSR và đưa ra sơ đồ hình cây biểu thị mối quan hệ di truyền giữa các nhóm này và đánh giá mức độ đa dạng của các nhóm lily phân bố ở các vị trí địa lý khác nhau. Các mẫu lily đó được thu thập ở 12 vị trí trên hai nước này tương ứng với 12 nhóm Tương tự, năm 2012, Mengli *et al.*, cũng đã sử dụng các chỉ thị ISSR để xác định và đánh giá các dòng lily đột biến *in vitro* từ giống *Lilium longiflorum*. Kết quả kiểm tra tần số đa dạng gen đạt 36,06% với 7 mồi ISSR đánh giá. Như vậy, sử dụng chỉ thị ISSR mang lại những kết quả nhanh, chính xác trong đánh giá sự đa dạng và mối quan hệ giữa các giống lily. Chính vì vậy, nghiên cứu này trình bày kết quả “đánh giá sự đa dạng và mối quan hệ di truyền một số giống lily trồng tại Việt Nam bằng chỉ thị phân tử ISSR” phục vụ công tác lai tạo giống mới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu lá cây của 13 giống lily do Trung tâm nghiên cứu và phát triển hoa cây cảnh, Viện nghiên cứu Rau quả cung cấp gồm các giống như ở bảng 1.

Bảng 1. Danh sách tên giống và ký hiệu giống sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Tên gọi (tên thương mại) | Kí hiệu | Thuộc nhóm | Xuất xứ |
|-----|---------------------------|---------|--|----------|
| 1 | Conqueror | Con | Lily Phương đông (Oriental Trumpet Lily- OT) | Hà lan |
| 2 | Robina | Rob | Lily Phương đông (Oriental Trumpet Lily -OT) | Hà lan |
| 3 | Tiber | Tib | Lily Phương đông (Oriental Lily-O) | Hà lan |
| 4 | Donkeror | Don | Lily Phương đông (Oriental Trumpet Lily -OT) | Hà lan |
| 5 | Yelloween | Yel | Lily phương đông (Oriental Trumpet Lily -OT) | Hà lan |
| 6 | Bernini | Ber | Lily Phương đông (Oriental Lily -O) | Hà lan |
| 7 | Cherbourg | Che | Lily Phương đông (Oriental Lily -O) | Hà lan |
| 8 | Lake carey | Lak | Lily Phương đông (Oriental Lily-O) | Hà lan |
| 9 | Sorbon | Sor | Lily Phương đông (Oriental Lily -O) | Hà lan |
| 10 | Belladonna | Bef | Lily phương đông (Oriental Trumpet Lily-OT) | Hà lan |
| 11 | <i>Lilium longiflorum</i> | L | Loa kèn (Trumpet Lily-T) | Việt Nam |
| 12 | <i>Lilium formolongo</i> | F | Loa kèn (Trumpet Lily-T) | Hà Lan |
| 13 | Lily đại Sapa | SP | Loa kèn (Trumpet Lily-T) | Việt Nam |

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết và xác định hàm lượng DNA tổng số

Tách chiết và tinh sạch DNA các mẫu lily theo phương pháp CTAB của Doyle có cải tiến (Doyle, 1987). Sau đó, các mẫu DNA được đo nồng độ và độ

tinh sạch bằng máy NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

Phương pháp PCR - ISSR

Phương pháp PCR với các mồi ISSR được thực hiện trên máy Veriti™ 96 well thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Hỗn hợp với

tổng thể tích là 15 µl/mẫu gồm những thành phần là DNA (100 ng/ul) - 1,8 µl; mỗi ISSR (10 pmol) - 1,2 µl, Master Mix 2X - 7,5 µl; ddH₂O - 4,5 µl được trộn đều rồi chuyển vào máy PCR và chạy theo chương trình đã cài đặt gồm các bước: bước 1. 94°C trong 4 phút, bước 2 92°C trong 1 phút;

