



ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA TẬP ĐOÀN GIỐNG MƯỚP HƯƠNG (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) BẰNG CHỈ THỊ RAPD

Trương Thị Hồng Hải^{1*}, Trần Bảo Ngà²

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Ủy ban nhân dân xã Hoà Nhon, huyện Hoà Vang, Đà Nẵng, Việt Nam

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, 11 chỉ thị RAPD biểu hiện đa hình được chọn từ 100 chỉ thị và được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền của 48 giống mướp hương *Luffa cylindrica*, trong đó có 47 giống được thu thập từ trung tâm Tài nguyên Thực vật – Viện Khoa học Việt Nam và 1 giống mướp hương địa phương được thu thập tại Gia Lâm – Hà Nội. Dựa vào mức độ tương đồng về hệ số di truyền, 48 giống mướp hương được chia thành 7 nhóm chính. Nhóm I gồm có 18 giống với hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng 0,62–0,69 và được chia thành 2 nhóm nhỏ. Nhóm II gồm có 8 giống và được chia thành 2 nhóm phụ. Nhóm III gồm 11 giống có hệ số tương đồng di truyền cao nhất 0,83. Nhóm IV gồm có 3 giống có và có hệ số tương đồng 0,73. Nhóm V gồm có 3 giống và có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,67–0,7. Nhóm VI gồm có 3 giống với hệ số tương đồng 0,76. Nhóm VII gồm có 2 giống với hệ số tương đồng 0,54. Sự đa dạng về di truyền của tập đoàn giống mướp hương sẽ giúp cho các nhà chọn giống chọn được các tổ hợp lai có ưu thế lai cao để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo về sự di truyền các tính trạng và công tác chọn tạo giống mướp hương.

Từ khóa: chọn giống, đa dạng di truyền, *Luffa cylindrica* (L.) Roem), tập đoàn

1 Mở đầu

Mướp hương (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) hay còn gọi là mướp ngọt, là loại rau ăn quả được sử dụng phổ biến ở các nước châu Á và Việt Nam, có giá trị dinh dưỡng và giá trị y học cao. Quả mướp hương chứa hàm lượng cao các chất khoáng (Mg, Ca, Na, Fe, Cu...) [3], có vị ngọt mát, mùi thơm dễ chịu nên nhiều người ưa thích. Trong quả mướp hương có nhiều vitamin tốt cho sức khỏe con người như vitamin B giúp ngăn ngừa lão hóa, vitamin C làm trắng da... Mướp hương có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới, có thời gian sinh trưởng ngắn, khả năng sinh trưởng và ra hoa đậu quả tốt trong mùa nóng, góp phần phát triển sản xuất rau trái vụ. Vì thế, mướp hương ngày càng được chú ý phát triển, không những đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước mà còn xuất khẩu, lợi nhuận cao mà còn là đối tượng nghiên cứu trong di truyền học.

Tuy nhiên, mướp hương là loài thực vật lưỡng bội với bộ nhiễm sắc thể 26 ($n = 13$) và là cây giao phấn [1], cây hoa đơn tính đồng chu, thụ phấn chủ yếu nhờ côn trùng, nên các giống mướp

* Liên hệ: tthhai@hueuni.edu.vn

huong, đặc biệt là các giống mướp hương địa phương quả có mùi thơm nếp đang bị thoái hóa dần và nguy cơ bị biến mất nguồn gen của giống mướp này là rất cao. Bên cạnh đó, do quá trình đô thị hóa cũng là nguyên nhân làm cho nhiều giống mướp hương bị mất dần. Như vậy, việc sưu tập và nghiên cứu các giống mướp hương phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen là rất cần thiết.

Chi thị phân tử rất hữu ích trong phân loại và phân tích đa dạng di truyền. Có nhiều kỹ thuật để xác định sự đa dạng di truyền của tập đoàn giống và một trong những biện pháp có tính khả quan nhất chính là RAPD. Kỹ thuật này cho phép phát hiện tính đa hình các đoạn DNA được nhân bản ngẫu nhiên bằng việc sử dụng mỗi đơn chứa trình tự nucleotide ngẫu nhiên. Kỹ thuật này đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực của sinh học phân tử như: thiết lập bản đồ di truyền, đánh giá hệ gen của giống và sự đa dạng di truyền của các tập đoàn giống [2, 5–7]. Trong nghiên cứu này, chi thị RAPD được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn giống mướp hương làm cơ sở cho công tác bảo tồn, duy trì và khai thác tập đoàn giống mướp hương phục vụ công tác lai tạo giống mới.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Đối tượng

