

Study on genetic diversity of *Dyosma* by RAPD markers

Luu Thuy Hoa, Khuat Huu Trung, Tran Dang Khanh, Pham Thi Ly Thu, Tran Van On

Abstract

Dyosma (Woodson) is a genus, belonging to Berberidaceae family. This plant contains high berberine constituent and widely used as the medicinal treatments in many countries. Ten samples of *Dyosma* Woodson collected from some different geographical areas in northern Vietnam, were evaluated for their genetic diversity by applying 25 different RAPD markers, of which 17 markers showed polymorphism. Total 170 PCR reactions obtained a total of 816 DNA bands that belonged to 111 different patterns (average 6.5 patterns/primer). Of which, 62 bands were polymorphic bands (55.86%) and 49 monomorphic bands (44.14%). The obtained bands sized from 250 bp to 2000 bp. PIC value of 17 primers changed from 0.5 to 0.88 with a mean of 0.78 which showed amplified DNA bands are very diversified. The analyzed result showed that samples of *Dyosma* in our research were very diverse. Genetic similarity coefficients of 10 samples of *Dyosma* ranged from 0.57 to 0.91. At genetic similarity coefficient of 0.67, total 10 studied samples was divided into 2 different genetic groups. The results showed that 9 out of 17 used RAPD primers defined exactly 5 studied samples (PO1, PO9, PO10 and PO11). This results may be useful for the classification and identification of the genus indigenous nomadic dysentery (*Dyosma*) for conservation and control of high quality seedlings.

Keywords: *Diphtheria*, *Dyosma*, RAPD, genetic diversity

Ngày nhận bài: 18/9/2018
Ngày phản biện: 25/9/2018

Người phản biện: PGS. TS. Đông Huy Giới
Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA ĐOẠN GEN *rbcL* Ở MỘT SỐ NGUỒN GEN BƯỞI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Ngọc Lan¹, Nguyễn Thị Lan Hoa²,
Nguyễn Thị Thanh Thủy³, Lê Tuấn Nghĩa²

TÓM TẮT

Bưởi là một trong những cây ăn quả nhiệt đới quan trọng có giá trị kinh tế ở nhiều nước trên thế giới. Nghiên cứu đa dạng di truyền đoạn gen *rbcL* của tập đoàn 25 nguồn gen bưởi Việt Nam đã xác định được 2 trình tự nucleotit đặc trưng cho giống bưởi Thanh Trà (G2) và bưởi Da Xanh (G27). Đột biến điểm được tìm thấy là đột biến đồng hoán (C>T) tại vị trí 595 của gen ở cả 2 giống bưởi Thanh Trà (G2) và Da Xanh (G27), đột biến này có ý nghĩa trong nhận dạng các nguồn gen bưởi Thanh Trà và bưởi Da Xanh của nước ta. Hai trình tự này đã được đăng ký NCBI với số đăng ký lần lượt là KR073282 và KR073281. Phân tích cây phả hệ bằng phương pháp Neighbor Joining dựa trên trình tự của đoạn gen *rbcL* 600 nucleotid đã nhóm thành công được các trình tự của chi *Citrus* thuộc họ Rutaceae, tách biệt rõ ràng được hai giống bưởi Thanh Trà và Da Xanh của Việt Nam.

Từ khóa: Bưởi, giải trình tự, ADN mã vạch, *rbcL*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bưởi là một trong những loại cây ăn quả nhiệt đới quan trọng và có giá trị kinh tế ở nhiều nước trên thế giới. Bưởi được trồng rộng rãi ở Việt Nam, tuy nhiên mỗi vùng có một số giống bưởi khác nhau do kết quả của quá trình chọn lọc cũng như ảnh hưởng của điều kiện của khí hậu và thổ nhưỡng. Ở nước ta, từ lâu đã hình thành những vùng trồng bưởi với những giống bưởi nổi tiếng như Đoan Hùng (Phú Thọ), bưởi Đường (Hương Sơn), bưởi Phúc Trạch (Hương Khê), bưởi Thanh Trà (Huế)... Các giống bưởi này về mặt hình thái khác nhau không đáng kể

từ lá, hoa cho đến hình dạng trái. Đây chính là một trở ngại trong công tác phân loại, quản lý và chọn tạo nguồn gen.

