

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ**

**XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU DNA MÃ VẠCH
CHO CÁC GIỐNG CÂY ĂN TRÁI ĐẶC SẢN
CỦA VIỆT NAM KHU VỰC NAM BỘ**

Mã số: B2019-TCT-562-11

Chủ nhiệm đề tài: TS. Đỗ Tấn Khang

Cần Thơ, Tháng 1/2022

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CẤP BỘ**

**XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU DNA MÃ VẠCH
CHO CÁC GIỐNG CÂY ĂN TRÁI ĐẶC SẢN
CỦA VIỆT NAM KHU VỰC NAM BỘ**

Mã số: B2019-TCT-562-11

Xác nhận của cơ quan chủ trì đề tài

Chủ nhiệm đề tài

TS. Đỗ Tấn Khang

Cần Thơ, Tháng 1/2022

DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA ĐỀ TÀI VÀ ĐƠN VỊ PHỐI HỢP CHÍNH

1/ Những thành viên tham gia thực hiện đề tài

1. TS. Đỗ Tấn Khang
2. TS. Nguyễn Phạm Anh Thi
3. TS. Trần Thanh Mến
4. TS. Nguyễn Văn Ây
5. PGS.TS. Trần Nhân Dũng
6. CN. Trần Văn Bé Năm
7. CN. Trần Gia Huy
8. CN. Đinh Đào Tấn Phát
9. CN. Huỳnh Ngọc Hơ

2/ Đơn vị phối hợp chính

Viện Cây ăn quả Miền Nam

Tên cơ quan chủ quản: Viện Cây ăn quả Miền Nam

Điện thoại: 02733 893 129 Fax: 02733 893 122

Địa chỉ: Long Định – Châu Thành – Tiền Giang

Họ và tên thủ trưởng tổ chức: TS. Võ Hữu Thoại

MỤC LỤC

DANH SÁCH CÁC THÀNH VIÊN THAM GIA ĐỀ TÀI	i
MỤC LỤC	ii
DANH SÁCH BẢNG.....	v
DANH SÁCH HÌNH.....	vii
DANH SÁCH CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	x
THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	xi
INFORMATION ON RESEARCH RESULTS.....	xvi
PHẦN I. MỞ ĐẦU.....	1
1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	1
1.1. DNA mã vạch	1
1.1.1. Khái niệm	1
1.1.2 Các vùng DNA mã vạch.....	2
1.1.3 Các nghiên cứu về ứng dụng DNA mã vạch	6
1.2. Đa dạng di truyền	11
1.2.1 Khái niệm đa dạng di truyền.....	11
1.2.2. Đa dạng di truyền ở thực vật và tầm quan trọng	11
1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến đa dạng di truyền	12
1.2.4. Các phương pháp phân tích và ước tính đa dạng di truyền	13
1.3. Các cây ăn trái đặc sản	14
1.3.1. Cây bưởi Da Xanh	15
1.3.2 Cây cam Mật.....	18
1.3.3 Cây chôm chôm Đường.....	21
1.3.4 Cây dâu Hạ Châu	24
1.3.5. Cây măng cầu Xiêm	28
1.3.6 Cây quýt hồng Lai Vung	30
1.3.7 Cây sầu riêng Ri-6	32
1.3.8 Cây thanh long ruột đỏ	35
1.3.9 Cây vú sữa Lò Rèn	37
1.3.10. Cây xoài Cát Hòa Lộc	41
1.4. Cây đầu dòng	46
1.4.1 Giới thiệu.....	46
1.4.2 Một số khái niệm, định nghĩa	46
2. Lý do chọn đề tài.....	48
3. Mục tiêu nghiên cứu	50
4. Cách tiếp cận.....	50
5. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	50

6. Nội dung nghiên cứu.....	51
7. Phương pháp nghiên cứu	51
7.1. Phương tiện	51
7.1.1. Hóa chất.....	51
7.1.2 Thiết bị.....	52
7.1.3 Dụng cụ	52
7.2 Phương pháp	52
7.2.1 Ly trích DNA thực vật.....	52
7.2.2 Điện di DNA.....	53
7.2.3 Khuếch đại các đoạn DNA mã vạch.....	54
7.2.4 Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử ISSR.....	55
7.2.5 Phân tích dữ liệu	57
PHẦN II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	59
CHƯƠNG I. KHẢO SÁT CÂY ĐÀU DÒNG CỦA 10 LOẠI	59
CÂY ĂN TRÁI ĐẶC SẢN	59
1. Một số kết quả cây đầu dòng đã được bình tuyển và công nhận	60
2. Đặc tính nông học 10 cây ăn trái đầu dòng.....	62
2.1. Cây bưởi Da Xanh, cây cam Mật và cây quýt Hồng	62
2.2. Cây chôm chôm Đường, cây măng cầu Xiêm và cây xoài Cát Hòa Lộc.....	63
2.3 Cây sầu riêng Ri-6, cây vú sữa Lò Rèn, cây dâu Hạ Châu và cây thanh long.....	64
CHƯƠNG 2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ DNA MÃ VẠCH.....	65
VÀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN	65
1. Cây bưởi Da Xanh	65
1.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs	66
1.2. Đa dạng di truyền dấu phân tử ISSR	68
2. Cây cam Mật.....	71
2.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs.....	72
2.2. Đa dạng di truyền các giống cam dựa vào dấu phân tử ISSR.....	77
3. Cây chôm chôm Nhãn	80
3.1. Kết quả phân tích vùng trình tự DNA mã vạch.....	81
3.2. Kết quả phân tích đa hình bằng dấu phân tử ISSR	82
4. Cây dâu hạ châu	86
4.1. Kết quả phân tích vùng trình tự DNA mã vạch.....	88
4.2. Đa dạng di truyền dựa vào dấu phân tử ISSR.....	89
5. Cây măng cầu xiêm	97
5.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs.....	99
5.2. Phân tích đa dạng di truyền bằng dấu phân tử ISSR	100
6. Cây quýt hồng Lai Vung.....	103

6.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs	104
6.2. Kết quả phân tích đa dạng di truyền dựa vào dấu phân tử ISSR.....	107
7. Cây sầu riêng Ri-6	110
7.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs	111
7.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với dấu phân tử ISSR.....	113
8. Cây thanh long ruột đỏ	121
8.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch, xác định SNPs	121
9. Cây vú sữa lò rèn	126
9.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch, xác định SNPs	128
9.2. Kết quả phân tích sự đa hình chỉ thị ISSR.....	132
10. Cây xoài cát hòa lộc.....	135
10.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs	137
10.2. Kết quả phân tích đa dạng dấu phân tử ISSR.....	143
CHƯƠNG III. CƠ SỞ DỮ LIỆU DNA MÃ VẠCH.....	149
3.1 Giới thiệu	149
3.2 Cơ sở dữ liệu	149
PHẦN III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	152
1. Kết luận	152
2. Đề nghị.....	153
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	154
PHỤ LỤC	176

DANH SÁCH BẢNG

Bảng 1. Gen mã hóa loài <i>Chrysophillum cainito</i> L. trên NCBI	40
Bảng 2. Thành phần dung dịch ly trích DNA thực vật.....	52
Bảng 3. Trình tự 8 cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu.....	54
Bảng 4. Chu kỳ nhiệt PCR khuếch đại các đoạn DNA mã vạch.....	55
Bảng 5. Thành phần của phản ứng PCR.....	56
Bảng 6. Trình tự môi ISSR được sử dụng trong nghiên cứu.....	56
Bảng 7. Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR với các đoạn môi ISSR.....	57
Bảng 1.1. Danh sách cây đầu dòng được công nhận, lưu giữ và khai thác.....	60
Bảng 2.1. Kết quả thu và ký hiệu các mẫu bưởi.....	65
Bảng 2.2. Các vị trí sai khác trên vùng trình tự ITS các giống bưởi.....	68
Bảng 2.3. Danh sách giống cam được sử dụng trong thí nghiệm.....	71
Bảng 2.4. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật với các giống cam khác ở vùng gen <i>ycf1b</i>	72
Bảng 2.5. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật không hạt với các giống cam khác ở vùng gen <i>atpF-atpH</i>	74
Bảng 2.6. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật không hạt với các giống cam khác ở vùng gen <i>trnH-psbA</i>	75
Bảng 2.7. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật không hạt với các giống cam khác ở vùng gen <i>psbK-psbI</i>	76
Bảng 2.8. Danh sách các giống chôm chôm được sử dụng trong thí nghiệm.....	80
Bảng 2.9. Thống kê các dấu SNP đặc trưng trên gen <i>matK</i> của 15 trình tự thuộc chi <i>Nephelium</i>	82
Bảng 2.10. Các mẫu dâu đã thu được.....	87
Bảng 2.11. So sánh trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu khác.....	88
Bảng 2.12. So sánh trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu đối chứng	89
Bảng 2.13. So sánh trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu đối chứng ở gen <i>rbcL</i>	89
Bảng 2.14. Danh sách các mẫu được sử dụng trong thí nghiệm	98
Bảng 2.15. Kết quả so sánh các trình tự <i>rbcL</i> của các loài cây thuộc chi <i>Na</i>	99
Bảng 2.16. Kết quả so sánh các trình tự <i>rpoC1</i> của các loài cây thuộc chi <i>Na</i>	100

Bảng 2.17. Kết quả thu mẫu quýt trong nghiên cứu.....	104
Bảng 2.18. Vị trí khác biệt trên trình tự DNA của giống quýt hồng ở vùng gen ITS so với các giống khác	105
Bảng 2.19. Vị trí khác biệt trên trình tự DNA của giống quýt hồng ở vùng gen matK so với các giống khác	106
Bảng 2.20. Vị trí và kí hiệu của 20 mẫu lá sầu riêng dùng trong nghiên cứu	110
Bảng 2.21. Bảng các vị trí SNPs trong trình tự nucleotide dựa trên vùng ITS của các giống sầu riêng.....	111
Bảng 2.22. Bảng các vị trí SNPs trong trình tự nucleotide dựa trên gen matK của các giống sầu riêng.....	113
Bảng 2.23. Kết quả 5 môi được phân tích sự đa dạng giữa 20 giống sầu riêng.....	117
Bảng 2.24. Danh sách mẫu thanh long được sử dụng trong nghiên cứu.....	121
Bảng 2.25. Đa hình trình tự DNA mã vạch của 4 locus trong nghiên cứu	122
Bảng 2.26. Đa hình nucleotide ở trình tự atpF-H.....	123
Bảng 2.27. Đa hình nucleotide ở trình tự gen rbcL	124
Bảng 2.28. Đa hình nucleotide ở gen matK	125
Bảng 2.29. Ký hiệu và địa thu các mẫu của bốn giống vú sữa.....	127
Bảng 2.30. Kích thước điện di sản phẩm PCR và kích thước giải trình tự của các môi.....	129
Bảng 2.31. Các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của các giống vú sữa Lò Rèn với các giống khác	131
Bảng 2.32. Môi ISSRK1 và môi ISSRK2 và kết quả khuếch đại	133
Bảng 2.33. Danh sách các giống xoài được dùng trong thí nghiệm.....	135
Bảng 2.34. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống xoài cát Hòa Lộc với các giống xoài khác ở vùng ITS	138
Bảng 2.35. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống xoài cát Hòa Lộc với các giống xoài khác ở vùng trình tự matK	140
Bảng 2.36. Các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của các giống xoài cát Hòa Lộc với các giống khác trên trình tự rpoC1	142
Bảng 2.37. Kết quả so sánh trình tự xoài cát hòa lộc với các giống xoài khác	143

DANH SÁCH HÌNH

Hình 2.1. Kết quả so sánh vùng trình tự ycf1b của trình tự bưởi Da Xanh với các giống trong nghiên cứu.....	66
Hình 2.2. Nucleotit với các peak bằng nhau.....	67
Hình 2.3. Kết quả so sánh vùng trình tự ITS của trình tự bưởi Da Xanh với các giống trong nghiên cứu.....	67
Hình 2.4. Kết quả phân tích điện di ISSRK2	68
Hình 2.5. Kết quả phân tích điện di ISSR22	69
Hình 2.6. Biểu đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền của các giống bưởi.....	69
Hình 2.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR03	77
Hình 2.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR K2	78
Hình 2.9. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR K3	78
Hình 2. 10. Biểu đồ thể hiện mối tương quan di truyền của các mẫu cam	79
Hình 2.11. Kết quả điện di với môi ISSR 10.....	83
Hình 2.12. Kết quả điện di với môi ISSR 23.....	83
Hình 2.13. Biểu đồ phân nhánh của 8 giống chôm chôm bằng phương pháp UPGMA....	86
Hình 2.14. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 03.....	91
Hình 2.15. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 13.....	92
Hình 2.16. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 22.....	92
Hình 2.17. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 31	93
Hình 2.18. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR K1	93
Hình 2.19. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR.....	94
Hình 2.20. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR K3	94
Hình 2. 21. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 27.....	95
Hình 2.22. Biểu đồ phân nhóm các mẫu dâu	95
Hình 2.23. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại với môi ISSR 3	101
Hình 2.24. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại với môi ISSR 31	102
Hình 2.25. Biểu đồ phân nhánh của các loài cây thuộc chi Na qua phân tích dấu phân tử ISSR bằng phần mềm NTSYSpc 2.10.....	103

Hình 2.26. Kết quả điện di PCR với môi ISSRK1	107
Hình 2.27. Kết quả điện di PCR với môi ISSRK2	108
Hình 2.28. Kết quả điện di PCR với môi ISSRK3	108
Hình 2.29. Sơ đồ phả hệ mối tương quan di truyền dựa vào dấu phân tử ISSR	109
Hình 2.30. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR03	114
Hình 2.31. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR03	114
Hình 2.32. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR13	115
Hình 2.33. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR22	115
Hình 2.34. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSRK2	116
Hình 2.35. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSRK3	116
Hình 2.36. Biểu đồ hình cây thể hiện mối tương quan di truyền giữa 20 mẫu sầu riêng	120
Hình 2. 37. Kết quả điện di với sản phẩm PCR môi ISSRK1	132
Hình 2.38. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi ISSRK2	133
Hình 2.39. Sơ đồ phân nhóm của các mẫu vú sữa.....	134
Hình 2.40. Kết quả điện di mẫu PCR với môi ISSR K1	144
Hình 2.41. Kết quả điện di mẫu PCR với môi ISSR K2	144
Hình 2.42. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR03	145
Hình 2.43. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR31	145
Hình 2.44. Kết quả điện di với môi ISSR K3	146
Hình 2.45. Kết quả điện di với môi ISSR K13	146
Hình 2.46. Biểu đồ mối tương quan di truyền của các giống xoài.....	147

Phụ lục

Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi ycf1b các giống bưởi	176
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi psbK-psbI các giống bưởi.....	177
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi ITS	177
Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ITS.	178
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi rpoC1.	179
Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi atpF-atpH	179
Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi psbK-psbI.....	180
Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi psbA-trnH	180

Hình 9. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi <i>ycf1b</i>	181
Hình 10. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với môi <i>matK</i>	181
Hình 11. Kết quả điện di PCR với môi ITS	182
Hình 12. Kết quả điện di PCR với môi <i>matK</i>	182
Hình 13. Kết quả điện di PCR với môi <i>atpF-atpH</i>	183
Hình 14. Kết quả điện di PCR với môi <i>psbK-psbI</i>	183
Hình 15. Kết quả điện di PCR với môi <i>rbcL</i>	183
Hình 16. Kết quả điện di PCR với môi <i>trnH-psbA</i>	184
Hình 17. Kết quả điện di PCR với môi <i>rpoC1</i>	184
Hình 18. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại vùng gen <i>rbcL</i>	185
Hình 19. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại vùng trình tự <i>rpoC1</i>	185
Hình 20. Kết quả điện di PCR với môi ITS	187
Hình 21. Kết quả điện di PCR với môi <i>matK</i>	187
Hình 22. Kết quả điện di PCR với môi <i>atpF-atpH</i>	187
Hình 23. Kết quả điện di PCR với môi <i>psbK-psbI</i>	188
Hình 24. Kết quả điện di PCR với môi <i>rbcL</i>	188
Hình 25. Kết quả điện di PCR với môi <i>rpoC1</i>	189
Hình 26. Kết quả điện di PCR với môi <i>ycf1b</i>	189
Hình 27. Kết quả khuếch đại vùng ITS	190
Hình 28. Kết quả khuếch đại gen <i>matK</i>	191
Hình 29. Kết quả khuếch đại vùng gen <i>rpoC1</i>	191
Hình 30. Phổ điện di 8 trình tự DNA mã vạch.....	193
Hình 31. Kết quả giải trình tự các sản phẩm PCR vùng trình tự ITS và <i>matK</i>	194
Hình 32. Kết quả điện di mẫu PCR với môi ITS.....	195
Hình 33. Kết quả điện di mẫu PCR với môi <i>matK</i> (gel 5)	195
Hình 34. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>rbcL</i>	196
Hình 35. Kết quả điện di mẫu PCR với môi <i>rpoC1</i>	196
Hình 36. Kết quả điện di mẫu PCR với môi <i>ycf1b</i>	197

DANH SÁCH CÁC TỪ VIẾT TẮT

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
BLAST	Basic local alignment search tool
COI	Cytochrome c oxidase I gene
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ĐBSCL	Đồng bằng sông Cửu Long
EB	Extraction buffer
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	Internal transcribed spacer
<i>matK</i>	Maturase K gene
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nu	Nucleotide
NTSYSpc	Numerical taxonomy system for personal computer
PCR	Polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple sequence repeat
TAE	Tris-acetate EDTA buffer
TE	Tris EDTA buffer
UPGMA	Unweighted pair group method with agrithmetic mean

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thông tin chung

- Tên đề tài: Xây dựng cơ sở dữ liệu DNA mã vạch cho các giống cây ăn trái đặc sản của Việt Nam khu vực Nam Bộ
- Chủ nhiệm đề tài: TS. Đỗ Tấn Khang – Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học
- Cơ quan chủ trì: Trường Đại học Cần Thơ
- Thời gian thực hiện: 01/2019 đến 6/2021

2. Mục tiêu đề tài

Mục tiêu chung: Xây dựng được cơ sở dữ liệu DNA mã vạch cho 10 loại trái cây đặc sản của Việt Nam khu vực Nam Bộ.

Mục tiêu cụ thể:

Khảo sát và tìm được các cây đầu dòng của 10 loại cây ăn trái đặc sản ở Nam Bộ.

Giải được trình tự DNA mã vạch và phân tích được đa dạng di truyền của từng loại DNA mã vạch của từng loại cây ăn trái đặc sản dựa trên các phần mềm tin sinh học và cơ sở dữ liệu DNA, từ đó xây dựng được cơ sở dữ liệu DNA mã vạch chuẩn có giá trị nhận dạng chính xác 10 loại cây ăn trái đặc sản Nam Bộ.

3. Tính mới và sáng tạo

DNA mã vạch là một trong những công cụ ứng dụng mới trong công nghệ sinh học nông nghiệp để nhận dạng giống cây trồng. Việc đưa công cụ này vào nhận diện cây giống và các sản phẩm từ cây ăn trái là một trong những bước tiến của nông nghiệp trong ứng dụng công nghệ 4.0.

Đề tài đã xác định được các vị trí chuyên biệt của từng giống cây ăn trái đặc sản trong nhóm cây ăn trái có nhiều đặc điểm tương đồng cả về hình thái và về gen.

4. Kết quả nghiên cứu

- Bưởi Da Xanh: Dựa trên mức độ sai khác về nucleotide, ITS là trình tự tiềm năng để nhận diện giống bưởi Da Xanh. với độ tương đồng dao động trong khoảng 0,66-0,95 với khoảng dao động là 0,07 được chia thành 3 nhóm chính: nhóm I với Nhóm 2 có hệ số tương đồng là 0,76, nhóm I, II với nhóm 3 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,66.

- Cam Mật: gen ycf1b cho thấy có 5 SNPs có thể phân biệt giữa các giống cam Mật với các giống khác. Giản đồ phả hệ dựa trên dấu ISSR cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu cam Mật không hạt và các mẫu cam khác trong nghiên cứu.

- Chôm chôm: Gene matK có thể được sử dụng làm DNA mã vạch để nhận diện giống chôm chôm rừng ruột vàng, chôm chôm Java và giống chôm chôm lai Tiến Cường của Việt Nam. Phương pháp phân tích đa hình dựa trên môi ISSR này đã chia tám giống – 14 mẫu chôm chôm thành bốn nhóm lớn. Với hệ số tương đồng giữa các giống dao động từ 72 đến 100%

- Dâu hạ châu: Trình tự atpF-H thấy được trình tự của dâu Hạ Châu khác biệt hoàn toàn với các mẫu dâu đối chứng ở 11 vị trí nucleotide. Dựa trên giản đồ, cho thấy sự đa dạng di truyền giữa 12 mẫu dâu thể hiện qua hệ số tương đồng là 74%. Các mẫu dâu Hạ Châu có hệ số tương đồng với nhau khá cao nằm trong khoảng từ 0,875 - 1 và nằm chung ở 1 nhóm trên giản đồ.

- Mãng cầu xiêm: Kết quả phân tích cho thấy gene rpoC1, kết quả nghiên cứu đã đưa ra 7 vị trí sai khác nucleotide. Trong đó có 2 vị trí đặc trưng cho loài bình bát, 4 vị trí có khả năng nhận diện loài măng cầu. Kết quả trên cho thấy ISSR phù hợp để đánh giá đặc tính của ba loài Annona và có sự khác biệt đáng kể về đa dạng di truyền giữa các loài

- Quýt hồng: Kết quả phân tích trình tự vùng ITS ở cho thấy có 14 vị trí khác nhau giữa quýt hồng và các giống quýt khác. Từ kết quả xây dựng giản đồ phả hệ ISSR cho thấy, mức độ tương đồng của các mẫu biến thiên từ 0,49 đến 1,00.

- Sầu riêng Ri-6: Phát hiện 6 SNPs giữa các trình tự của các mẫu sầu riêng. Trong đó có một SNP đặc trưng cho giống sầu riêng Ri-6 là vị trí 444, ở sầu riêng Ri-6 là G trong khi các giống còn lại là C. Kết quả phân tích dựa vào dấu phân tử ISSR đã phân chia 20 giống sầu riêng thu được ở bốn tỉnh của vùng ĐBSCL chia thành các 5 nhóm có hệ số tương đồng dao động khá xa trong khoảng 0,61 – 0,97.
- Thanh long ruột đỏ: Giống thanh long ruột đỏ Viện Cây ăn quả miền Nam được xác định bởi ba locus, *atpF-H* + *rbcL* + *matK*.
- Vú sữa lò rèn: Khi dựa trên trình tự DNA vùng *atpF-atpH* cho thấy có sự khác biệt giữa năm giống vú sữa Lò Rèn, vú sữa bơ hồng, vú sữa bơ tím, vú sữa tím và vú sữa Mica. Phân tích đa dạng di truyền bằng dấu ISSR cho thấy các giống vú sữa có độ tương đồng từ 0,68 đến 1,00 trong đó các giống vú sữa Lò Rèn được tách thành một nhánh riêng.
- Xoài cát Hòa Lộc: Qua kết quả phân tích vùng trình tự *matK* xuất hiện đa dạng vị trí biến đổi xảy ra ở hầu hết các vị trí ở 16 trình tự, trong đó có 27 vị trí có thể nhận diện xoài cát Hòa Lộc với các mẫu còn lại. Dựa trên dấu phân tử ISSR, các mẫu xoài được chia thành 2 nhóm với hệ số tương đồng trung bình là 0,67.

5. Sản phẩm

Sản phẩm khoa học:

- 05 bài báo quốc tế

- + 01 bài đăng trên Asian Journal of Plant Sciences 20(3) (2021) – Q3
- + 01 bài đăng trên Biodiversitas 2021 – Q3 (vượt 01 so với thuyết minh)
- + 01 bài đăng trên Asian Journal of Agriculture and Biology 2021(2) – Q4
- + 02 bài đăng trên International Journal of Agriculture and Biological Sciences 04(2021) (vượt 02 so với đăng ký thuyết minh).

- 02 bài báo trong nước

- + 01 bài đăng trên Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
- + 01 bài đăng trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam
- 01 Sách chuyên khảo: “DNA mã vạch và đa dạng di truyền cây ăn trái”.

Sản phẩm đào tạo:

- Đào tạo thành công 06 thạc sĩ (vượt 04 so với đăng ký thuyết minh)

Sản phẩm ứng dụng:

- 01 Cơ sở dữ liệu về DNA mã vạch của 10 giống cây ăn trái đặc sản của Việt Nam (<https://dnavf.ctu.edu.vn/>)

- 01 Thư viện DNA mã vạch của 10 giống cây ăn trái đặc sản của Nam Bộ

6. Hiệu quả, phương thức chuyển giao kết quả nghiên cứu và khả năng ứng dụng vào thực tế

6.1. Hiệu quả

Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu này là một bước đột phá của vùng đồng bằng sông Cửu Long nói chung và của Trường đại học Cần Thơ nói riêng. Cơ sở dữ liệu DNA của các loại cây ăn trái đặc sản của Nam Bộ được lưu giữ tại trường làm cơ sở cho các tra cứu về gen cho các nghiên cứu liên quan. Đề tài còn hỗ trợ luận văn cho học viên cao học của trường. Các luận văn và luận án này là nguồn tài liệu tham khảo quý cho các học viên tiếp theo cũng như cho các nhà khoa học cùng lĩnh vực nghiên cứu.