Giống: Trong thí nghiệm này có 48 giống mướp hương, trong đó 47 giống được thu thập từ trung tâm Tài nguyên Thực vật – Viện Khoa học Việt Nam và 1 giống mướp hương địa phương được thu thập tại Gia Lâm – Hà Nội (xem Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách tập đoàn giống mướp hương nghiên cứu

STT	KH giống	SĐK	Tên giống	STT	KH giống	SĐK	Tên giống
1	A1	GBVN007760	Mướp Thom quả dài	25	B6	GBVN005326	Mướp Thom
2	A2	GBVN007766	Mướp hương	26	B7	GBVN005331	Mướp hương dạng 1
3	A3	GBVN007767	Mướp hương dạng 1	27	B8	GBVN005332	Mướp Tràng Định
4	A4	GBVN007768	Mướp hương	28	B9	GBVN005333	Mướp hương
5	A5	GBVN007769	Mướp Thom	29	B10	GBVN005336	Mướp hương
6	A6	GBVN007773	Mướp hương	30	B12	GBVN005346	Mướp hương dạng 1

STT	KH giống	SĐK	Tên giống	STT	KH giống	SĐK	Tên giống
7	A7	GBVN007776	Mướp hương	31	B13	GBVN005347	Mướp hương
8	A10	GBVN008861	Mướp hương	32	B14	GBVN005348	Mướp hương
9	A11	GBVN008864	Mướp hương	33	B15	GBVN06568	Mướp Thom
10	A12	GBVN008866	Mướp hương	34	B16	GBVN006574	Mướp Thom
11	A13	GBVN009754	Mướp hương	35	B17	GBVN006576	Mướp hương
12	A15	GBVN012229	Mướp hương dạng 2	36	B18	GBVN006578	Mướp hương
13	A16	GBVN012230	Mướp hương dạng 2	37	B19	GBVN006721	Mướp hương
14	A17	GBVN012233	Mướp hương dạng 2	38	B21	GBVN006735	Mướp hương
15	A18	GBVN012235	Mướp hương dạng 2	39	B22	GBVN006737	Mướp hương
16	A19	GBVN012242	Mướp nếp	40	B23	GBVN006778	Mướp hương
17	A20	GBVN005324	Mướp vàng	41	B24	GBVN006779	Mướp Nho Quan
18	A29	GBVN005351	Mướp Trâu	42	B25	GBVN006900	Mướp Hương
19	A30	GBVN 006567	Mướp Dài	43	B26	GBVN006901	Mướp Hương
20	B1	GBVN003694	Mướp hương	44	B27	GBVN006902	Mướp Hương
21	B2	GBVN003695	Mướp hương	45	B28	GBVN006903	Mướp hương
22	B3	GBVN003696	Mướp hương	46	B29	GBVN006904	Mướp hương
23	B4	GBVN003717	Mướp hương	47	B30	GBVN006906	Mướp hương
24	B5	GBVN003834	Mướp hương	48	ĐP		Mướp địa phương

SĐK: Số đăng ký; KH giống: ký hiệu giống

2.2 Vật liệu

Mỗi RAPD: 100 mỗi UBC (University of British Columbia) RAPD được tổng hợp bởi công ty Bioneer (Hàn Quốc). Tên và trình tự 11 mỗi cho sự đa hình lớn được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của 48 giống mướp hương trình bày trong bảng Bảng 2.

Bảng 2. Môi RAPD sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên môi	Trình tự môi
1	UBC#301	CGGTGGCGAA
2	UBC#312	ACGGCGTCAC
3	UBC#322	GCCGCTACTA
4	UBC#334	ATGGCAAAGC
5	UBC#337	TCCCGAACCG
6	UBC#350	TGACGCGCTC
7	UBC#368	ACTTGTGCGG
8	UBC#353	TGGGCTCGCT
9	UBC#357	AGGCCAAATG
10	UBC#381	ATGAGTCCTG
11	UBC#386	TGTAAGCTCG

2.3 Phạm vi nghiên cứu

Địa điểm: Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học và Nhà lưới của khoa Nông học, trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế; Thời gian: Từ 2 năm 2014 đến tháng 5 năm 2015.

2.4 Phương pháp

DNA của các cá thể mướp hương được tách chiết theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) được mô tả bởi Doyle và Doyle có cải tiến [4].

