PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁC MẪU GIỐNG CAM SÀNH TẠI HÀ GIANG BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ ISSR

Vũ Văn Hiếu[1], Nông Thị Huệ[2], Nguyễn Thị Oanh[2], Ninh Thị Thảo[2], Vũ Quang Sáng[2], Nguyễn Thị Phương Thảo[2*]

[1]Trung tâm KHKT giống cây trồng Đạo Đức, Hà Giang
[2]Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email[*]: ntpthao@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 24.03.2015 Ngày chấp nhận: 15.09.2015

TÓM TẮT

Việc sử dụng chỉ thị phân tử để đánh giá mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu giống cam sành Hà Giang sẽ góp phần phục vụ công tác thu thập, phân loại, đánh giá và bảo tồn nguồn gen cũng như cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền giữa các giống cam sành làm cơ sở cho các chương trình chọn tạo giống. Trong nghiên cứu này, sử dụng hai chỉ thị di truyền RAPD và ISSR cùng với việc thiết lập cây phân loại di truyền đã cho thấy mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống cam nghiên cứu. Kết quả đã chỉ ra 25 mồi RAPD và 5 mồi ISSR sử dụng đều cho đa hình (chiếm 100%), tuy nhiên số băng đa hình trên từng mẫu cho sự biến động lớn. Tất cả các mồi tạo ra được tổng số 2.157 băng, trung bình 1,80 băng tính trên mỗi mẫu nghiên cứu. Nhóm các chỉ thị RAPD gồm OPAW19; OPAE15 và nhóm chỉ thị ISSR gồm T1, T5 cho số băng ADN đa hình trung bình cao nhất, tương ứng đạt 4,48; 4,23 và 3,25; 3,45 băng/mẫu. Hệ số tương đồng di truyền của 39 dòng cam sành dao động trong khoảng 0,62 - 0,98 và 5 nhóm di truyền chính được ghi nhận.

Từ khóa: Chỉ thị ADN, cam sành, đa dạng di truyền, RAPD, ISSR.

Analysis of Genetic Diversity of Citrus Genotypes Collected in Ha Giang by RAPD and ISSR Markers

ABSTRACT

Oranges grown in Ha Giang are one of the most common citrus products in northern Viet Nam. However, vegetative propagation and selection for adaptation to various growing environments led to deviation from original genotype. Assessing genetic diversity of indigenous citrus may contribute to the collection, classification, evaluation and conservation as well as provide genetic information among citrus germplasm, which could be used for the breeding program. RAPD and ISSR analysis combined with the construction of phylogenetic tree revealed the genetic relationship among researched citruses. The results showed that 25 RAPD and 5 ISSR primers generated polymorphic patterns of PCR products (100%), however, the numbers of polymorphic bands detected on each genotype were significant in range. A total of 2157 DNA bands were found with an average of 1.80 DNA bands per genotype. RAPD markers (OPAW19 and OPAE15) and ISSR markers (T1 and T5) yielded highest polymorphism, with 4.48, 4.23 and 3.25, 3.45 bands per genotype, respectively. The results also indicated that the similarity coefficient of 39 samples ranged from 0.33 to 0.98 and 5 genetic groups were obtained.

Keywords: RAPD and ISSR markers, citrus, genetic diversity, RAPD, ISSR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây có múi (*Citrus*) là tên gọi chung của nhóm cây cam, chanh, quýt, bưởi, là một chi thực vật lớn trong họ *Rutaceae*. Việt Nam thuộc khu vực Đông Nam Á, là một trong những trung tâm phát sinh của các loài cây có múi (Rainer et al., 1975; Frederick et al., 1990). Một số công

