

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN CÂY HUỆ TRẮNG (*Polianthes tuberosa* L.) BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ISSR VÀ RAPD

Phan Diễm Quỳnh, Nguyễn Trường Giang, Lê Thị Thu Hằng

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá mối quan hệ di truyền của các mẫu huệ trắng được thu thập từ Bình Chánh (Thành phố Hồ Chí Minh), Sa Đéc (Đồng Tháp) và Phúc Thọ (Hà Nội) dựa trên chỉ thị phân tử ISSR (Inter simple Sequence Repeats) và RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của 5 mẫu giống huệ trắng dựa trên 9 chỉ thị phân tử ISSR và 3 chỉ thị phân tử RAPD cho thấy: Đối với chỉ thị ISSR có tổng số alen là 39 từ 9 mỗi có giá trị trung bình là 4,3. Tỷ lệ băng đa hình đạt 100%. Đối với chỉ thị phân tử RAPD có tổng số alen là 12 từ 3 mỗi có giá trị trung bình là 4. Tỷ lệ băng đa hình đạt 50-100%. Hàm lượng thông tin đa hình (Polymorphic information content –PIC) giữa các mẫu giống huệ trắng đạt từ 0,23 đến 0,64 với trung bình là 0,47 dựa trên chỉ thị phân tử RAPD; từ 0,12 đến 0,96 với trung bình là 0,47 dựa trên chỉ thị phân tử ISSR. Dựa trên chỉ thị phân tử ISSR và RAPD các mẫu giống huệ trắng chia làm 5 nhóm chính với hệ số di truyền là 0,156. Các kết quả này có thể ứng dụng trong việc đánh giá đa dạng di truyền, bảo tồn nguồn gen cho một số giống huệ trắng.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, đa dạng di truyền, huệ trắng, ISSR, RAPD.

MỞ ĐẦU

Huệ trắng là một trong những loại hoa cắt cành được dùng nhiều nhất trong các nghi lễ truyền thống của Việt Nam và một số nước châu Á. Huệ trắng rất được ưa chuộng vì hương thơm và tinh dầu của nó là thành phần quan trọng của nước hoa cao cấp (Gautheret, 1969). Tinh dầu hoa huệ rất đắt tiền vì rất khó để thu được tinh dầu từ hoa. Bên cạnh đó, cây hoa huệ còn có công dụng trong y học, bộ phận được sử dụng là củ huệ. Trong tinh dầu củ huệ có chứa thành phần sapogenin. Sapogenin bao gồm hecogenin và tigogenin là loại hợp chất được chiết xuất để bào chế ra một số loại thuốc quý (Naidu, Reid, 1989). Từ lâu trong dân gian người dân đã biết sử dụng cây hoa huệ để làm thuốc chữa một số bệnh đơn giản (cảm ho, sốt rét...).

Du nhập vào nước ta từ lâu và được trồng rộng rãi trong cả nước, nhưng hoa huệ được trồng phổ biến nhất ở khu vực miền Nam và Nam Trung Bộ. Trải qua quá trình canh tác lâu dài, giống không được chọn lọc thường xuyên dẫn đến huệ trắng có biểu hiện suy giảm sức sống, bị thoái hoá, làm giảm năng suất và chất lượng giống, dễ bị nhiễm sâu bệnh. Bên cạnh đó, do quá trình đô thị hóa cũng là nguyên nhân làm cho diện tích canh tác huệ trắng bị thu hẹp dần. Vì vậy, việc sưu tập và đánh giá các giống huệ trắng phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen là rất cần thiết (Huỳnh Thị Huệ Trang *et al.*, 2007).