Đối với lĩnh vực giáo dục và đào tạo

Công nghệ sinh học của Việt Nam đang phát triển khá chậm so với thế giới, do đó những công trình về gene sẽ tăng tốc cho sự phát triển của khoa học nước ta. Đề tài cho ra các sản phẩm khoa học là các bài báo và sách về công nghệ DNA của thực vật. Đây là một trong những lĩnh vực quan trọng của công nghệ sinh học, có thể sử dụng như các tài liệu giảng dạy ở các cơ sở đào tạo ngành công nghệ sinh học và các ngành gần có liên quan.

Đối với lĩnh vực khoa học và công nghệ có liên quan

Xác định và lưu giữ cây đầu dòng cho việc sản xuất và nhân giống cây ăn trái ở khu vực Nam Bộ. Kết quả nghiên cứu tạo tiền đề quan trọng cho hướng nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử vào việc phân loại, giám định, đánh giá đa dạng di truyền, bảo tồn và quản lý thương mại nguồn tài nguyên sinh vật ở nước ta, cụ thể là các loại cây ăn trái đặc sản trên toàn lãnh thổ.

Đối với phát triển kinh tế-xã hội

Ngoài giá trị khoa học xác định giống cây ăn trái, một hệ thống quản lý giống dựa vào DNA mã vạch sẽ giúp chúng ta quản lý được tài nguyên di truyền để khai thác hiệu quả nhất và có đủ cơ sở khoa học để chứng minh được quyền sở hữu quốc gia

đối với nguồn tài nguyên sinh học, khi Việt Nam gia nhập tổ chức thương mại quốc tế.

6.2. Phương thức chuyển giao kết quả

- Cơ sở dữ liệu DNA mã vạch của 10 loại cây ăn trái được công khai trên internet và được xem như chứng minh thư của các loại cây ăn trái này. Các tổ chức nghiên cứu trong nước và thậm chí nước ngoài có thể sử dụng làm trình tự tham khảo khi nghiên cứu về gen của các cây trồng tương tự.
- Có khả năng ứng dụng trong quản lý giống cây trồng ở các trung tâm giống và trung tâm ứng dụng tiến bộ khoa học công nghệ.

Cơ quan chủ trì

Chủ nhiệm đề tài

TS. Đỗ Tấn Khang

INFORMATION ON RESEARCH RESULTS

1. General information

- Project title: Establishing DNA barcodes database of special fruits in Southern area, Vietnam
- Coordinator: PhD. Do Tan Khang
- Implementing institution: Can Tho University
- Duration: from 01/2019 to 6/2021

2. Objective(s)

General objective: Establishing DNA barcodes database of 10 special fruits in Southern of Vietnam.

Detailed objectives:

Evaluating the status of 10 approved special fruit trees in Southern of Vietnam.

Sequencing DNA barcodes and analysing genetic diversity of each DNA barcode of fruits based on bioinformatics softwares for establishing DNA barcodes database which can be applied in authenticating 10 special fruits in Southern of Vietnam.

3. Creativeness and innovativeness

DNA barcoding and metabarcoding have potential in the context of quality control of both well and poorly regulated supply systems. Standardisation of protocols for DNA barcoding and DNA sequence-based identification are necessary before DNA-based biological methods can be implemented as routine analytical

approaches and approved by the competent authorities for use in regulated procedures.

4. Research results

- “Da xanh” pomelo: Based on the degree of nucleotide difference, ITS is a potential sequence to identify the green-skinned pomelo variety. The similarity ranging from 0.66-0.95 with a range of 0.07 divided into 3 main groups: group I with Group 2 with similarity coefficient of 0.76, group I, II with similarity coefficient of 0.76. group 3 has the lowest similarity coefficient of 0.66.

- “Mat” orange (*Citrus sinensis* L.): the *ycf1b* gene shows that there are 5 SNPs that can distinguish honey orange varieties from other varieties. The pedigree based on the ISSR marker showed that there were genetic differences between the seedless orange samples and the other orange samples in the study.

- “Nhan” rambutan: The *matK* gene can be used as a barcoded DNA to identify the yellow-fleshed forest rambutan, Java rambutan and Tien Cuong hybrid rambutan from Vietnam. This ISSR primer-based polymorphism analysis divided eight varieties – 14 rambutan samples into four large groups. With similarity coefficients between varieties ranging from 72 to 100%.

- “Ha Chau” Burmese grape: *AtpF-H* sequence showed that the sequence of “Ha Chau” Burmese grape was completely different from the control samples at 11 nucleotide positions. Based on the diagram, it shows that the genetic diversity between 12 strawberry samples is expressed through a similarity coefficient of 74%. “Ha Chau” mulberry samples have a relatively high similarity coefficient, ranging from 0.875 to 1 and are in the same group on the diagram.

- “Xiem” soursop (*Annona* spp.): The analysis results showed that the *rpoC1* gene, the research results gave 7 positions of nucleotide difference. In which, there are 2 positions specific to the species of bowl, 4 positions are capable of identifying the custard apple species. The above results show that the ISSR is suitable for characterization of three *Annona* species and there is a significant difference in genetic diversity between species.

- “Hong Lai Vung” mandarin: The results of sequencing analysis in the ITS region show that there are 14 different positions between “Hong Lai Vung” mandarin and

other varieties of mandarin. From the results of ISSR marker, the similarity level of the samples varied from 0.49 to 1.00.

- “Ri-6” durian: Detecting 6 SNPs between sequences of durian samples. Among them, there is a specific SNP for durian variety Ri-6 at position 444, in durian Ri-6 it is G while the rest is C. Analysis results are based on molecular markers ISSR has divided 20 Durian varieties obtained in four provinces of the Mekong Delta were divided into five groups with similarity coefficients ranging from 0.61 to 0.97.

- “Ruot do” dragon fruit: Red flesh dragon fruit variety was identified by three loci, *atpF-H + rbcL + matK*.

- “Lo Ren” star apple: Based on the DNA sequence of *atpF-atpH* region, there are differences between five varieties of Lo Ren suckling, pink buttermilk, purple buttermilk, purple breast, and Mica. Genetic diversity analysis using ISSR markers showed that all varieties have similarity from 0.68 to 1.00 in which the Lo Ren suckling varieties were classified into a separated clade.

- “Hoa Loc” mango: Through the analysis of the *matK* sequence region, a variety of variable positions occurred in most of the 16 sequences, of which 27 positions could identify Hoa Loc mango. with the rest of the samples. Based on the ISSR molecular marker, the mango samples were divided into 2 groups with an average similarity coefficient of 0.67.

5. Products

Scientific products:

- 05 international articles

+ 01 article published in Asian Journal of Plant Sciences 20(3) (2021) – Q3

+ 01 article published in Biodiversitas 2021 – Q3

+ 01 article published in Asian Journal of Agriculture and Biology 2021(2) (2021) – Q4

+ 02 article published in International Journal of Agriculture and Biological Sciences 04(2021)

- 02 national articles

+ 01 article published in Scientific Journal of Can Tho University

+ 01 article published in Journal of Sciences and Agricultural Technology of Vietnam

- 01 book: “DNA barcode and genetic diversity of fruits”.

Educational products:

- Supporting for 06 master theses.

Applicable products:

- Library of DNA barcodes of fruit trees.
- Database of DNA barcodes of 10 fruit varieties (<https://dnavf.ctu.edu.vn/>).

6. Effects, transfer alternatives of research results and applicability

6.1 Effects

- For organizations: storing and maintaining genetic resources of fruit trees in order to use for research and agricultural production.
- The applied institutions: the result brings scientific and practical benefits to researchers and farmers, and it helps farmers in selecting of varieties.
- Evaluating and concluding the feasible of DNA barcode application in agriculture.

6.2 Method of transferring results

DNA barcoding can be used for authenticating products based on single herbal ingredients and DNA metabarcoding for assessment of species diversity in processed products, and both methods should be used in combination with appropriate hyphenated chemical methods for quality control. Standardisation of protocols for DNA barcoding and DNA sequence-based identification are necessary before DNA-based biological methods can be implemented as routine analytical approaches and approved by the competent authorities for use in regulated procedures.

PHẦN I. MỞ ĐẦU

1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. DNA mã vạch

1.1.1. Khái niệm

Khái niệm DNA mã vạch được Paul Heber, một nhà nghiên cứu tại Đại học Guelph, Ontario đưa ra lần đầu tiên vào năm 2003, nhằm giúp nhận diện các mẫu vật (Hebert, 2003). Mã vạch được sử dụng là một đoạn DNA ngắn từ một phần của hệ gen và được dùng giống như cách một máy quét ở siêu thị phân biệt được các sản phẩm bằng cách nhận diện được các sọc màu đen đặc trưng của từng sản phẩm. Trong công nghệ mã vạch, có thể hai mặt hàng trông rất giống nhau và không phân biệt được bằng mắt thường, song qua mã vạch, máy quét có thể phân biệt được. DNA mã vạch là quá trình xác định các loài dựa trên sự đa dạng nucleotide của các đoạn DNA ngắn (Vijayan and Tsou, 2010). Các chuỗi DNA ngắn được chuẩn hóa có chiều dài từ 400-800 cặp base mà theo lý thuyết có thể dễ dàng phân lập và đặc trưng cho tất cả các loài thực vật trên hành tinh (Kress, 2017).

Bằng cách kết hợp các thể mạnh của di truyền phân tử, công nghệ giải trình tự và tin sinh học, DNA mã vạch cung cấp thông tin để tạo ra một hệ thống quản lý giống dựa vào các kỹ thuật sinh học phân tử sẽ giúp chúng ta quản lý được tài nguyên di truyền để bảo tồn, khai thác hiệu quả nhất tài nguyên này và có đủ cơ sở khoa học để chứng minh được quyền sở hữu quốc gia đối với nguồn tài nguyên sinh học, khi Việt Nam gia nhập AFTA và tổ chức thương mại quốc tế (Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang, 2012).

Theo Kress and David (2007), để tạo được DNA mã vạch, một vùng gen phải đáp ứng ba tiêu chí:

- Có sự biến đổi giữa các loài nhưng ổn định và có tính đặc hiệu bên trong loài hoặc biến đổi không đáng kể.
- Có các vị trí sườn được bảo tồn để phát triển các mồi PCR phổ quát cho ứng dụng phân loại rộng rãi.
- Độ dài chuỗi ngắn để tạo điều kiện thuận lợi cho khả năng trích xuất và khuếch đại DNA.

1.1.2 Các vùng DNA mã vạch

Khác với các chỉ thị hình thái và sinh hóa, DNA mã vạch không giới hạn về số lượng, không ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường và giai đoạn phát triển của cây. DNA mã vạch được sử dụng nhiều trong nghiên cứu quan hệ di truyền, phát sinh chủng loại và phân loại phân tử; trong lập bản đồ liên kết di truyền, nhận biết gen và trong chọn giống bao gồm đánh giá đa dạng di truyền, nhận biết giống, chọn lọc các tính trạng kháng bệnh, chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường, năng suất và phẩm chất giống. Mỗi loại DNA mã vạch được phát triển bằng một kỹ thuật tương ứng. Kỹ thuật chỉ thị DNA lý tưởng cần phải có các tiêu chí sau: Cho đa hình cao và phân bố đều trong genome; Cho sự phân biệt rõ sự khác nhau về di truyền, tạo nhiều chỉ thị độc lập và chính xác; Đơn giản, nhanh và ít tốn kém; cần ít mẫu và DNA; Liên kết với kiểu hình nhất định; Có thể lặp lại trong các nghiên cứu, mức độ sai sót thấp nhất, ghi số liệu dễ và chính xác, có nhiều allele (hàm lượng thông tin cao), không cần biết trước thông tin về genome (Nguyễn Đức Thành, 2014).

DNA mã vạch từ vùng gen trong nhân

Theo Vijayan and Tsou (2010), các trình tự barcode được nhân bản từ DNA hệ gen của bố mẹ dự kiến sẽ cung cấp nhiều hơn thông tin về các loài cần xác định. Tuy nhiên khó khăn trong việc khuếch đại PCR từ gen nhân vì gen nhân chủ yếu là đơn gen hoặc có bản sao gen thấp, đặc biệt từ sự suy thoái và chất lượng DNA genome và khả năng phân biệt dưới loài do bảo toàn gen chức năng có thể chính là lý do tại sao hạn chế số lượng các gen nhân được thử nghiệm trong xác định loài bằng phương pháp DNA barcode.

Vùng trình tự ITS

Theo Yao et al. (2010) gen rDNA là hệ thống đa gen mã hóa phần RNA của ribosome. Các gen DNA ribosome (rDNA) mang trình tự vừa có tính bảo thủ vừa có tính đa dạng thích hợp để phân biệt các loài gần gũi. Trong tế bào, rDNA được sắp xếp như các đơn vị được lặp lại ngẫu nhiên bao gồm DNA mã hóa ribosome 18S, 5,8S, 28S và xen giữa các trình tự không mã hóa ITS1, ITS2 (internal transcribed spacers) nằm ở hai bên sườn của vùng 5,8S. Vùng mã hóa của ba gen rDNA được bảo tồn cao hơn hai vùng ITS.

Vùng ITS có kích thước nhỏ (600-700bp) và trình tự lặp lại cao lên tới 30.000 bản trong mỗi tế bào nên dễ dàng được khuếch đại từ mẫu DNA nhỏ, loãng hay bị

thoái hóa cao, cũng có một số nghiên cứu chứng minh rằng vùng ITS có sự đa dạng cao trong việc phân biệt kiểu hình. Điều này làm cho ITS trở thành đề tài được quan tâm cho việc nghiên cứu về sự tiến hóa và phát triển loài (Baldwin et al., 1995). Trong ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, đoạn mỗi ITS1 và ITS4 được xem là đoạn mỗi tiêu chuẩn sử dụng để biết được sự đa dạng di truyền (Gardes and Bruns, 1993).

DNA mã vạch từ plastid

Lục lạp (chloroplast) là bào quan phổ biến và đóng vai trò quan trọng trong thế giới thực vật, là nơi thực hiện chức năng quang hợp, tạo ra năng lượng cho tế bào. Lục lạp có hệ thống di truyền riêng (có DNA) và hệ tổng hợp protein độc lập (có chứa ribosome, các loại RNA). DNA của lục lạp cũng có cấu tạo giống DNA của prokaryote (vi khuẩn và tảo lam) có cấu trúc vòng, không chứa histon. DNA của lục lạp chứa thông tin mã hóa cho một số protein mà lục lạp tự tổng hợp trên ribosome của mình. DNA lục lạp là nhân tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể. Người cho rằng trong quá trình phát sinh chủng loại, lục lạp được hình thành do sự cộng sinh của một loài vi khuẩn lam trong tế bào (Dyal et al., 2004). Với tốc độ tiến hóa chậm, khá bảo thủ về kích thước, cấu trúc và thành phần gen, đặc biệt giữa các loài trong cùng chi, gen trên lục lạp thường được sử dụng để nhận dạng và đánh giá mối quan hệ di truyền của các loài ở nhiều cấp độ (Ravi et al., 2008). Mã vạch phân tử ở thực vật dựa trên các đoạn DNA ngắn trong hệ gen lục lạp, có thể đảm bảo được tốc độ tiến hóa, thao tác dễ dàng, phù hợp làm DNA mã vạch.

Trình tự gen *rbcL*: trong các gen lục lạp thể, *rbcL* là trình tự gen đặc trưng nhất, mã hóa các tiểu đơn vị lớn của rubulose-1,5-bisphosphate cacboxylase/oxygenase (RUBISCO). *rbcL* là gen đầu tiên được giải trình từ thực vật. *rbcL* đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phát sinh loài và phân loại thực vật với hơn 10000 trình tự *rbcL* có sẵn trong GenBank. Tuy nhiên, do khả năng phân biệt loài thấp, nên hầu hết các nhóm đều cho rằng nên sử dụng kết hợp *rbcL* với các với các chỉ thị barcode khác, ví dụ như *matK* là hai locus barcode chuẩn cho thực vật (Yong et al., 2010).

Trình tự gen *matK*: trong số các gen lục lạp, *matK* là một trong những gen tiến hoá nhanh nhất, có kích thước khoảng 1550 bp và mã hóa cho enzyme maturase liên quan đến quá trình loại bỏ các intron loại 2 trong quá trình phiên mã RNA. Do *matK* tiến hoá nhanh và có mặt hầu hết trong thực vật nên đã được sử dụng như một chỉ thị

trong nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài và phát sinh loài ở thực vật (Vijayan and Tsou, 2010).

Trình tự gen *rpoB* và *rpoC1*: gen *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2* mã hóa ba trong 4 tiểu đơn vị của RNA polymerase lục lập. Khi nghiên cứu họ Dipterocarpaceae, Tsumura *et al.*, (1996) đã nhận thấy gen *rpoB* là thích hợp để nghiên cứu phát sinh loài. Hiện nay *rpoB* là gen được sử dụng nhiều trong nghiên cứu phát sinh loài và xác định các loài vi khuẩn, đặc biệt là khi nghiên cứu các chủng có quan hệ gần gũi. Cùng với gen 16S rRNA, *rpoB* được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để xác định loài vi khuẩn mới. Do vậy cần có các nghiên cứu tiếp theo để chứng minh sự phù hợp khi sử dụng *rpoB* và *rpoC1* làm chỉ thị barcode trong các nghiên cứu giám định loài (Wu *et al.*, 2006).

Trình tự gen *ycf5*: *ycf5* mã hóa cho một protein có chứa 330 amino acids. Gen này được bảo tồn trên tất cả các vùng thực vật và đã được kiểm nghiệm cho phù hợp với DNA barcode của một vài nhóm. Tuy nhiên, gen này chưa được công nhận và sử dụng nhiều trong vai trò của một DNA barcode (Van *et al.*, 2009).

Trình tự gen *ycf1b*: Là gen lớn thứ hai trong hệ gen plastid, *ycf1* mã hóa một protein gồm khoảng 1.800 axit amin. Các thí nghiệm gần đây cho thấy *ycf1* cần thiết cho khả năng sống của cây và mã hóa Tic214, một thành phần quan trọng của phức hợp *Arabidopsis* TIC (Kikuchi *et al.*, 2013). Trong bộ gen plastid, *ycf1* trải dài các bản sao đơn nhỏ (SSC) và vùng lặp lại ngược (IR). Phần *ycf1* trong vùng IR ngắn (dài dưới một kilobase) và được bảo toàn. Ngược lại, phần *ycf1* trong vùng SSC có sự biến đổi trình tự cao ở cây hạt kín. Vùng này của gen *ycf1* thay đổi nhiều hơn so với *matK* trong hầu hết các đơn vị phân loại được điều tra cho đến nay (Oliver *et al.*, 2010) và đã được sử dụng trong hệ thống phân loại học phân tử ở các cấp phân loại thấp. Hai vùng trong *ycf1* là *ycf1a* và *ycf1b*, đã được dự đoán là có độ đa dạng nucleotide cao nhất (π) ở cấp độ loài trong hệ gen plastid của cây hạt kín. Bởi vì *ycf1* quá dài (5709 bp trong *Nicotiana glauca*) và quá thay đổi để cho phép thiết kế các đoạn môi phổ biến, nó đã ít được chú ý cho mục đích DNA mã vạch hoặc hệ thống phân tử ở mức độ phân loại thấp. Tuy nhiên, sự biến đổi cao của *ycf1* cho thấy giá trị tiềm năng của nó trong DNA mã vạch của thực vật trên cạn. Theo nghiên cứu của Dong *et al.* (2015) *ycf1b* có chiều dài khoảng 800-900bp cho thấy khả năng phân biệt cao nhất trong 3 môi là *matK*, *rbcL* và *ycf1a*.

Trình tự vùng *psbK-psbI*: *psbK* và *psbI* là 2 gen nằm trong hệ gen mã hóa hai

polypeptit khối lượng phân tử nhỏ là K và I của photo-hệ thống II trong pha sáng quang hợp (*psbK* và *psbI*, tương ứng). Hệ thống quang II (PSII) là một trong bốn hệ siêu phân tử phức hợp nhiều protein của thylakoid- lục lạp tham gia vào phản ứng pha sáng của quang hợp (Herrmann *et al.*, 1985; Grey 1987). PSII có khoảng 20 polypeptit khác nhau, trong đó ít nhất 12 polypeptit được mã hóa trong bộ gen lục lạp (Sugiura, 1989). Chúng bao gồm: D1 (*psbA*) và D2 (*psbD*), liên kết với chất diệp lục, pheophytin và các phân tử plastoquinon của trung tâm phản ứng; 47kDa (*psbB*) và 43kDa (*psbC*) chlorophyll-apoprotein 10 kDa phosphoprotein (*psbH*); hai đơn vị con của cy-tochrome b559 (*psbE*, *psbF*) và năm khối lượng phân tử nhỏ là các polypeptit PSII (*psbL*, *K*, *L*, *M* và *N*). mà vùng giữa 2 đoạn gen *psbK-psbI* là vùng không mã hóa cho bất cứ polypeptit nào, chúng được chèn ở giữa 2 gen *psbK* và *psbI* có nhiệm vụ chính là điều hòa hoạt động cũng như chỉnh sửa gen.

Trình tự vùng *trnH-psbA*: có kích thước trung bình khoảng 450 bp, nhưng thay đổi từ 296 đến 1120 bp, *trnH-psbA* được chứng minh là có khả năng xác định loài cao. Locus *trnH-psbA* đã được khuếch đại thành công ở nhiều thực vật hạt kín và hạt trần. Tuy nhiên, trong nhiều thực vật hạt kín *trnH-psbA* lại có kích thước rất ngắn (~ 300 bp), kích thước của gen này thay đổi lớn do sự có mặt của gen *rpS19* hoặc các gen giả nằm giữa cùng gen của hai gen *trnH* và *psbA* (Storchova and Olson, 2007).

Trình tự vùng *trnL(UAA)-trnF(GAA)*: locus *trnL* (UAA) - *trnF* (GAA) chứa gen *trnL* (UAA), vùng intron và vùng nằm giữa hai gen *trnL* (UAA) và *trnF* (GAA). Taberlet và đtg là nhóm nghiên cứu đầu tiên sử dụng *trnL* trong các nghiên cứu hệ thống học thực vật. Vùng không mã hoá *trnL(UAA)* và *trnF* (GAA) không phải là vùng có sự biến đổi lớn nhất của DNA lục lạp nhưng có ưu thế như cấu trúc bậc 2 với vùng biến đổi và vùng bảo thủ xen kẽ nhau (Yong *et al.*, 2010).

Trình tự vùng *atpF-atpH*: Các gen *atpF* và *atpH* mã hóa ATP synthase tương ứng với tiểu đơn vị CFO I và CFO III. Vùng gen này khuếch đại PCR dễ dàng hơn nhưng việc sắp xếp các chuỗi khó khăn do sự thay đổi độ dài đáng kể 218-847 bp. Vì thế, nó được dùng là một locus bổ sung kết hợp với *matK* để mã hóa cho thực vật và vùng gen này được liệt kê là một trong những locus bổ sung với locus khác để góp phần phân loại các nhóm tốt hơn.

1.1.3 Các nghiên cứu về ứng dụng DNA mã vạch

Nghiên cứu trong nước

Một nghiên cứu khác của Võ Công Thành và Huỳnh Kỳ (2001) đã nhận định “Qua phân tích 42 cây xoài cát Hòa Lộc chúng tôi nhận thấy sự hiện diện các băng không đồng nhất với nhau nhưng các băng đặc biệt thì rất giống với xoài Tượng. Từ đó cho thấy đây là giống thuộc loài *Mangifera indica* nhưng do ảnh hưởng của gốc ghép nên có sự khác biệt như trên”.

Nguyễn Thanh Nhân *et al.* (2004) đã ứng dụng RAPD marker phân biệt giống và phân tích nhóm các giống/loài thuộc chi *Citrus* ở Việt Nam. 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.

Hoàng Tấn Quảng *et al.* (2011) đã tiến hành đánh giá đa dạng di truyền trên cây Thanh Trà (*Citrus grandis* L.) tại Thừa Thiên Huế, Việt Nam. kết quả cho thấy chúng có sự khác biệt đáng kể về hầu hết các đặc điểm hình thái của cây và quả như kích thước cây và lá, hình dạng và kích thước quả. Sự biến đổi di truyền của các cây Thanh Trà cũng được đánh giá bằng cách sử dụng chỉ thị phân tử RAPD. Tất cả 68 đoạn gen được khuếch đại cho thấy tính đa hình giữa các cây, với số điểm đánh dấu đa hình trung bình trên mỗi mẫu là 7,56. Số lượng các gen được khuếch đại trên mỗi mẫu thay đổi từ 5 đến 11, với kích thước của chúng dao động trong khoảng từ 305 đến 2.354 bp.