bước 3. Ta °C với mỗi mỗi trong 1 phút (trong đó Ta là nhiệt độ bắt cặp từng mỗi); bước 4. 72°C trong 1 phút; bước 5. Lặp lại 40 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; bước 6 72°C trong 10 phút; bước 7. Giữ nhiệt độ 10°C. Các mỗi được sử dụng trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Tên và trình tự các mỗi ISSR sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Mỗi ISSR | Nhiệt độ gắn mỗi (Ta°C) | Trình tự mỗi | STT | Mỗi ISSR | Nhiệt độ gắn mỗi (Ta°C) | Trình tự mỗi |
|-----|----------|-------------------------|----------------------|-----|----------|-------------------------|---------------------|
| 1 | ISSR5 | 45 | (CTC) ₆ | 7 | ISSR52 | 45 | (CT) ₆ G |
| 2 | ISSR8 | 45 | (TG) ₆ GA | 8 | ISSR53 | 45 | (CA) ₆ A |
| 3 | ISSR12 | 53 | (GT) ₆ C | 9 | ISSR55 | 45 | (AC) ₆ T |
| 4 | ISSR15 | 46 | (CT) ₆ T | 10 | ISSR56 | 46 | (AC) ₆ G |
| 5 | ISSR50 | 46 | TT(CA) ₆ | 11 | ISSR67 | 45 | (ATG) ₆ |
| 6 | ISSR51 | 45 | (GA) ₆ A | | | | |

Phương pháp phân tích số liệu ISSR

Nhị phân hóa sự xuất hiện băng (phân đoạn) DNA trên bản điện di sản phẩm PCR

Các đoạn DNA xuất hiện hay không trên băng điện di được mã hóa bằng số tự nhiên 1 và 0, cụ thể, mẫu nào xuất hiện đoạn DNA thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện thì ký hiệu là 0 (Rohlf, 1989).

Đánh giá hiệu quả sử dụng mỗi

Để đánh giá một mỗi sử dụng có hiệu quả hay không trong đánh giá sự đa dạng di truyền giữa các giống nghiên cứu thì tỷ lệ phân đoạn đa hình (là tỷ lệ phần trăm số phân đoạn đa hình so với tổng số phân đoạn quan sát được) được chú ý. Một phân đoạn DNA (có kích thước cụ thể) xuất hiện ở mẫu thứ n nhưng không xuất hiện ở mẫu m hoặc đồng thời xuất hiện ở cả n và m nhưng không xuất hiện ở các mẫu khác thì phân đoạn DNA này gọi là phân đoạn đa hình. Ngược lại, nếu phân đoạn DNA nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là phân đoạn đơn hình. Ngoài ra, 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:

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

Ghi chú: P_i là tần suất allen thứ j với locus thứ i.

Tỷ lệ phân đoạn đa hình và PIC càng cao thì hiệu quả mỗi sử dụng càng cao (Weir, 1996).

Phân nhóm các mẫu lily nghiên cứu dựa trên hệ số tương đồng Jaccard

Số liệu nhị phân các mẫu được xử lý với phần mềm NTSYS 2.00 để tính hệ số tương đồng di truyền và lập biểu đồ quan hệ di truyền hình cây giữa các đối tượng nghiên cứu (Rohlf, 1989).

Phân nhóm các mẫu lily nghiên cứu dựa trên phân tích PCA

Sử dụng phần mềm NTSYS 2.2 để lập biểu đồ phân nhóm 2 chiều dựa trên phân tích PCA (Principal Coordinate Analysis) và qua đó sẽ lập biểu đồ phân nhóm dựa trên khoảng cách di truyền 2 chiều giữa các dòng, giống nghiên cứu (Rohlf, 2000)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết DNA tổng số

Sản phẩm tách chiết và tinh sạch DNA có ảnh hưởng rất lớn đến phản ứng chạy PCR- ISSR. Nếu DNA tách ra bị lẫn nhiều tạp chất thì phản ứng PCR sẽ bị ảnh hưởng rất lớn. Vì vậy, để thực hiện phản ứng PCR, DNA được tách chiết phải có băng vạch đậm, rõ nét và không có dải vệt dài, có hàm lượng tối ưu và sạch.