Ứng dụng chỉ thị phân tử ISSR và RAPD để xác định đa dạng di truyền của các mẫu giống huệ trắng cho phép phát hiện tính đa hình các đoạn DNA bằng việc sử dụng mỗi đơn chứa trình tự nucleotide ngẫu nhiên làm cơ sở cho công tác bảo tồn, duy trì và khai thác mẫu giống huệ trắng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

15 mẫu giống huệ trắng thơm được thu thập tại các xã Hưng Long, Tân Quý Tây, Bình Chánh thuộc huyện Bình Chánh (Thành phố Hồ Chí Minh), Sa Đéc (Đồng Tháp), Phúc Thọ (Hà Nội) có ký hiệu và đặc điểm theo bảng 1.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA mẫu lá non của 15 mẫu huệ trắng được thực hiện theo quy trình của Kit GeneJET Plant genomic DNA Purification như sau: Cân 100 mg mẫu tươi nghiền trong niơ lỏng thành bột mịn. Chuyển vào effendorf chứa sẵn 350 µl Lysis Buffer A. Bổ sung 50 µl Lysis Buffer B, 20 µl RNase A, trộn đều (vortex) trong 1 phút, ủ ở 65°C trong 10 phút. Bổ sung 130 µl Precipitation Solution, lắc đều, giữ lạnh trên đá trong 5 phút. Ly tâm 14000 rpm trong 5 phút. Thu dịch nổi chuyển sang ống mới (khoảng 450 - 550 µl). Bổ sung 400 µl Plant gDNA Binding solution, 400 µl 96% ethanol, lắc đều hỗn hợp. Chuyển 1/2 hỗn hợp (khoảng 600 - 700 µl) vào cột spin column.

CÔNG NGHỆ GEN

Ly tâm 8000 rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch lỏng qua cột. Chuyển 1/2 hỗn hợp còn lại vào cột spin column. Ly tâm 8000 rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch lỏng qua cột. Bổ sung 500 µl dung dịch rửa (Wash Buffer I), ly tâm 10000 rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch qua cột. Đặt cột vào tube mới, bổ sung 500 µl Wash Buffer II vào cột, ly tâm 14000 rpm trong 3 phút, loại bỏ dịch lỏng qua cột. Đặt cột vào tube mới, bổ sung 100 µl Elution, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 10000 rpm trong 1 phút, thu dịch lỏng qua cột. Lặp lại bước 14 và 15. Thu dịch lỏng (chứa DNA tổng số). Sử dụng và bảo quản -20°C.

Kết quả tách DNA tổng số sau đó được tiến hành kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8% và kiểm tra nồng độ bằng đo OD ở bước sóng 260 nm, kiểm tra độ tinh sạch bằng đo OD ở bước sóng 280 nm bằng máy NanoDrop.

Bảng 1. Các mẫu giống huệ trắng nghiên cứu

TT	Ký hiệu	Nơi thu thập	Đặc điểm cơ bản của hoa
1	A1-1	Hưng Long-Bình Chánh	Hoa trắng kép thơm
2	A1-2		
3	A1-3		
4	A2-1	Tân Quý Tây-Bình Chánh	Hoa trắng kép thơm
5	A2-2		
6	A2-3		
7	A3-1	Sa Đéc – Đồng Tháp	Hoa trắng kép thơm
8	A3-2		
9	A3-3		
10	A4-1	Sa Đéc- Đồng Tháp	Hoa trắng kép không thơm
11	A4-2		
12	A4-3		
13	A5-1	Phước Thọ -Hà Nội	Hoa trắng đơn thơm
14	A5-2		
15	A5-3		

Phương pháp PCR

Phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại locus dựa trên chỉ thị phân tử ISSR và RAPD (bảng 2, 3). Thành phần cơ bản cho 1 phản ứng PCR 20 µl: 0,2 mM dNTP mix, enzyme DreamTaq polymerase 1U, dream taq buffer 10X, 0,4 µM primer xuôi, 0,4 µM primer ngược, nước cất 2 lần khử trùng, 1 µl mẫu với nồng độ DNA từ 100 - 500 ng/µl. Chu kỳ PCR tiền biến tính 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ (biến tính ở 95°C trong 30 giây; bắt cặp (T_a : phụ thuộc vào từng cặp mỗi sử dụng) trong 30 giây; 72°C trong 40 giây); chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Kết quả PCR được phân tích đánh giá trên gel agarose 1,2%, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy gel doc.