Lê Văn Hậu *et al.* (2018) đã tiến hành định danh các mẫu Bo Bo (*Moina* sp.) tại năm tỉnh thành thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Bến Tre và Long An) bằng cả hình thái và chỉ thị phân tử DNA mã vạch nằm trên gen ty thể cytochrome oxidase subunit I (*mtCOI*). Nghiên cứu đã giải trình tự thành công đoạn gen *mtCOI* của 48 mẫu *Moina* sp. phân lập được. Kết quả phân tích cho thấy loài *M. micrura* hiện diện nhiều nhất, kể đến là loài *M. macrocopa*. Các mẫu *Moina* spp. được phân thành năm nhóm di truyền; trong đó, 31/48 mẫu thuộc nhóm I tương đồng 99% với *M. micrura*; 4/48 mẫu thuộc nhóm V, tương đồng 99% với loài *M. macrocopa*; 8/48 mẫu thuộc nhóm II, 4/48 mẫu thuộc nhóm III và 1/48 mẫu thuộc nhóm IV chứa trình tự gen *mtCOI* có sự tương đồng thấp hơn 90% so với các loài

Moina đã được công bố trên Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI), Hoa Kỳ nên có khả năng là những loài mới, chưa có trình tự *mtCOI* cập nhật trên ngân hàng gen.

Vũ Thị Như Trang *et al.* (2018) đã tiến hành phân tích đặc điểm hình cây Thỏ nhân sâm (*Talinum Paniculatum*) và trình tự nucleotide vùng ITS, gen *rpoC1* và *rpoB*. Kết quả, vùng ITS, hai đoạn gen *rpoC1* và *rpoB* được phân lập từ cây Thỏ nhân sâm có kích thước tương ứng là 643 bp, 595 bp và 518 bp kết hợp với đặc điểm phân tích hình thái thì các mẫu Thỏ nhân sâm thu tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam được xác định thuộc loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ rau sam (Portulacaceae).

Để hỗ trợ cho việc định danh loài Bảy lá một hoa Việt Nam - *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li phục vụ nghiên cứu chọn tạo giống và nhân trồng, Nguyễn Tiến Dũng *et al.* (2018) đã mô tả, xác định đặc điểm hình thái đặc trưng và phân tích mã vạch DNA dựa trên hai vùng gene ITS và *psbA-trnH*. Kết quả so sánh giữa 2 vùng này cho thấy ITS có khả năng phân biệt loài Bảy lá một hoa Việt Nam với các loài khác trong chi *Paris* tốt hơn với độ biến thiên trình tự giữa các loài cao hơn so với *trnH-psbA*.

Hồ Viết Thế *et al.* (2019) đã ứng dụng chỉ thị phân tử để nhận diện giống mít không hạt. Nghiên cứu sử dụng hai chỉ thị phân tử RAPD và ISSR cùng với hai chỉ thị mã vạch trên hai vùng gen *matK* và *rbcL* nhằm phân biệt giống mít không hạt với hai giống mít phổ biến hiện nay là mít Nghệ và mít Thái. Kết quả cho thấy có sự khác biệt trong cấu trúc của 3 loại mít này. Đối với chỉ thị RAPD, tỉ lệ đa hình từ 20 primer phân bố từ 25% tới 100%. Đối với chỉ thị ISSR, tỉ lệ đa hình của 20 primer phân bố từ 45,5% đến 100% có hai vạch băng dùng có thể sử dụng phân biệt giống mít không hạt với hai giống còn lại. Đối với mã vạch DNA, kết quả cho thấy có sự khác biệt trong hai vùng gen này giữa giống mít không hạt và hai giống mít còn lại. Các kết quả về chỉ thị phân tử cho thấy giống mít không hạt có họ hàng gần với giống mít Thái.

Các nghiên cứu đã tạo tiền đề quan trọng cho hướng nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử vào việc phân loại, giám định, đánh giá đa dạng di truyền, nguồn tài nguyên sinh vật ở nước ta.

Nghiên cứu ngoài nước

Các nhà nghiên cứu của CBOL (2009) đã khảo sát 7 loại mã vạch DNA từ lục lạp bao gồm 3 loại không mã hóa (*atpF-atpH*, *trnH-psbA* và *psbK-psbI*) và 4 loại mã hóa (*matK*, *rbcL*, *rpoB* và *rpoC1*). Qua phân tích 907 mẫu vật thuộc 550 loài bao gồm thực vật hạt kín (445 loài), hạt trần (38 loài), dương xỉ và rêu (67 loài), dựa trên các tiêu chí về chất lượng của trình tự DNA mã vạch, hiệu quả khuếch đại và nhận diện loài (87,5%), tổ hợp *matK* và *rbcL* được xem như mã vạch đặc thù cho nhóm thực vật trên cạn. Trong khi đó, các mã vạch *trnH-psbA* và *psbK-psbI* mặc dù có khả năng phân biệt loài tốt nhưng do tỷ lệ nucleotide lặp lại cao gây khó khăn trong quá trình giải trình tự.

Yu *et al.* (2011) đã tiến hành nghiên cứu nhằm tìm ra một chỉ thị mã vạch DNA thích hợp cho việc nhận diện loài. Bốn vùng mã hóa của bộ gene lục lạp bao gồm *matK*, *rpoB*, *rpoC1* và *rbcL*, thu thập từ 59 mẫu vật thuộc nhóm cam chanh (Citrus) và những cây họ hàng gần đã được sử dụng. *matK* cho hiệu quả tốt nhất so với các vùng khác trong khi *rpoB* và *rpoC1* không cho kết quả khác biệt rõ ràng còn *rbcL* cho kết quả phân tích với hiệu quả trung bình.

Hidayat *et al.* (2012) đã sử dụng gene mã hóa maturase K nằm trên bộ gene lục lạp để phân tích 19 loài thuộc chi *Mangifera* thu thập từ Indonesia và Thái Lan. Phân tích phả hệ cho thấy *matK* có thể nhận diện và chia chi *Mangifera* thành ba nhóm chính. Ngoài ra, mã vạch *matK* có khả năng nhận diện các giống xoài đến từ Thái Lan. Kết quả phân tích còn cho thấy sự khác biệt trong trình tự gene *matK* của hai loài *M. laurina* và *M. macrocarpa* giữa Indonesia và Thái Lan.

Madesis *et al.* (2012) khi nghiên cứu phân loại 25 giống cây họ đậu ở Địa Trung Hải bằng việc sử dụng gen *rpoC1* và một số gen khác đã có nhận xét rằng, khi sử dụng kết quả phân tích gen *rpoC1* có khả năng xác định được 72% trong tổng số cây họ đậu nghiên cứu (Vijayan *et al.*, 2010).

Các nhà sinh thái học sử dụng DNA mã vạch thực vật như một công cụ hữu ích muốn tìm hiểu các yếu tố, chẳng hạn như nhóm đa dạng loài và đặc điểm chức năng, điều khiển sự tập hợp các loài vào nhóm sinh thái (Swenson, 2012).

Tripathi *et al.* (2013) đã tiến hành kiểm tra độ hữu hiệu của 5 locus mã vạch thực vật (*rbcL*, *matK*, ITS, *trnH-psbA*, và ITS2) trên 300 mẫu cây trồng nhiệt đới. *rbcL* là

locus tốt nhất với khả năng khuếch đại trong PCR và giải trình tự tốt nhất. ITS và *trnH-psbA* là hai locus cho hiệu quả thứ nhì sau *rbcL*. Khả năng phân biệt và nhận diện loài của ITS dao động từ 24,4% đến 74,3%, từ 25,6% đến 67,7% đối với *trnH-psbA* phụ thuộc vào dữ liệu và phương pháp sử dụng. *matK* và ITS2 cho hiệu quả khuếch đại PCR kém nhất. Độ phân tích loài khi dùng ITS2 và *rbcL* dao động từ 9,0-48,7% và 13,2-43,6%. Việc kết hợp giữa ITS và *trnH-psbA* cho hiệu quả nhất định trong phân tích đa dạng di truyền, đặc biệt đối với các loài thực vật nhiệt đới, khi so sánh với độ hiệu quả chuẩn của chương trình mã vạch DNA được báo cáo ở thời điểm hiện tại. Việc sử dụng *rbcL* và *matK* làm mã vạch cho các loài thực vật nhiệt đới không cho hiệu quả tốt.

Năm 2014, nghiên cứu xác định các loài trong họ Sapotaceae từ rừng Đại Tây Dương tác giả đã dùng bốn vùng gen đánh dấu mã vạch thực vật để đánh giá các gen lục lạp như *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* và vùng ITS để xác định các loài trong họ Sapotaceae. Kết quả ITS mang lại khoảng cách giữa các loài khác nhau trung bình cao nhất (0,125), tiếp theo là *trnH-psbA* (0,009), đến *trnH-psbA* (0,009), *matK* (0,008) và *rbcL* không có cách biệt. Những kết quả này chỉ ra rằng vùng ITS là lựa chọn tốt nhất để nhận dạng phân tử các loài Sapotaceae từ rừng Đại Tây Dương (Vivas *et al.*, 2014).

Bolson *et al.* (2015) đã sử dụng 3 vùng gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* và ITS để hỗ trợ nhận diện 30 loài nguyệt quế ở rừng nhiệt đới phía bắc Brazil. Kết quả phân tích chỉ ra rằng ITS có hiệu quả nhận diện loài cao nhất so với các mã vạch còn lại. Khi kết hợp ITS và *trnH-psbA* cũng cho hiệu quả nhận diện tương đương.

Dong *et al.* (2015) đã đề xuất vùng *ycf1b* trong bộ gene lục lạp để nhận diện các loài thực vật trên cạn. Sau khi kiểm tra với 420 mẫu thực vật từ các nhóm Thông, Diên vĩ, Lạp mai, Hoa hồng, Mẫu đơn, Cỏ và Sâm thu nhận từ Vườn thực vật Bắc Kinh, có 357 loài được phân biệt chính xác bằng trình tự mã vạch này với hiệu quả khuếch đại từ 82,80% đến 98,17%. Hiệu quả phân biệt loài đạt 71,87%, cao hơn so với tổ hợp *rbcL* và *matK* (67,52%) cũng như khi so sánh riêng với 2 mã vạch này.

Theo Kress (2017) đối với những người sử dụng phân loại, mã vạch DNA đóng vai trò là phương tiện để xác định các loài hiện có, loài xâm lấn và đặc biệt là các loài có nguy cơ tuyệt chủng để bảo vệ chúng khỏi các giao dịch bất hợp pháp việc sử dụng cây rừng của người dân địa phương và để kiểm tra tên và độ tinh khiết từ các sản phẩm thực vật, như thuốc thảo dược thương mại và thực phẩm bổ sung. Ngoài ra, DNA mã

vạch hiện đang còn được sử dụng để giải quyết các vấn đề sinh thái, tiến hóa và bảo tồn, chẳng hạn như các quy tắc sinh thái kiểm soát sự tập hợp của các loài trong quần xã thực vật, mức độ chuyên môn hóa sinh thái được tìm thấy trong thực vật và xác định môi trường sống đa dạng tiến hóa nhất để bảo vệ chúng.

Li *et al.* (2018) đã thực hiện nhiều phân tích so sánh trên 10 bộ gen lục lạp khác nhau của các loài hồng ăn trái thuộc chi Thị (*Diospyros*) thu thập từ vườn thực vật Bắc Kinh (Beijing Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences) và Ngân hàng gen hồng Quốc gia (khoa Nông nghiệp, trường đại học Tây Bắc A&F, Dương Lâm, tỉnh Thiểm Tây, Trung Quốc). Tám vùng gen có độ đa hình cao bao gồm *trnH-psbA*, *rps16-trnQ*, *rpoB-trnC*, *rps4-trnT-trnL*, *ndhF*, *ndhF-rpl32-trnL*, *ycf1a*, và *ycf1b* đã được tìm thấy. Các trình tự tiềm năng này có thể được phát triển thành chỉ thị DNA lục lạp nhằm nhận biết các cá thể ở cấp độ trên loài.

Agostino *et al.* (2018) đã giải mã trình tự đầy đủ của bộ gen lạp thể từ 8 loài thuộc chi Ớt (*Capsicum*). Các phân tích so sánh cho thấy một độ đa dạng cao, kết quả do các đột biến điểm và các đột biến chèn hoặc mất đoạn (InDels) tạo ra. Trong đó, *accD*, *ndhB*, *rpl20*, *ycf1*, và *ycf2* là các gen giá trị nhất. Các trình tự đa hình được tìm thấy đã mở ra triển vọng phát triển chỉ thị phân tử hữu ích cho việc phân biệt các loài trong chi *Capsicum*.

Wang *et al.* (2018) đã tiến hành nghiên cứu bộ gene lục lạp của giống cỏ *Conyza bonariensis* [L.] Cronquist (flaxleaf fleabane), một giống cỏ dại khó kiểm soát phổ biến ở nhiều nước trên thế giới, nhằm mục tiêu tìm ra những mã vạch DNA mới và sử dụng toàn bộ bộ gene lục lạp như một siêu mã vạch (super-barcode) phục vụ kỹ thuật nhận diện phân tử. Từ trình tự có được, một mã vạch DNA hữu hiệu, *rps16* và *trnQ-UUG*, đã được thiết kế và thành công phân biệt được ba loài *Conyza* phổ biến (*C. bonariensis*, *C. canadensis*, và *C. sumatrensis*). Các phân tích phả hệ dựa trên bộ gene lục lạp của *C. bonariensis*, *C. canadensis* và 18 loài thuộc họ Cúc (Asteraceae) đã chứng minh được tiềm năng của bộ gene lục lạp như một siêu mã vạch thực vật có thể phân biệt các loài có quan hệ di truyền gần.

Tổng kết các nghiên cứu trên, có thể thấy mỗi loại DNA mã vạch đặc thù riêng với một nhóm hay một loài thực vật khác nhau, do đó khó có thể xác định mã vạch nào là tiêu chuẩn để phân biệt tất cả các loài thực vật. Các công trình trên cũng cho thấy một mã vạch thích hợp không chỉ thể hiện qua hiệu quả nhận diện mà còn ở các tiêu

chí như hiệu quả khuếch đại và chất lượng trình tự DNA. Bên cạnh đó, để nhận diện loài một cách chính xác, cần sử dụng không chỉ một mà có thể kết hợp nhiều loại mã vạch DNA, đặc biệt là các đoạn mã vạch tiềm năng từ bộ gene lục lạp như *matK*, *rbcL*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH*, *trnH-psbA*.

1.2. Đa dạng di truyền

1.2.1 Khái niệm đa dạng di truyền

Đa dạng di truyền được định nghĩa là sự sai khác về thông tin di truyền của các sinh vật trong một loài, trong một quần thể, một cộng đồng (United Nations, 1992). Sự đa dạng di truyền giữa các cá thể phản ánh sự hiện diện của các alen khác nhau trong nhóm gene và tạo các kiểu gene khác nhau trong quần thể. Sự thay đổi linh động của kiểu hình phụ thuộc vào bất kỳ sự biến đổi di truyền nào của sinh vật cũng giúp nó thích nghi và tiến hóa trong các áp lực môi trường khác nhau (Tanmay và Soumen, 2016).

Theo Nguyễn Nghĩa Thìn (2005) đa dạng di truyền thể hiện bằng đa dạng về nguồn gene và kiểu gene nằm trong mỗi loài. Phân biệt cá thể qua bộ nhiễm sắc thể hoặc phân biệt qua isoenzyme (những protein có vai trò quan trọng trong sinh trưởng, phát triển của sinh vật) tức là bằng cách xác định sự có mặt của các alen hay các trình tự DNA. Mỗi loài có một bản đồ nhiễm sắc thể khác nhau và sự khác nhau trước hết thể hiện ở từ các cặp nhiễm sắc thể tương đồng đến các cặp khác nhau.

Sự đa dạng di truyền là một trong các cấp độ xảy ra của đa dạng sinh học, đa dạng di truyền ở đây có thể là những biến đổi trong gene và kiểu gene. Khác biệt di truyền giữa các cá thể và có thể biểu hiện ở sự khác biệt về trình tự DNA, về đặc điểm sinh hóa (về cấu trúc protein hoặc tính chất isoenzyme), về đặc tính sinh lý (chống chịu stress) màu sắc hoặc hình dạng thực vật (Rao và Hodgkin, 2002).

1.2.2. Đa dạng di truyền ở thực vật và tầm quan trọng

Đối với thực vật, đa dạng di truyền đại diện cho sự biến đổi di truyền trong và giữa các loài thực vật. Dựa trên cơ sở những biến dị di truyền trong quần thể giao phối này con người lựa chọn ra những cá thể thích hợp với mục đích của mình hoặc để cải tiến giống cây trồng. Do đó, bảo tồn sự đa dạng di truyền thực vật là điều cần thiết của con người ở hiện tại và trong tương lai. Trong những năm gần đây, nhận thức về tầm

quan trọng của việc áp dụng quan điểm toàn diện về đa dạng sinh học, bao gồm đa dạng sinh học nông nghiệp, bảo tồn để sử dụng và phát triển bền vững. Những nguyên tắc này đã được quy định trong Công ước về Đa dạng sinh học và Kế hoạch hành động toàn cầu của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên hợp quốc (Rao và Hodgkin, 2002).

Đa dạng di truyền là cơ sở cho sự sống còn của thực vật trong tự nhiên và cải tiến cây trồng. Sự đa dạng về nguồn gene thực vật tạo cơ hội cho các nhà nhân giống cây trồng phát triển các giống mới và cải tiến với các đặc tính mong muốn, bao gồm cả các tính trạng ưa thích của nông dân như cây cho năng suất cao, hạt lớn,... và các đặc điểm ưa thích của nhà tạo giống như kháng sâu bệnh, nhạy cảm với ánh sáng,... Sự đa dạng cũng rất quan trọng đối với khả năng thích nghi của cây trồng với môi trường khác nhau đặc biệt là cây sống trong điều kiện khí hậu thay đổi (Bhandari et al., 2017).

Đối với việc bảo tồn sinh vật, khi hiểu rõ về sự đa dạng di truyền giúp con người xác định những gì cần bảo tồn, bảo tồn ở đâu cũng như giúp phân loại nguồn gốc và sự tiến hóa của các loài thực vật đang quan tâm tới. Kiến thức về cả hai chủ đề này rất cần thiết cho việc thu thập và sử dụng bất kỳ loài thực vật nào và họ hàng hoang dã của nó (Rao và Hodgkin, 2002).

1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến đa dạng di truyền

Nền tảng của đa dạng di truyền là sự phát sinh các đột biến và biến dị tổ hợp. Người ta thường nhận ra rằng sự đa dạng di truyền thực vật thay đổi theo thời gian và không gian. Mức độ và sự phân bố đa dạng di truyền ở một loài thực vật phụ thuộc vào hệ thống tiến hóa và nhân giống của nó, các yếu tố sinh thái và địa lý và thường nhiều nhất là yếu tố của con người. Có thể tìm thấy rất nhiều sự đa dạng của các loài trong quần thể cá thể hoặc phân vùng giữa một số quần thể khác nhau (Rao và Hodgkin, 2002).

Theo Bhandari *et al.* (2017) các nhân tố tiến hóa như chọn lọc, đột biến, di cư và trôi dạt di truyền dẫn đến sự thay đổi về tần số alen trong quần thể và ảnh hưởng đến sự đa dạng di truyền. Sự thuần hóa hay chọn lọc nhân tạo làm tăng tần số các alen được chọn tăng lên. Do đó, quá trình thuần hóa làm giảm sự đa dạng di truyền khi so sánh với sự đa dạng trong tự nhiên. Trong khi đó, chọn lọc tự nhiên ảnh hưởng đến sự

đa dạng di truyền đáng kể nếu chọn lọc đột biến làm tăng sự đa dạng di truyền, ngược lại chọn lọc định hướng và ổn định giảm độ đa dạng di truyền.

Trên thực tế, sản xuất nông nghiệp cũng làm giảm độ đa dạng di truyền của cây trồng. Xu hướng chung của những thập kỷ qua là phát hành và canh tác các giống cải tiến của nhiều loài cây trồng chính và phụ (Rao và Hodgkin, 2002). Khi nhân giống chỉ tập trung cải thiện một số tính trạng mong muốn nên làm giảm độ phong phú của các alen trong quần thể. Và việc nhân giống sử dụng thường xuyên một số kiểu gene được chọn làm cha mẹ có đặc tính nổi trội làm cũng làm giảm độ đa dạng. Cùng với việc nhân giống, việc giới thiệu một số dòng nổi bật cho nhiều quốc gia do đó dẫn đến tăng sự tương đồng di truyền giữa các giống cây trồng và làm giảm sự biến đổi di truyền cũng như sự đa dạng giữa các loài cây trồng (Bhandari et al., 2017).

1.2.4. Các phương pháp phân tích và ước tính đa dạng di truyền

Phương pháp phân tích đa dạng di truyền có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đặc tính hình thái, tế bào học, sinh hóa và phân tử. Các công cụ thống kê như phân tích Metroglyph, phân tích D2, phân tích nhóm, phân tích thành phần chính (PCA), phân tích Canonical, phân tích PCoA, phân tích nhân tố, phân tích tương ứng bằng các phần mềm hỗ trợ phân tích là SAS, SPAR 3.0, Past, NTSYSpc, GenAlEx, Popgene, Power Marker (Bhandari et al., 2017).

Các kỹ thuật chỉ thị DNA được sử dụng trong nghiên cứu di truyền như: đa hình độ dài đoạn cắt enzyme giới hạn (RFLP), dấu cắt enzyme giới hạn (REF), đa hình độ dài các đoạn nhân bản chọn lọc (AFLP), DNA đa hình được nhân bản ngẫu nhiên (RAPD), PCR với môi ngẫu nhiên (AP-PCR), hệ thống đột biến nhân bản chịu nhiệt (ARMS), các dấu hiệu ngẫu nhiên từ nhân bản (ASAP), chuỗi đa hình nhân bản được cắt bằng enzyme giới hạn (CAPS), giải trình tự và nhân bản kết hợp (CAS), chuỗi lặp lại đơn giản (ISSR), PCR với môi tiểu vệ tinh (MP-PCR), các trình tự lặp lại đơn giản (SSR), vùng đệm (ITS), đa hình nucleotide đơn (SNP), đa hình cấu tạo sợi đơn (SSCP), giải trình tự DNA (Nguyễn Đức Thành, 2014).

Kỹ thuật ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) là kỹ thuật nhân bản đoạn DNA nằm giữa hai vùng lặp lại giống hệt và ngược chiều nhau. Kỹ thuật này sử dụng các tiểu vệ tinh như các môi trong phản ứng PCR với một môi cho nhiều locus đích để nhân bản chủ yếu các chuỗi lặp lại đơn giản với độ dài khác nhau, tạo ra các chỉ thị

trội (Nguyễn Đức Thành, 2012). ISSR là kỹ thuật đánh giá kiểu gene nhanh, chi phí thấp, không cần thông tin về trình tự, tạo được nhiều locus, có tính đa hình cao và tạo ra chỉ thị trội (Mishra et al., 2003). Kỹ thuật ISSR sử dụng mồi dài (15 đến 30 nucleotide) vì vậy nhiệt độ bắt mồi cao dẫn đến độ ổn định cao của phản ứng. Sản phẩm có độ dài 200-2000 bp nên có thể phân tách trên cả gel agarose và polyacrylamide. Kỹ thuật ISSR được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền (Reddy et al., 2002), nghiên cứu đặc điểm di truyền trong quần thể (Qian et al., 2001), xác định cây trồng (Lu et al., 2009).

DNA mã vạch và đa dạng di truyền là những công cụ mạnh mẽ trong việc ứng dụng sinh học phân tử trong nông nghiệp, đặc biệt là cây trồng. Trong xu thế hiện nay, khi nền nông nghiệp ngày càng hội nhập sâu rộng, các yêu cầu về sở hữu trí tuệ cũng như bảo hộ giống ngày càng quan trọng. Ở nước ta hiện nay các nghiên cứu về DNA mã vạch và dấu phân tử đã được thực hiện ở một số giống cây trồng, tuy nhiên còn khá hạn chế. Do đó, cần đẩy mạnh hơn nữa việc nghiên cứu nhằm xác định các trình tự DNA đặc trưng cho các giống cây trồng đặc sản của nước ta hiện nay.

Từ các nghiên cứu trên, có thể thấy mỗi loại DNA mã vạch đặc thù riêng với một nhóm hay một loài thực vật khác nhau, do đó khó có thể xác định mã vạch nào là tiêu chuẩn để phân biệt tất cả các loài thực vật. Các công trình trên cũng cho thấy một mã vạch thích hợp không chỉ thể hiện qua hiệu quả nhận diện mà còn ở các tiêu chí như hiệu quả khuếch đại và chất lượng trình tự DNA. Bên cạnh đó, để nhận diện loài một cách chính xác, cần sử dụng không chỉ một mà có thể kết hợp nhiều loại mã vạch DNA, đặc biệt là các đoạn mã vạch tiềm năng từ bộ gene lục lạp như *matK*, *rbcL*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH*, *trnH-psbA*.

1.3. Các cây ăn trái đặc sản

Cây ăn trái đặc sản là sản phẩm có nguồn gốc từ một khu vực, địa phương, vùng địa lý cụ thể, có những tính chất đặc thù về hình thái, chất lượng không giống các sản phẩm cùng loại khác và các đặc tính này chủ yếu có được do các điều kiện tự nhiên, con người vùng sản xuất, chế biến sản phẩm tạo ra. Nói một cách đơn giản hơn, cây ăn trái đặc sản là sản phẩm được sản xuất hay khai thác ở một vùng nhất định theo một quy trình, tập quán khai thác, sản xuất nhất định, có những đặc tính, đặc điểm đặc trưng mà nơi khác không có được.