Sản phẩm PCR-RAPD được nhuộm bằng thuốc nhuộm SYBR Green I nồng độ 1/10000 trong 20 phút, sau đó điện di trên gel agarose 1 %, trong dung dịch đệm TBE 0,5X trong 3,5 giờ ở 120 V và chụp ảnh dưới ánh sáng tia cực tím. 100 bp ladder (Bioline, Hàn Quốc) được sử dụng để đánh dấu khối lượng phân tử.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

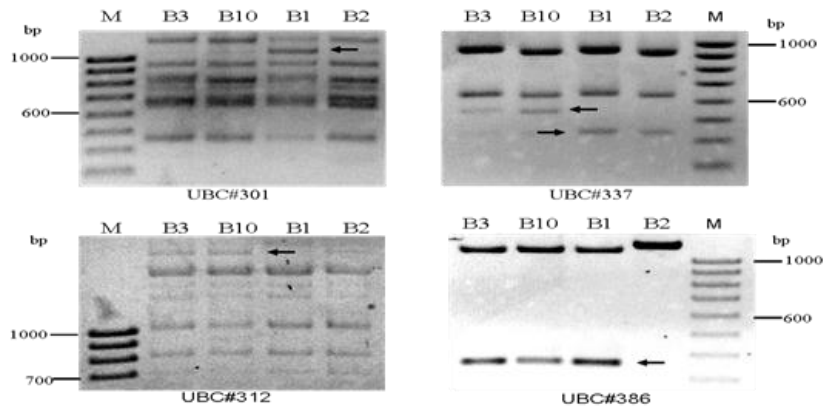
Số liệu RAPD được ghi nhận dựa vào thang chuẩn 100 bp. Tiêu chuẩn hóa sản phẩm RAPD theo quy ước: “1” xuất hiện phân đoạn DNA, “0” không xuất hiện phân đoạn DNA. Xây dựng

biểu đồ quan hệ di truyền và phân tích nhóm theo phương pháp toán học UPGMA được thực hiện bằng chương trình NTSYS – PC (Exeter Software, Mỹ) dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard (1908).

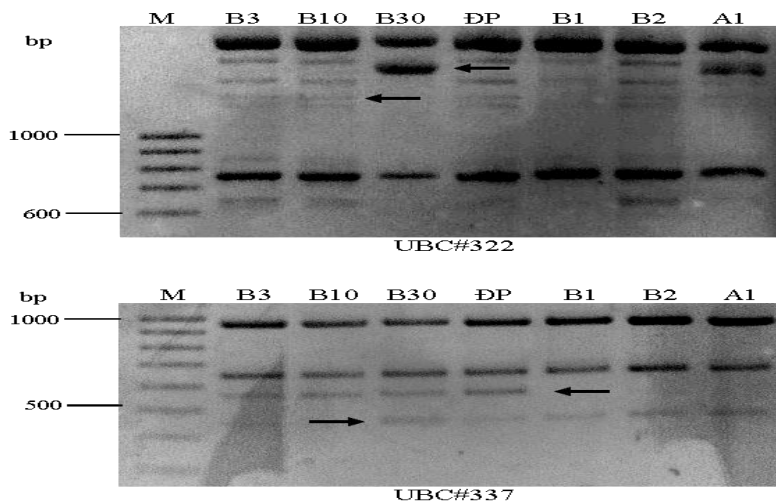
3 Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1 Khảo sát chỉ thị RAPD

Để phân tích tính đa hình DNA của tập đoàn mướp hương, chúng tôi đã sử dụng 100 môi để khảo sát tính đa hình của 4 giống đại diện từ 48 giống nghiên cứu có những đặc điểm hình thái đối lập nhau như B3 và B10, B1 và B2. Những kết quả điện di của 4 giống trên với 100 môi RAPD cho thấy có 33 môi biểu hiện đa hình (Hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di của một số môi RAPD biểu hiện đa hình được khảo sát từ 4 giống mướp hương (B3, B10, B1 và B2); M: 100 bp leader (Bioline, Hàn Quốc); Mũi tên chỉ các đoạn đa hình đại diện.