Phương pháp phân tích số liệu ISSR và RAPD

Các băng DNA được ghi nhận dựa trên sự có mặt của chúng trên băng điện di của các mẫu nghiên cứu theo DNA thang chuẩn (DNA marker). Nếu một phân đoạn DNA xuất hiện ở mẫu i nhưng không xuất hiện mẫu j hoặc đồng thời xuất hiện ở cả i và j 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. Các đoạn được mã hóa bằng số tự nhiên 0 và 1, khi đó mẫu nào xuất hiện đoạn DNA thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện thì ký hiệu là 0. Các số liệu nhị phân này được đưa vào xử lý theo chương trình NTSYSpc 2.1 (Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System) để tính hệ số tương đồng di truyền và lập biểu đồ quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu. Tổng số các băng DNA có cùng kích thước (được coi là cùng một alen) sẽ được nhập vào phần mềm tính đa hình PIC (Polymorphic Information Content) theo công thức: $PIC(i) = 1 - \sum P_{ij}^2$ (P_{ij} là tần suất alen thứ j với locus thứ i). Tỷ lệ alen = (số alen đa hình/tổng số alen)*100.

Bảng 2. Một số môi của chỉ thị phân tử ISSR được chọn lọc để đánh giá di truyền các giống huệ trắng

TT	Môi ISSR	Trình tự 5'-3'	Nhiệt độ bắt cặp	Kích thước
1	UBC813	CT CT CT CT CT CT CT CTT	50	200 - 1600
2	UBC814	CT CT CT CT CT CT CT CTA	50	600 - 1200
3	UBC815	CT CT CT CT CT CT CT CTG	50	500 - 1500
4	UBC 817	CA CA CA CA CA CA CAA	53	300 - 1200
5	UBC 821	CA CA CA CA CA CA CAG	53	300 - 1200
6	UBC 827	AC AC AC AC AC AC AC ACT	53	500 - 1500
7	UBC 829	AC AC AC AC AC AC AC ACG	53	500 - 1500
8	UBC 836	TG TG TG TG TG TG TG TGC	50	300 - 1300
9	UBC 840	TG TG TG TG TG TG TG TGG	50	200 - 1200
10	UBC 841	GA GA GA GA GA GA GA GAY	54	1000 - 2200

(Khandagale, 2011; Kameswari et al., 2014; Bharti et al., 2016; Sirohi et al., 2017)

Bảng 3. Một số môi của chỉ thị phân tử RAPD được chọn lọc để đánh giá di truyền các giống huệ trắng

TT	Môi RAPD	Trình tự 5'-3'
1	OPC-07	GTCCCCGACGA
2	OPJ-13	CCACACTACC
3	OPC-15	GACGGATCAG
4	OPD-08	GTGTGCCCCA
5	OPF-13	GGCTGCAGAA
6	OPF-17	AACCCGGGAA
7	OPK-11	AATGCCCCAG
8	OPD-16	CAGGCCCTTC
9	OPC-2	TGCCGAGCTG
10	OPC-3	AGTCAGCCAC

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

DNA tổng số của 15 mẫu giống huệ trắng được điện di trên gel agarose 1% cho thấy các băng xuất hiện đậm, rõ nét và không tạo vệt dài, chứng tỏ DNA được tách với hàm lượng lớn, ít đứt gãy. Nồng độ DNA từ 104,7 - 194,3 ng/ul, đồng thời tỷ lệ OD 260/280 nằm trong khoảng 1,6 - 1,9 điều này cho thấy chất lượng DNA đạt tiêu chuẩn có thể dùng cho phản ứng PCR.