Ngày nay, với sự phát triển của sinh học phân tử và phương pháp phân tích hệ gen sinh vật đã mở ra hướng tiếp cận mới có vai trò đầy hứa hẹn cải thiện hiệu quả được cách nhận dạng giống cây trồng. Những tiến bộ trong kỹ thuật giải trình tự ADN bằng các đoạn gen ngắn đặc biệt là đoạn gen *rbcL* trong hệ gen lục lạp. Đây là một trong những đoạn gen phổ biến để phân loại cây trồng (Kellogg E. and Juliano ND., 1997). Mặc dù, gen *rbcL* không

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Trung tâm Tài nguyên thực vật; ³ Bộ Nông nghiệp và PTNT

được tính là chỉ thị để phân biệt mức độ loài và dưới loài nhưng các nhà nghiên cứu vẫn sử dụng *rbcL* như là một mã vạch để nhận dạng cây trồng. Ưu điểm của đoạn gen này là dễ dàng khuếch đại và giải trình tự được hầu hết các loại cây trồng. *RbcL* được coi là một trong những đoạn gen chuẩn để xây dựng phát sinh loài (W. John Kress and David L. Erickson, 2007). Trong phân loại, *rbcL* là đoạn gen ưa thích để xây dựng cây phả hệ và là đoạn gen được sử dụng nhiều nhất của hệ gen lục lạp để giải trình tự (Suyama *et al.*, 2000; Tshering Penjor *et al.*, 2010).

Chính vì vậy, việc lựa chọn đoạn gen *rbcL* để tiến hành khuếch đại và xác định trình tự nucleotit là cần thiết, từ đó làm cơ sở cho việc nhận dạng các giống bưởi, góp phần nâng cao hiệu quả quản lý, bảo tồn và chọn tạo các nguồn gen quý.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- 25 giống bưởi được lưu giữ tại các vườn bảo tồn của các đơn vị như Trung tâm Tài nguyên thực vật, Trung tâm ăn quả Phủ Quý, Viện Nghiên cứu Rau quả, Viện Cây ăn quả miền Nam.

Bảng 1. Danh sách 12 giống chuối sử dụng trong nghiên cứu

ID ¹	ID ²	Tên giống	ID ¹	ID ²	Tên giống
GBVNML 1.177	G1	Phúc Trạch	GBVNML 18.57	G16	Bưởi lông cổ cò
GBVNML1.180	G2	Thanh Trà	GBVNML 18.8	G18	Bưởi đường Hooc Môn
GBVNML 1.185	G3	Phú Diễn	GBVNML 18.46	G19	Bưởi hồng đường
GBVNML11.36	G4	Bưởi đỏ	TEMPDA9002	G20	Bưởi Bằng Luân
TEMPDA9000	G6	Bưởi đường An Phú Đông	TEMPDA9003	G21	Bưởi đắng
TEMPDA5173	G7	Bưởi đường Hiệp Thuận	GBVNML 18.50	G22	Bưởi xiêm ta
TEMPDA5146	G8	Bưởi Quế Dương	GBVNML18.7	G24	Bưởi đường bánh xe
GBVNML18.49	G10	Bưởi ổi	GBVNML 18.29	G25	Bưởi mật ong
GBVNML 18.6	G12	Bưởi đường lá cam	GBVNML 18.41	G26	Bưởi Năm Roi
TEMPDA9001	G13	Bưởi Trụ	GBVNML18.2	G27	Bưởi da xanh
TEMPDA0283	G14	Bưởi Luận văn	GBVNML 18.51	G28	Bưởi thanh da láng
TEMPDA1975	G15	Bưởi Đoan Hùng	GBVNML 18.12	G29	Bưởi xiêm vang
			GBVNML 18.4	G30	Bưởi đường da láng

Ghi chú: ID¹: Số đăng ký cơ quan mạng lưới, ngân hàng gen cây trồng Quốc gia (GBVNML); ID²: Ký hiệu giống.