Hình 2. Kết quả điện di của một số môi RAPD biểu hiện đa hình được khảo sát từ 7 giống mướp hương (B3, B10, B30, ĐP, B1, B2 và A1). Mũi tên chỉ các đoạn DNA đa hình đại diện

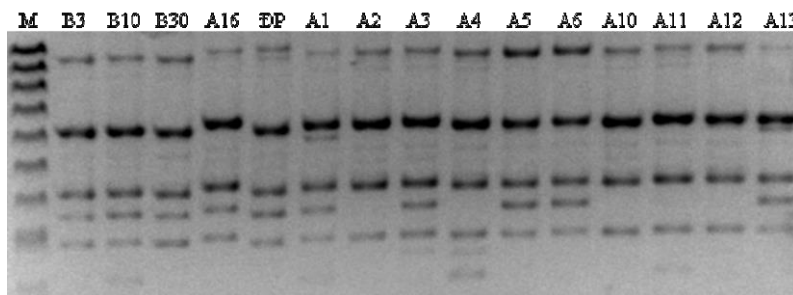
Để kiểm chứng các môi đa hình RAPD, chúng tôi tiếp tục sử dụng 33 môi đa hình để phân tích thêm 3 giống đại diện khác gồm B30, ĐP và A1 cùng với 4 giống đã được sử dụng ở trên để so sánh kết quả khuếch đại của các môi RAPD. Từ sản phẩm điện di thu được (Hình 2), chúng tôi chọn 11 môi trong 33 môi biểu hiện đa hình cho các băng DNA rõ nét sử dụng cho nghiên cứu đánh giá kiểu gen của 48 giống mướp hương.

3.2 Đánh giá kiểu gen của tập đoàn giống mướp hương

Tính đa hình thể hiện ở sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn khi so sánh giữa các giống mướp hương với nhau trong cùng 1 môi. Tổng số phân đoạn DNA của 11 giống mướp hương khi phân tích 11 môi ngẫu nhiên là 111 phân đoạn, trong đó có 63 phân đoạn cho tính đa hình (chiếm 56,76 %) và không đa hình là 48 phân đoạn (chiếm 43,24 %) (Bảng 3).

Bảng 3. Tỷ lệ đa hình của tập đoàn giống mướp hương với chỉ thị RAPD

Môi	Số phân đoạn DNA	Số phân đoạn đa hình	Số phân đoạn đơn hình	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (%)
UBC#301	11	4	7	36,36
UBC#312	13	6	7	46,15
UBC#322	10	8	2	80
UBC#334	4	4	0	100
UBC#337	9	5	4	55,56
UBC#350	14	8	6	57,14
UBC#353	14	5	6	35,71
UBC#357	14	6	8	42,86
UBC#368	10	8	2	80
UBC#381	13	8	5	61,54
UBC#386	2	1	1	50
Tổng	111	63	48	56,76



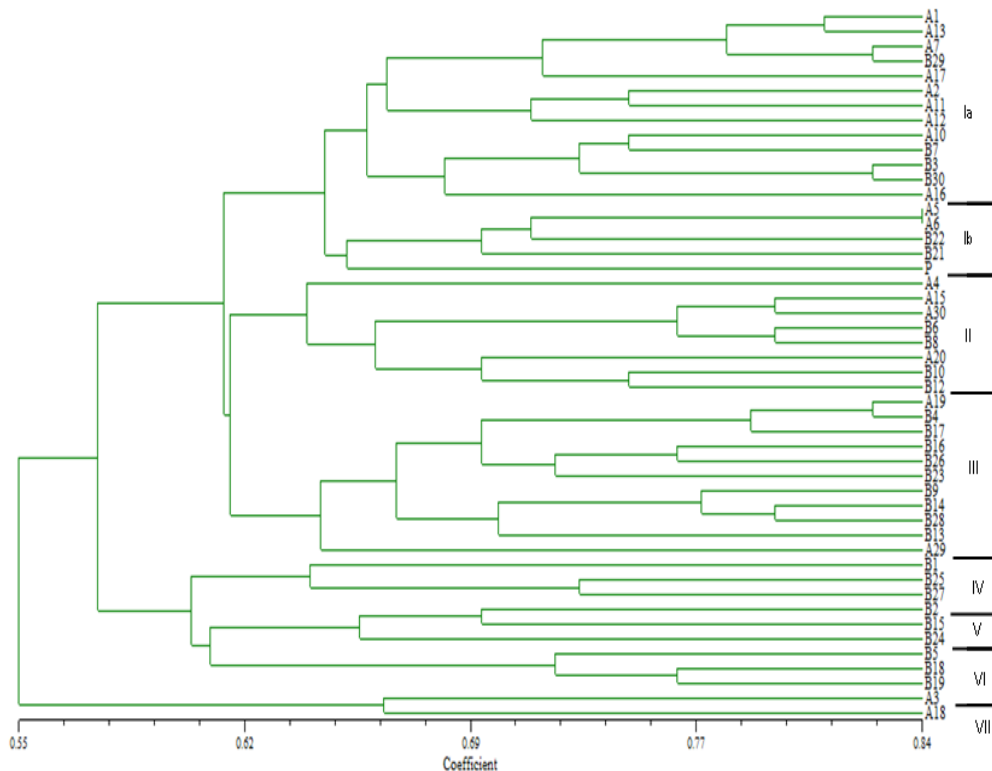
Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của tập đoàn giống mướp hương sử dụng môi UBC#350. M: 100 bp leader (Bioline, Hàn Quốc)