Kết quả phân tích di truyền dựa trên chỉ thị phân tử ISSR

Kết quả sàng lọc bộ chỉ thị phân tử ISSR cho một số mẫu hoa huệ dựa trên 10 locus với môi tương ứng cho thấy có 09/10 môi có sản phẩm khuếch đại đạt tỷ lệ 90%, số sản phẩm khuếch đại từ 1 - 9 sản phẩm/ môi. Tổng số alen là 39 từ 9 môi có giá trị trung bình 4,3. Tỷ lệ băng đa hình đạt 100%. Khandagale và đồng tác giả (2014) cũng cho thấy số alen trung bình là 6,6 và sự hiện diện alen đa hình là 73,53%. Rõ ràng số alen xuất hiện có sự tương ứng với nghiên cứu trước đây, tuy nhiên tỷ lệ alen đa hình lại thấp hơn. Điều này có thể do sự khác nhau về đặc điểm di truyền giữa các nguồn mẫu.

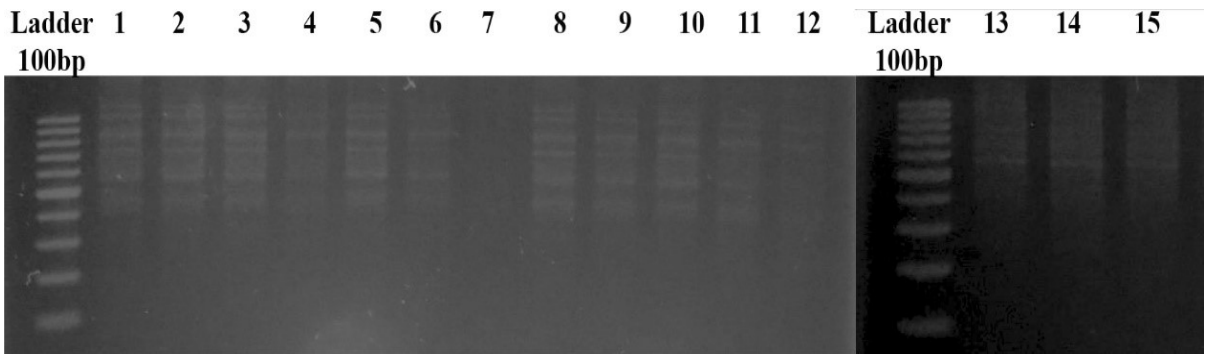
Từ 09 locus đã được chọn lọc trên 5 giống huệ trắng chúng tôi tiến hành đánh giá mối quan hệ di truyền dựa trên chỉ thị phân tử ISSR. Chỉ số PIC đánh giá mức độ đa hình của các chỉ thị, với 03 chỉ thị phân tử ISSR cho thấy giá trị trung bình PIC là 0,47 biến thiên từ 0,12 đến 0,96. Dựa trên kết quả phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 và giá trị trung bình của hệ số tương quan là 0,156 chúng tôi chia cây phân nhóm thành 5 nhóm chính.

CÔNG NGHỆ GEN

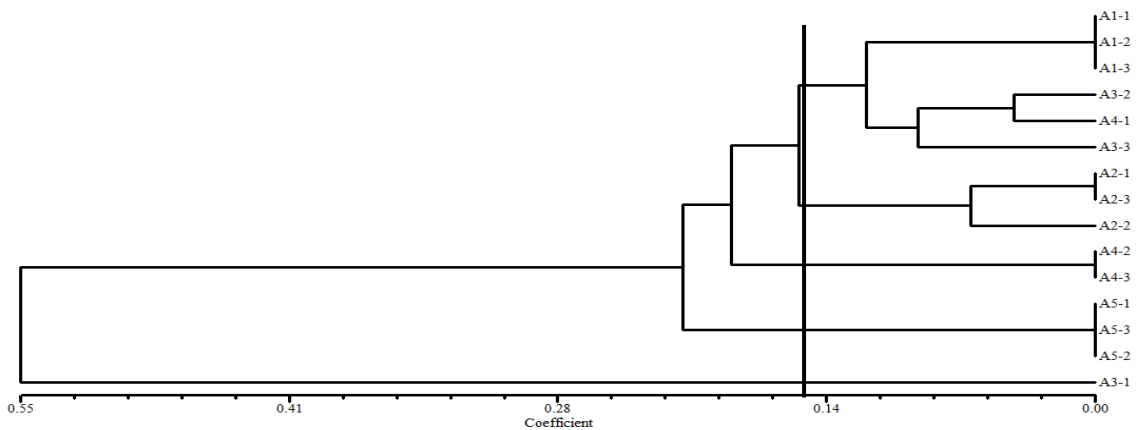
Bảng 4. Kết quả sàng lọc môi dựa trên chỉ thị phân tử ISSR