trình đã công bố của các tác giả Trần Thế Tục (1977), Đỗ Đình Ca (1992) và Hoàng Ngọc Thuận (1993) cho thấy Việt Nam có nguồn gen cây có múi khá đa dạng với nhiều vùng trồng cam quýt nổi tiếng truyền thống với những giống cam quí như cam Xã Đoài (Nghệ An); cam sành Bắc Quang (Hà Giang); cam sành Hàm Yên (Tuyên Quang); cam sành Bố Hạ (Bắc Giang); cam canh (Hà Nội)... Trong đó, cam sành Bắc Quang từ lâu đã trở thành thương hiệu nổi tiếng được người tiêu dùng trong cả nước biết đến và trở thành cây kinh tế mũi nhọn của của tỉnh Hà Giang. Cam sành thuộc loại cây ăn quả lâu năm chịu ảnh hưởng rất rõ bởi điều kiện ngoại cảnh, biểu hiện qua sinh trưởng, phát triển, năng suất và phẩm chất của quả. Hiện nay nguồn gen cam sành tại Hà Giang khá phức tạp và không đồng nhất. Mỗi vùng đều có những điều kiện sinh thái nhất định ảnh hưởng đến quá trình sống cũng như bảo tồn nguồn gen của chúng, qua quá trình chọn lọc tự nhiên có những giống mang được các đặc tính di truyền quý của địa phương, có những giống lại không đáp ứng được điều đó. Việc nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen cam sành Hà Giang có ý nghĩa trong việc bảo tồn tính đa dạng sinh học và sử dụng có hiệu quả các nguồn gen quý đó phục vụ cho công tác chọn tạo giống tại địa phương.

Trên thế giới, các chỉ thị phân tử đã được sử dụng khá phổ biến để nghiên cứu đa dạng di truyền các loài thuộc chi *Citrus*. Machado et al. (1996) đã sử dụng chỉ thị RAPD để phân tích sự đa hình và mức tương đồng di truyền của 39 loài quýt Địa Trung Hải. Dehesdtani et al. (2007) cũng sử dụng loại chỉ thị này để đánh giá đa dạng di truyền của các dòng cam ngọt nguồn gốc từ Iran. Yong et al. (2006) sử dụng chỉ thị SSR đánh giá sự đa dạng di truyền của 122 mẫu bưởi. Trong khi đó, chỉ thị ISSR được Capparelli et al. (2004) sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của 69 mẫu chanh thu thập tại Italy.

Ở nước ta, việc ứng dụng các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu các loài thuộc cây có múi cũng đã được thực hiện bởi Nguyễn Thanh Nhàn và cs. (2004); Trần Thị Oanh Yến và cs. (2004); Khuất Hữu Trung và cs. (2009)... Trong nghiên cứu này, chỉ thị RAPD và ISSR được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 40 mẫu giống cam sành hiện đang trồng phổ biến tại Hà Giang. Qua phân tích di truyền nguồn gen cam sành sẽ được phân nhóm, kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp cơ sở khoa học cho công tác chọn tạo giống cũng như quản lý nguồn gen, tạo tiền đề cho việc phát triển cam sành qui mô lớn một cách bền vững tại tỉnh Hà Giang.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

39 mẫu cam sành Hà Giang được thu thập từ 5 xã của huyện Bắc Quang, tỉnh Hà Giang và 1 mẫu cam Vinh. Danh sách các mẫu cam nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA

Mẫu lá cam sau khi thu được ghi số và bảo quản trong tủ lạnh -20^{0}C. DNA được chiết tách từ lá cam theo quy trình của Doyle và Doyle (1990) cải tiến.

Sau khi chiết tách DNA, tiến hành kiểm tra sản phẩm DNA tổng số bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu được kiểm tra trên máy Nanodrop. Sau đó mẫu DNA được bảo quản trong tủ lạnh sâu - 20^{0}C.

2.2.2. Phân tích bằng chỉ thị RAPD và SSR

Danh sách 25 mồi RAPD và 5 mồi ISSR sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR với thành phần và chu kỳ nhiệt như trình bày ở bảng 3 và bảng 4.

Sản phẩm RAPD - PCR được điện di trên gel agarose 1,0%; sản phẩm ISSR - PCR được điện di trên gel agarose 2,0%. Sau khi điện di, gel agarose được nhuộm Ethilium bromide trong 15 phút rồi chụp ảnh.