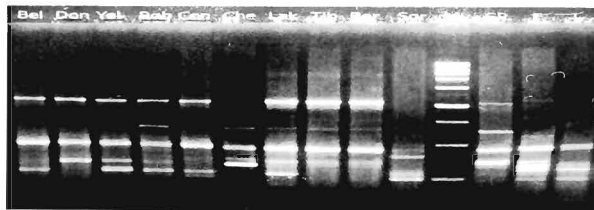
Bảng 3. Kết quả tách chiết DNA tổng số 13 giống lily

| STT | Tên dòng | OD _{260/280} | Hàm lượng (ng/ μ l) | STT | Tên dòng | OD _{260/280} | Hàm lượng (ng/ μ l) |
|-----|----------|-----------------------|-------------------------|-----|----------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | Bel | 1,83 | 279,1 | 8 | Tib | 1,89 | 331,5 |
| 2 | Dol | 1,80 | 342,6 | 9 | Ber | 1,81 | 404,3 |
| 3 | Yel | 1,89 | 310,2 | 10 | Sor | 1,80 | 561,8 |
| 4 | Rob | 1,88 | 440,4 | 11 | SP | 1,87 | 251,9 |
| 5 | Con | 1,86 | 210,1 | 12 | F | 1,85 | 405,0 |
| 6 | Che | 1,86 | 282,2 | 13 | L | 1,82 | 388,6 |
| 7 | Lak | 1,83 | 376,6 | | | | |

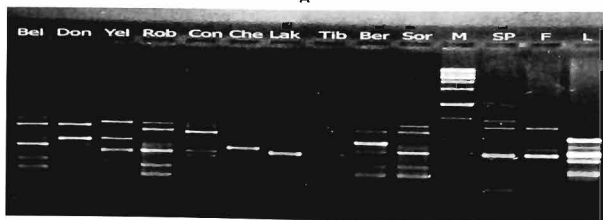
Trên bảng 3, ta có thể thấy, DNA tách chiết có độ sạch OD_{260/280} nằm trong khoảng 1,80-1,89 chứng tỏ DNA được tách có độ sạch cao, không bị lẫn tạp chất. Hàm lượng DNA tách chiết đạt các nằm trong khoảng 210,1 - 440,4 ng/ μ l. Hàm lượng DNA này đã được pha loãng đến nồng độ 100 ng/ μ l để dùng cho phản ứng PCR-ISSR.

Đánh giá hiệu quả sử dụng các chỉ thị ISSR trong phân tích sự đa dạng các giống lily

Các môi ISSR có tên và trình tự tại bảng 2 được sử dụng cho phản ứng PCR với 13 mẫu lily nghiên cứu. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% cho thấy các băng DNA rõ, đa hình về kích thước, ví dụ ở hình 1A, 1B



A



B

Hình 1. A: Ảnh điện di sản phẩm PCR - ISSR 13 giống lily với mỗi ISSR 8; B: Ảnh điện di sản phẩm PCR - ISSR 13 giống lily với mỗi ISSR 52

Sự xuất hiện hay không của các băng DNA khi tiến hành phản ứng PCR-ISSR với 11 mỗi ISSR được tổng hợp và đánh giá trong bảng 4. Hệ số đa hình di truyền cho mỗi locus (PIC) của từng chi thị ISSR trên lily dao động từ 0,6954 (mỗi ISSR 5) đến 0,886 (mỗi ISSR 56), trung bình đạt 0,82. Như vậy, các chi thị ISSR tạo sự đa dạng về các phân đoạn DNA của 13 giống lily rất cao nên có ý nghĩa trong việc đánh giá chúng. Chính vì vậy, chúng tôi tiếp tục tiến hành nghiên cứu một số chi số tiếp theo. Cụ thể là, trong tổng số 613 phân đoạn DNA xuất hiện trên bản điện di thì có 39 phân đoạn đơn hình (xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu) (chiếm 6,36%) và 574 phân đoạn đa hình (chiếm 93,64%). Kích thước phân đoạn nhỏ nhất khoảng 0,25 kb và kích thước phân đoạn lớn nhất khoảng 2 kb. Mỗi ISSR 56 nhận lên