TT	Locus	Kích thước dự kiến (bp)	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Số alen	Alen đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)	PIC
1	UBC813	200 - 1600	700 - 1500	3	3	100	0,55
2	UBC814	600 - 1200	800 - 1200	3	3	100	0,43
3	UBC815	500 - 1500	-	-	-	-	
4	UBC 817	300 - 1200	600 - 1000	2	2	100	0,12
5	UBC 821	300 - 1200	400 - 1100	7	7	100	0,15
6	UBC 827	500 - 1500	600 - 1200	4	4	100	0,13
7	UBC 829	500 - 1500	400 - 1100	7	7	100	0,45
8	UBC 836	300 - 1300	350 - 800	3	3	100	0,96
9	UBC 840	200 - 1200	300 - 1400	9	9	100	0,85
10	UBC 841	1000 - 2200	500	1	1	100	0,64
Tổng số				39	39		
Trung bình				4,3	4,3		

Chú thích: -: Không có sản phẩm khuếch đại.



Hình 1. Kết quả PCR vùng UBC-829 dựa trên chỉ thị phân tử ISSR



Hình 2. Cây phát sinh loài của 15 mẫu huệ trắng dựa trên 09 chỉ thị phân tử ISSR

Dựa trên cây phát sinh loài của 5 giống huệ trắng chỉ làm 5 nhóm chính:

- Nhóm 1: Gồm giống huệ trắng kép thơm Hưng Long - Bình Chánh, huệ trắng kép thơm Sa Đéc (Đồng Tháp) và một giống kép không thơm Sa Đéc (Đồng Tháp).

- Nhóm 2: Mẫu giống huệ trắng kép thơm Tân Quý Tây - Bình Chánh.
- Nhóm 3: Mẫu giống kép không thơm Sa Đéc (Đồng Tháp).
- Nhóm 4: Mẫu giống trắng đơn thơm Phúc Thọ (Hà Nội).
- Nhóm 5: 1 mẫu giống trắng kép thơm Sa Đéc (Đồng Tháp).

Kết quả trên cho thấy các giống huệ trắng kép thơm và không thơm có mối quan hệ gần nhau, giống huệ trắng đơn thơm có sự khác biệt di truyền so với các giống khác. Tuy nhiên, có một mẫu giống huệ trắng kép thơm được thu thập từ Sa Đéc nằm riêng một nhánh và có sự khác biệt so với các mẫu giống còn lại. Đồng thời, cũng cho thấy các mẫu giống có đặc điểm hoa kép có mối quan hệ di truyền gần nhau.

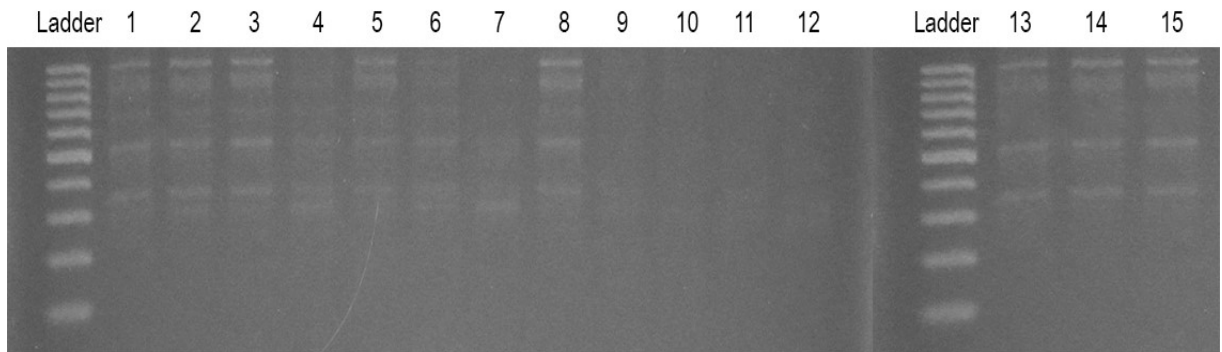
Đánh giá mối quan hệ di truyền dựa trên chỉ thị phân tử RAPD