Bảng 1. Các mẫu giống cam trong nghiên cứu

STT	Kí hiệu mẫu	Nơi thu thập	STT	Kí hiệu mẫu	Nơi thu thập
1	VT 11	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	21	TK 23	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang
2	VT 12	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	22	TK 31	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang
3	VT 13	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	23	TK 32	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang
4	VT 21	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	24	TK 33	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang
5	VT 22	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	25	VH 11	Hồng Thái - Việt Hồng - Bắc Quang
6	VT23	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	26	VH 12	Hồng Thái - Việt Hồng - Bắc Quang
7	VT 31	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	27	VH 13	Hồng Thái - Việt Hồng - Bắc Quang
8	VT 32	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	28	VH 21	Hồng Thái - Việt Hồng - Bắc Quang
9	VT 33	Việt Tân - Việt Quang - Bắc Quang	29	VH 22	Hồng Thái - Việt Hồng - Bắc Quang
10	NT 11	Ngàn Trung - Tân Thành - Bắc Quang	30	VH 23	Hồng Thái - Việt Hồng - Bắc Quang
11	NT 12	Ngàn Trung - Tân Thành - Bắc Quang	31	VC 11	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
12	NT 13	Ngàn Trung - Tân Thành - Bắc Quang	32	VC 12	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
13	NT 21	Ngàn Trung - Tân Thành - Bắc Quang	33	VC 13	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
14	NT 22	Ngàn Trung - Tân Thành - Bắc Quang	34	VC 21	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
15	NT 23	Ngàn Trung - Tân Thành - Bắc Quang	35	VC 22	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
16	TK 11	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang	36	VC 23	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
17	TK 12	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang	37	VC 31	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
18	TK 13	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang	38	VC 32	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
19	TK 21	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang	39	VC 33	Vĩnh Chính - Vĩnh Hảo - Bắc Quang
20	TK 22	Dàn Hạ - Tiên Kiều - Bắc Quang	40	CV	Vinh - Nghệ An

Bảng 2. Danh sách các mồi được sử dụng trong phương pháp chỉ thị RAPD và SSR

STT	Ký hiệu	Trình tự	Tài liệu tham khảo	STT	Ký hiệu	Trình tự	Tài liệu tham khảo
Mồi RAPD			Valdemar et al. (2004)	16	OPY10	CAAACGTGGG	Valdemar et al. (2004)
1	OPAD06	AAGTGCACGG		17	P36	CCGAATTCGC	
2	OPA10	GTGATCGCAG		18	P37	CTGACCAGCC	
3	OPA18	AGGTGACCGT		19	AK12	AGTGTAGCCC	
4	P44	GGACCCCGCC		20	OPP05	CCCCGGTAAC	
5	OPA12	TCGGCGATAG		21	OPA14	TCTGTGCTGG	
6	OPM12	GGGACGTTGG		22	OPD18	GAGAGCCAAC	
7	OPAX10	CCAGGCTGAC		23	OPX18	GACTAGGTGG	Sunday et al. (2008)
8	OPE15	ACGCACAACC		24	UBC465	GGTCAGGGCT	
9	OPC11	AAAGCTGCGG		25	OPX17	GACACGGACC	
10	OPD13	GGGGTGACGA		Mồi ISSR			Oliveira et al. (2010)
11	OPAW07	AGCCCCCAAG		26	ISSR - T1	$(GT)_6CC$	
12	OPAD14	GAACGAGGTT		27	ISSR - T2	$(CT)_6TG$	
13	OPAE15	TGCCTGGACC		28	ISSR - T3	$(AC)_6CG$	
14	OPAW19	GGACACAGAG		29	ISSR - T4	$(CAC)_5$	
15	OPAW11	CTGCCACGAG		30	ISSR - T5	$(AG)_6T$	

Bảng 3. Thành phần phản ứng RAPD - PCR và ISSR - PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích 1 phản ứng (µl)
H_2O		14,2
Dung dịch đệm	10X	2
dNTPs	2mM	2
Mg^{2+}	25mM	0,2
Mồi	10mM	0,4
Taq polymerase	5 unit/µl	0,2
DNA khuôn		1
Tổng thể tích		20