- Bộ mỗi khuếch đại các vùng gen *rbcL*:

Bảng 2. Danh sách mỗi khuếch đại vùng gen *rbcL*

Gen	Mỗi	Trình tự 5'-3'	Tham khảo
<i>rbcL</i>	rbcLa-F	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	W. John Kress and David L. Erickson, 2007
	rbcLa-724R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp dùng công nghệ màng lọc silica và băng cột lọc của QUIAGEN Dnaeasy Plan Kit.

Phản ứng PCR khuếch đại gen và *rbcL* được thực hiện với thành phần: Taq KodFx (1 đơn vị), hỗn hợp dNTPs (200 mM), mỗi xuôi - ngược (0,5 μl mỗi mỗi), DMSO (3%) và ADN tổng số (25 ng) trong đệm HF/GC 1x; thể tích phản ứng PCR là 25 μl; ở điều kiện nhiệt: biến tính ở 98°C trong 30 giây, 1 chu trình; 98°C trong 10 giây, 55 - 60°C trong 30 giây,

72°C trong 1 phút, 30 chu trình; 72°C trong 10 phút, 1 chu trình, bảo quản tại 16°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TBE, nhuộm bằng EtBr. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng máy đo quang phổ nanodrop 2000. Những mẫu có nồng độ sản phẩm khoảng 100 ng/μl được dùng để giải trình tự.

Chu trình và phản ứng cho giải trình tự: Mẫu được khuếch đại với từng mỗi, mỗi mẫu lặp lại 5 lần với thành phần như sau: 100 ng sản phẩm PCR tinh sạch; 3,2 pmol mỗi xuôi hoặc ngược và 8 μl hỗn hợp

BigDye Terminator Ready Reaction; tổng thể tích 20 µl; ở điều kiện 96°C trong 1 phút, 1 chu trình; 96°C trong 10 giây, 50°C trong 5 giây, 60°C trong 1 phút, 25 chu trình; bảo quản tại 4°C. Sản phẩm được đưa vào hệ thống giải trình tự bằng máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

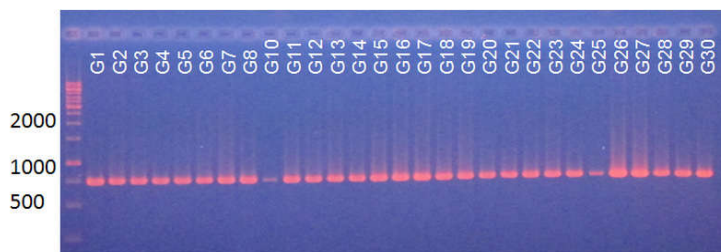
Trình tự của các mẫu thu được có QV>20 sẽ được xử lý, hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit 4.9, sắp xếp thẳng hàng trình tự bằng công cụ ClustalW và so sánh trên ngân hàng gen bằng công cụ NCBI/BLAST được tích hợp trong phần mềm phân tích Geneious 7.11.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành năm từ 2014 đến năm 2016 tại Trung tâm Tài nguyên Thực vật (An Khánh - Hoài Đức - Hà Nội).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết mẫu lá của giống bưởi cho thấy ADN có sự đồng đều về kích thước và không còn lẫn tạp ARN, đủ tiêu chuẩn để thực hiện các bước khuếch đại để giải trình tự tiếp theo.



Hình 1. Khuếch đại vùng gen *rbcL* bằng cặp mồi *rbclA-F/724R*

Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcL* từ 25 giống bưởi được so sánh với trình tự của toàn bộ hệ gen lục lạp (BLAST với dữ liệu trình tự NCBI). Kết quả BLAST hit cho thấy trình tự 600bp nucleotide của các giống bưởi nằm trong vùng cấu trúc gen của gen *rbcL*. Vì vậy, các trình tự này đã được phân tích để tìm khung đọc ORF để dịch mã cho các axit amin tương ứng.