Kết quả sàng lọc bộ chỉ thị phân tử RAPD cho một số mẫu hoa huệ dựa trên 10 môi khác nhau cho thấy có 03/10 môi có sản phẩm khuếch đại đạt tỷ lệ khuếch đại 30%, số sản phẩm khuếch đại từ 2 – 7 sản phẩm/ môi. Tổng số alen là 12 từ 3 môi có giá trị trung bình 4. Tỷ lệ băng đa hình đạt 50-100%. Theo nghiên cứu của Sirohi và đồng tác giả (2017) cho thấy số alen trung bình là 3,57 và sự hiện diện alen đa hình là 92,85%. Khandagale và đồng tác giả (2014) cũng cho thấy số alen trung bình là 7 và sự hiện diện alen đa hình là 53,51%. Kết quả trên cho thấy số alen xuất hiện có sự tương ứng với nghiên cứu trước đây, tuy nhiên tỷ lệ alen đa hình lại thấp hơn. Điều này có thể do sự khác nhau về đặc điểm di truyền giữa các nguồn mẫu.

Bảng 5. Kết quả sàng lọc môi dựa trên chỉ thị phân tử RAPD

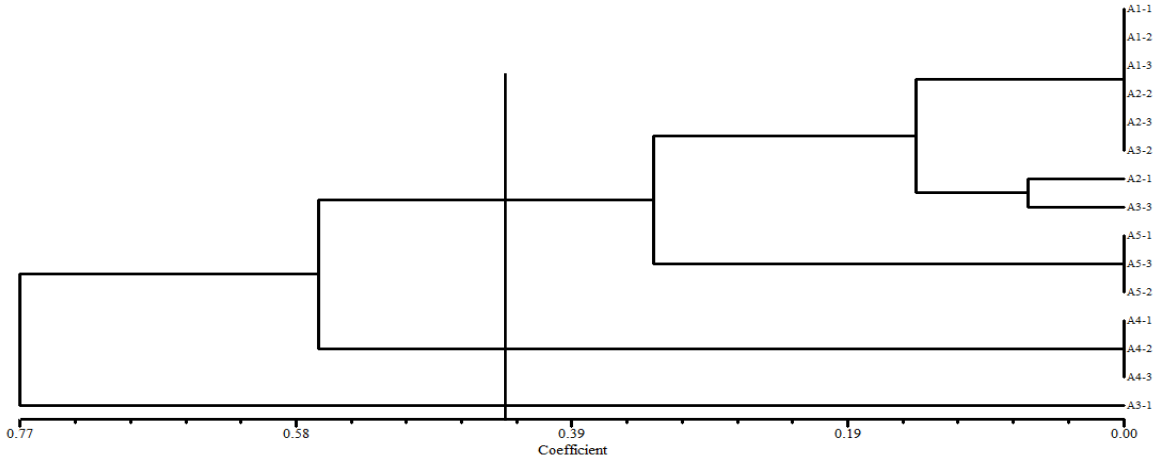
TT	Locus	Kích thước dự kiến (bp)	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Số alen	Băng đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)	PIC
1	OPC-07	250 - 2000	-	-	-	-	
2	OPJ-13	200 - 2000	-	-	-	-	
3	OPC-15	220 - 2000	-	-	-	-	
4	OPD-08	250 - 2000	200 - 1200	7	5	71,43	0,64
5	OPF-13	150 - 2000	-	-	-	-	
6	OPF-17	250 - 2000	-	-	-	-	
7	OPK-11	200 - 2000	-	-	-	-	
8	OPD-16	250 - 2000	-	-	-	-	
9	OPC-2	250 - 2000	350 - 1500	2	1	50	0,23
10	OPC-3	400 - 2000	500 - 1500	3	3	100	0,53
Tổng số				12	9		
Trung bình				4	3	73,77	