Bảng 4. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian		Chu kỳ
		RAPD - PCR	ISSR - PCR	
Biến tính	94	5 phút	3 phút	1
Biến tính	94	30 giây	1 phút	40
Gắn mồi	Tm	30 giây	45 giây	
Tổng hợp	72	2 phút	2 phút	
Tổng hợp	72	5 phút	7 phút	1
Bảo quản	4	∞	∞	

2.2.3. Xử lý số liệu

Số liệu phân tích RAPD và ISSR được xử lý bằng phần mềm NTSYS 2.1, các băng vạch sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0. Phần mềm Crosschecker được sử dụng để kiểm tra việc ghi điểm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng di truyền của 40 mẫu cam nghiên cứu

Phân tích mối quan hệ di truyền của 39 mẫu cam sành thu thập tại Hà Giang và 1 mẫu cam Vinh bằng 25 chỉ thị RAPD cho thấy tất cả các mồi đều cho đa hình. Tổng số 1.720 băng được ghi nhận, trung bình 1,72 băng tính trên mỗi mẫu cam sành nghiên cứu (Bảng 5). Số băng đa hình trên từng giống có sự biến động lớn, nhóm các chỉ thị OPAW19; P37; OPAE15; UBC465 cho số băng đa hình trung bình cao, tương ứng đạt 4,48; 3,63; 4,23; 3,13 băng. Trong khi đó, 10 chỉ thị RAPD gồm OPA10, OPA18, OPA12, OPAX10, OPY10, P36, AK12, OPPO5, OPD18, OPA14 cho số băng trung bình tính trên mỗi mẫu đạt dao động 0,15 – 0,93 băng/mẫu (Bảng 5).

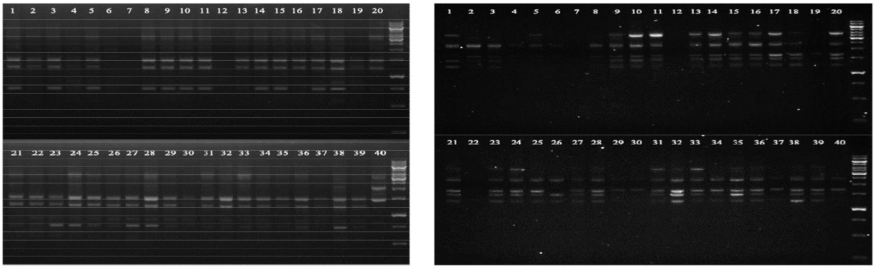
Dựa trên kết quả thu được có thể thấy việc sử dụng chỉ thị RAPD để phân tích mối quan hệ di truyền trong quần thể các mẫu cam nghiên cứu đã chỉ ra sự đa dạng di truyền của các mẫu giống cam sành thu thập. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác, nghiên cứu tiếp tục sử dụng chỉ thị ISSR để phân tích sự đa dạng di truyền của các mẫu cam sành này.

Kết quả sử dụng 5 chỉ thị ISSR để đánh giá đa dạng di truyền của 40 mẫu cam thu thập đã chỉ ra rằng tất cả các chỉ thị ISSR cũng đều thể hiện sự đa hình, trong tổng số 437 băng ADN được tạo ra, trung bình 2,17 băng/mẫu, chỉ có 1 băng đơn hình duy nhất. Nhóm các chỉ thị ISSR T1, T3, T5 cho số băng ADN trung bình tính trên các mẫu giống cam đạt cao nhất, tương ứng 3,25; 3,13; 3,45 băng/mẫu. Hai chỉ thị ISSR còn lại là T2 và T4 cho số băng ADN trung bình thấp nhất tương ứng là 0,78 và 0,33 băng/mẫu (Bảng 5).

Như vậy có thể thấy, sự đa hình của các mẫu cam nghiên cứu thể hiện qua số vạch băng thu nhận sau khi phân tích RAPD và ISSR khá cao. Sự đa hình càng cao thì sự khác biệt về mặt di truyền càng lớn, điều này chứng tỏ mặc dù các mẫu cam cùng được thu thập tại một địa bàn nhưng có thể do ảnh hưởng của điều kiện sinh thái từng vùng hoặc thông qua quá trình chọn lọc tự nhiên đã dẫn đến sự khác biệt về mặt di truyền.