Số lượng các phân đoạn tương ứng với mỗi môi nằm trong khoảng 2 đến 14 phân đoạn, trong đó môi nhân bản được ít phân đoạn DNA nhất là môi UBC#386 (2 phân đoạn), và môi nhân được nhiều phân đoạn DNA nhất là môi UBC#350, UBC#353 và UBC#357 (14 phân đoạn). Kết quả cũng cho thấy cả 11 môi đều biểu hiện tính đa hình. Tuy nhiên, mức độ đa hình giữa các môi là khác nhau. Mức độ đa hình của 11 môi nghiên cứu dao động từ 35,71 % đến 100 %.

3.3 Đánh giá sự đa dạng di truyền của tập đoàn giống mướp hương

Đánh giá mức độ đa dạng và khoảng cách di truyền của các giống mướp hương đem lại cái nhìn chung nhất về quan hệ di truyền của chúng. Mỗi tương quan di truyền đó được xác định thông qua hệ số tương đồng di truyền và biểu đồ hình cây. Hệ số tương đồng di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền của các giống mướp hương với nhau. Các giống có giá trị hệ số di truyền tương ứng càng gần đến 0 thì sự khác biệt về di truyền càng lớn và khả năng sử dụng trong lai tạo giống càng cao, còn các giống có hệ số di truyền giống nhau tương ứng càng gần tới 1 thì càng gần nhau về mặt di truyền.

Hệ số tương đồng 0,62 thể hiện trên biểu đồ quan hệ di truyền ở Hình 4 cho thấy 48 giống mướp hương được chia thành 7 nhóm chính và nhiều nhóm phụ a, b (Hình 4).



Hình 4. Phân nhóm di truyền của 48 giống mướp hương dựa vào chỉ thị RAPD

Nhóm I: Nhóm này bao gồm 18 giống. Có mức độ tương đồng nằm trong khoảng 0,62–0,69. Trong nhóm I, các giống lại được chia thành 2 nhóm phụ với khoảng cách di truyền gần hơn như sau:

Nhóm phụ Ia: Gồm 13 giống A1, A13, A7, B29, A17, A2, A11, A12, A10, B7, B, B30 và A16. Trong đó có 2 cặp giống B3 và B30, A7 và B29 giống nhau nhiều hơn cả, hệ số tương đồng giữa chúng là 0,83.

Nhóm phụ Ib: Gồm 5 giống ĐP, A5, A6, B22 và B21. Trong đó, giống A5 có tương đồng di truyền cao nhất với A6. Điều này có thể cho biết khả năng lai tạo giữa 2 giống này sẽ ít ưu thế lai.

Nhóm II: Gồm có 8 giống và được chia thành 2 nhóm phụ.

Nhóm phụ IIa gồm duy nhất 1 giống là A4, có hệ số tương đồng di truyền nằm trong khoảng 0,63–0,65 và tương đồng với các giống B1, B25 và B27 mặc dầu chúng nằm cách xa nhau khi xây dựng biểu đồ quan hệ di truyền giữa các giống.

Nhóm phụ IIb gồm 7 giống: T2, B12, A20, A15, A30, B6 và B8. Trong đó có 2 cặp giống A15 và A30, B6 và B8 giống nhau nhiều hơn cả; hệ số sai khác giữa chúng là 0,79.

Nhóm III: Gồm có 11 giống: A19, B4, B17, B16, B26, B23, B9, B14, B28, B13 và A29. Trong đó, 2 giống A19 và B4 tương đối gần nhau về mặt di truyền với hệ số tương đồng di truyền là 0,83.

Nhóm IV: Bao gồm 3 giống B1, B25 và B27, trong đó 2 giống B25 và B27 gần nhau về mặt di truyền với hệ số tương đồng di truyền là 0,73.