Do tính đặc thù về địa lý, danh tiếng và chất lượng, đặc sản thường có giá trị gia tăng lớn hơn so với sản phẩm thông thường cùng loại. Giá trị này thuộc về cộng đồng sản xuất sản phẩm trong nhiều năm, thậm chí qua nhiều thế hệ phát triển thành đặc sản mang lại lợi ích lâu dài, bền vững cho cộng đồng địa phương.

1.3.1. Cây bưởi Da Xanh

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). Một số công trình đã công bố của một số tác giả như: Nguyễn Thị Tuyết *et al.* (2018), Nguyễn Phương Thúy *et al.* (2016) cho thấy Việt Nam có nguồn gen cây có múi khá đa dạng với nhiều vùng trồng bưởi truyền thống với nhiều giống bưởi quý như bưởi diên, bưởi thanh trà, bưởi Da Xanh, bưởi biên hòa, bưởi năm roi, bưởi đoan hùng, bưởi phúc Trạch... (vv). Theo bộ Nông Nghiệp Và Phát Triển Nông Thôn trong các giống bưởi trên bưởi Da Xanh được xem là giống bưởi có giá trị xuất khẩu cao. Không chỉ có giá trị về mặt kinh tế, bưởi Da Xanh còn có những giá trị dinh dưỡng và mùi vị phù hợp với thị hiếu người dùng như tăng cường hệ miễn dịch, giảm cholesterol và đẹp da. Theo Viện Nghiên Cứu Cây Ăn Quả Miền Nam, bưởi Da Xanh được trồng ở vùng ĐBSCL với diện tích khoảng 130.000 ha; Trong đó tập trung nhiều ở 3 tỉnh: Bến Tre, Tiền Giang và Vĩnh Long. Thông tin từ Sở Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn, hiện toàn tỉnh Bến Tre trồng hơn 72 ngàn héc- bưởi Da Xanh, chiếm 20% diện tích cây ăn trái. Từ năm 2006-2008, Sở Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn tỉnh Bến Tre phối hợp với Viện Nghiên Cứu Cây Ăn Quả Miền Nam đã nghiên cứu đề tài: Tuyển chọn và đánh giá di truyền của một số dòng bưởi Da Xanh tại Bến Tre do thạc sĩ Trần Thị Oanh Yên làm chủ nhiệm cùng nhóm nghiên cứu của Viện. Kết quả đề tài đã xác định dòng di truyền bưởi Da Xanh của các huyện Chợ Lách, Mỏ Cày (nay là Mỏ Cày Bắc và Mỏ Cày Nam), Thành phố Bến Tre là không khác biệt. Từ đó có thể khẳng định bưởi Da Xanh có nguồn gốc từ xã Thanh Tân, huyện Mỏ Cày Bắc, tỉnh Bến Tre.

Hệ thống phân loại

Giới (Regnum): Plantae

Ngành (Phylum): Mangoliophyta

Lớp (class): Magnoliopsida

Bộ (Order): Sapindales

Họ (Family): Ruceae

Chi (Genus): *Citrus*

Loài (Species): *Citrus maxima* (Merr, 1917)

Đặc điểm hình thái

Cây bưởi nói riêng và cây có múi cam quýt nói chung đều có chung những đặc điểm phân loại như: Cây có mang tuyến dầu chủ yếu phân bố ở lá, bầu mọc nổi trên đài hoa, lá thuộc loại lá đơn và phần lớn có đỉnh viền răng cưa, trái gồm hai hay nhiều noãn bên trong (Nguyễn Hữu Thọ, 2015).

Đặc điểm chung về bưởi là loại cây lâu năm, thuộc dạng thân gỗ, một cây trưởng thành có độ cao từ 5-10m. Khi còn non, thân và cành thường có màu xanh sẫm, khi lớn lên, thân cây to, rộng và chuyển sang màu xám nâu. Bưởi có nhiều cành, nhánh mọc từ thân chính, trên cành có những gai dài và nhọn, đây chính là điểm đặc biệt của loại cây này so với các cây ăn trái khác. Lá bưởi màu xanh sẫm, to bằng nửa bàn tay, hình trứng, hai đầu lá tù, địa cánh to. Nụ hoa bưởi trắng, hình tròn hơi bầu, hoa mọc thành từng chùm từ 6 -10 bông. Từng cánh hoa trắng nhỏ, mỏng manh chụm vào khi còn non và nở bung khi đúng thời điểm, tỏa ra hương thơm ngan ngát. Rễ bưởi thuộc dạng rễ cọc, cắm sâu vào lòng đất để nuôi cây. Trái bưởi có dạng hình cầu, đường kính 15-30cm, trái khi còn non thường có màu xanh nhẵn nhụi, khi chín, bưởi chuyển sang màu vàng đẹp mắt. Cùi bưởi gần vỏ, màu trắng, sau lớp cùi bưởi chính là các múi bưởi. Một trái bưởi thường gồm nhiều múi nhỏ hơn, trong múi có những tép bưởi, mọng nước, chua ngọt thanh dịu (Nguyễn Hữu Thọ, 2015).

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong nước

Nguyễn Thị Loan Anh *et al.* (2008). Nghiên cứu đa dạng sinh học các giống bưởi (*Citrus maxima* (Burm) Merr.) ở Việt Nam bằng phương pháp AFLP. Kết quả có 60 dấu phân tử được ghi nhận, trong đó có 6 dấu phân tử xuất hiện ở tất cả các giống bưởi nghiên cứu, 2 dấu phân tử xuất hiện với tần suất 1/40 giống. Kết quả phân tích đa dạng di truyền cho thấy các giống bưởi nghiên cứu chia làm 4 nhóm, khoảng cách di truyền dao động trong khoảng 2-41%. Hai giống bưởi cùng tên là 5 Roi Trâu Quì thu tại 2 địa

điểm khác nhau là không có khác biệt di truyền. Các giống bưởi có quan hệ di truyền gần gũi với nhau.

Trần Thanh Mến *et al.* (2008). Nghiên cứu đa dạng sinh học các giống bưởi (*Citrus maxima* (Burm) Merr.) ở Việt Nam bằng phương pháp PCR-RFLP. Kết quả theo giản đồ phả hệ chia các giống bưởi thành 1 nhóm lớn và 3 nhóm nhỏ. 3 nhóm đầu có mối quan hệ gần với nhau, nhóm còn lại có sự khác biệt so với 3 nhóm trên. Khoảng cách di truyền giữa các nhóm dao động trong khoảng từ 0-23%. Trong 12 dấu phân tử, có 6 dấu phân tử xuất hiện ở tất cả các giống, 2 dấu phân tử xuất hiện ở 29 giống, 2 dấu phân tử xuất hiện ở 2 giống và 2 dấu phân tử xuất hiện ở 3 giống. Tóm lại, các giống bưởi thu được có mối quan hệ tương đối gần nhau. Khuất Hữu Trung *et al.* (2009) đã tiến hành Nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống bưởi bản địa Việt Nam (*Citrus grandis*) bằng chỉ thị *microsatellite*. Kết quả cho thấy trên 29 mẫu bưởi thuộc 11 giống bưởi bản địa Việt Nam bằng chỉ thị SSR cũng cho thấy các nguồn gen bưởi phân ra làm 2 nhóm chính, trong đó giống bưởi Da Xanh nằm cùng nhóm với bưởi đường lá cam, bưởi 5 Roi, bưởi thanh trà và bưởi phúc Trạch với mức tương đồng là 0,5. Do vậy, cần phải có đánh giá đa dạng di truyền các giống bưởi với số lượng giống lớn hơn để có cái nhìn tổng quát về đa dạng di truyền nguồn gen bưởi bản địa Việt Nam.

Nguyễn Thị Tuyết *et al.* (2018) đã Đánh giá đa dạng di truyền một số nguồn gen bưởi (*Citrus spp.*) bằng chỉ thị SSR. Nghiên cứu đã cho kết quả tổng số 44 allele được phát hiện tại 20 locus trong 25 chỉ thị SSR được sử dụng, số lượng allele nhiều nhất là 4 với trung bình 2,2 allele trên mỗi cặp allele và giá trị PIC trung bình là 0,29. Chỉ thị CgEMS-138 và CgEMS-139 thể hiện thông tin cao nhất với số allele tối đa (4) và giá trị PIC là 0,54 (CgEMS-138) và 0,48 (CgEMS-139). Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,79 đến 0,99 trong số các nguồn gen được đánh giá. Các hệ số này được sử dụng để phân tích UPGMA. Sơ đồ hình cây cho thấy 06 nguồn gen bưởi được chia thành 2 nhóm: Nhóm 1 bao gồm 4 nguồn gen (Polo, Da xanh, Quế Dương và Đường Hiệp Thuận); Nhóm 2 bao gồm 2 nguồn gen (Bốn mùa và Chua). Kết quả chỉ ra rằng có thể sử dụng mỗi CgEMS-138 và CgEMS-139 như là chỉ thị DNA để nhận dạng các giống bưởi nói chung và giống bưởi Bốn mùa nói riêng.

Nghiên cứu ngoài nước

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*. Dehesdri *et al.*, (2007) đã sử dụng loại chỉ thị RAPD 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 Ily.

Uran *et al.*, (2011a) đã đánh giá đa dạng di truyền ở chanh và một số họ hàng của chúng dựa trên các dấu hiệu SRAP và SSR.

Colet-Filho *et al.*, (1998) đã Phân tích sự đa dạng di truyền giữa các loài quýt (*Citrus spp.*) bằng cách sử dụng chỉ thị RAPD

Federici *et al.*, (1998) đã phân tích mối quan hệ phát sinh loài trong chi *Citrus* (Ruceae) và các chi liên quan bằng chỉ thị RFLP và RAPD.

Gulsen *et al.*, (2000) đã phân tích nguồn gốc của chanh Interdonato từ các dấu phân tử cpRFLP, SSR, isozyme và ISSR, Luro *et al.*, (1992) đã ứng dụng RAPD để phân loại và di truyền Citrus.

Nicolosi *et al.*, (2000) sử dụng chỉ thị phân tử để tìm hiểu sự phát sinh loài cây có múi và nguồn gốc di truyền của các loài quan trọng.

Uzun *et al.*, (2011b) đã đánh giá sự đa dạng di truyền của bưởi và pummelo dựa trên các dấu hiệu SRAP, Uzun *et al.*, (2010) đã phân biệt bưởi và pummelo bằng cách sử dụng dấu chỉ thị ISSR. Từ các công trình nghiên cứu trên cho thấy *Citrus* đã và đang được phân tích di truyền rộng rãi do đặc tính phổ biến cao và chúng thích hợp trồng ở nhiều vùng khí hậu.

1.3.2 Cây cam Mật

Cam Mật từ lâu đã trở thành thương hiệu nổi tiếng được người tiêu dùng trong cả nước biết đến, phổ biến ở các vùng thuộc đồng bằng sông Cửu Long và miền đông Nam Bộ. Cam Mật thuộc loại cây ăn trái 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 trái.

Hệ thống phân loại

Giới : Plantae

Bộ: Sapindales

Họ: Rutaceae

Chi: *Citrus*

Loài: *Citrus sinensis*

Danh pháp hai phần : *Citrus sinensis* L.Osbeck

Họ *Rutaceae*, được phân chia thành 130 giống (genus)

Đặc điểm hình thái

Cam Mật: có trái dạng tròn, vỏ dày 3-4mm, màu xanh đến xanh vàng, thịt trái vàng cam, ngọt đậm, khá nhiều nước. Tuy nhiên nhiều hạt (13-20 hạt/trái), trọng lượng trung bình 20g/trái, tỷ lệ nước trong trái 36-52%. Đặc biệt, giống cam Mật không hạt có độ Brix 8-10%, acid tổng số 0,5-0,6 g/100 ml dịch trái, hàm lượng vitamin C 30-32 mg/100 ml dịch trái, năng suất khá cao (20- 30 kg/cây/năm ở cây 4-5 năm tuổi).

Hạt: Gồm nhiều phôi từ 1-7 phôi gọi là hiện tượng đa phôi trong đó có 1 phôi hữu tính còn các phôi khác gọi là phôi vô tính. Thường phôi vô tính nảy mầm thành cây khoẻ hơn mầm từ phôi hữu tính và có khuynh hướng giống mẹ nhiều hơn. Do đó nếu gieo hạt cam quýt và có chọn lọc cẩn thận, ta có thể được các cây con tốt. Mặt khác, qua nghiên cứu thấy rằng nếu lấy mầm của cây mọc từ phôi vô tính ghép tạo cây mới, sẽ được một cây ghép khoẻ hơn và cho năng suất quả cao hơn cây ghép bằng mắt lấy từ chính cây mẹ đó. Đó chính là cơ sở để có thể phục tráng giống cam quýt đã thoái hoá.

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong nước

Vũ Văn Hiếu *et al.* (2015), đã phân tích đa dạng di truyền của các mẫu giống cam sành tại Hà Giang bằng chỉ thị RAPD và ISSR. 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 môi RAPD và 5 môi ISSR sử dụng đều cho đa hình (chiếm 100%), tuy nhiên số băng đa hình trên từng mẫu cho sự biến động lớn. 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. 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.

Nghiên cứu ngoài nước

Trong cây có múi, cam ngọt (*C. sinensis* L. Osbeck) có nguồn gốc là giống lai tự nhiên giữa quýt và bưởi (Barrett and Rhodes, 1976), cho thấy mức độ đa dạng di truyền thấp (Luro *et al.*, 1995; Novelli *et al.*, 2000; Novelli *et al.*, 2006; Uzun, 2009). Hầu hết các trái cam ngọt thu được là do đột biến từ một cây tổ tiên, mặc dù có sự khác biệt về đặc điểm hình thái, biến thể di truyền (Fang and Roose, 1997).

Sự đa dạng di truyền của các giống cam rất cao (Uzun, 2009), mức độ tương đồng của 250 mẫu cam thay đổi trong khoảng từ 0,86 đến 1,00. Barrett and Rhodes (1976) đã cho rằng các biến thể của cam, chanh, bưởi dựa trên các đột biến xảy ra trên một cây tổ tiên. Roose (1988) đã báo cáo rất khó phân biệt các giống cây có nguồn gốc đột biến bằng cách sử dụng các dấu isozyme. Mức độ đa hình thấp trong màu của trái cam cũng được tìm thấy bằng kỹ thuật ISSR (Fang and Roose, 1997), SSR (Luro *et al.*, 2000; Novelli *et al.*, 2006), SRAP (Uzun *et al.*, 2009). Trong một nghiên cứu khác, người ta đã tìm thấy các vị trí giống nhau ở 9 trên 10 locus SSR trong số các giống cam và dòng vô tính được phân tích (Hvarleva *et al.*, 2008). Các nhà nghiên cứu cũng đã nghiên cứu mức độ tương đồng cao về kiểu gen, giống và dòng vô tính trái ngược với sự biến đổi kiểu hình của chúng được quan sát (Hình 2.6), chỉ ra rằng các giống cây địa phương có thể có nguồn gốc từ các đột biến mà SSR đã sử dụng bản sao của cùng một giống gốc. Điều này phù hợp với quan điểm rằng hầu hết các giống cam có nguồn gốc từ các đột biến ảnh hưởng đến hầu hết các đặc điểm của trái.

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.

1.3.3 Cây chôm chôm Đường

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) là loài cây ăn trái có nguồn gốc từ Malaysia, ngày nay được trồng phổ biến ở nhiều nước châu Á, châu Phi và Mỹ Latin như một loại trái cây nhiệt đới tiêu biểu (Sukmandari *et al.*, 2017). Ở mỗi quốc gia, lại có những giống chôm chôm đặc trưng, có đặc tính riêng biệt tạo nên thương hiệu nông sản cho nước nhà. Chôm chôm được trồng chủ yếu ở các tỉnh phía Nam, Việt Nam với diện tích hơn 50.000 héc ta, mỗi năm cung cấp cho thị trường khoảng 300.000 tấn. Cục bảo vệ thực vật, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2021) cho biết, thời gian qua, chôm chôm của Việt Nam đã xuất khẩu qua các thị trường: Mỹ, Canada, Liên minh châu Âu (EU), Đông Âu, một số quốc gia ở châu Phi, Trung Quốc và các nước trong khu vực Đông Nam Á.

Hệ thống phân loại

Bộ Bồ hòn - Sapindales

Họ Bồ hòn - Sapindaceae

Chi Chôm chôm - *Nephelium* L.

Loài Chôm chôm - *Nephelium lappaceum* L.

Họ *Sapindaceae* hay còn gọi là họ Bồ hòn bao gồm khoảng 125 chi và hơn 1000 loài cây gỗ và cây bụi phân bố rộng khắp các vùng nhiệt đới (Merrill, 1923).

Đặc điểm hình thái

Nephelium lappaceum L. (thuộc Họ *Sapindaceae* – Họ Bồ hòn), thường được gọi là “chôm chôm”, là một cây gỗ thường xanh cao khoảng 10 - 12 m. Do có nhiều lông trên trái, nên từ chôm chôm có nguồn gốc tiếng Malaysia “rambut” có nghĩa là "tóc". Cây có nguồn gốc từ Malaysia và Indonesia, ngày nay nó đã được trồng phổ biến ở Philippines, Singapore, Thái Lan, Việt Nam, Ấn Độ, Syria, Zaire, Nam Phi,

Madagascar và Úc. Lá chôm chôm có màu xanh, hoa mọc thành chùm lớn, thành cụm, cụm hoa nhiều nhánh, hoa có màu vàng lục đến trắng tùy theo giống, kích thước nhỏ và không có cánh, có mùi thơm ngọt nhẹ, đơn tính (hoa đực và hoa cái riêng lẻ trên cây) hoặc lưỡng tính, nhiều mật hoa, thu hút ong. Cây ra hoa hai lần trong năm. Trái hình bầu dục hoặc hình cầu, da sần sùi với gai có lông mềm, khi chín chuyển từ màu xanh lục đến vàng rồi đỏ. Thịt trái màu trắng, bùi, ăn được, có vị chua chua ngọt ngọt và bao quanh một hạt lớn (Sukmandari *et al.*, 2017).

Chôm chôm Nhãn (hay chôm chôm Đường, chôm chôm trái rập): trái tròn và nhỏ, trọng lượng chỉ từ 20-30 g. Vỏ cứng, có rãnh dọc hai bên như hai trái rập lại, độ dày vỏ 2,8 mm, màu xanh chuyển đỏ vàng đến đỏ sậm khi chín, râu thưa, hơi ngắn khoảng 5-7 mm (so với các loại chôm chôm khác), có màu xanh vàng hay đỏ khi chín. Thịt dày giòn, tróc cùi rất tốt, độ dày cơm 5,5-7,5 mm, tỷ lệ cơm 35-46%, độ brix 20-23%, vị rất ngọt, thơm mùi nhãn. Cây sinh trưởng khá tốt, cành ngắn hơn chôm chôm Java. Lá có kích thước nhỏ hơn so với giống Java và xanh nhạt.

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong nước

Riêng tại Việt Nam, chôm chôm đã được trồng và sử dụng làm thực phẩm từ thời xa xưa, tuy nhiên các nghiên cứu về loại cây trồng này chỉ tập trung trong một số lĩnh vực như dinh dưỡng, kỹ thuật canh tác. Ví dụ như là các nghiên cứu về cải thiện quy trình trồng và chăm sóc cũng như thu hoạch chôm chôm, các nghiên cứu về chiết xuất hoạt chất từ các bộ phận của chôm chôm, công dụng của chôm chôm trong nhiều lĩnh vực cuộc sống. Về đặc điểm di truyền và nguồn gốc phân loại dựa trên kiểu gen ở các giống chôm chôm Việt Nam vẫn chưa có dữ liệu nào được ghi nhận cụ thể.

Nghiên cứu ngoài nước

Edwards và Gadek (2001) của Đại học James Cook ở Úc, đã thực hiện một nghiên cứu nhằm phân tích phát sinh loài trình tự nucleotide từ các locus plastid (*matK*, intron *trnK-matK*, intron *rps16*) và một locus trong nhân (ITS-1). Thí nghiệm được tiến hành cho 14 loài *Alectryon* và năm chi liên quan trong họ *Sapindaceae*, trong đó có loài *Nephelium lappaceum* L. (chôm chôm).

Năm năm sau đó, Harrington *et al.* đã tiếp tục công trình nghiên cứu của họ trên họ Bò hòn. Các mối quan hệ phát sinh loài trong họ *Sapindaceae* được đánh giá bằng cách sử dụng dữ liệu trình tự từ hai vùng trình tự plastid *rbcL* và *matK*, được phân tích

riêng biệt và kết hợp với nhau. Tổng cộng có 46 trình tự *rbcL* (31 trong số đó là trình tự mới) và 89 trình tự *matK* (75 trình tự mới) đại diện cho 64 chi đã được phân tích (Harrington *et al.*, 2005).

Năm 2009, Buerki *et al.* đã đưa ra một đánh giá mới về các mối quan hệ phát sinh loài trong họ *Sapindaceae* dựa trên 85 trong số 141 chi được thu thập, trong đó có chi *Nephelium* (Buerki *et al.*, 2009). Phân tích này dựa trên sự kết hợp của một vùng nhân (vùng ITS: ITS1, 5,8S, ITS2) và bảy vùng trình tự plastid (coding *matK* và *rpoB*; intron non-coding *trnL* và các liên gen *trnD-trnT*, *trnK-matK*, *trnL-trnF* và *trnS-trnG*). Qua đó, việc mã hóa các vùng trình tự trên đã được chứng minh là hữu ích trong việc giải quyết các mối quan hệ phát sinh loài ở các cấp độ phân loại cao hơn.

Một năm sau đó, Buerki *et al.* tiếp tục phân tích 104 trong tổng số 142 chi thuộc họ *Sapindaceae*, trong đó có loài chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) (Buerki *et al.*, 2010). Sử dụng vùng ITS trong nhân, vùng trình tự lục lạp như *matK*, *rpoB*, *trnD-trnT*, *trnK-matK*, *trnL-trnF* và *trnS-trnG* để mô tả cây phát sinh loài của họ *Sapindaceae*.

Dựa trên các nghiên cứu trước đây, *matK* và ITS là hai vùng trình tự thích hợp dùng để nhận dạng các loài thuộc họ *Sapindaceae*, trong đó có chôm chôm (Edwards và Gadek, 2001; Harrington *et al.*, 2005; Buerki *et al.*, 2009; Buerki *et al.*, 2010).

Năm 2016, bốn loài chôm chôm hoang dã, thuộc năm giống khác nhau được thu thập ở Indonesia bao gồm *N. cuspidatum* giống *cuspidatum*, *N. cuspidatum* giống *eripetalum*, *N. cuspidatum* giống *robustum*, *N. lappaceum* giống *lappaceum*, *N. lappaceum* giống *xanthioides*, *N. rubescens* và *N. uncinatum*. Sử dụng mỗi ISSR3: (CTC)₄AC và ISSR8: (AC)₈TA để xác định tính đa dạng di truyền của các mẫu thu thập trên (Napitu *et al.*, 2016).

Theo nghiên cứu của một nhóm các nhà khoa học Indonesia, ISSR cũng đã được sử dụng kết hợp với phân tích hình thái lá nhằm mục đích phân biệt các giống chôm chôm ở nước này (Madiah *et al.*, 2018). Sáu mỗi ISSR được sử dụng phục vụ nghiên cứu này bao gồm ISSR1: (AGG)₅, ISSR5: (GAG)₅AT, ISSR10: (GA)₆CC, ISSR15: (GTG)₃GC, ISSR23: (GACA)₃CC và UBC807: (CA)₈A. Trong đó mỗi ISSR10 và ISSR23 cho tính đa hình cao nhất, từ đó hiệu suất đánh giá đa dạng di truyền giữa các giống chôm chôm Indonesia được biểu hiện rõ ràng và chính xác hơn.

1.3.4 Cây dâu Hạ Châu

Dâu Hạ Châu do nhà vườn ở Phong Điền (Cần Thơ) tuyển chọn từ các giống dâu địa phương và hiện nay trở thành loại cây ăn trái đặc thù của địa phương (Trần Văn Hậu và Lê Minh Quốc, 2009). Năm 2006, dâu Hạ Châu đã được Cục Sở hữu Trí tuệ công nhận thương hiệu dâu Hạ Châu là đặc sản của huyện Phong Điền TP. Cần Thơ. Theo thống kê ở huyện Phong Điền, đến cuối năm 2015 toàn huyện có gần 600 ha dâu Hạ Châu, chủ yếu tập trung nhiều ở các xã Nhơn Ái, Mỹ Khánh và thị trấn Phong Điền. Theo thông tin được tham khảo từ website “Đặc sản trái cây miền Tây (2011)” cho biết dâu Hạ Châu có điểm đặc biệt vượt trội hơn các loại dâu khác là khi chín thì đài hoa vẫn còn bám chặt, vỏ mỏng, ruột có màu trắng ngà rất đẹp mắt, vị ngọt thanh, thơm, chùm trái dài, mỗi trái có từ 3 – 4 múi và trông rất giống trái bòn bon. Cho đến nay, các nghiên cứu về cây dâu *Baccaurea ramiflora* Lour. chủ yếu tập trung vào việc phân tích các hoạt tính chống oxy hóa từ cao chiết của cây (Md Sahab Uddin *et al.*, 2018) hay nghiên cứu về thành phần hóa học của cây (Xu Jing *et al.*, 2007), ...