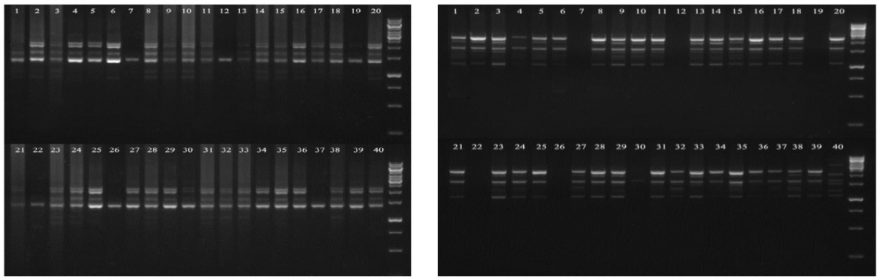
Bảng 5. Kết quả sử dụng mồi trong phương pháp chỉ thị RAPD và ISSR

STT	Tên mồi	Loại chỉ thị	Tổng số băng ADN	Số băng TB/mẫu
1	OPAD06	RAPD	43	1,08
2	OPA10		34	0,85
3	OPA18		34	0,85
4	P44		54	1,35
5	OPA12		15	0,40
6	UBC465		125	3,13
7	OPAX10		32	0,80
8	OPE15		107	2,70
9	OPC11		60	1,50
10	OPD13		115	2,90
11	OPAW07		62	1,55
12	OPAD14		58	1,45
13	OPX17		82	2,05
14	OPAW19		179	4,48
15	OPAW11		44	1,10
16	OPY10		26	0,65
17	P36		16	0,40
18	P37		145	3,63
19	AK12		6	0,15
20	OPP05		35	0,88
21	OPX18		108	2,70
22	OPD18		31	0,78
23	OPA14		37	0,93
24	OPM12		103	2,56
25	OPAE15		169	4,23
Tổng	*25*		*1720*	*1,72*
26	T1	ISSR	130	3,25
27	T2		31	0,78
28	T3		125	3,13
29	T4		13	0,33
30	T5		138	3,45
Tổng	*5*		*437*	*2,19*
Tổng	*RAPD +ISSR*		*2157*	*1,80*



OPM12 OPX18

Hình 1. Sản phẩm RAPD - PCR với mồi OPM12 và OPX18



T1 T3

Hình 2. Sản phẩm ISSR - PCR với mồi T1 và T3

Chú thích: mẫu: 1 - VT11; 2 - VT12; 3 - VT13; 4 - VT21; 5 - VT22; 6 - VT23; 7 - VT31; 8 - VT32; 9 - VT33; 10 - NT11; 11 - NT12; 12 - NT13; 13 - NT21; 14 - NT22; 15 - NT23; 16 - TK11; 17 - TK12; 18 - TK13; 19 - TK21; 20 - TK22; 21 - TK23; 22 - TK31; 23 - TK32; 24 - TK33; 25 - VH11; 26 - VH12; 27 - VH13; 28 - VH21; 29 - VH22; 30 - VH23; 31 - VC11; 32 - VC12; 33 - VC13; 34 - VC21; 35 - VC22; 36 - VC23; 37 - VC31; 38 - VC32; 39 - VC33; 40 – CV.

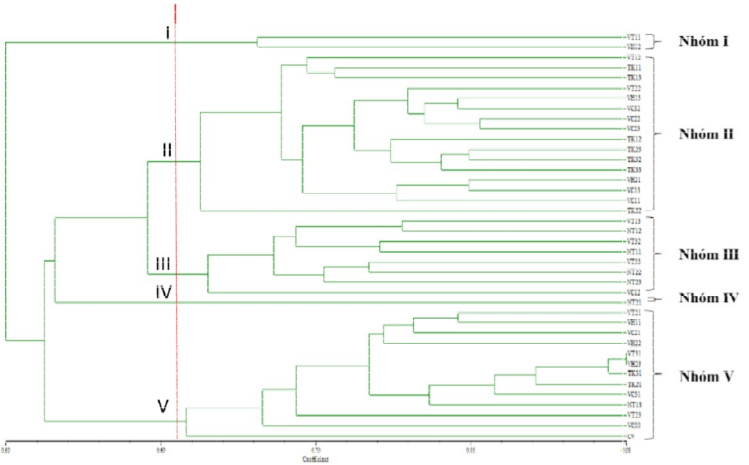
3.2. Biến động di truyền của 40 mẫu cam nghiên cứu