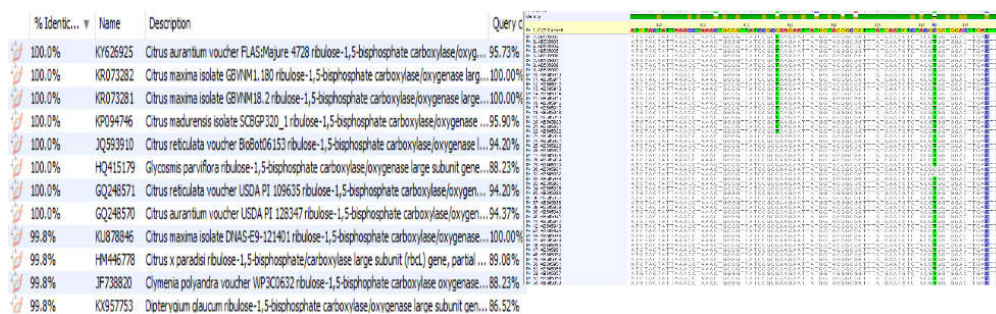
Kết quả phân tích so sánh các trình tự đoạn gen *rbcL* thu được từ 25 giống bưởi thu được các trình tự của đoạn gen *rbcL* gần như hoàn toàn tương đồng. Tuy nhiên, có sự khác biệt của 2 giống bưởi Thanh Trà (G2) và bưởi Da Xanh (G27) với cả tập đoàn bưởi nghiên cứu tại vị trí 583 (T>C) và 595 C>T (vị trí của gen *rbcL*, tham chiếu từ trình tự có số đăng ký NCBI NC_034290, gene ID: 32229015).



Hình 2. So sánh trình tự gen *rbcL* của các giống bưởi nghiên cứu

Tiến hành BLAST các trình tự này với ngân hàng dữ liệu trình tự của NCBI và CBOLD, kết quả thu được như sau:

- Mức độ tương đồng của trình tự đoạn gen *rbcL* giữa các loài bưởi trong chi *Citrus* biến thiên từ 98,9% lên đến 100%.

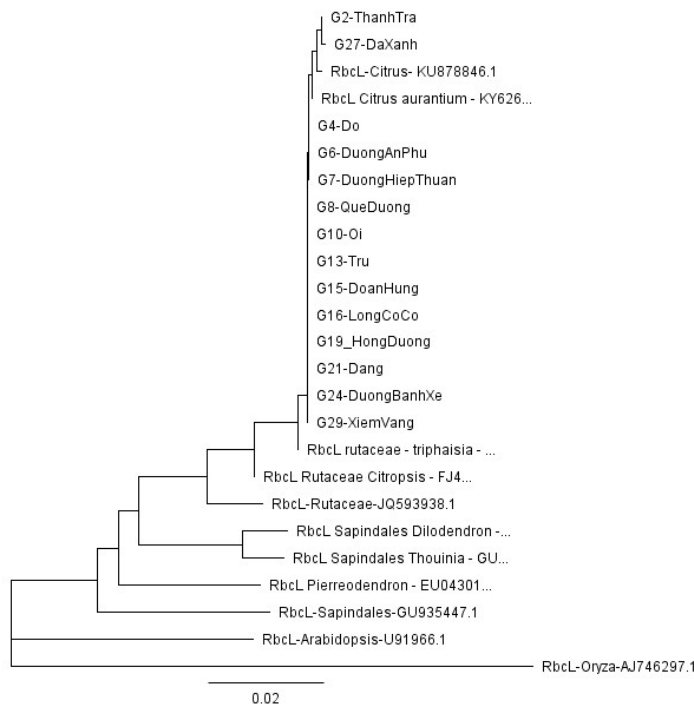


Hình 3. Kết quả BLAST của mẫu bưởi ở vùng gen *rbcL*

- Tuy có trình tự tương đồng 100% nhưng độ bao phủ không đạt 100% nên đột biến đồng hoán (C>T) tại vị trí 595 của đoạn trình tự ở cả 2 giống bưởi Thanh Trà và Da Xanh khác biệt hoàn toàn với toàn bộ các đoạn trình tự trên ngân hàng gen. Hai trình tự đặc biệt này đã được đăng ký NCBI với số đăng ký lần lượt là KR073282 và KR073281.