được số phân đoạn nhiều nhất (94 phân đoạn). Mỗi ISSR 53 nhận lên được số phân đoạn ít nhất (38 phân đoạn). Có 8 mỗi cho tỷ lệ đa hình là 100% (mỗi ISSR 12, ISSR 15, ISSR 50, ISSR 51, ISSR 52, ISSR 53, ISSR 55, ISSR 67) và 3 mỗi còn lại đều cho tỷ lệ đa hình cao (lớn hơn 65%). Khi sử dụng mỗi ISSR, ta thấy số phân đoạn đa hình trung bình của một mỗi là khoảng 52 phân đoạn. Tỷ lệ đa hình cao ở các phân đoạn quan sát được cũng cho thấy, các mỗi ISSR đang sử dụng có ý nghĩa cao trong phân tích, nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống lily.

Như vậy, các chi thị ISSR đã sử dụng có ý nghĩa trong việc đánh giá đa dạng các giống lily nghiên cứu.

Bảng 4. Giá trị PIC và tỷ lệ phân đoạn đa hình của 11 chi thị ISSR với mẫu lily nghiên cứu.

| STT | Tên mỗi | PIC | Số phân đoạn quan sát được | Số phân đoạn đa hình | Tỷ lệ phân đoạn đa hình (%) |
|------------|---------|--------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | ISSR 5 | 0,6954 | 43 | 30 | 69,77 |
| 2 | ISSR 8 | 0,8298 | 60 | 47 | 78,33 |
| 3 | ISSR 12 | 0,8426 | 47 | 47 | 100,0 |
| 4 | ISSR 15 | 0,7659 | 43 | 43 | 100,0 |
| 5 | ISSR 50 | 0,8040 | 45 | 45 | 100,0 |
| 6 | ISSR 51 | 0,8598 | 68 | 68 | 100,0 |
| 7 | ISSR 52 | 0,8649 | 59 | 59 | 100,0 |
| 8 | ISSR 53 | 0,7573 | 38 | 38 | 100,0 |
| 9 | ISSR 55 | 0,8430 | 60 | 60 | 100,0 |
| 10 | ISSR 56 | 0,8860 | 94 | 81 | 86,17 |
| 11 | ISSR 67 | 0,8529 | 56 | 56 | 100,0 |
| Tổng | - | - | 613 | 574 | |
| Trung bình | | 0,82 | 55,7 | 52,2 | 93,64 |

Phân tích mối quan hệ di truyền giữa 13 giống lily

Mối quan hệ di truyền và phân nhóm lily theo hệ số tương đồng di truyền Jaccard

Số liệu nhị thức tiếp tục được xử lý bằng phần mềm NTSYSpC 2.00 để tính hệ số tương đồng di truyền và xây dựng biểu đồ quan hệ di truyền giữa các giống lily.

Từ bảng 5, ta thấy hệ số tương đồng di truyền giữa các cặp giống dao động là từ 0,3 (Bel và SP) đến 0,79 (Ber và Tib). Ta cũng thấy rằng, chỉ có một tỷ lệ nhỏ (3,85 % ứng với 3/78 cặp) có hệ số tương đồng di truyền lớn (>0,65), đó là các cặp Ber và Tib; Sor và Tib; Sor và Ber. Tổng số cặp có hệ số tương đồng di truyền khoảng từ 0,5 đến 0,65 chỉ chiếm

26,9 % (ứng 21/78 cặp). Với hệ số tương đồng này, chúng có khả năng tạo ưu thế lai khi sinh sản hữu tính (Thùy *et al.*, 2009). Nhưng cặp giống khác thì hệ số tương đồng từng cặp thấp (<0,5) chiếm 73,1%, chúng tập đoàn mẫu có sự đa dạng về mặt di truyền khá lớn.