Sự biến động di truyền của 40 mẫu cam được dựa vào kết quả của phản ứng RAPD - PCR và ISSR - PCR, chỉ số tương đồng giản đơn SM (simple matching coefficient) bằng phân tích nhóm theo phương pháp UPGMA. Kết quả thu được trên sơ đồ cây phân nhóm cho thấy hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu cam nghiên cứu dao động từ 0,62 - 0,98, điều này chứng tỏ các mẫu cam có sự đa dạng cao về mặt di truyền. Hai mẫu cam thu thập tại thôn Việt Tân, xã Việt Quang, huyện Bắc Quang (VT31) và thôn Hồng Thái, xã Việt Hồng, huyện Bắc Quang (VH23) có mức độ tương đồng cao nhất (98%). Đây cũng là hai mẫu cam sành có sự khác biệt di truyền lớn nhất với mẫu cam Vinh (Hình 3).

Nếu xét ở mức độ tương đồng 0,70; 40 mẫu cam nghiên cứu được chia thành 5 nhóm chính như sau:

- Nhóm I gồm 2 mẫu cam sành VT11 và VH12 với hệ số tương đồng khoảng 0,75.

- Nhóm II là nhóm lớn nhất gồm 16 mẫu cam sành với hệ số tương đồng dao động từ 0,71 - 0,89 gồm mẫu VT12, TK11, TK13, VT22, VH13, VC22, VC23, TK12, TK23, TK32, TK33, VH21, VC13, VC32, VC11 và TK22. Trong đó,



Hình 3. Sơ đồ hình cây biểu hiện mối tương quan về di truyền của 39 mẫu cam sành Hà Giang và 1 mẫu cam Vinh

mẫu VC22 và VC23 có quan hệ chặt về mặt di truyền (hệ số tương đồng đạt 0,89).

- Nhóm III gồm 8 mẫu cam sành Hà Giang VT13, NT12, VT32, NT11, VT33, NT22, NT23 và VC12 có hệ số tương đồng dao động từ 0,72 - 0,85.

- Nhóm IV gồm mẫu cam Hà Giang NT21.

- Nhóm V có mức độ tương đồng từ 0,71 - 0,98 gồm các mẫu VT21, VH11, VC21, VH22, VT31, VH23, TK31, TK21, VC31, NT13, VT23, VC33 và CV. Trong nhóm này, mẫu cam VT31 có quan hệ rất chặt về mặt di truyền với mẫu cam VH23, đạt 98%.