Hệ thống phân loại

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999) cây dâu được phân loại như sau

Giới: Plantae

Bộ: Malpighiales

Họ: Phyllanthaceae

Chi: *Baccaurea*

Loài: *Baccaurea ramiflora* L.

Cây dâu (*Baccaurea ramiflora* Lour.) thuộc chi Dâu da (danh pháp khoa học: *Baccaurea*) là một chi thực vật có hoa thuộc họ Phyllanthaceae. Chi này bao gồm hơn 100 loài, phân bố từ Indonesia cho đến phía Tây Thái Bình Dương. Ở Việt Nam, dâu thường được trồng làm cây ăn trái. Dâu có trái cỡ nhỏ, khi chín có màu vàng hoặc đỏ, trái có vị ngọt và chua.

Đặc điểm hình thái

Dâu Hạ Châu là cây thân gỗ cao 10 – 15 m; cành non mảnh, không lông. Lá thường tập hợp ở ngọn các nhánh; phiến lá dày, thuôn, nhọn ở hai đầu, dài 10 – 20 cm, rộng 3 – 9 cm; lá kèm hơi có lông ở mặt lưng, sớm rụng.

Theo Trần Văn Hậu và Lê Minh Quốc (2009) hoa dâu Hạ Châu thuộc loại hoa đơn tính biệt chu, trên mỗi phát hoa cái có khoảng $59,3 \pm 2,0$ hoa, mỗi hoa có 4 – 6 lá

đài có lông tơ và một bầu noãn nướm chẻ ba, có lông mịn. Hoa cái có màu trắng hơi xanh, không cánh hoa, lá đài có chiều dài từ 5,1 – 7,2 mm, rộng 3 – 4,2 mm, ôm lấy bầu noãn. Trên mỗi phát hoa đực có khoảng $237,1 \pm 14$ hoa, trong đó mỗi đỉnh hoa có 3 hoa đực. Hoa đực có màu vàng, mỗi hoa có 4 – 5 cánh hoa, có lông mịn, cánh hoa có chiều dài từ 1,9 – 3,0 mm, rộng 1,0 – 1,5 mm, có 5 – 6 chỉ nhị, trên mỗi chỉ nhị có 2 bao phấn, trên mỗi hoa từ 10 -12 bao phấn, bao phấn có màu vàng nhạt. Để hoa cái có thể nhận phấn tốt từ hoa đực thì lá đài phải bung ra, bầu noãn phình to để lộ nướm ra ngoài. Do đó, muốn tăng tỉ lệ thụ phấn hoa ta có thể tác động các biện pháp thụ phấn bổ sung vào giai đoạn hoa nở. Đường kính trung bình của hạt phấn dâu Hạ Châu từ $18,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Hoa đực dâu Hạ Châu rất nhỏ nên đường kính hạt phấn cũng rất nhỏ so với đường kính hạt phấn sầu riêng ($79,31 - 4,25 \mu\text{m}$) (Nguyễn Thị Bích Vân, 2001). Hạt phấn dâu Hạ Châu có hình tròn, ống phấn hình trụ, chiều dài thay đổi theo thời gian nảy mầm, khi mới nhú chỉ là khối nhô ra ngoài sau đó phát triển dài ra.

Từ khi đậu trái đến khi thu hoạch là 130 ngày. Trọng lượng trái bắt đầu tăng nhanh ở giai đoạn 80 – 90 ngày sau khi đậu trái do sự tăng trưởng của thịt trái.

Trái dâu hạ châu có trọng lượng trái trung bình $14,3 \pm 0,4\text{g}$, °Brix 17,5%, nhưng lại ít chua (TA=2,7) nên có vị ngọt đậm đà, tỉ lệ ăn được 61,4 %.

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong nước

Trong những năm qua, đã có các nghiên cứu về giống dâu Hạ Châu ở Việt Nam, các công bố tiêu biểu như sau:

Trần Văn Hâu và Lê Minh Quốc (2009) đã thực hiện đề tài nhằm tìm hiểu đặc tính sinh học sự ra hoa và phát triển trái của dâu Hạ Châu. Sự ra hoa được ghi nhận khi mầm hoa có kích thước 1 mm, mỗi cây theo dõi từ 15 – 20 phát hoa. Sự phát triển trái và rụng trái non ghi nhận 10 ngày/lần từ khi đậu trái đến khi thu hoạch. Kết quả cho thấy hoa đực và hoa cái xuất hiện cùng lúc và phát triển trong $33,5 \pm 0,9$ ngày. Hoa bắt đầu nở ở giai đoạn $29,3 \pm 0,4$ ngày và kéo dài trong $3,7 \pm 0,3$ ngày. Tỉ lệ đậu trái đạt khá cao (87,5%), sự rụng trái non xuất hiện ở giai đoạn 8 – 20 ngày sau khi đậu trái, tập trung ở giai đoạn 16 ngày, tỉ lệ trái còn lại trên phát hoa khá thấp ($6,9 \pm 1,1$ trái/phát hoa), chiếm tỉ lệ 13,2%. Từ khi đậu trái đến khi thu hoạch là 130 ngày khi vỏ trái chuyển sang màu trắng đục. Trọng lượng trái tăng nhanh ở giai đoạn 80 – 90

SKĐT do sự phát triển của thịt trái. Trái có trọng lượng trung bình ($14,26 \pm 0,4$ g), tỉ lệ ăn được (61,1%).

Nghiên cứu xác định liều lượng paclobutrazol (PBZ) trong điều kiện có và không phủ liếp lên sự ra hoa vụ sớm dâu Hạ Châu của Trần Văn Hâu và Lê Minh Quốc (2012a) đã cho thấy liều lượng PBZ xử lý có tương quan nghịch với hàm lượng chất giống như GA3 và tương quan thuận với tỉ lệ C/N trong lá. Biện pháp phủ liếp góp phần làm cho cây dâu ra hoa sớm hơn, tăng tỉ lệ ra hoa và tăng năng suất trái. Xử lý PBZ với liều lượng từ 0,5 – 1,0 g a.i./m đường kính tán kết hợp với phủ liếp làm cho dâu ra hoa sớm hơn từ 8 – 15 ngày, tăng tỉ lệ ra hoa, tăng khối lượng trung bình trái, khối lượng trái trên chùm và dẫn đến tăng năng suất hơn hai lần so với đối chứng.

Trần Văn Hâu *et al.* (2014) đã xác định hình thái và sức sống của hạt phấn, tìm ra một số biện pháp cải thiện sự đậu trái và hạn chế rụng trái non trên dâu Hạ Châu. Kết quả cho thấy hạt phấn dâu Hạ Châu có kích thước $18,8 \pm 0,3$ μ m, tỉ lệ ăn màu Acetocarmin tương ứng với tỷ lệ hạt phấn có sức sống đạt 86%. Trong môi trường nuôi cấy, H₃BO₃ nồng độ 10 ppm làm tăng tỉ lệ nảy mầm hạt phấn và sự phát triển chiều dài ống phấn, NAA 20 – 40 ppm giúp hạt phấn nảy mầm trên 50% sau 6 – 12 giờ và đạt 100% sau 24 giờ. Hạt phấn sau khi thu hoạch sống đến 18 giờ trong điều kiện nhiệt độ phòng, bảo quản ở 20 – 25°C có thể sống đến 48 giờ. Phun GA3 ở nồng độ 40 ppm giai đoạn 10 – 15 ngày sau khi đậu trái có hiệu quả giảm sự rụng trái non gấp 2,5 so với đối chứng.

Trần Văn Hâu và Lê Minh Quốc (2012) đã xác định thời gian xiết nước tạo khô hạn trong điều kiện có phủ liếp và không phủ liếp lên sự ra hoa mùa nghịch cây dâu Hạ Châu. Kết quả cho thấy xiết nước từ 20 – 40 ngày làm cây dâu Hạ Châu rụng lá từ 38% - 48%, giảm hàm lượng gibberellin trong lá, giảm đậm tổng số cũng như tỷ số C/N, làm cho cây dâu ra hoa mùa nghịch, tỷ lệ ra hoa cao (>80%), tăng khối lượng chùm trái nhưng không ảnh hưởng đến năng suất và phẩm chất trái. Phủ liếp trước khi xiết nước 20 ngày làm tăng số hoa trên phát hoa, tỷ lệ đậu trái, khối lượng chùm trái nhưng nếu xiết nước đến 30 – 40 ngày thì biện pháp phủ liếp không có hiệu quả.

Nguyễn Văn Vũ và Nguyễn Văn Thành (2018) đã phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt tính lên men cao từ trái dâu, từ đó ứng dụng lên men rượu vang dâu Hạ Châu chất lượng cao (hàm lượng rượu cao, rượu tạp và aldehyde thấp, cảm quan tốt). Kết quả nghiên cứu đã được phân lập được 48 dòng nấm men từ dịch trái dâu tại thành

phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Dựa vào khóa phân loại nấm men (hình thái, sinh lý, sinh hóa) ba giống được phân lập gồm: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia*. Thí nghiệm thực hiện trên các dòng thuộc giống *Sacharomyces* và đã tuyển chọn dòng nấm men CB1.1. Kết quả dòng CB1.1 được phân lập từ dịch trái dâu bòn bon tại huyện Phong Điền (Cần Thơ) có các đặc tính tốt như khả năng lên men nhanh (24 giờ), cho hàm lượng rượu cao nhất (12,71% v/v) và đường sót thấp nhất (7,83°Brix). Rượu vang dâu Hạ Châu lên men từ nấm men CB1.1 với dịch phối chế từ các thông số tối ưu Brix = 24,70; pH = 4,20; mật số tế bào nấm men 107 tế bào/mL và lên men ở nhiệt độ phòng trong 10 ngày cho kết quả độ rượu tối ưu 13,76% v/v. Kết quả định danh dòng nấm men CB1.1 bằng phương pháp giải trình tự DNA đã xác định được CB1.1 tương đồng với *Saccharomyces cerevisiae*.

Kết quả nghiên cứu phân tích chuỗi giá trị sản phẩm dâu Hạ Châu ở huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ (TP. Cần Thơ) chỉ ra rằng, chuỗi giá trị sản phẩm dâu Hạ Châu được vận hành chủ yếu thông qua 4 kênh thị trường chính. Phần lớn sản lượng được nông hộ bán chủ yếu cho vựa trái cây (chiếm 43,67%) và thương lái đường dài (chiếm 43,26%). Trong các kênh thị trường chính, kênh 1 và kênh 2 là 2 kênh tạo ra giá trị gia tăng (GTGT) và nhận về giá trị gia tăng thuần (GTGTT) cao nhất. Trong các kênh thị trường có mặt của tác nhân bán lẻ thì đây là tác nhân tạo ra GTGT và nhận về GTGTT cao nhất so với các tác nhân còn lại (Nguyễn Quốc Nghi *et al.*, 2018).

Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có những nghiên cứu về DNA của dâu Hạ Châu và đa dạng di truyền của các giống dâu tại Việt Nam.

Nghiên cứu ngoài nước

Goyal *et al.* (2013) đánh giá tổng số phenol, flavonoid, flavonols và proanthocyanidins cũng như hoạt động loại bỏ DPPH của rượu vang, được chế biến từ cùi trái dâu, về độ lão hóa so với nước trái cây. Tổng số phenol, flavonoid, flavonols và proanthocyanidins lần lượt nằm trong khoảng 141,27 – 313,78 mg GAE/L; 149,2 – 531,2 mg QE/L; 103,2 – 179,2 mg QE/L và 1,46 – 8,45 µg catechin/L. Hoạt động thu dọn gốc tự do bằng phương pháp DPPH cho thấy mức độ ức chế (%) của các mẫu trong khoảng 5,85 – 37%.

Amin và Nabi (2015) đã nghiên cứu các phân đoạn hòa tan chloroform và ether dầu hỏa của chiết xuất methanol thô của trái cây dâu Hạ Châu để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào và chống oxy hóa. Xét nghiệm sinh học khử độc tính của tôm ngâm

nước muối được sử dụng để đánh giá hoạt động gây độc tế bào và phương pháp hoạt động quét gốc tự do được sử dụng để đánh giá hoạt động chống oxy hóa. Nghiên cứu này cho thấy rằng trái dâu Hạ Châu có hoạt tính gây độc tế bào và chống oxy hóa, do đó nó có thể là một nguồn tiềm năng các liệu pháp khác nhau.

Mann *et al.* (2016) đã điều tra về thành phần dinh dưỡng, chất hóa thực vật và các hợp chất hoạt tính sinh học của cây dâu Hạ Châu. Một đặc điểm dinh dưỡng chi tiết của trái cây đã chứng minh rằng nó có tiềm năng hoạt động như một nguồn khoáng chất tốt cùng với các chất dinh dưỡng khác, chất xơ, hợp chất phenolic quan trọng và có đặc tính chống oxy hóa. Hàm lượng phenolic, flavonoid và flavonol tối đa thu được lần lượt là 32,78 μg GAE, 71,67 μg RE và 85,58 μg RE trên mỗi mg dịch chiết metanol. Hoạt động chống oxy hóa (như giá trị IC50) của các chiết xuất khác nhau (khi thu gom DPPH) dao động trong khoảng 3,89 đến 10,14 mg/mL và ABTS với nồng độ chất chống oxy hóa tương đương trolox (TEAC) được ghi nhận tương ứng từ 2,55 đến 6,23 mg / mL.

Singh *et al.* (2017) đã nghiên cứu về các thông số vật lý và chất lượng khác nhau của trái dâu (*Baccaurea ramiflora* L.) cho thấy độ ngọt dao động từ 12,5 đến 16,5°Brix và các thông số của trái như khối lượng trái, khối lượng cùi, nước trái, TSS, tổng lượng đường và độ axit được tìm thấy là có ý nghĩa giữa các kiểu gen.

1.3.5. Cây măng cầu Xiêm

Cây măng cầu Xiêm là một trong những loại cây trồng mới mà nhiều nông dân chọn để canh tác, giúp cải thiện kinh tế gia đình của nhiều người dân nông thôn. Cây măng cầu xiêm là một loại cây khá dễ trồng, cho thu nhập khá cao và đầu ra ổn định vì thế được trồng nhiều ở các tỉnh ĐBSCL như Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long, ...

Hệ thống phân loại

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999), chi Na được phân loại như sau:

Giới: Plantae

Bộ: Magnoliales

Họ: Annonaceae

Chi: *Annona*

Loài: *Annona muricata*

Đặc điểm hình thái

Các loài cây thuộc chi *Na* thích hợp trồng ở khí hậu nhiệt đới hoặc cận nhiệt nên yêu cầu về nhiệt độ khá cao từ 25–32°C. Các loài này là loài cây ưa sáng, phát triển tốt khi có lượng mưa nhiều, độ ẩm cao và sẽ cho năng suất cao hơn, ít nhiễm sâu bệnh (Pinto *et al.*, 2005).

Trái măng cầu thường có kích thước lớn, hình bầu dục hoặc hình tim, màu xanh, nhiều gai. Chiều dài dao động từ 10–30 cm, rộng khoảng 15 cm và trọng lượng có thể lên tới 4,5–6,8 kg. Mỗi trái có từ vài chục đến 200 hạt trở lên, hạt hình bầu dục, mịn, cứng, màu đen, dài 1,25–2 cm (Adewole and Caxton-Martins, 2006).

Đặc điểm di truyền

Hầu hết các loài *Annona* có số lượng nhiễm sắc thể là $2n = 14$ hoặc 16, ngoại trừ *Annona glabra* là loài tứ bội (Pinto *et al.*, 2005).

Nhằm thực hiện một phương pháp nhanh chóng và đáng tin cậy để phân biệt giữa các loài *Annona*, nhà nghiên cứu đã phát triển các loại mồi đặc trưng cho loài để phân biệt rõ ràng bảy loài *Annona* ở Trung và Nam Mỹ dựa trên dữ liệu được giải trình tự. Khả năng phân biệt của các gen mã vạch thực vật được sử dụng nhiều nhất (*rbcL* và *matK*) đã được kiểm tra, sử dụng các trình tự *Annona* bổ sung có sẵn trong cơ sở dữ liệu BOLD (Barcode of Life Database) và các trình tự mới thu được (Larranaga and Hormaza, 2015).

Theo Niu *et al.* (2020), bộ gen lục lạp của *Annona muricata* được tìm thấy có cấu trúc vòng, sợi kép với kích thước là 196.038 bp và bao gồm bốn vùng: vùng sao chép đơn lớn (LSC, 75.339 bp), vùng sao chép đơn nhỏ (SSC, 3.105 bp), và hai vùng lặp lại đảo ngược (IRa và IRb, 58.797 bp). So với bộ gen lục lạp của các loài thực vật khác, vùng IR của *A. muricata* được tìm thấy có kích thước lớn và có vùng SSC nhỏ. Hàm lượng GC của các vùng LSC, SSC và IR của hệ gen lục lạp lần lượt là 38,84%, 45,07% và 40,73%. Hàm lượng GC của toàn bộ hệ gen lục lạp là 39,92%. Toàn bộ hệ gen lục lạp của *A. muricata* bao gồm 59.091 base A (30,14%), 58.697 base T (29,94%), 39.673 base G (20,24%) và 38.577 base C (19,68%). Có 111 gen mã hóa protein (PCGs), một gen giả, 38 gen tRNA và 8 gen rRNA được ghi nhận. Bộ gen lục lạp của *A. muricata* có tổng số gen là 158.

1.3.6 Cây quýt hồng Lai Vung

Quýt hồng Lai Vung (huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp) không chỉ là đặc sản của Việt Nam mà còn là của cả miền Tây Nam Bộ. Tháng 10 năm 2020, UBND tỉnh Đồng Tháp vừa phê duyệt Đề án bảo tồn vườn quýt hồng Lai Vung, giai đoạn 2020-2024. Trong thời gian vừa qua Phòng Nông nghiệp và Phát triển nông thôn huyện Lai Vung đã tổ chức lễ công bố chứng nhận nhãn hiệu Quýt hồng Lai Vung độc quyền trong nước. Những sản phẩm mang nhãn hiệu Quýt hồng Lai Vung là nhãn hiệu được cấp cho sản phẩm quýt hồng được trồng, sản xuất, chế biến và kinh doanh trên địa bàn 4 xã: Vĩnh Thới, Tân Phước, Tân Thành, Long Hậu - huyện Lai Vung. Hiện 4 xã này có tổng diện tích trồng quýt hồng là 1.176ha, sản lượng bình quân đạt trên 41.000 tấn/năm.

Hệ thống phân loại

Giới: Plantae

Ngành: Magnoliophyta

Lớp: Magnoliopsida

Bộ: Sapindales

Họ: Rutaceae

Chi: *Citrus*

Loài: *Citrus reticulata* Blanco

(Nguyễn Bảo Vệ và Lê Thanh Phong, 2004).

Đặc điểm hình thái

Phần lớn rễ quýt hồng phân bố ở tầng đất sâu 10 - 30 cm. Rễ hút tập trung ở tầng sâu 10 - 25 cm. Rễ hoạt động mạnh ở thời kỳ 1 - 8 năm tuổi sau khi trồng. Sự phân bố tầng rễ của cây quýt hồng tùy thuộc vào nhiều yếu tố. Trước hết là tùy thuộc vào loại đất: độ dày tầng đất mặt, thành phần hóa học của đất, mực nước ngầm. Việc phân bố của rễ con tùy thuộc vào các biện pháp và kỹ thuật canh tác. Rễ quýt rất sợ đất chặt, bí và không phát triển được ở những nơi có mực nước ngầm cao. Quýt hồng nhân giống bằng hạt có bộ rễ ăn sâu nhưng phân bố hẹp và ít rễ hút. Cây chiết và cây giâm cành có bộ rễ ăn nông nhưng nhiều rễ hút phân bố nông và tự điều tiết được tầng sâu

phân bố theo những thay đổi của điều kiện bên ngoài nhất là mực nước ngầm (Đường Hồng Dật, 2003).

Quýt hồng ít có thân chính nếu để cây phát triển tự do, vì vậy cần tạo hình ngay khi cây bắt đầu phát triển để dễ dàng chăm sóc. Các cành chính thường mọc ra ở các vị trí trong khoảng 1m cách mặt đất. Cành có thể có gai, nhất là khi trồng bằng hạt. Tuy nhiên sau giai đoạn ra hoa trái, các gai thường ít phát triển. Ở một vài loài, gai chỉ mọc ra từ những cành sinh trưởng mạnh (Nguyễn Bảo Vệ và Lê Thanh Phong, 2004). Quýt hồng thuộc dạng thân gỗ, loại hình bán bụi. Cây trưởng thành có thể có 4 - 6 cành chính. Tùy theo tuổi cây và điều kiện sống, phương pháp nhân giống cây có thể có chiều cao và hình thái khác nhau (Trần Thế Tục và *ctv.*, 1998).

Lá quýt hồng thuộc loại lá đơn gồm có cuống lá, cánh lá và phiến lá. Kích thước cánh lá cũng thay đổi theo mùa. Một cây quýt khỏe mạnh có thể có 150000 – 200000 lá với tổng diện tích lá khoảng 200 m². Trên lá khi không tập trung nhiều nhất ở mặt lưng. Lá có chứa túi tinh dầu, hiện diện ở lớp mô giậu (Trần Thượng Tuấn và *ctv.*, 1994).

Hoa quýt thuộc dạng hoa đơn hay hoa chùm, tự thụ, mọc từ nách lá. Hoa thường mọc trong mùa xuân, nhưng nếu gặp hạn kéo dài và sau đó có mưa hay tưới nước thì cây cũng ra hoa rộ (như trong kỹ thuật xiết nước để kích thích ra hoa) (Nguyễn Bảo Vệ và Lê Thanh Phong, 2004).

Trái có hình cầu dẹp ở hai đầu, đỉnh và đáy trái lõm, có từ 6 - 10 múi, mỗi múi có từ 0 - 4 hạt, vỏ có quả màu hồng đặc trưng rất đẹp và không có lớp vỏ trắng xốp. Mặt ngoài vỏ có lớp sừng chứa nhiều túi tinh dầu (Trần Thượng Tuấn và *ctv.*, 1994). Quýt hồng trung bình có 13,2 hạt / trái, nặng 2,8g và chiếm 2,5% trọng lượng trái, hạt nhiều phần nào ảnh hưởng đến chất lượng của trái. Hạt màu vàng nhạt, dạng cầu, dài 11,9 mm, rộng 8,2 mm vỏ hạt láng, tứ diện và phôi đều có màu trắng xanh và mỗi hạt trung bình có khoảng 2 phôi (Trần Thượng Tuấn, 1999).

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong nước

Cây có múi trong tự nhiên bình thường có bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội $2n = 18$. Qua khảo sát so sánh số lượng nhiễm sắc thể của các loài cam, chanh của Việt Nam,

Thiều Thị Tạo (1996) cũng kết luận rằng nhóm cây có múi có $2n = 18$. Trên cây quýt hồng có bộ nhiễm sắc thể là $2n = 18$.

“Khảo sát đặc tính hình thái thực vật của quýt đường không hạt được phát hiện năm 2014 tại xã Tân Thành, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp” của Nguyễn Bá Phú *et al.* (2016).

“Khảo sát phẩm chất trái quýt đường Lai Vung – Đồng Tháp, Phụng Hiệp – Hậu Giang, Trà Ôn – Vĩnh Long” của Võ Ngọc Loan Anh (2010).

Nghiên cứu ngoài nước

Nghiên cứu “Biến đổi gen và mối quan hệ của cây quýt bằng cách sử dụng các dấu hiệu hình thái và phân tử” (Pal *et al.*, 2013).

Nghiên cứu về “Mối quan hệ nhiễm sắc thể giữa các giống cây quýt, giống lai và các loài liên quan của nó” (Cornelio *et al.*, 2003).

1.3.7 Cây sầu riêng Ri-6

Sầu riêng (*Durio zibethinus*) được mệnh danh là “vua” của các loại cây ăn trái, bởi khi nhắc đến loại trái cây người ta sẽ nghĩ ngay đến hương vị đặc trưng và sự thơm ngon khó tả. Tại Việt Nam, sầu riêng được trồng nhiều ở các tỉnh như: Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương, Bình Phước, Bến Tre, Tiền Giang, Vĩnh Long, Cần Thơ,... với diện tích khoảng 13.000 ha, sản lượng 150.000 tấn (Viện CAQMN, 2003). Trên cơ sở quyết định số 1648/QĐ-BNN-TT ngày 17 tháng 07 năm 2013 của Bộ NN&PT Nông thôn đã định hướng phát triển sầu riêng là một trong 12 chủng loại cây ăn trái chủ lực trồng tập trung ở Nam bộ với diện tích là 15.000 ha và được bố trí diện tích trồng rải vụ 5.250 ha đến năm 2020. Ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) hiện đang được trồng rất nhiều giống sầu riêng khác nhau như: sầu riêng Khô Qua Xanh, sầu riêng Ri-6, sầu riêng Chuồng Bò, sầu riêng Chín Hoá, sầu riêng Monthong (nhập ngoại)... Trong đó, "sầu riêng Ri 6 là một trong những giống sầu riêng ngon nhất vùng ĐBSCL", TS Nguyễn Minh Châu (2013), Viện trưởng Viện cây ăn quả miền Nam đánh giá sầu riêng Ri-6 mệnh danh là “Thiên hạ đệ nhất danh sầu” có những đặc điểm nổi bật hơn hẳn so với các giống sầu riêng cùng loại với những yếu tố đặc biệt như: cơm dày và dẻo, màu vàng đẹp, hạt lép, mùi thơm nồng, có vị ngọt, béo... Sầu riêng Ri 6 được đặt tên từ ông Sáu Ri ở ấp Phước Định 1, xã Bình Hoà Phước (Long Hồ, Vĩnh Long,

người đã có công gây giống và phát triển giống này. Năm 2002 cây sầu riêng Ri 6 của gia đình ông đăng ký bảo hộ sản phẩm thành công với cục Sở hữu trí tuệ.