Bên cạnh đó, sơ đồ hình cây cũng biểu thị mối quan hệ tổng thể các giống được nghiên cứu (Hình 2). Qua sơ đồ này và hệ số tương đồng di truyền từng cặp thì 13 giống lily được nghiên cứu có thể chia thành 3 nhóm chính.

Nhóm 1. Gồm 4 giống: Bel, Yel, Rob, Con và Don; hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm trong khoảng 0,42 với cặp Don và Con đến 0,58 với cặp Rob và Con.

Nhóm II: Gồm 5 giống Lak, Sor, Ber, Tib và Che; hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm trong khoảng 0,51 với cặp Lak và Sor đến 0,79 với cặp Ber và Tib.

Nhóm III: Gồm 3 giống SP, F và L; hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm trong khoảng 0,35 với cặp SP và L đến 0,54 với cặp F và L. Nhìn chung ba giống này có hệ số tương đồng với các giống khác không cao (0,30 đến 0,54); đặc biệt là giống SP có hệ số này với các giống rất thấp, từ 0,30 đến 0,47.

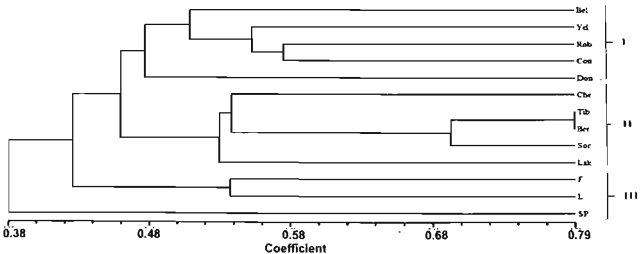
Mối quan hệ di truyền và phân nhóm lily theo phân tích tọa độ PCA

Biểu đồ tọa độ 2 chiều (Hình 3) thể hiện kiểu phân nhóm dựa vào khoảng cách của các giống lily trên 2 chiều tọa độ Dim-1 và Dim-2. Kết quả phân

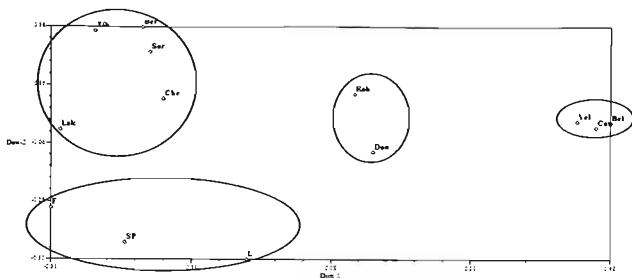
tích có thể thấy các giống thuộc nhóm I trên cây phân loại hệ số tương đồng được chia thành 2 nhóm nhỏ trên biểu đồ 2 chiều này gồm nhóm 1 gồm 3 giống là Yel, Con và Bel (đều thuộc nhóm OT); nhóm 2 gồm 2 giống là Rob và Don (thuộc nhóm OT). Nhóm II gồm Lak, Sor, Ber, Tib và Che (thuộc nhóm O) trên cây phân loại theo hệ số tương đồng cũng thuộc cùng nhóm trong biểu đồ 2 chiều là nhóm 3. Nhóm III trên cây phân loại dựa trên hệ số tương đồng gồm 3 giống là SP, F và L (đều thuộc nhóm T), trong biểu đồ 2 chiều tọa độ của chúng nằm cách hơi xa nhau, tuy vậy cũng có thể xếp chúng vào một nhóm còn lại là nhóm 4 trên biểu đồ 2 chiều này. Như vậy, nhờ chỉ thị ISSR, bước đầu có thể phân loại chúng theo các nhóm phù hợp với sự phân nhóm theo nguồn gốc.