Thông qua chỉ thị RAPD và ISSR, nghiên cứu đã đánh giá được sự đa dạng di truyền giữa các mẫu giống cam nghiên cứu. Kỹ thuật RAPD cũng đã được rất nhiều tác giả sử dụng để phân tích đa dạng di truyền của các giống cam, quýt. Dựa vào kết quả phân tích bằng chỉ thị RAPD, Coletta - Filho et al. (2000) kết luận sự thay đổi di truyền của các cá thể quýt Ponkan (*Citrus reticulate* Blanco) là rất thấp. Nguyễn Hữu Hiệp và cs.. (2004) đã sử dụng 4 mồi RAPD là A02, A04, A11 và A13 để phân tích đa dạng di truyền nhóm cây cam quýt ở Gò Quao - Kiên Giang. Kết quả cho thấy qua sơ đồ phả hệ, nhóm cam quýt ở đây được chia thành 4 nhóm gồm bưởi, cam - quýt, chanh và hạnh. Nhan et al. (2003) sử dụng 15 mồi RADP để phân tích đa dạng di truyền của 37 giống/loài cam quýt (các giống trồng truyền thống và các giống lai thu thập trong tự nhiên) ở Việt Nam. Mặc dù kết quả RAPD không phân biệt được các giống thuộc loài *Citrus sinensis* (cam Valencia, cam Mật, cam Soàn và cam xã Đoài) và không phân biệt được các cá thể cam sành (*Citrus nobilis*) được thu thập ở những vùng trồng khác nhau nhưng lại có thể phân biệt được tất cả các giống lai, các giống quýt trồng ở Việt Nam và các cá thể quýt đường "Zygotic". Rima et al. (2011) đa sử dụng 11 mồi SSR và 10 mồi RADP để phân tích đa dạng di truyền của 4 nhóm chính (bao gồm 93 mẫu giống thu thập từ 31 vùng) trong chi *Citrus* bao gồm chanh, quýt, bưởi và cam. Kết quả phân tích cho thấy, nhóm quýt có mức độ đa dạng di truyền cao nhất (hệ số tương đồng 0,513), trong khi nhóm bưởi có mức đa dạng di truyền thấp nhất. Nguyễn Bá Phú và cs. (2011) sử dụng chỉ thị RAPD với 7 mồi (A13, OPH13, SO15, SN20, A02, OPH18 và SN06) để phân tích mối quan hệ di truyền giữa hai cây quýt đường không hạt với nhau và với quýt đường có hạt. Kết quả cho thấy, mồi SO15 và A13

có thể phân biệt được hai cây quýt đường không hạt với cây quýt đường có hạt; mồi SN06 và SN20 có thể phân biệt được hai cây quýt đường không hạt với nhau; hai cây quýt đường có mối quan hệ rất gần với hệ số tương đồng là 0,92; đồng thời hai cây này cũng có quan hệ gần với quýt đường có hạt với hệ số tương đồng là 0,87.

Như vậy có thể thấy, các loài cam quýt từ các vùng sinh thái khác nhau rất đa dạng. Trong nghiên cứu này, sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu cam trong nhóm V cao hơn so với các mẫu trong nhóm I, II và III. Nhóm IV gồm 1 mẫu cam sành duy nhất là NT21. Điều này có thể giải thích là do mẫu cam sành NT21 được lấy từ một vùng địa lý khác và được đưa về trồng tại Hà Giang hoặc do quá trình chọn lọc tự nhiên đã tạo ra sự khác biệt lớn này. Tuy nhiên, những nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành để tìm được câu trả lời chính xác nhất. Nhóm V gồm 13 mẫu cam trong đó có cả mẫu cam Vinh. Điều này có thể do cam Vinh và các loại càm sành Hà Giang có cùng một nguồn gốc tổ tiên với nhau và được lai tạo tạo ra các dòng cam sành khác nhau. Những kết quả thu được về tương quan di truyền của các mẫu cam sẽ là cơ sở dữ liệu quan trọng cung cấp cho các nhà chọn tạo giống tham khảo trước khi quyết định sử dụng vào các mục tiêu nghiên cứu khác nhau như thu thập, phân loại, bảo tồn nguồn gen và sử dụng cho các chương trình chọn tạo giống.

4. KẾT LUẬN

- 25 mồi RAPD và 5 mồi ISSR sử dụng nghiên cứu đa dạng di truyền 40 mẫu cam đều cho đa hình với số băng đa hình trung bình tương ứng 1,72 và 2,17 băng/mẫu.

- Thông qua các phân tích chỉ thị RAPD và ISSR cho thấy các mẫu cam có sự đa dạng về mặt di truyền cao với hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,62 - 0,98. Trong đó, hai mẫu cam VT31 và VH23 có mức độ tương đồng cao nhất 98%. Mẫu cam Vinh và hai mẫu cam sành VT31 và VH23 có sự khác biệt di truyền lớn nhất.

- Ở mức độ tương đồng 70%, 40 mẫu cam nghiên cứu được chia thành 5 nhóm chính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Capparelli R., Viscardi M., Amoroso M.G., Blaiotta G. (2004). Inter-simple sequence repeat markers and flow cytometry for the characterization of closely related Citrus limon germplasms. Biotechnology Letters, 26: 1295-1299.