Nhóm V: Có 3 giống B2, B15 và B24, với sự sai khác di truyền nằm trong khoảng 0,67–0,70.

Nhóm VI: Gồm có 3 giống B5, B18 và B19, trong đó 2 giống B18 và B19 gần nhau về mặt di truyền với hệ số tương đồng di truyền là 0,76.

Nhóm VII: Bao gồm 2 giống A13 và A18 với hệ số tương đồng di truyền là 0,54.

4 Kết luận

Kết quả phân tích cho thấy có sự sai khác di truyền giữa các giống mướp hương nghiên cứu. Hệ số tương đồng giữa 48 giống mướp hương nghiên cứu dao động trong khoảng 0,37–0,84. Trong đó, hai giống A5 và A6 có hệ số tương đồng di truyền lớn nhất là 0,84; hai giống A1 và B24 có hệ số đồng dạng nhỏ nhất là 0,37.

Phân nhóm di truyền dựa trên chỉ thị phân tử RAPD cho thấy nếu hệ số tương đồng là 0,62 thì tập đoàn mướp hương được phân thành 7 nhóm di truyền khác biệt. Những thông tin từ phân nhóm di truyền dựa trên chỉ thị phân tử rất có giá trị để lựa chọn giống cho chương trình chọn tạo giống mướp hương lai.

Tài liệu tham khảo

1. Bal K. J., Hari B. K. C., Radha K. T., Madhusudan G., Bhuwon R. S., Madhusudan P. U. (2004), Descriptors for Sponge Gourd *Luffa cylindrica* (L.) Roem, *NARC, LIBIRD & IPGRI*.
2. Betal S., Roy C. P., Kundu S., Sen R. S. (2004), Estimation of geneetic variability of *Vigna radiate* cultivars by RAPD analysis, *Biologia plantarum*, 48(2), pp. 205–209.
3. Dairo F. A. S. and Adanlawo I. G. (2007), Nutritional quality of *Crasocephalum crepidioides* and *Senecio biafrae*, *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(1), pp. 35–39.
4. Doyle J. J., and Doyle J. L. (1987), A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, pp. 11–15.
5. Kawar P. G. Devarumath R. M. and Nerkar Y. (2009), Use of RAPD markers for assessment of genetic diversity in *sugarcane* cultivars, *Indian Journal of Biotechnology*, 8, pp. 67–71.
6. Leal A. A., Mangolin C. A., Amaral A. T. J., Goncalves L. S., Scapim C. A, Mott A. S., Eloi I. B., Cordovés V., Silva M. F. (2010), Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among *popcorn* lines, *Genetics and Molecular Research*, 9(1), pp. 9–18
7. Neha M., Dinesh Y. (2010), RAPD analysis among Pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) cultivars for their genetic diversity, *Genetic engineering and biotechnology Journal* 8(2), pp. 186–189

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF LUFFA GERMPLASM (*Luffa cylindrica* (L.) Roem) USING RAPD MARKER

Truong Thi Hong Hai^{1*}, Tran Bao Nga²

¹Hue University, Institute of Biotechnology, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

²People's Committee of Hoa Nhon commune, Hoa Vang district, Da Nang, Vietnam

Abstract. In this study, 11 RAPD polymorphic primers selected from 100 primers were used to study the genetic diversity of 48 *Luffa cylindrica* (L.) Roem accessions, 47 of which were collected from The Plant Resource Center – Vietnam Academy of Science, and one local variety was collected in Gia Lam – Hanoi. Based on the degree of the coefficient of genetic similarity, 48 varieties were classified into seven major groups. Group I consisted of 18 varieties with the coefficient of genetic similarities ranging from 0.62 to 0.69 and divided into two sub-groups. Group II consisted of 8 varieties and divided into 2 sub-groups. Group III had 11 varieties with the highest genetic correlation coefficient of 0.83. Group IV included 3 varieties with a coefficient of 0.73. Group V composed three varieties with the similar coefficients ranging from 0.67 to 0.7. Group VI included three varieties with the similarity coefficient of 0.76. Group VII included 2 varieties with the coefficient of 0.54. The genetic diversity of the *Luffa* germplasm will enable breeders to select hybrid combinations having superior hybrids to serve subsequent studies of trait heredity and breeding program.

Keywords: breeding, germplasm, genetic diversity, *Luffa cylindrica* (L.) Roem