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền giữa 13 giống lily.

| | Bel | Don | Yel | Rob | Con | Che | Lak | Tib | Ber | Sor | SP | F | L |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Bel | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Don | 0,45 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Yel | 0,50 | 0,48 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| Rob | 0,46 | 0,54 | 0,54 | 1,00 | | | | | | | | | |
| Con | 0,56 | 0,42 | 0,57 | 0,58 | 1,00 | | | | | | | | |
| Che | 0,34 | 0,40 | 0,47 | 0,50 | 0,43 | 1,00 | | | | | | | |
| Lak | 0,34 | 0,39 | 0,36 | 0,51 | 0,40 | 0,51 | 1,00 | | | | | | |
| Tib | 0,45 | 0,46 | 0,44 | 0,56 | 0,42 | 0,57 | 0,55 | 1,00 | | | | | |
| Ber | 0,46 | 0,56 | 0,47 | 0,60 | 0,45 | 0,55 | 0,55 | 0,79 | 1,00 | | | | |
| Sor | 0,46 | 0,47 | 0,47 | 0,55 | 0,45 | 0,50 | 0,51 | 0,68 | 0,71 | 1,00 | | | |
| SP | 0,30 | 0,38 | 0,34 | 0,43 | 0,32 | 0,34 | 0,42 | 0,40 | 0,37 | 0,38 | 1,00 | | |
| F | 0,33 | 0,42 | 0,34 | 0,45 | 0,40 | 0,47 | 0,46 | 0,51 | 0,49 | 0,54 | 0,47 | 1,00 | |
| L | 0,40 | 0,47 | 0,39 | 0,38 | 0,38 | 0,41 | 0,44 | 0,37 | 0,40 | 0,39 | 0,35 | 0,54 | 1,00 |



Hình 2. Sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa các giống lily



Hình 4. Biểu đồ tọa độ 2 chiều biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa các giống lily

KẾT LUẬN

11 môi ISSR đã được sử dụng trong đánh giá mối quan hệ di truyền của 13 giống lily nghiên cứu có hệ số đa dạng PIC nằm dao động trong khoảng từ 0,6954 (mỗi ISSR 5) đến 0,886 (mỗi ISSR 56); trung bình đạt 0,82.

Các giống lily nghiên cứu có hệ số tương đồng giữa các cặp giống nằm trong khoảng từ 0,3 (Bel và SP) đến 0,79 (Ber và Tib). Tỷ lệ các cặp giống có hệ số tương đồng di truyền từ 0,5 đến 0,65 chiếm 26,9% là nguồn vật liệu cung cấp cho lai tạo giống mới có ưu thế lai cao. Tỷ lệ các cặp có hệ số tương đồng thấp (< 0,5) chiếm tỷ lệ cao 73,1%, chứng tỏ tập đoàn mẫu nghiên cứu có độ đa dạng về di truyền khá lớn.

Dựa trên hệ số tương đồng Jaccard và trên sự phân tích PCA, cây phân loại 13 giống lily nghiên cứu đã được lập ra và nó có 4 nhánh (nhóm) chính, đó là nhóm 1 - gồm 3 giống là Yel, Con và Bel; nhóm 2 - 2 giống là Rob và Don; nhóm 3 - gồm Lak, Sor, Ber, Tib và Che; nhóm 4 - gồm 3 giống là SP, F và L.