Hệ thống phân loại

Sầu riêng được phân loại thực vật học như sau:

Giới (Regnum): Plantae

Ngành (Phylum): Magnoliophyta

Lớp (Class): Magnoliopsida

Bộ (Order): Malvales

Họ (Family): Malvaceae (Bombacaceae)

Chi (Genus): *Durio*

Loài (Species): *Durio zibethinus*

Đặc điểm hình thái

Nhìn chung, các giống sầu riêng có các đặc điểm như sau:

Sầu riêng là cây thân gỗ, cao lớn. Nếu được trồng từ hạt thì cây sầu riêng có thể cao tới 20 – 40 m, nếu được trồng từ cây ghép, cây chiết thì chỉ cao khoảng 8 -12 m. Thân thẳng, cành thường nằm ngang, phân cành thấp, tán lá thưa (Nguyễn Danh Vàn, 2008).

Lá sầu riêng thuộc loại lá đơn, mọc nách, dạng tròn hơi dài, gốc lá tròn hay tù, có lông hình vẩy, mặt trên màu xanh sáng, mặt dưới có lông mịn, màu hơi vàng nâu óng ánh. Chiều dài khoảng 12 -20 cm, rộng 4 -6 cm. Cuống lá dày, dài khoảng 1,5 - 3 cm, đường kính từ 0,15 -0,25 cm (Trần Thế Tục và Chu Doãn Thành, 2004).

Rễ sầu riêng chắc khỏe, nếu gặp điều kiện thuận lợi (mực nước ngầm thấp, không có tầng sỏi đá phía dưới,...) rễ có thể đâm sâu tới 5 – 6 m. Sự phân bố của rễ phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chất đất, mực nước ngầm cao hay thấp, loại cây giống (cây giống được gieo từ hạt hay từ cành chiết, ghép...) kỹ thuật chăm sóc tốt hay không tốt,... (Nguyễn Danh Vàn, 2008).

Hoa sầu riêng thuộc loại lưỡng tính, mọc thành từng chùm từ 3 -30 hoa (hoặc hơn) trên những cành lớn, ít mọc ở những chỗ nhỏ và không mọc ở đầu cành như một số loại cây ăn trái khác (nhãn, vải, chôm chôm,...). Số lượng hoa rất nhiều, trên một cây có đến 20.000 – 40.000 hoa. Đài có 5 cánh, đài phụ phía ngoài có 3 cánh, vành hoa

5 cánh màu kem hơi xanh. Nhị đực dài hơn cánh, gồm 5 bó với nhau ở phần gốc. Bầu hình trái xoan, có vòi dài, đầu nhụy tròn có 5 mảnh, khi chín có nhựa dính. Từ khi bắt đầu nở đến khi thành hoa mất 2 - 3 ngày (Nguyễn Danh Vàn, 2008).

Sau khi đậu trái, từ tuần lễ thứ 5 -13 trái tăng trưởng rất nhanh, sau đó chậm dần, đến tuần thứ 15 – 16 thì chín. Vỏ trái có nhiều gai hình chóp nhọn, gai có hình dạng và kích thước lớn nhỏ tùy giống. Màu sắc vỏ trái tùy thuộc vào giống, có giống màu xanh nhạt (khổ hoa xanh), có giống màu vàng đồng (sữa hạt lép Bến Tre)... Trái to (trọng lượng khoảng 1,5 – 4 kg, cá biệt có khi đến 8kg), gồm 5 lá noãn, khi chín nứt dọc từ cuống đến đỉnh trái, lộ ra 5 ô, mỗi ô có 1 -7 hạt, bên ngoài hạt bao bọc một lớp cùi mềm (là phần ăn được, tỷ lệ chiếm khoảng 22 - 30% trọng lượng trái), cùi có màu trắng ngà, màu vàng, vàng nhạt hay vàng cam, giống như bơ, vị ngọt, béo và thơm mùi đặc trưng

Sầu riêng Ri-6: có xuất xứ từ Mianma, du nhập vào nước ta từ năm 1988 tại xã Bình Hòa Phước, huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Hiện trồng khá phổ biến ở các tỉnh ĐBSCL như Cần Thơ, Tiền Giang, Bến Tre, Đồng Nai, Bình Phước,... Cây sinh trưởng phát triển khá tốt, phân cành ngang, tán hình tháp, lá hình xoan, mặt lá có màu xanh đậm. Trái có hình ôvan, trọng lượng trung bình từ 2 - 2,5 kg, vỏ trái có màu vàng khi chín, thưa gai. Cơm trái dày, có màu vàng đậm, không xơ, ráo, không sượng, vị béo ngọt, thơm hấp dẫn, hạt lép nhiều, tỷ lệ cơm cao 32 - 34% (Trần Thế Tục và Chu Doãn Hoàn, 2004; Nguyễn Danh Vàn, 2008).

Đặc điểm di truyền

Giang *et al.* (2016) đã thực hiện nghiên cứu đa dạng di truyền của 16 giống sầu riêng có nguồn gốc từ Việt Nam, Malaysia và Thái Lan dựa trên dấu phân tử ISSR. Trong số 181 phân đoạn được khuếch bởi 13 môi ISSR, có 165 phân đoạn đa hình đạt tỉ lệ 91,1%, có 12,7 phân đoạn đa hình trên mỗi môi. Mỗi quan hệ di truyền của 16 giống sầu riêng được đánh giá dựa trên phương pháp UPGMA để chứng minh sự khác biệt và thể hiện mối tương quan ở mức độ phân tử và nguồn gốc địa lý. Nhóm I các giống sầu riêng có nguồn gốc từ Thái Lan. Nhóm II bao gồm ba giống từ Việt Nam là Chuồng Bò, Sáu Hũu và Khổ Qua Xanh, trong đó nhóm III gồm hai giống ở Malaysia là D10 và D24. Nhóm IV và nhóm V chỉ có giống D197 có nguồn gốc từ Malaysia và giống HB11 từ Việt Nam. Qua kết quả khảo sát các môi ISSR như ISSR B2 và ISSR BB7 có thể sử dụng để xác định giống sầu riêng HB11. Do đó, thông tin DNA của

giống sầu riêng dựa trên dấu phân tử ISSR cho thấy tiềm năng hữu ích của chỉ thị phân tử cho việc phân loại cây trồng.

Siew *et al.* (2018) đã đánh giá biến đổi di truyền của sầu riêng Malaysia bằng dấu phân tử ISSR và trình tự DNA lục lạp. Cho đến năm 2018, có 124 giống sầu riêng đã được đăng ký với Cục Nông nghiệp Malaysia dựa trên kiểu hình. Tuy nhiên, mức độ và hướng nghiên cứu di truyền sự khác biệt giữa các giống sầu riêng chưa được biết đến. Trong nghiên cứu này, lá của 27 giống sầu riêng được lấy mẫu từ bốn vườn sầu riêng ở đại học Putra, Malaysia. Nghiên cứu sử dụng 25 môi ISSR để đánh giá mức độ di truyền của sầu riêng. Trong đó, 12 môi ISSR khuếch đại 133 phân đoạn DNA và có 122 phân đoạn đa hình chiếm 91,73%, cho thấy mức độ biến đổi di truyền cao giữa các giống sầu riêng này. Trong số bốn môi được sử dụng để khuếch đại là *trnL-trnF*, *atpB-rbcL*, *trnH-psbA* và *matK* thì có hai môi khuếch đại thành công, nhưng không có sự khác biệt trong hai vùng trình tự ngay khi bổ sung các mẫu ở Việt Nam. Những phát hiện trong nghiên cứu này đặt ra nền tảng toàn diện hơn cho những nghiên cứu về sự biến đổi di truyền giữa các giống sầu riêng.

Sundari *et al.* (2019) đã thực hiện nghiên cứu trên 36 giống sầu riêng và sử dụng ba mã vạch DNA: *matK*, ITS và *trnL*. Trong đó, môi ITS cho được khuếch đại thành công và đáng tin cậy nhất để nhận dạng bằng công cụ BLASTN trên NCBI. Mặc khác, gen *matK* cho thấy khả năng khuếch đại thấp nhất nhưng khả năng nhận diện loài tốt hơn vùng intron *trnL*.

1.3.8 Cây thanh long ruột đỏ

Thanh long là một trong những giống cây ăn trái chủ lực của Việt Nam và Nam Bộ. Theo Bộ Công Thương, năm 2018 cả nước có khoảng 25.000 ha trồng thanh long, cho sản lượng hơn 1 triệu tấn, các vùng trồng thanh long trọng điểm là Bình Thuận, Long An và Tiền Giang. Viện cây ăn quả Miền Nam đã lai tạo thành công giống thanh long ruột đỏ LD1 và thanh long ruột tím hồng LD5, hai giống này đã được đăng ký bảo hộ bởi Cục Trồng trọt.

Đặc điểm phân loại

Giới: Thực vật (Plantae)

Ngành: Hạt kín (Angiospermatophyta)

Lớp: Hai lá mầm (Dicotyledoneae)

Bộ: Cẩm chướng (Caryophyllales)

Họ: Xương rồng (Cactaceae)

Chi: Thanh long (*Hylocereus*)

Cây thanh long (*Hylocereus* spp.) thuộc chi *Hylocereus*, họ xương rồng (Cactaceae) có nguồn gốc từ khu vực Châu Mỹ, từ Mexico đến Bắc Argentina. Thanh long phân bố rộng rãi ở các khu vực có khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Loài thực vật này cũng thích nghi với nhiều điều kiện sinh thái, từ ven biển, núi cao và rừng mưa nhiệt đới. Thanh long thuộc nhóm thực vật CAM (Crassulacean acid metabolism), do đó có thể tồn tại trong điều kiện khô hạn kéo dài (Cisneros and Tel-Zur, 2012).

Hiện nay trên thế giới đã ghi nhận khoảng 16 loài thanh long (Kew Botanical Garden, 2012) bao gồm: *Hylocereus calcaratus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *Hylocereus esculintlensis* Kimnach, *Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose, *Hylocereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Ralf Bauer, *Hylocereus microcladus* Backeb., *Hylocereus minutiflorus* Britton & Rose, *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton & Rose, *Hylocereus ocamponis* (Salm-Dyck) Britton & Rose, *Hylocereus purpusii* (Weing.) Britton & Rose, *Hylocereus schomburgkii* (C.F. Först.) Backeb., *Hylocereus setaceus* (Salm-Dyck ex DC.) Ralf Bauer, *Hylocereus stenopterus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *Hylocereus trigonus* (Haw.) Saff., *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose và *Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose.

Thanh long chịu hạn giỏi và có thể mọc được trên nhiều loại đất như đất xám bạc màu (Bình Thuận), đất phèn và đất phù sa (Đồng bằng sông Cửu Long), đất đỏ (Đồng Nai).

Đặc điểm hình thái

Cây thanh long có dạng thân leo, lá tiêu giảm thành mấu gai, có rễ khí sinh, bám vào cây to hoặc trên bờ tường. Trái to hình trái xoan thịt trái màu đỏ thẫm, nặng bình quân 300- 500g. Thanh long chịu hạn giỏi và có thể mọc được trên nhiều loại đất như đất xám bạc màu (Bình Thuận), đất phèn và đất phù sa (Đồng bằng sông Cửu Long), đất đỏ (Đồng Nai). Trái thanh long rất giàu vitamin (B1, B2, B3, niacin, pyridoxine và cobalamin), khoáng và carbohydrate. Bên cạnh đó, thanh long còn là

nguồn cung cấp nhiều hoạt chất có tính kháng oxy hóa như phytoalbumin, flavonoid, phenolic và betacyanin. Hoa thanh long là một vị thuốc điều trị ho, tăng động, lao, viêm phế quản, quai bị, tiểu đường và viêm cổ tử cung trong y học cổ truyền Trung Quốc (Ibrahim *et al.*, 2018).

Đặc điểm di truyền

Nguyễn Thị Phụng và Nguyễn Hoàng Việt (2015) đã khảo sát đặc tính nông học của 4 giống thanh long ruột đỏ và 1 giống ruột trắng. Kết quả cho thấy các giống này khác nhau ở một số đặc điểm như chiều cao cây, đường kính thân, số núp gai và hàm lượng diệp lục tố. Tuy nhiên, nếu ở các giai đoạn khác nhau của cây thì các đặc điểm trên có thể chưa xuất hiện hoặc xuất hiện chưa rõ làm ảnh hưởng đến công tác giám định giống.

Tao *et al.* (2014) đã khảo sát đa dạng di truyền của 50 giống thanh long bằng các đặc điểm hình thái và chỉ thị phân tử ISSR. Sau khi phân tích bằng 16 cặp mồi và xây dựng cây phả hệ dựa trên phổ điện di cho thấy có 3 nhóm rõ rệt gồm nhóm thanh long ruột đỏ, ruột trắng và nhóm thanh long hoang dại. Tỷ lệ băng đa hình dao động từ 25-100%. Tiếp nối nghiên cứu này, Pan *et al.* (2017) đã sử dụng mồi SSR để khảo sát đa dạng di truyền của 46 giống thanh long từ Trung Quốc, Đài Loan, Việt Nam, Lào và Israel. Theo giản đồ phả hệ, các giống thanh long được chia làm 4 nhóm là ruột trắng, ruột đỏ, ruột trắng vỏ vàng và nhóm đối chứng là xương rồng. Các giống thanh long ruột đỏ hầu hết đều có nguồn gốc từ Đài Loan. Nghiên cứu cũng cho thấy có sự đa dạng cao về mặt di truyền giữa các giống thanh long

1.3.9 Cây vú sữa Lò Rèn

Ở Tiền Giang, vú sữa Lò Rèn Vĩnh Kim là giống trái cây đặc sản nổi tiếng, đã khẳng định thương hiệu và đang được thị trường ưa chuộng. Vú sữa Lò Rèn Vĩnh Kim là cây trồng đặc hữu đã được tỉnh Tiền Giang đăng ký nhãn hiệu tập thể và chỉ dẫn địa lý số 00044 do Cục Sở hữu trí tuệ cấp. Sản phẩm được khẳng định trên thị trường và xuất khẩu sang nhiều nước: Thái Lan, Hàn Quốc, Đức, Nga,... Tiền Giang hiện có khoảng 3.174 ha vú sữa Lò Rèn, với sản lượng hàng năm 63.764 tấn/năm, năng suất bình quân 20 tấn/ha. Vùng chuyên canh vú sữa tập trung tại các xã: Vĩnh Kim, Phú Phong, Kim Sơn, Bàng Long, Bình Trung,... thuộc huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang. Hiện nay vú sữa Lò Rèn đã được chứng nhận sản xuất an toàn theo tiêu chuẩn GlobalGAP bởi tổ chức SGS New Zealand limited và cấp code nhà đóng gói cho thị

trường Mỹ bởi USDA (United States Department of Agriculture) - Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ.

Hệ thống phân loại

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999), cây vú sữa được phân loại như sau:

Giới: Thực vật

Bộ: Ericales

Họ: Sapotaceae

Chi: *Chrysophyllum*

Loài: *Chrysophyllum cainito* L.

Đặc điểm hình thái

Vú sữa là cây lưỡng tính, có tốc độ sinh trưởng nhanh. Đây là loài cây nhiệt đới nên yêu cầu nhiệt độ và độ ẩm thường xuyên cao. Tuy vậy, khả năng thích ứng mạnh. Nhiệt độ thấp dưới 10°C cây sinh trưởng kém, không ra hoa, lá non bị cháy.

Về đất, cây vú sữa sống được trên nhiều loại đất, tuy vậy thích hợp đất phù sa, đất thịt nhẹ, tầng đất sâu và thoát nước. Rễ cây khỏe và ăn sâu, có khả năng chịu hạn khá tuy nhiên chịu ngập nước kém. Thời gian sống của cây tới trên 50 năm (Nguyễn Mạnh Chinh và Nguyễn Đăng Nghĩa, 2006).

Thân vú sữa là một cây thường xanh mọc cao tới 15 m với đường kính của thân khoảng 60 cm. Tán dày và rộng. Vỏ cây có mủ trắng. Cây vú sữa được nhân giống bằng hạt hay ghép (Yahia *et al.*, 2011).

Lá vú sữa có phiến bầu dục, mặt dưới vàng hoặc nâu vàng và có lông dày, chụm ở nách lá; hoa nhỏ, 5-6 phân, có lông hoe; tiểu nhụy 5-6, gắn trên ống vành. Chiều dài của thùy tràng hoa bằng hoặc vượt quá chiều dài của ống tràng hoa (Petersen *et al.*, 2012).

Hoa nhỏ, màu trắng pha tím, mọc thành chùm trên cành và bị che khuất một phần trong lá (Nguyễn Mạnh Chinh và Nguyễn Đăng Nghĩa, 2006).

Trái vú sữa thuộc loại phỉ quả, tròn hơi bẹp, có khi có hình quả trứng, hay nón, trắng hay tím, láng, nạt quanh hạt trong, có vị ngọt, có mủ trắng như giọt sữa; mỗi trái có 3-10 hạt, đẹp, mỗi hạt có chóp nhọn, láng, nâu đậm, thẹo trắng, dài (Phạm Hoàng

Hộ, 1999). Khi cắt ngang mặt của trái sẽ thấy một hình ngôi sao (Morton, 1987; Orwa *et al.*, 2009). Trái có dạng hình cầu hoặc hình cầu hơi thuôn, vỏ trái khi chín trắng ứng hồng. Thịt trái có màu trắng đục, mềm, nước dạng sữa, dày thịt, tỷ lệ thịt trái cao, ít hạt. Vị ngọt béo và mùi thơm nhẹ (độ Brix từ 14 - 17%). Kích thước trung bình của quả có đường kính 7,3 - 8,4cm, trọng lượng 250 - 350 g/trái. Mùa vụ thu hoạch tập trung từ tháng 1 đến tháng 3 dương lịch.

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong và ngoài nước

Ở Việt Nam, các giống vú sữa cũng đã được khảo sát các vùng trình tự như ITS, *matK*, *trnH-psbA*. Trong đó, nghiên cứu đã xác định đặc điểm trình tự của các vùng ITS và *matK* giúp nhận diện phân tử ở cấp độ loài. Vùng *trnH-psbA* là vùng khó khuếch đại, cần được thiết kế các cặp mồi đặc hiệu trên vú sữa (Vũ Thị Huyền Trang *et al.*, 2019).

Khi kiểm tra gen mã hóa loài *Chrysophillum cainito* L. trên NCBI có 22 vùng gen được mã hóa (Bảng 1).

Bảng 1. Gen mã hóa loài *Chrysophilum cainito* L. trên NCBI

STT	Gen mã hóa	Số lượng trình tự
1	5.8S ribosomal RNA	84
2	18S ribosomal RNA	84
3	28S ribosomal RNA	84
4	NADH dehydrogenase (<i>ndhF</i>)	1
5	<i>trnH – psbA</i>	1
6	Maturase K (<i>matK</i>)	1
7	Ribulose-1,5bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (<i>rbcL</i>)	1
8	Internal transcribed spacer 2 (ITS2)	84
9	Photosystem II protein D1 (<i>psbA</i>); <i>psbA-trnH</i>	1
10	RNA polymerase II second largest subunit (<i>rpb2</i>)	1
11	<i>trnS</i> (UGA)- <i>trnM</i> (CAU)	81
12	NADH dehydrogenase subunit 1 (NAD1)	1
13	PSII CP47 protein (<i>psbB</i>); PSII N protein (<i>psbN</i>); PSII phosphoprotein (<i>psbH</i>)	1
14	<i>trnS-trnG</i>	1
15	NADH dehydrogenase subunit 7 (NAD7)	2
16	NADH dehydrogenase subunit 4 (NAD4)	1
17	rpS14	1
18	<i>trnL-trnF</i>	1
19	Ribosomal protein S16 (rps16)	
20	rp120-rps12	1
21	<i>atpB-rcbL</i>	1
22	Microsatellite	10

Trong nghiên cứu với các mục tiêu để kiểm tra mối quan hệ phát sinh gen, xác định họ hàng gần nhất của cây vú sữa giữa các loài trong chi *Chrysophilum* và kiểm tra giả thuyết quần thể vú sữa hoang dã có nguồn gốc từ Greater Antilles cũng như xác định sự khác biệt di truyền vú sữa được canh tác ở Mexico và Mesoamerica với cây vú sữa hoang dã đã cho thấy các haplotype dựa trên trình tự ITS có cấu trúc liên kết phân nhánh cao và cho thấy mối quan hệ rất giống như các loài đơn bội được phục hồi trong

cây phát sinh gen. Các nghiên cứu đáng chú ý đã sử dụng các dấu phân tử để đánh giá quá trình thuần hóa của cây ăn trái tìm thấy ở Trung và Nam Mỹ cho thấy quần thể vú sữa được trồng duy trì mức độ đa dạng di truyền (Petersen *et al.*, 2012).

Các môi microsatellite cho cây vú sữa vùng nhiệt đới để xác định phạm vi bản địa của loài, kiểm tra sự phân chia đa dạng di truyền ở các quần thể hoang dã và canh tác. Nghiên cứu này đã dùng 10 đoạn môi đa hình từ các thư viện DNA bộ gen của cây vú sữa cho các trình tự lặp lại di-, tri- và tetranucleotide. Nghiên cứu này chỉ ra rằng các môi microsatellite hữu ích trong các nghiên cứu di truyền trong tương lai cũng như các nghiên cứu nhằm tìm hiểu nguồn gốc địa lý của các quần thể hoang dã cũng như canh tác (Petersen *et al.*, 2014). Khi sử dụng các môi để đánh giá sự đa dạng di truyền của vú sữa được khuếch đại bằng 10 môi để phát hiện các đoạn RAPD, mỗi trong số 10 môi đã định hướng thành công việc khuếch đại DNA mã vạch đặc trưng cho bộ gen (Mahdy, 2018).

1.3.10. Cây xoài Cát Hòa Lộc

Xoài là một trong những loại trái cây lâu đời và được người dân ưa chuộng ở Việt Nam và trên thế giới. Bộ NN&PTNN (2013) đã đưa xoài vào danh sách quy hoạch 12 cây ăn trái chủ lực của Nam Bộ. Theo Cục Trồng trọt (Bộ NN-PTNT), đến năm 2018, tổng diện tích xoài cả nước ước đạt trên 87.000 ha. Xoài hiện được trồng phổ biến ở 59/63 tỉnh, thành của nước ta. Các vùng trồng xoài chính ở Việt Nam bao gồm vùng Tây Bắc như Sơn La; vùng ĐBSH; vùng Đông Bắc (Lạng Sơn); vùng Nam Trung Bộ (Bình Thuận, Ninh Thuận, Khánh Hòa, Bình Định); vùng Tây Nguyên (Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Lâm Đồng); vùng Đông Nam Bộ (Đồng Nai, Bà Rịa Vũng Tàu). Trong đó, ĐBSCL là vùng trồng xoài lớn nhất gồm 13 tỉnh, thành, khu vực trồng xoài, chiếm 48% tổng diện tích trồng xoài cả nước.

Bộ giống xoài của nước ta hiện cũng rất đa dạng, với tổng cộng 46 giống xoài. Trong đó, xoài Cát Hòa Lộc là một trong số giống trồng thương mại phổ biến nhất và mang lại giá trị kinh tế cao bởi chất lượng thơm ngon và giá trị dinh dưỡng từ trái xoài này mang lại.

Hệ thống phân loại

Giới (Regnum): Plantae

Ngành (Phylum): Mangoliophyta

Lớp (Class): Mangoliopsida

Bộ (Order): Sapindales

Họ (Family): Anacardiaceae

Chi (Genus): *Mangifera*

Loài (Species): *Mangifera indica* L.

(Shah *et al.*, 2010)

Họ Anacardiaceae có 73 chi với 600-850 loài. Chi *Mangifera* có 69 loài phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới Châu Á. Sự đa dạng cao nhất của chi này được ghi nhận ở Malaysia, đặc biệt là ở bán đảo Malaya, Borneo và Sumatra ; nơi đây được xem là trung tâm phân bố đại diện cho trung tâm của bộ của chi. Trong đó loài *Mangifera indica* chủ yếu phân bố tại các nước Đông Nam Á. Theo Mukherjee (1951) cho rằng *Mangifera indica* xuất hiện lần đầu tiên vào kỉ Đệ tứ, còn theo Yonemori *et al.*, 2002 thì loài *Mangifera indica* có nguồn gốc từ vùng Indo-Myanmar trong kỷ Phấn Trắng và sau đó được trồng rộng rãi sang các vùng nhiệt đới và cận nhiệt trên khắp thế giới.

Xoài cát Hòa Lộc của Việt Nam qua công tác bình tuyển giống từ năm 1995 và Hội thi cây xoài giống tốt được tổ chức tại Viện cây ăn quả miền Nam vào năm 1996, hai cá thể đầu dòng của giống xoài Cát Hòa Lộc mang mã số CT1 và C6 đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận đưa vào sản xuất từ năm 1997.