Chú thích: -: Không có sản phẩm khuếch đại.



Hình 3. Kết quả PCR vùng OPC02 dựa trên chỉ thị phân tử RAPD

Phân tích hệ số tương đồng giữa các mẫu cho thấy, hệ số tương đồng giữa các cặp cá thể nằm trong khoảng 0,080 – 0,773. Hệ số tương đồng cao nhất giữa nhóm A5 với A3-1 là 0,773 và thấp nhất giữa nhóm A4-1 với A3-2 là 0,042. Chỉ số PIC đánh giá mức độ đa hình của các chỉ thị, với 03 chỉ thị phân tử RAPD cho thấy giá trị trung bình PIC là 0,47 biến thiên từ 0,23 đến 0,64. Từ 03 locus đã được chọn lọc trên 5 giống huệ trắng chúng tôi tiến hành đánh giá mối quan hệ di truyền dựa trên chỉ thị phân tử RAPD. Dựa trên kết quả phân tích bằng phần mềm NTSY Spc2.1 và giá trị trung bình của hệ số tương quan là 0,42 chúng tôi chia cây phân nhóm thành 4 nhóm chính.



Hình 4. Cây phát sinh loài của 15 mẫu huệ trắng dựa trên 09 chỉ thị phân tử RAPD

Dựa trên cây phát sinh loài của 5 giống huệ trắng chia làm 3 nhóm chính:

- Nhóm 1: Gồm giống huệ trắng kép thơm Hưng Long-Bình Chánh, Tân Quý Tây - Bình Chánh và Sa Đéc và giống đơn thơm thu thập từ Hà Nội.
- Nhóm 2: Gồm giống huệ trắng kép không thơm được thu thập từ Sa Đéc.
- Nhóm 3: Một mẫu giống huệ trắng kép thơm Sa Đéc và nằm riêng một nhánh, có sự khác biệt so với các giống còn lại.

Đánh giá mối quan hệ di truyền dựa trên kỹ thuật ISSR có ưu điểm là không yêu cầu phải biết trước thông tin về bộ gen. So với RAPD, phương pháp này cũng đơn giản và nhanh nhưng lại cho độ chính xác cao hơn RAPD vì sử dụng các đoạn mồi dài hơn nên sản phẩm phản ứng ổn định hơn, có thể lặp lại thí nghiệm. Đồng thời, kỹ thuật ISSR được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền, nghiên cứu đặc điểm di truyền quần thể, lấy dấu di truyền, đánh dấu gen, xác định cây trồng, phân tích nguồn gốc, xác định sự thay đổi hệ gen và đánh giá con lai. Từ kết quả phân tích trên cho thấy trong nghiên cứu này cho thấy việc đánh giá mối quan hệ di truyền của các mẫu giống huệ trắng bằng chỉ thị phân tử ISSR, RAPD liên quan đến đặc điểm hình thái của hoa, trong đó ISSR liên quan đến kiểu hình của hoa (hoa đơn, hoa kép), RAPD liên quan đến mùi thơm của hoa. Trong trường hợp này việc kết hợp giữa hai chỉ thị phân tử ISSR và RAPD có hiệu quả hơn trong việc đánh giá mối quan hệ di truyền của các mẫu giống huệ trắng trên.