Lời cảm ơn: Đề tài này được thực hiện nhờ sự cung cấp kinh phí của đề tài cấp bộ "Chọn tạo giống hoa lily cho Việt nam" do Viện Nghiên cứu rau quả làm chủ trì. Chúng tôi xin cảm ơn các cán bộ Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Phòng Công nghệ tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam đã giúp đỡ về máy móc, thiết bị và chuyên môn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bennet M, Smith JB (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc London Ser B* 274: 227-274
- Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19(1): 11-15.
- Guo W (2011) Genetic diversity of Lilium tsingtauense in China and Korea revealed by ISSR markers and morphological characters. *Biochem Syst Ecol* 39: 352 - 360.
- Gupta M, Chyi YS, Severson JR, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998 - 1006
- Gupta PK, Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Masumi Yamagishi, Hiromi Abe, Michiharu Nakaro, Akira Nakatsuka (2002) PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. *Sci Hort* 96: 225 - 234.
- Mengli Xi, Lina Sun, Shuai Qu, Juanjuan Liu, Jin Xu, Jisen Shi (2012) In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant cell Rep* 31: 1034 - 1051.
- Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ and Vilgays R (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 31: 2274 - 2280.

- Thúy Nguyễn Thanh, Hương Bùi Thị Thu, Quang Trịnh Khắc (2009). Nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống hoa lily, loa kèn (*Lilium* spp.) bằng chỉ thị phân tử RAPD. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 9: 3 - 8.
- Persson H, Lundquist K and Nybom H (1998) RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's-cap lily (*Lilium martagon* L.). *Hereditas* 128: 213 - 220.
- Rohlf FJ (1989) *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.00*. Exeter Publication, New York.
- Rohlf FJ (2000) *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2*. Exeter Software, Setauket, New York.
- Sentry J, Smyth DR (1989) An element with long terminal repeats and its variant arrangements in the genome of *Lilium henryi*. *Mol Gen Genet* 215: 349 - 354.
- Siljak Yakovlev S, Peccenini S, Muratovic E, Zoldos V, Robin O, Valles J (2003) Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. *Plant Syst Evol* 236 (3 - 4): 165 - 173.
- Staub JE, Serquen FC, Gupta M (1996) Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *Hort Science* 31(5): 729 - 739.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland MA 376p.
- Wen C, Hsiao JY (2001) Altitudinal genetic differentiation and diversity of Taiwan lily (*Lilium longiflorum* var *formosanum*; Liliaceae) using RAPD markers and morphological characters. *Int J Plant Sci* 162: 287 - 297.
- Woodcock H and Stearn (1950) *WT Lilies of the World*. Country Life Ltd, London
- Wu K, Jones R, Eberger LD, Scolnik PA (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res* 22. 3257 - 3258.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176 - 183.

ANALYSIS OF DIVERSITY AND GENETIC RELATIONSHIP OF SOME LILY VARIETIES CULTIVATED IN VIETNAM BY USING ISSR MARKERS

Bui Thi Thu Huong^{1,2*}, Chu Hoang Ha¹, Le Tran Binh¹, Dang Van Dong³, Trinh Khac Quang³

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Hanoi University of Agriculture, Ministry of Education and Training

³Institute of Vegetable Research and Developing, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

SUMMARY

Lily (*Lilium*) is one of the most beautiful and popular flowers in the world as well as in Vietnam. With the increasing demand of kinds and colors for this flower, scientists have been continuously selecting and creating new lily varieties from available ones. The Vietnamese also has conducted this work as a first step in the collection and field assay; however there are few results on evaluating the diversity of lily varieties to serve for the breeding. Therefore, this paper presents some important results in the study of genetic diversity and genetic relationship of 11 imported and 2 domestic lily varieties by using ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) molecular markers. Research showed that PIC (Polymorphic Information Content) values between *locus* locations ranged from 0.6954 (ISSR 5) to 0.886 (ISSR 56) and the average was 0.82. The result also showed that there were 574 polymorphic segments in a total of 613 segments obtained and the average was 52 polymorphic ones per primer. The coefficient of genetic similarity between each two breeds ranged from 0.3 - 0.79. The 13 lily varieties studied were classified into three groups based on similarity coefficient and divided into 4 groups based on PCA (Principal Coordinate Analysis).

Keywords. DNA polymorphisms, ISSR, *lilium*, genetic relationship

* Author for correspondence: Tel: +84-463284139; E-mail: Btthuonhph@gmail.com