Coletta-Filho H.D., Machado M.A., Targon M.L.P.N., Pompeu J. (2000). The use of random amplified polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) accessions. Genetic and Molecular Biology, 23(1): 169-172.

Dehesdtani A., Kazemitabar S.K., Rahimian H. (2007). Assessment of genetic diversity of navel sweet orange cultivars grown in Mazandaran province using RAPD markers. Asian Journal of Plant Sciences, 6(7): 1119-1124.

Đỗ Đình Ca (1992). Khả năng và triển vọng phát triển cây quýt và một số cây ăn quả có múi khác vùng Bắc Quang - Hà Giang. Luận án tiến sĩ, tr. 36 - 37.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13 - 15.

Frederick G., Hu X. (1990). The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (*Rutaceae*). Economic Botany, 44(2): 267 - 277.

Hoàng Ngọc Thuận (1993). Kết quả điều tra một số giống quýt tỉnh Lạng sơn. Kết quả nghiên cứu khoa học của khoa Trồng trọt. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Khuất Hữu Trung, Hà Trọng Huy, Nguyễn Trường Khoa, Ngô Hồng Bình, Nguyễn Thanh Bình, Đặng Trọng Lương, Lê Huy Hàm (2009). Nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống bưởi bản địa Việt Nam (*Citrus grandis*) bằng chỉ thị Microsatellite. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 7(4): 485 - 492.

Nguyễn Bá Phú, Nguyễn Bảo Vệ, Bùi Thị Cẩm Hường, Trần Nhân Dũng (2011). Nhận diện và xác định mối quan hệ di truyền của hai cá thể quýt đường không hột được phát hiện ở Đồng bằng sông Cửu Long bằng dấu phân tử DNA. Tạp chí Khoa học, 20a: 108-118.

Nguyễn Hữu Hiệp, Trần Nhân Dũng, Đặng Thanh Sơn, Nguyễn Văn Được (2004). Đa dạng sinh học của nhóm cây có múi ở huyện Gò Quao, tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học, 1: 111-121.

Nguyễn Thanh Nhàn, Nguyễn Minh Châu, Tokurou Shimizu, Mitsuo Omura (2004). Ứng dụng RAPD marker phân biệt giống và phân tích nhóm các giống/loài thuộc chi Citrus ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ Rau Quả 2002-2003. Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr. 48 - 56.

Nhan N.T, Shimizu T., Hirohisa N., Omura M., Chau N.M. (2003). RADP markers: application to varietal identification and analysis of genetic ralationships among Citrus varieties/species in Viet Nam. Jircas Newsletter, p. 155 - 160.

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

Rainer W.S. (1975). On the history and origin of Citrus. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 102(6): 369-375.

Rima el-mouei, Wafaa C., Fayssal D. (2011). Molecular characterization and genetic diversity in genus *Citrus* from Syria. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 13: 351 - 356.

Sunday E. A., Ariyo O. J., Robert L. (2008). Genetic relationships among West African okra (*Abelmoschus caillei*) and Asian genotypes (*Abelmoschus esculentus*) using RAPD. African Journal of Biotechnology, 7(10): 1426-1431.

Trần Thế Tục, 1990. Tài nguyên cây ăn quả Việt Nam, trong "Tuyển chọn một số công trình NCKH Nông nghiệp (1986-1991)". Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Trần Thị Oanh Yến, Nguyễn Ngọc Thi, Luro Francois (2004). Phân biệt tính đa dạng di truyền nguồn gen cây ăn quả có múi ở Việt Nam bằng microsatellite marker. Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ Rau Quả 2002-2003. Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr. 57 - 66.

Valdemar P.C., Claudete F.R., Josué M.F., Rosângela M.P.M., Paulo M.R. (2004). Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD. Genetics and Molecular Biology, 27(2): 228 - 236.

Yong L., De-Chun L., Bo W., Zhong-Hai S. (2006). Genetic diversity of pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its relatives based on simple sequence repeat markers. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 3: 119 - 126.