Các trình tự của đoạn gen *rbcl* gồm 600 nucleotid và một số trình tự tham chiếu từ NCBI

tương ứng đại diện cho *Citrus* được sử dụng để phân tích tương quan di truyền giữa các nguồn gen trong tập đoàn nghiên cứu, bằng phương pháp lập sơ đồ hình cây NJ (Saitou N & Nei M., 1987), với outgroup là trình tự của loài *Oryza sativa* - đại diện nhóm cây 1 lá mầm. Các trình tự tham chiếu được chọn với tiêu chí là các trình tự có tương đồng từ gần nhất đến xa nhất trong danh sách BLAST-hit bao gồm các trình tự *Citrus aurantium*, *Citrus maxima*, *Pierreodendron africanum*.



Hình 4. Cây phân loại dựa trên đoạn gen *rbcl* của các giống bưởi nghiên cứu

Kết quả cho thấy cây phả hệ đã nhóm được các trình tự thuộc Bộ Sapindales. Trong Bộ Sapindales, các trình tự thuộc chi *Citrus* được nhóm thành 1 nhóm lớn, tách biệt với trình tự thuộc chi *Citropsis*, *Triphasia*. Kết quả phân nhóm dựa vào đoạn 600 nucleotid này phù hợp với phân loại từ Bộ, Họ, Chi theo khóa phân loại thông thường tham khảo từ NCBI. Kết quả này cho thấy đoạn gen *rbcl* có ý nghĩa trong phân loại đến mức nhận dạng Chi.

Các trình tự bưởi nghiên cứu đều nằm trong nhóm chi *Citrus*. Hai trình tự bưởi Thanh Trà (G2) và Da Xanh (G27) đứng tách biệt với các trình tự của bưởi Việt Nam và các nguồn gen đại diện khác (Hình 4).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đa dạng trình tự đoạn gen

rbcl gồm 600 nucleotid của tập đoàn 25 nguồn gen bưởi nghiên cứu đã xác định được đột biến đồng hoán (C>T) tại vị trí 595 của đoạn trình tự ở cả 2 giống bưởi Thanh Trà (G2) và Da Xanh (G27). Các đột biến này khác biệt với toàn bộ các đoạn trình tự trên ngân hàng gen và được đăng ký trên NCBI với số đăng ký lần lượt là KR073282 và KR073281.

Phân tích cây phả hệ cho thấy, trình tự của đoạn gen *rbcl* đã nhóm được các trình tự chi *Citrus* trong cùng họ Rutaceae. Thông tin cả đoạn với 600 nucleotit đã không phân biệt chính xác các loài bưởi nghiên cứu và tham chiếu. Tuy nhiên đoạn gen *rbcl* đã tách biệt được giống bưởi Thanh Trà và Da Xanh của Việt Nam.

4.2. Đề nghị

Kết quả giải trình tự các giống chuối này có thể được sử dụng trong nhận dạng nguồn gen và các chương trình chọn tạo giống bưởi trong tương lai.

Công trình là kết quả của đề tài “Xây dựng mã vạch ADN (DNA barcode) cho các giống cây trồng đặc hữu có giá trị kinh tế của Việt Nam” thuộc chương trình Công nghệ Sinh học Nông nghiệp và Thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Kellogg E., Juliano ND, 1997. The structure and function of RuBisCo and their implications for systematic studies. *Am J Bot*, 84: 413-428.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, volume 4, issue 4, 406-425.