Đặc điểm hình thái

- Đặc điểm sinh trưởng: Trong điều kiện thuận lợi về thời tiết và dinh dưỡng, cây xoài mọc thẳng và phát triển nhanh; tán có thể mọc thẳng và tròn. Xoài là cây thân gỗ lâu năm với bộ rễ to khỏe có thể bám sâu vào trong đất. Theo Khan (1956) ở Pakistan khi đào bộ rễ cây xoài 18 tuổi thấy bộ rễ ăn xa tới 9 m, nhưng phần lớn rễ tập trung trong phạm vi cách gốc 2 m, xuống sâu chỉ thấy có rễ cái và những rễ cây này có thể ăn sâu 6 - 8 m. Chiều cao cây từ 10 - 20 m, có tán cây dạng hình tháp. Tuổi thọ của cây nếu được chăm sóc tốt có thể hơn 20 năm. Trên thế giới đã từng ghi nhận mẫu cây xoài lâu năm nhất được biết đến đã hơn 300 tuổi và vẫn đang cho trái.

- Thân cây xoài là cây thường xanh, hình dạng đối xứng, cây cho tán rộng, thân cây mọc thẳng và chia nhiều nhánh. Chiều cao trung bình từ 10-40m, đường kính thân cây thay đổi từ 25 cm đến 65 cm. Với cây trồng bằng hạt sẽ cho tuổi thọ hơn 100 năm

và cao hơn tuổi thọ cây ghép chỉ sống được từ 80 năm trở xuống (Deependra Yadav *et al.*, 2018).

- Rễ cây tạo thành một rễ cái dài không phân nhánh (lên đến 6 đến 8 mét và có thể dài hơn nữa) cùng với đó là các rễ phụ dày đặc. Các rễ này sẽ hấp thu dinh dưỡng và phát triển ở gốc của thân cây hoặc sâu hơn một chút, tạo thành rễ neo và đôi khi một tập hợp các rễ phát triển trên mực nước ngầm. Bộ rễ dạng sợi vươn xa theo đường nhỏ giọt. Theo quan sát ở cây xoài 18 năm tuổi với bộ rễ phát triển tốt có thể sâu 1,2 m với độ lan ra bên xa tới 7,5 m (Deependra Yadav *et al.*, 2018)

- Lá xoài thuộc dạng lá đơn nguyên hình lưỡi mác thuôn, màu xanh đậm và dài. Cả hai mặt lá đều có khí khổng nhưng mặt dưới tập trung nhiều hơn mặt trên (Singh, 1986). Chiều dài và chiều rộng lá thay đổi tùy theo giống, chiều dài dao động trong khoảng từ 15-30 cm, chiều rộng từ 4-8 cm. Lá non mới mọc có màu đỏ tím, mềm, sau mỗi đợt ra lá thì chiều dài cành tăng thêm khoảng 40-50 cm. Mỗi năm cây xoài ra từ 1-5 đợt đợt tùy vào giống, tuổi và tình trạng sinh trưởng. Phần lớn các kiểu lá xoài có dạng gân lá từ hơi đối đến so le, không có kiểu gân đối (Lê Thanh Phong, 2011).

- Cụm hoa/ phát hoa : Cụm hoa là hình chùy phân nhánh và được sinh ra tại vị trí các chồi, với chiều dài 6–40 cm, sở hữu số lượng lớn hoa nhỏ (4 mm) màu trắng lục hoặc hơi hồng. Các cụm hoa là một chùy hình nón từ hẹp đến rộng tùy thuộc vào điều kiện trồng trọt và môi trường trong sự phát triển của nó. Thông thường là có lá bắc ; lá bắc có hình elip và lõm. Màu sắc của bông hoa có thể có màu xanh lục vàng, màu xanh lá cây nhạt với các mảng màu đỏ thẫm hoặc với màu đỏ thẫm trên cành cây. Sự phân nhánh của cụm hoa thường là bậc ba, hiếm khi bậc bốn, nhưng sự phân nhánh cuối cùng là luôn luôn dạng cụm. Mỗi phát hoa có từ 500-6.000 bông hoa trong đó 1-70% là lưỡng tính, còn lại là hoa đực tùy thuộc trên cây trồng và nhiệt độ trong quá trình phát triển của nó. Cả hai hoa đực và hoa lưỡng tính được sinh ra trên cùng một cây. Các hoa đối xứng tỏa tròn, và thường có 5 cánh hoa, vệt màu đỏ. Thường chỉ có 1 nhị hoa lớn trên mỗi bông hoa; 4 nhị còn lại là bất thụ. Bông hoa có một đĩa 5 thùy để thấy giữa cánh hoa và nhị hoa (Deependra Yadav *et al.*, 2018).

- Trái có dạng hình trứng đến thuôn dài, thịt trái có màu vàng hoặc màu xanh nhạt (giống phần vỏ khi trái còn sống). Ở giữa có hạt, vỏ bao hạt rất cứng, hình dạng và kích thước trái tùy vào giống, có ít hay nhiều xơ (Phạm Hoàng Hộ, 1999). Xoài cát

Hòa Lộc tại ĐBSCL cho trái to (600-700 g/trái), cơm dày, thịt dẻ, không có xơ, hạt nhỏ, hương vị ngọt và rất thơm, năng suất trung bình 100kg/cây/năm.

Đặc điểm di truyền

Nghiên cứu trong nước

Cho đến nay, công trình nghiên cứu về giống xoài ở các vùng trong nước còn hạn chế. Kết quả điều tra bước đầu của Trần Thế Tục (1977, 1987, 1991), Dương Minh *et al.* (1993) cho thấy, ngoài các loài đại và bán hoang đại (quéo, muỗm, xoài mủ, xoài hôi, xoài mướm) hiện có khoảng 50 giống xoài trong đó một số giống nhập vào nước ta từ rất lâu đời. Nguyễn Thị Thuận *et al.* (1995) điều tra và khảo sát giống xoài ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long và tỉnh Đồng Nai, Sông Bé thu nhập được 60 giống.

Một nghiên cứu khác của Võ Công Thành và Huỳnh Kỳ (2001) đã nhận định qua phân tích 42 cây xoài cát Hòa Lộc kết quả nhận thấy sự hiện diện các băng không đồng nhất với nhau nhưng các băng đặc biệt thì rất giống với xoài Tượng. Từ đó cho thấy đây là giống thuộc loài *Mangifera indica* nhưng do ảnh hưởng của gốc ghép nên có sự khác biệt như trên.

Quảng Ngọc Vàng và Võ Công Thành (2005) đã đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn giống Xoài tại vùng ĐBSCL bằng kỹ thuật điện di protein (phương pháp SDS-PAGE) và điện di DNA (primer CAP 5A). Kết quả cho thấy các giống xoài trong thí nghiệm chia thành 3 nhóm: giống xoài Bưởi, Đu Đủ, Hòn và xoài Thơm thuộc loài *Mangifera odorata*; giống xoài Cát Chu, Cát, Lai, cát Hòa Lộc, xoài Tượng và xoài Bắc thuộc loài *Mangifera indic*; giống xoài Thanh Ca thuộc loài *Mangifera mekongensis*.

Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang (2012) đã tiến hành phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP và kỹ thuật giải trình tự dựa trên đoạn trình tự ITS trên 36 giống xoài thu thập từ một số tỉnh của Việt Nam, phần lớn tập trung ở tỉnh Đồng Tháp. Kết quả kết hợp tương quan phân tích AFLP và ITS, cho thấy hai giống xoài Đá và xoài Gạo chỉ là một; hai giống xoài Bôm, xoài Úc Kensington Pride chỉ là một. Xoài Thủy Triều Nha Trang và những dạng xoài có dạng tương tự ở Nha Trang có cùng nguồn gốc với xoài Thanh Ca ở miền Nam. Xoài Bac-Tam-Bang, một giống xoài ưa thích của người Campuchia, là một dạng của xoài Hòn xanh 19 xoài Cát Chu có nhiều kiểu hình và kiểu gen khác nhau. Các giống xoài ăn xanh Thái Lan có kiểu hình, kiểu gen riêng khác với các giống xoài Việt Nam. Riêng giống xoài *Manduongcao* chứa

gen tương đồng với xoài Tượng. Xoài Yên Châu ở miền Tây Bắc Việt Nam lại có cùng nguồn gốc với xoài Úc Kensington Pride, xoài Bôm, hai giống xoài đồng dạng có nguồn gốc từ Mã Lai, Châu Đại Dương.

Bùi Thị Thu Giang và Nguyễn Thị Thanh Thủy (2016) đã đánh giá đa dạng di truyền của 21 giống xoài đặc sản của một số vùng từ Bắc vào Nam của Việt Nam với 19 dấu chỉ thị phân tử ScoT (Start Codon Tagged). Qua phân tích quan hệ di truyền của các giống xoài trong nghiên cứu này có khoảng cách di truyền cách xa nhau.

Nguyễn Hữu Thuận Anh *et al.* (2013) đã khảo sát phân tích đặc điểm trình tự nucleotide và so sánh khả năng phân định các giống xoài thuộc chi *Mangifera* ở Việt nam dựa trên 4 vùng gen là ITS, *matK*, *trnL-F* và *rpl20-rps12*. Kết quả nghiên cứu đã mô tả được đặc điểm đa hình trình tự của các vùng gen ITS, *rpl20-rps12* và *trnL-F* của 16 mẫu thuộc 9 giống xoài chi *Mangifera*, đồng thời so sánh với trình tự *Mangifera* từ Genbank. Các vùng trình tự *rpl20-rps12* và *trnL-F* có đặc điểm giống nhau hoàn toàn ở các giống xoài trong nghiên cứu và tương đồng cao với trình tự thế giới. Riêng vùng ITS có tính đa hình cao và có khả năng phân định tốt các giống xoài của Việt Nam.

Nghiên cứu ngoài nước

Pandit *et al.* (2007) đã sử dụng 33 môi ISSR để phân tích đa dạng di truyền trên 70 giống xoài ở Ấn Độ, kết quả cho số băng đa hình là 408 băng, chiếm tỉ lệ 97,14%. Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn chưa phân biệt được các giống xoài giữa miền Bắc và miền Nam Ấn Độ. Điều này cho thấy sự đa hình trong trình tự lặp trên các giống xoài.

Mansour *et al.* (2008) đã đánh giá đa dạng di truyền của các giống xoài thuộc loài *Mangifera indica* L. ở vùng Egypt (Ai Cập) bằng việc kết hợp hai dấu phân tử ISSR và RAPD. Những thông tin thu thập từ thí nghiệm này cung cấp những phương tiện cần thiết cho việc phân loại và việc canh tác trên đồng.

Kheshin *et al.* (2016) đã nghiên cứu tính đa dạng di truyền của giống xoài Sukkay (*Mangifera indica* L.) dựa trên 12 dấu chỉ thị phân tử ISSR. Qua kết quả nghiên cứu chứng minh rằng việc ứng dụng dấu chỉ thị phân tử ISSR dễ dàng phân biệt các giống cây tốt hơn việc chỉ dựa trên các đặc điểm hình thái học.

1.4. Cây đầu dòng

1.4.1 Giới thiệu

Diện tích Cây ăn quả các tỉnh phía Nam hiện nay là 639.530 ha, với tốc độ tăng diện tích trung bình hàng năm là 4,2%/năm, tương đương 26.860 ha. Như vậy, với khuyến cáo mật độ trồng Cây ăn quả thì 01 ha trung bình trồng từ 200 - 400 cây (trừ cây ổi, dừa, đu đủ, chuối, thanh long) thì tổng số lượng cây giống CAQ hàng năm cần từ 5,4 - 10,7 triệu cây giống để phục vụ nhu cầu trồng mới và cải tạo vườn tạp.

Viện Cây ăn quả miền Nam hàng năm cung cấp khoảng hơn 250.000 cây giống Cây ăn quả các loại, đáp ứng 2,3 - 4,6 % nhu cầu cây giống Cây ăn quả hàng năm. Ngoài Viện Cây ăn quả miền Nam cần phải phối hợp với các cơ sở sản xuất cây giống, Trung tâm giống của các tỉnh để cùng nhau sản xuất cây giống đúng giống, đạt chuẩn xuất vườn ươm cung cấp cho các nhà vườn, trang trại,...

Theo quy định của Luật Trồng trọt số 31/2018, để sản xuất cây giống ở nhóm cây lâu năm như Cây ăn quả phải có đầy đủ cây đầu dòng và vườn cây đầu dòng chất lượng để cung cấp mắt ghép, cành ghép, cành chiết v.v. nhằm tạo ra được cây giống có chất lượng tốt.

1.4.2 Một số khái niệm, định nghĩa

Cây đầu dòng là cây tốt nhất được bình tuyển và công nhận từ quần thể của một giống cây trồng.

Vườn cây đầu dòng là vườn cây được nhân từ cây đầu dòng hoặc vườn cây do tổ chức, cá nhân thiết lập được thẩm định và công nhận.

Giống cây trồng là một quần thể cây trồng có thể phân biệt được với quần thể cây trồng khác thông qua sự biểu hiện của ít nhất là một đặc tính và di truyền được cho đời sau; đồng nhất về hình thái, ổn định qua các chu kỳ nhân giống; có giá trị canh tác, giá trị sử dụng; bao gồm giống cây nông nghiệp, giống cây dược liệu, giống cây cảnh và giống nấm ăn.

Giống cây trồng thuộc loài cây trồng chính chỉ được phép sản xuất, buôn bán, xuất khẩu, nhập khẩu sau khi được cấp Quyết định công nhận lưu hành giống cây trồng hoặc cấp Quyết định công nhận lưu hành đặc cách giống cây trồng, trừ trường hợp phục vụ nghiên cứu, khảo nghiệm, triển lãm, trao đổi quốc tế hoặc sản xuất hạt lai để xuất khẩu. Giống cây trồng không thuộc loài cây trồng chính chỉ được phép sản

xuất, buôn bán, xuất khẩu, nhập khẩu khi tổ chức, cá nhân tự công bố lưu hành giống cây trồng, trừ trường hợp phục vụ nghiên cứu, khảo nghiệm, quảng cáo, triển lãm, trao đổi quốc tế và sản xuất hạt lai để xuất khẩu. Tổ chức, cá nhân Việt Nam và tổ chức, cá nhân nước ngoài có văn phòng đại diện, chi nhánh công ty hoạt động trong lĩnh vực giống cây trồng tại Việt Nam có quyền đứng tên đăng ký cấp quyết định công nhận lưu hành hoặc tự công bố lưu hành giống cây trồng. Việc cấp Quyết định công nhận lưu hành giống cây trồng được thực hiện đồng thời với việc cấp Bằng bảo hộ giống cây trồng khi tổ chức, cá nhân đứng tên đăng ký công nhận lưu hành giống cây trồng đề nghị và đáp ứng các điều kiện về bảo hộ giống cây trồng theo quy định của pháp luật về sở hữu trí tuệ. Giống cây trồng thuộc loài cây trồng chính phải được khảo nghiệm do tổ chức khảo nghiệm độc lập được công nhận đủ điều kiện (sau đây gọi là tổ chức khảo nghiệm giống cây trồng) thực hiện trước khi cấp hoặc gia hạn Quyết định công nhận lưu hành giống cây trồng, trừ trường hợp giống cây trồng được cấp Quyết định công nhận lưu hành đặc cách giống cây trồng.

Công tác tuyển chọn và công nhận Cây đầu dòng Cây ăn quả được thực hiện theo Nghị định số 94/2019/NĐ-CP. Chương 2, Điều 9. Hồ sơ, trình tự, thủ tục, thẩm quyền cấp, đình chỉ, phục hồi, hủy bỏ Quyết định công nhận cây đầu dòng, Quyết định công nhận vườn cây đầu dòng, cây công nghiệp, cây ăn quả lâu năm nhân giống bằng phương pháp vô tính

Hồ sơ cấp Quyết định công nhận cây đầu dòng, Quyết định công nhận vườn cây đầu dòng gồm: Văn bản đề nghị cấp Quyết định công nhận cây đầu dòng, Quyết định công nhận vườn cây đầu dòng; Báo cáo kết quả bình tuyển cây đầu dòng theo; Báo cáo kết quả thiết lập vườn cây đầu dòng.

Trình tự, thủ tục, thẩm quyền cấp Quyết định công nhận cây đầu dòng, Quyết định công nhận vườn cây đầu dòng:

- a) Tổ chức, cá nhân đăng ký công nhận cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng gửi hồ sơ tới Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn nơi có cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng đề nghị công nhận.
- b) Trong thời hạn 15 ngày làm việc, kể từ ngày nhận đủ hồ sơ hợp lệ, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành Quyết định thành lập Hội đồng thẩm định cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng. Hội đồng tối thiểu 05 thành viên là đại diện các nhà khoa

học, cơ quan quản lý và cơ quan chuyên môn liên quan. Trong thời hạn 05 ngày làm việc, kể từ ngày thành lập, Hội đồng có trách nhiệm thẩm định hồ sơ, kiểm tra cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng tại địa điểm có cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng.

c) Trường hợp cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng đáp ứng đủ điều kiện, trong thời hạn 05 ngày làm việc, kể từ ngày kết thúc thẩm định, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cấp Quyết định công nhận cây đầu dòng.

Trong thời hạn tối đa 01 năm, kể từ thời điểm ban hành Quyết định đình chỉ, tổ chức, cá nhân không phục hồi được chất lượng cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng theo tiêu chuẩn quốc gia hoặc tiêu chuẩn cơ sở, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành quyết định hủy bỏ Quyết định công nhận cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng đã cấp.

2. Lý do chọn đề tài

Cây ăn quả chủ lực trồng tập trung ở Nam Bộ được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn phê duyệt, trong đó 12 loại cây ăn trái chủ lực được đề nghị bao gồm thanh long, xoài, chôm chôm, sầu riêng, vú sữa, bưởi, nhãn, chuối, dứa (khóm), cam, măng cầu và quýt. Tổng diện tích cây ăn quả chủ lực trồng tập trung là 257.000 ha, trong đó vùng Đồng bằng sông Cửu Long 185.100 ha, vùng Đông Nam Bộ 71.900 ha. Trong đó, diện tích trồng thanh long là 24.800 ha, xoài 45.900 ha, chôm chôm 18.300 ha, sầu riêng 15.000 ha, vú sữa 5.000 ha, bưởi 27.900 ha, nhãn 29.800 ha, chuối 28.900 ha, dứa 21.000 ha, cam 26.250 ha, măng cầu 8.300 ha và quýt 5.850 ha. Quy hoạch đặt mục tiêu xây dựng ngành hàng trái cây chủ lực trồng tập trung ở Nam Bộ theo hướng sản xuất hàng hóa lớn trên cơ sở phát huy lợi thế so sánh, nâng cao sức cạnh tranh của sản phẩm trên thị trường trong nước và nước ngoài. Ngoài ra, trái cây Việt Nam được người tiêu dùng thế giới đánh giá cao về chất lượng và mang tính đặc trưng của vùng. Trong thời gian qua, nhiều loại trái cây Việt Nam đã được thâm nhập và mở rộng xuất khẩu vào các thị trường như Hoa Kỳ, Úc, Malaysia, Châu Âu (Pháp, Đức, Anh, Hà Lan), Nhật Bản, Hàn Quốc, Singapore...

DNA mã vạch, một khái niệm được đưa ra bởi Heber (2003), là trình tự nucleotide của một chuỗi DNA ngắn, có cùng nguồn gốc tổ tiên (orthologous), trong đó có vùng ít bị thay đổi (rất ổn định – bảo thủ) và có vùng dễ thay đổi trong quá trình tiến hóa. Dựa vào mức độ thay đổi trong trình tự DNA này để đánh giá sự sai khác di

truyền giữ các sinh vật. Như vậy, DNA mã vạch là một phương pháp định danh mới sử dụng một hoặc nhiều đoạn DNA chuẩn ngắn nằm trong hệ genome của sinh vật đang nghiên cứu, nhằm xác định sinh vật đó thuộc về loài nào. Sau khoảng 10 năm nghiên cứu và phát triển DNA mã vạch, đến nay các nhà khoa học đã công bố trên hàng nghìn công trình khoa học trên các tạp chí khoa học chuyên ngành, với hơn 3.483.696 trình tự mã vạch DNA ở 215.513 loài sinh vật, trong đó động vật có 144.402 loài, thực vật có 54.478 loài, nấm và các dạng sinh vật khác có 16.633 loài. Nhiều kết quả nghiên cứu đã cho thấy, có nhiều đoạn DNA đặc trưng được sử dụng làm DNA mã vạch, các đoạn DNA mã vạch có thể là những đoạn DNA nằm ở trong nhân như: 18S, 5,6S, 26S, 5S và vùng ITS; nằm ở ty thể như: *Cytb* và vùng kiểm soát (control region); nằm ở lục lạp như: *matK*, *rcbL*, *atpβ*, *ndnF* (Cuenoud, 2002; Kress *et al.*, 2008; Aron *et al.*, 2008; Spooner *et al.*, 2009). Có khoảng 8 locus gen đã được sử dụng làm mã vạch DNA ở các loài thực vật, bao gồm cả hệ gen nhân và hệ gen lục lạp (vùng xen *atpF-atpH*, gen *matK*, gen *rbcL*, gen *rpoC1*, vùng xen *psbK-psbI*, vùng xen *trnH-psbA* và vùng gen nhân ITS).

Hướng nghiên cứu xây dựng cơ sở dữ liệu DNA mã vạch đang được nhiều quốc gia, nhiều nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm phát triển, đặc biệt trong những năm gần đây và sẽ là một xu thế nghiên cứu trong thời gian tới. DNA mã vạch được xem là một công cụ mới, hỗ trợ có hiệu quả trong nghiên cứu về phân loại, phát hiện loài mới, giám định loài và các mẫu có nguồn gốc từ sinh vật sống hoặc đã chết thậm chí đã qua chế biến, vì vậy mã vạch DNA có rất nhiều ứng dụng trong nghiên cứu cũng như thực tiễn (Nimis, 2010; Bruni, 2010; Bell, 2011; Hebert, 2003; Lahaye, 2008; Liu, 2010). Ưu điểm của công nghệ này là định danh loài nhanh chóng. Nếu xây dựng mẫu chuẩn thì trong vòng 4 giờ đã cho kết quả rất chính xác. Có thể phát triển và áp dụng nó ở các tổ chức hoạt động trong lĩnh vực kiểm định.

Để đáp ứng nhu cầu hội nhập và giữ vững thị phần trên thị trường quốc tế, trái cây của Việt Nam cần được đảm bảo về an toàn, chất lượng lẫn hình thức, trong đó việc truy xuất nguồn gốc là vấn đề hết sức quan trọng. Hơn nữa, việc chứng minh chất lượng của trái cây được sản xuất từ giống gốc hoặc cây đầu dòng vô cùng phức tạp và gặp nhiều khó khăn, do đó cần phải có một phương pháp đáng tin cậy để giải quyết vấn đề này. Chính vì thế, việc xây dựng cơ sở dữ liệu DNA mã vạch cho các loại cây

ăn trái đặc sản của Việt Nam là một nhiệm vụ vô cùng quan trọng và cấp thiết hiện nay.

3. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chung: Xây dựng được cơ sở dữ liệu DNA mã vạch cho 10 loại trái cây đặc sản của Việt Nam khu vực Nam Bộ.

Mục tiêu cụ thể:

- Khảo sát và tìm được các cây đầu dòng của 10 loại cây ăn trái đặc sản ở Nam Bộ.
- Giải được trình tự DNA mã vạch và phân tích được đa dạng di truyền của từng loại DNA mã vạch của từng loại cây ăn trái đặc sản dựa trên các phần mềm tin sinh học và cơ sở dữ liệu DNA, từ đó xây dựng được cơ sở dữ liệu DNA mã vạch chuẩn có giá trị nhận dạng chính xác 10 loại cây ăn trái đặc sản Nam Bộ.

4. Cách tiếp cận

Dựa trên nhu cầu về đăng ký sở hữu trí tuệ các loại cây ăn trái đặc sản và tính cấp thiết về xây dựng cơ sở dữ liệu DNA cho quốc gia, đề tài được thực hiện bằng việc khảo sát tìm cây đầu dòng có nhiều đặc tính tốt, đặc biệt là phẩm chất trái để thu mẫu DNA. Việc phân tích sẽ tìm ra các trình tự hoặc vùng gen đặc trưng cho loại cây ăn trái để đăng ký và lưu giữ trên cơ sở dữ liệu.

5. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

DNA của các loại cây ăn trái gồm thanh long ruột đỏ, xoài cát Hòa Lộc, sầu riêng Ri-6, vú sữa lò rèn, bưởi Da Xanh ruột hồng, dâu hạ châu, chôm chôm đường, cam Mật, quýt hồng và măng cầu Xiêm.