KẾT LUẬN

Kết quả sàng lọc mồi dựa trên chỉ thị phân tử ISSR đã chọn được 9 locus với tổng số alen là 39 từ 9 mồi có giá trị trung bình 4,3. Sàng lọc được 3 locus dựa trên chỉ thị phân tử RAPD với tổng số alen là 12 từ 3 mồi có giá trị trung bình là 4. Phân tích mối quan hệ di truyền của 5 mẫu giống huệ trắng (mỗi giống 3 cây) được thu thập từ các nguồn khác nhau dựa trên chỉ thị phân tử ISSR cho thấy giá trị trung bình của hệ số tương quan là 0,156 và chia làm 5 nhóm chính, chỉ thị phân tử RAPD cho thấy giá trị trung bình của hệ số tương quan là 0,42 chúng tôi chia cây phân nhóm thành 4 nhóm chính. Hai chỉ thị phân tử trên liên quan đến kiểu hình và màu sắc của hoa.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí và cơ sở vật chất để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bharti H, Singh K, Singh R, Kumar R, Singh M (2016). Genetic diversity and relationship study of single and double petal tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cultivars based on RAPD and ISSR markers. *Indian J Hort* 73(2): 238-244.

Gautheret RJ (1969). Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured in vitro. *Am J Bot* 56: 702-717.

Huỳnh Thị Huệ Trang, Lê Hồng Giang, Nguyễn Bảo Toàn (2007). Phục hồi giống hoa huệ trắng (*Polianthes tuberosa* Linn) nhiễm bệnh chai bông bằng nuôi cấy phân sinh mô chồi. *Báo cáo Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa*: 135-138.

Kameswari PL, Girwani A, RadhaRani K (2014). Research Article Genetic diversity in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) using morphological and ISSR markers. *Electronic J Plant Breed* 5 (1): 52-57.

Khandagale K, Padmakar B, Reddy DL, Sane A, Aswath C (2014). Genetic diversity analysis and barcoding in tuberose (*Polianthes tuberosa* L) cultivars using RAPD and ISSR markers. *J Hort Sci* 9 (1): 5-11.

Khandagale KS (2011). Genetic diversity analysis and DNA fingerprinting of tuberose (*Polianthes tuberosa*) varieties/accessions. *University of Agricultural Sciences GKVK, Bangalore*.

Naidu JN, Reid MS (1989). Postharvest handling of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Acta horticulture* 261: 103-129

Sirohi U, Kumar M, Chauhan P, Kumar N, Prakash S, Chand P, Naresh RK, Sharma VR, Chaudhary V (2017). Genetic Diversity in Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) Germplasm using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Int J Curr Microbiol App Sci* 6(5): 1313-1321.

GENETIC DIVERSITY OR SOME *Polianthes tuberosa* L. BY USING ISSR AND RAPD MARKERS

Phan Diem Quynh, Nguyen Trung Giang, Le Thi Thu Hang

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

In this study, we evaluated the genetic diversity of 15 samples of *Polianthes tuberosa* L. that collected from Binh Chanh (Ho Chi Minh City), Sa Dec (Dong Thap) and Phuc Tho (Hanoi) based on ISSR and RAPD molecular markers. Results of analyzing the genetic relationship of *Polianthes tuberosa* L. varieties based on 9 ISSR primers and 3 RAPD primers showed that: For ISSR primers, the total collected alleles are 39 from 9 primers with the average of them is 4.3. The percentages of polymorphic were 100%. For RAPD primers, the total collected of alleles is 12 from 3 primers with mean values is 4. The percentages of polymorphic were ranged from 50% to 100%. The polymorphic values among the collected samples obtained from 0.23 to 0.64 with an average of 0.47 on RAPD marker, from 0.12 to 0.96 with an average of 0.47 on ISSR marker. Based on the molecular markers from ISSR and RAPD primers, 15 samples of *Polianthes tuberosa* L. were divided into 5 major groups with genetic coefficient was 0.156. These results can be applied in the evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources for some *Polianthes tuberosa* varieties.

Keywords: Molecular marker, genetic diversity, *Polianthes tuberosa*, ISSR, RAPD.