Suyama Y., Yoshimaru H., Tsmura Y, 2000. Molecular phylogenetic position of Japanese *Abies* (Pinaceae) based on chloroplast sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 16(2):271-277, doi: 10.1006/mpev.2000.0795.

Tshering Penjor, Toyoaki Anai, Yukio Nagano, Ryoji Matsumoto, Masashi Yamamoto, 2010. Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on *rbcL* gene sequences. *Tree Genetics & Genomes* (2010) 6: 931-939, doi: 10.1007/s11295-010-0302-1.

John Kress W. and David L. Erickson, 2007. A two - locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*, 2(6): e508, doi: 10.1371/journal.pone.0000508.

Genetic diversity of *rbcL* gene in Vietnam's grapefruit germplasms

Nguyen Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Lan Hoa, Nguyen Thi Thanh Thuy, La Tuan Nghia

Abstract

Grapefruit is one of the most important tropical fruit trees and has high economic value in many countries. Research on genetic diversity in *rbcL* gene of 25 Vietnam's grapefruit germplasms has identified two specific nucleotide sequences of Thanh Tra (G2) and Da Xanh (G27). This mutation was transition mutation (C>T) at 595 downstream position of sequence in both Thanh Tra and Da Xanh and it can be used for distinguishing Thanh Tra and Da Xanh varieties from others. These two sequences have been registered with NCBI codes as KR073282 and KR073281, respectively. The phylogenetic tree analysis by Neighbour Joining method based on 600 nucleotides of *rbcL* gene exactly grouped all surveying sequences. In addition, this analysis has clearly separated the *Citrus* in Rutaceae and discriminated two grapefruits of Vietnam (Thanh Tra and Da Xanh).

Keywords: Grapefruit, sequencing, DNA barcode, *rbcL*

Ngày nhận bài: 16/9/2018

Ngày phản biện: 21/9/2018

Người phản biện: TS. Trần Danh Sứ

Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

ĐÁNH GIÁ TÍNH CHỊU MẶN CỦA QUẦN THỂ LAI HỒI GIAO OMCS2000*4/POKKALI Ở THỂ HỆ BC_3F_2

Biện Anh Khoa¹, Bùi Phước Tâm²,
Nguyễn Thị Hồng Loan¹, Nguyễn Thị Lang¹

TÓM TẮT

Cây lúa mẫn cảm với điều kiện mặn và cho phản ứng khác nhau tùy thuộc vào loại môi trường cũng như bản chất di truyền của từng cá thể. Phân tích tính chịu mặn ở cây lúa đòi hỏi phải kết hợp giữa đánh giá kiểu hình và kiểu gen. Chín mươi chín (99) dòng BC_3F_2 của quần thể lai hồi giao OMCS2000*4/ Pokkali được thanh lọc khả năng chịu mặn với ba nồng độ muối khác nhau (EC = 0, 6 và 12 dS/m) ở giai đoạn mạ sau hai và bốn tuần thanh lọc. Kết quả ghi nhận 21/99 dòng biểu hiện tính chịu khá tốt ở cả 6 và 12 dS/m. Các dòng này tiếp tục được kiểm tra kiểu gen liên quan tính chịu mặn (*Saltol*) trên NST1 với hai chỉ thị phân tử RM3412b và RM8094. Kết quả cho thấy 100% dòng chịu mặn (21 dòng) đều có alen mặn trên NST1. Qua đánh giá kiểu hình và kiểu gen, các dòng lúa xác định có tiềm năng chịu mặn tốt là BC_3F_2 -65, BC_3F_2 -66, BC_3F_2 -70, BC_3F_2 -71, BC_3F_2 -76, BC_3F_2 -77, BC_3F_2 -81 và BC_3F_2 -83.

Từ khóa: Mặn, chịu mặn, quần thể lai hồi giao, thanh lọc, giai đoạn mạ

¹ Viện Nghiên cứu Nông nghiệp công nghệ cao Đồng bằng sông Cửu Long

² Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long