Phạm vi nghiên cứu

Các loại cây ăn trái được trồng ở vùng đồng bằng sông Cửu Long và một số tỉnh vùng Tây Nam Bộ. Cụ thể:

Thanh long ruột đỏ (Tiền Giang, Bến Tre, Long An, Đồng Nai)

Xoài cát Hòa Lộc (Đồng Tháp, Tiền Giang, Cần Thơ, Vĩnh Long)

Sầu riêng Ri-6 (Bến Tre, Tiền Giang, Vĩnh Long)

Vú sữa lò rèn (Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long, Cần Thơ)

Bưởi Da Xanh ruột hồng (Bến Tre, Tiền Giang, Vĩnh Long)

Chôm chôm đường (Bến Tre, Tiền Giang, Vĩnh Long)

Cam Mật (Bến Tre, Tiền Giang, Vĩnh Long)

Quýt hồng (Đồng Tháp, Vĩnh Long, Tiền Giang)

Mãng cầu Xiêm (Tiền Giang, Vĩnh Long, Cần Thơ, Bến Tre)

Dâu hạ châu (Cần Thơ, Hậu Giang)

6. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Khảo sát cây đầu dòng của 10 loại cây ăn trái đặc sản

Nội dung 2: Giải trình tự DNA mã vạch của các loài cây ăn trái để có thể nhận dạng giống cây ăn trái.

Ly trích DNA

Phân tích dấu phân tử ISSR

Giải trình tự DNA mã vạch

Nội dung 3: Phân tích dữ liệu và xây dựng cơ sở dữ liệu

Phân tích đa dạng di truyền của từng loại DNA mã vạch của từng loại cây ăn trái

Xây dựng cơ sở dữ liệu DNA mã vạch cây ăn trái

7. Phương pháp nghiên cứu

7.1. Phương tiện

7.1.1. Hóa chất

- Ly trích DNA: Dung dịch trích DNA thực vật EB (Extraction Buffer), SDS 10%, isopropanol, TE 1X, CTAB buffer 2%, ethanol tuyệt đối, ethanol 70%, TE 0,1X.
- Thành phần PCR: Nước khử ion, Mytaq master mix 2X (Bioline, Anh), oligonucleotide (IDT, Mỹ)
- Điện di: Tris Acetic EDTA 50X, dung dịch tải mẫu Loading buffer, thang DNA chuẩn 100 bp (Bioline, Anh).
- Thành phần dịch ly trích DNA được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Thành phần dung dịch ly trích DNA thực vật

Thành phần	Nồng độ	Thể tích/khối lượng
Tris pH8	1 M	50 mL
EDTA pH8	0,5 M	50 mL
NaCl	5 M	50 mL
PVP40		2 g
Nước cất khử trùng		đến khi đủ 500 mL

Chú ý: Thêm β -mercaptoethanol vào trước khi sử dụng với tỉ lệ **10 mL EB: 7 μ L β -mercaptoethanol**

7.1.2 Thiết bị

- Máy nghiền mẫu, bể ủ nhiệt, máy ly tâm (Eppendorf, Đức), máy ly tâm chân không, hệ thống nước khử ion, máy luân nhiệt (Bio-rad C1000, Mỹ), máy vortex, bể điện di (Embitech, Mỹ), hệ thống chụp hình gel (Bio-rad Gel doc XR, Mỹ)

7.1.3 Dụng cụ

- Bộ micropipette, chai nắp xanh, ống đong thủy tinh, đầu cone xanh, đầu cone vàng, tube Eppendorf 2,0 mL và 1,5 mL, tube PCR 200 μ L.

7.2 Phương pháp

7.2.1 Ly trích DNA thực vật

Quy trình được thực hiện theo mô tả của Roger và Bendich (1988) với một số cải tiến.

- Cắt nhỏ mẫu lá (100 mg) cho vào ống tuýp 2.2 ml, cho viên bi sắt vào và làm lạnh bằng nitơ lỏng trong 10 phút. Nghiền mẫu bằng máy nghiền 3- 4 lần, mỗi lần 30 giây.
- Cho vào mỗi tuýp 1 ml Extraction buffer (EB) + 50 μ L SDS 10%. Ủ mẫu ở 65°C trong 30 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần nước trong (800 μ L) cho sang tuýp khác (bỏ phần cặn). Cho vào một lượng Isopropanol tương đương (800 μ L), đảo nhẹ, để trầm hiện DNA. Trữ mẫu ở -20°C trong 2 giờ. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần trầm hiện bỏ phần lỏng.

- Cho 400 μL TE 1X để hoà tan DNA. Cho CTAB 400 μL , ủ mẫu ở 65°C trong 15 phút. Cho 800 μL Chloroform/Isoamylalcohol (24:1), lắc nhẹ. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần lỏng ở trên cùng khoảng 700 μL , bỏ phần cặn. Cho Ethanol 96% gấp đôi (1400 μL), đảo nhẹ, để ở nhiệt độ phòng để trầm hiện DNA trong 15 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần trầm hiện (DNA). Rửa DNA trầm hiện bằng Ethanol 70% 2 lần, mỗi lần cho 700 μL Ethanol và ly tâm 10 phút lấy phần trầm hiện, bỏ phần lỏng. Sấy khô bằng máy sấy chân không 60°C trong 10 phút. Hoà tan mẫu DNA với 100 μL TE 0,1X. Trữ lạnh -20°C .
- Kiểm tra DNA bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% trong ở điện thế 100V trong 20 phút.
- Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được kiểm tra qua phương pháp đo mật độ quang phổ hấp phụ ở bước sóng 260 và 280nm. Mỗi mẫu đo ba lần và giá trị trung bình của ba lần đo được lấy làm kết quả cuối cùng. Độ tinh sạch của mẫu thể hiện qua thông số A_{260}/A_{280} , thông thường $A_{260}/A_{280}=1,8-2,0$ được coi là mẫu tinh sạch, nồng độ DNA của mẫu được tính thông qua giá trị $1,0 A_{260}=50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.2.2 Điện di DNA

- Chuẩn bị gel:
 - + Khay điện di được đặt sẵn lược ở một đầu khay và được đặt ở nơi bằng phẳng.
 - + Gel sử dụng chạy điện di nồng độ 2% agarose.
 - + Cho 0,6 g agarose vào chai thủy tinh có chứa 30 mL TAE 1X.
 - + Nấu hỗn hợp trong lò vi sóng đến khi agarose tan hoàn toàn và để nguội (có thể cầm bằng tay được), sau đó thêm 0,5 μL phẩm nhuộm DNA safe view vào, lắc đều và đổ nhẹ dung dịch vào một đầu khay. Dung dịch sẽ tự trải đều trong khay. Để yên sau khoảng 30 phút để gel đặc lại và sử dụng.
 - + Đặt gel vào bể điện di, thêm dung dịch điện di (buffer TAE 1X) phủ mặt gel khoảng 2 mm.
 - + Sau khi chuẩn bị gel, tiến hành bơm mẫu vào các giếng của gel.
- Load mẫu: Dùng micropipette hút dung dịch loading buffer và nhỏ thành từng giọt nhỏ khoảng 1 μL lên giấy parafilm. Trộn đều 10 μL dung dịch mẫu với dung dịch

loading buffer rồi nhỏ hỗn hợp vào giếng của gel. Tiến hành chạy điện di với điện thế và thời gian phù hợp với sản phẩm.

7.2.3 Khuếch đại các đoạn DNA mã vạch

a) Phương pháp tiến hành

- Khuếch đại 8 trình tự DNA mã vạch bằng kỹ thuật PCR bao gồm: *atpF-atpH*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *matK* và *rpoC1*, trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê tại Bảng 3. Chu kỳ nhiệt được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 3. Trình tự 8 cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'-3')
ITS	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>matK</i>	<i>matK</i> -390F: CGATCTATTCATTCAATATTTTC <i>matK</i> -1326R: TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
<i>atpF-atpH</i>	<i>atpF</i> : ACTCGCACACACTCCCTTTCC <i>atpH</i> : GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT
<i>rbcL</i>	<i>rbcLaF</i> : ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC <i>rbcLaR</i> : GTAAAATCAAGTCCACCRCG
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA3F</i> : GTTATGCATGAACGTAATGCTC <i>trnHF05R</i> : CGCGCATGGTGGATTACAATCC
<i>rpoC1</i>	<i>rpoC1_2F</i> : GGCAAAGAGGGAAGATTTCG <i>rpoC1_4R</i> : CCATAAGCATATCTTGAGTTGG
<i>ycf1b</i>	<i>ycf1bF</i> : TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT <i>ycf1bR</i> : ATACATGTCAAGTGATGGAAAA
<i>psbK-psbI</i>	<i>psbKF</i> : TTAGCCTTTGTTTGGCAAG <i>psbIR</i> : AGAGTTTGAGAGTAAGCAT

Nguồn: *Boldsystems.org*

Bảng 4. Chu kỳ nhiệt PCR khuếch đại các đoạn DNA mã vạch

Trình khuếch đại	tự tính ban đầu	35 chu kỳ			Kéo dài cuối cùng	Trữ mẫu
		Biến tính	Bắt cặp	Kéo dài		
ITS	95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	
	5 phút	30 giây	30 giây	1 phút	7 phút	
matK	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	
	1 phút	30 giây	40 giây	40 giây	5 phút	
atpF-atpH	94°C	94°C	51°C	72°C	72°C	
<i>psbK-psbI</i>	4 phút	30 giây	40 giây	40 giây	5 phút	10°C
rbcL	94°C	94°C	55°C	72°C	72 °C	30 phút
<i>trnH-psbA</i>	4 phút	30 giây	30 giây	1 phút	10 phút	
rpoC1	95°C	95 °C	52 °C	72 °C	72 °C	
	2 phút	30 giây	30 giây	1 phút	5 phút	
	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	
ycf1b	4 phút	30 giây	40 giây	1 phút	10 phút	

- Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 50V trong 30 phút, sau đó quan sát các băng DNA bằng máy chụp hình gel (Bio-Rad Gel Doc XRTM imaging system, Mỹ).

- Phổ điện di các sản phẩm PCR được quan sát trên phần mềm Quantity One (Bio-Rad) phiên bản 4.6.1.

- Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự theo phương pháp Sanger tại công ty Nextgen

7.2.4 Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử ISSR

Bảng 5 trình bày thành phần phản ứng PCR gồm 20 μ L với các thành phần: BiH₂O; Mix (gồm Buffer KCl, MgCl₂, dNTPs, *Taq* polymerase); môi ISSR; DNA đã được kiểm tra độ tinh sạch ở mục 7.2.1.

Bảng 5. Thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μL)
BiH₂O		7 μL
Mix	2X	10 μL
Primer	20 pmol/μL	1 μL
DNA		2 μL
Tổng thể tích của 1 phản ứng		20 μL

Tám môi ISSR dùng trong nghiên cứu được lấy từ bộ primer của phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học phân tử. Thông tin chi tiết của các môi được thể hiện trong Bảng 6 và chu kỳ nhiệt trình bày trong Bảng 7.

Bảng 6. Trình tự môi ISSR được sử dụng trong nghiên cứu

Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Tm (°C)
ISSR 13	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	53,8°C
ISSR 31	AGAGAGAGAGAGAGT	43,4°C
ISSR 03	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50°C
ISSR K1	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	57,3°C
ISSR 22	TGTGTGTGTGTGTGTGCC	56,1°C
ISSR K2	GTGGTGGTGGTGAC	46,7°C
ISSR 27	GGATGGATGGATGGAT	48,2°C
ISSR K3	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	47°C

Bảng 7. Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR với các đoạn môi ISSR

Trình tự khuếch đại	Nhiệt độ, thời gian biến tính ban đầu	40 chu kỳ			Nhiệt độ, thời gian kéo dài cuối cùng	Trữ mẫu
		Biến tính	Bắt cặp	Kéo dài		
ISSR 13	94°C	94°C	56,6°C	72°C	72°C	
ISSR 31	5 phút	45 giây	45 giây	1 phút	5 phút	
ISSR 03	94°C	94°C	47,9°C	72°C	72°C	
ISSR K1	5 phút	45 giây	45 giây	1 phút	5 phút	10°C
ISSR 22	94°C	94°C	53,5°C	72°C	72°C	
ISSR K2	5 phút	45 giây	45 giây	1 phút	5 phút	
ISSR 27	94°C	94°C	40°C	72°C	72°C	
ISSR K3	5 phút	45 giây	40 giây	1 phút	5 phút	

- Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 3% với điện thế 25 trong 120 phút và quan sát dưới tia UV.

7.2.5 Phân tích dữ liệu

a) DNA mã vạch

- Trình tự DNA được hiệu chỉnh bằng phần mềm Bioedit phiên bản 7.0, các trình tự nhiễu ở 2 đầu được loại bỏ, chất lượng trình tự được kiểm tra qua độ cao của peak nucleotide.
- Các trình tự DNA được dàn hàng (Alignment) bằng thuật toán Clustal W trên phần mềm Bioedit.
- Sử dụng chương trình MEGA X để xác định các vị trí bảo tồn và biến đổi, số SNPs, đột biến Indels.
- So sánh cục bộ và đối chiếu với các trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI.

b) Chỉ thị phân tử ISSR

- Các phổ điện di của các sản phẩm PCR được mã hóa theo hệ nhị phân bằng chương trình Excell 2013. Giản đồ phân nhánh được xây dựng theo theo phương pháp UPGMA để so sánh sự liên quan di truyền của các dòng khác nhau nhằm phát hiện sự đồng dạng.

PHẦN II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

CHƯƠNG I. KHẢO SÁT CÂY ĐÀU DÒNG CỦA 10 LOẠI

CÂY ĂN TRÁI ĐẶC SẢN

Cây ăn quả đầu dòng và vườn cây ăn quả đầu dòng là cần thiết cho công tác sản xuất cây giống chất lượng cao, đạt tiêu chuẩn, quy chuẩn phục vụ sản xuất cây ăn quả chất lượng cao, do đó việc thực hiện bình tuyển và kiểm tra đánh giá cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng thường xuyên và định kì là rất quan trọng.

Việc các cơ sở sản xuất cây giống cây ăn trái mà không có cây đầu dòng, vườn cây đầu dòng sẽ dẫn đến hệ lụy sau này là chúng ta có sản xuất ra sản lượng trái cây lớn nhưng không đồng đều về hình dáng, mẫu mã bên ngoài và khác biệt về chất lượng bên trong quả, làm hạn chế khả năng cạnh tranh của trái cây Việt Nam trên thị trường nội địa và xuất khẩu. Chính vì vậy, Các loại trái cây Việt Nam ngon, hấp dẫn người tiêu dùng nhưng chất lượng trái và mẫu mã không đồng đều là một trong những nguyên nhân gây ra rào cản làm giảm khả năng cạnh tranh của trái cây Việt Nam trong thị trường trong nước, khu vực và thế giới hiện nay.

Một trong những bất cập đó là rất nhiều chủng loại cây giống đang lưu hành trên thị trường nhưng không có cây đầu dòng, không đảm bảo chất lượng, số lượng lớn cây giống sản xuất, cung cấp cho người trồng không rõ nguồn gốc. Ví dụ là 01 ha vườn cây đầu dòng xoài khoảng 300 cây, trung bình mỗi cây xoài 3 năm tuổi lấy được 200 - 300 mắt ghép để nhân giống, như vậy tổng mắt ghép xoài lấy được là 75.000 – 90.000 mắt ghép/ha. Để sản xuất được 5,4 - 10,7 triệu cây giống cây ăn trái hàng năm, chúng ta cần 75 - 140 ha vườn cây đầu dòng. Trong thực trạng sản xuất giống cây ăn trái, số vườn cây đầu dòng (gồm đã có và trồng mới) là còn quá khiêm tốn, vì vậy cần thiết phải bình tuyển cây đầu dòng sản xuất cây giống từ vườn cây đầu dòng để cung cấp cho các tỉnh xây dựng vườn cây đầu dòng phục vụ sản xuất đại trà.

Một số cây ăn quả đầu dòng đã được Viện Cây ăn quả miền Nam và các tỉnh bình tuyển công nhận và chuyển giao cho sản xuất ở nhiều địa phương, tuy nhiên, nhiều cây đầu dòng được bình tuyển trước đây đến nay không còn hiệu lực.

Cây có múi (bưởi, cam, quýt) mang lại nguồn thu nhập cao cho người nông dân, tuy nhiên, các giống cây có múi khi trồng ngoài đồng thường xuất hiện bệnh vàng lá Greening, do đó nông dân cần nguồn cây giống sạch bệnh để thay thế hoặc trồng

mới. Cây có mùi khi bình tuyển, chọn lọc cần đánh giá và giám định bệnh vàng lá Greening và Tristeza; cây sau đó được đưa về lưu giữ trong nhà lưới chống côn trùng và được vi ghép, tạo cây sạch bệnh. Sầu riêng, xoài, chôm chôm, thanh long, vú sữa, măng cầu xiêm,... là các loại quả đã xuất khẩu đi các thị trường quen thuộc như Trung Quốc, Trung Đông, Ấn độ và các thị trường khó tính như Mỹ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Úc, New Zealand, Canada, Châu Âu,.. và có xu hướng tăng diện tích trồng trong thời gian tới là rất lớn. Mặc dù các cây măng cầu xiêm, na không phải là cây trồng chính nhưng có sản lượng tiêu thụ thị trường nội địa mạnh và xuất khẩu ở dạng chế biến (sấy, cấp đông, puree,...) nên nhu cầu cây giống rất lớn.

Một số giống cây ăn trái nhập nội không nằm trong danh mục sản xuất kinh doanh như: Sầu riêng Musangking, nhãn Edor, xoài tượng Da xanh, mít Changai, na Thái,.. nhưng vẫn được bán tràn lan, chất lượng cây giống không kiểm soát được.

1. Một số kết quả cây đầu dòng đã được bình tuyển và công nhận

Trong những năm gần đây, Viện Cây ăn quả miền Nam đã phối hợp cùng Sở Nông nghiệp & PTNT, Chi cục TT & BVTV, Trung tâm giống, TT ứng dụng Công nghệ cao các tỉnh tại ĐBSCL và ĐNB đã bình tuyển và được Sở NN & PTNT công nhận Cây đầu dòng trên nhiều chủng loại cây ăn quả được trình bày tại Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Danh sách cây đầu dòng được công nhận, lưu giữ và khai thác

TT	Cây ăn trái	Địa điểm	Tọa độ		Mã số
			N	E	
1	Bưởi Da Xanh	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.BDX.TG.01
		Xã Vĩnh Thành, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°12'10.7"	106°13'38.0"	B.BDX.BT.02
		Xã Hòa Nghĩa, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°15'08.23"	106°08'18.60"	B.BDX.BT.03
		Xã Hưng Khánh Trung B, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°10'09.8"	106°13'42.1"	B.BDX.BT.04
		Xã Tam Phước, huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre	10°17'11.0"	106°21'29.7"	B.BDX.BT.05
2	Xoài cát	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.XHL.TG.01
		Xã Vĩnh Thành,	10°12'10.12"	106°13'38.5"	B.XHL.BT.02

	Hòa Lộc	huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre			
		Xã Mỹ Thọ, huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp	10°27'48.9"	105°44'31.7"	B.XHL.DT.03
		Xã Hòa Hưng, huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang	10°17'37.1"	105°54'28.3"	B.XHL.TG.04
3	Sầu riêng Ri 6	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.SR6.TG.01
		Xã Vĩnh Thành, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°11'35.7"	106°12'30.2"	B.SR6.BT.02
		Xã Hòa Nghĩa, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°15'09.22"	106°08'24.52"	B.SR6.BT.03
4	Thanh long Ruột Đỏ	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.TL.TG.01
		Xã Quơn Long, huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang	10°24'06.2"	106°30'03.4"	B.TL.TG.02
5	Vú sữa Lò Rèn	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.VS.TG.01
		Xã Vĩnh Kim, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang	10°21'42.5"	106°14'19.7"	B.VS.TG.02
		Xã Long Thới, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°14'27.94"	106°10'11.48"	B.VS.BT.03
6	Mãng cầu Xiêm	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.MC.TG.01
7	Chôm chôm Nhãn	Xã Hòa Nghĩa, huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre	10°14'48.0"	106°08'30.3"	B.CCN.BT.01
8	Cam Mật	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.CM.TG.01
9	Quýt Hồng	Viện CAQMN	10°23'50.68"	106°16'47.15"	B.QH.TG.01
		Xã Long Hậu, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp	10°17'38.0"	105°36'50.9"	B.QH.DT.02
10	Dâu Hạ Châu	xã Nhơn Ái, huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ	9°59'36.32"	105°40'12.69"	B.DHC.CT.01

Năm 2012, Sở Nông nghiệp và PTNT TP. Cần Thơ đã thành lập hội đồng bình tuyển, tiến hành bình tuyển hồ sơ đăng ký công nhận nguồn giống cây đầu dòng của 05 hộ nông dân sản xuất dâu Hạ Châu tại huyện Phong Điền với tổng số 38 cây dâu Hạ

châu đăng ký gồm 22 cây dâu cái, và 16 cây dâu đực. Căn cứ vào kết quả theo dõi đặc tính sinh trưởng, năng suất, chất lượng của các cây qua 03 năm liên tục và kết quả kiểm tra đánh giá thực tế của tổ thẩm định tại thời điểm tiến hành công nhận. Hội đồng bình tuyển thống nhất và đề nghị công nhận 29 cây đạt tiêu chuẩn cây đầu dòng gồm 14 cây đực và 15 cây cái của 05 hộ nông dân sản xuất dâu Hạ Châu. Tuy nhiên, sau khi hết hiệu lực, các hộ nông dân chưa đăng ký để công nhận lại.

2. Đặc tính nông học 10 cây ăn trái đầu dòng

2.1. Cây bưởi Da Xanh, cây cam Mật và cây quýt Hồng

I	ĐẶC TÍNH NÔNG HỌC	Cây bưởi Da Xanh	Cây cam Mật	Cây quýt Hồng
1	Tuổi cây (năm)	10	7	8
2	Nguồn gốc cây	Chiết cành	Chiết cành	Mua giống
3	Phương pháp nhân giống	Vô tính	Vô tính	Vô tính
II.1	THÂN CÂY			
1	Dạng tán	Gần tròn	Không đều	Tròn
2	Đường kính tán (m)	6-7	4	3
3	Mật độ nhánh	Thưa	Thưa	Vừa
4	Màu tổng thể ngọn cây	Xanh đậm	Xanh/xanh nhạt	Xanh/xanh nhạt
5	Chiều cao cây (m)	5	3,5	4
6	Đường kính thân (cm)	22	16	14
II.2	LÁ			
1	Màu sắc lá non (mặt trên)	Xanh-xanh nhạt	Xanh-xanh nhạt	Xanh-xanh nhạt
2	Màu sắc lá trưởng thành (mặt trên)	Xanh-xanh đậm	Xanh-xanh đậm	Xanh-xanh đậm
3	Dài cánh lá (cm)	14-24	9-12	9-11
4	Rộng cánh lá (cm)	8-16	4-8	5-8
5	Dạng bìa lá	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn
6	Mút lá	Tròn	Nhọn	Nhọn
7	Lá phụ	Có	Không	Không
II.3	HOA			
1	Dạng cánh hoa	Cuốn lòng thuyền	Cuốn lòng thuyền	Cuốn lòng thuyền
2	Kích thước cánh hoa (cm)	1,2-2	0,5-1,2	1,3-1,5
II.4	TRÁI			
1	Trọng lượng trái (kg)	1,3-2,2	0,2-0,35	0,22-0,34
2	Đường kính trái (cm)	16-28	11-15	10-14
3	Hình dạng trái	Tròn	Tròn	Tròn dẹp
4	Màu vỏ trái khi chín	Xanh	Xanh – xanh vàng	Vàng-vàng cam

2.2. Cây chôm chôm Đường, cây măng cầu Xiêm và cây xoài Cát Hòa Lộc

I	ĐẶC TÍNH NÔNG HỌC	Cây chôm chôm Đường	Cây măng cầu Xiêm	Cây xoài Cát Hòa Lộc
1	Tuổi cây (năm)	10	7	14
2	Nguồn gốc cây	Chiết cành	Ghép	Mua giống
3	Phương pháp nhân giống	Vô tính	Vô tính	Vô tính
II.1	THÂN CÂY			
1	Dạng tán	Gần tròn	Không đều	Tròn
2	Đường kính tán (m)	6-7	4	8
3	Mật độ nhánh	Thưa	Thưa	Vừa
4	Màu tổng thể ngọn cây	Xanh đậm	Xanh/xanh đậm	Xanh/xanh nhạt
5	Chiều cao cây (m)	5	3,5	10
6	Đường kính thân (cm)	22	16	36
II.2	LÁ			
1	Màu sắc lá non (mặt trên)	Xanh-xanh nhạt	Xanh-xanh nhạt	Xanh-xanh nhạt
2	Màu sắc lá trưởng thành (mặt trên)	Xanh-xanh đậm	Xanh-xanh đậm	Xanh-xanh đậm
3	Dài cánh lá (cm)	14-24	9-12	18-26
4	Rộng cánh lá (cm)	6-9	8-12	5-8
5	Dạng bìa lá	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn
6	Mút lá	Tròn	Nhọn	Nhọn
7	Lá phụ	Không	Không	Không
II.3	HOA			
1	Dạng cánh hoa	Cuốn lòng thuyền	Cuốn lòng thuyền	Cuốn lòng thuyền
2	Kích thước cánh hoa (cm)	0,1-0,2	2,6-3,2	0,2-0,3
3	Kích thước đài hoa (cm)	-	1-2	-
II.4	TRÁI			
1	Trọng lượng trái (kg)	0,05-0,07	2-4	0,4-0,7
2	Đường kính trái (cm)	3-4	16-25	10-14
3	Hình dạng trái	Gần tròn	Tròn dài	Tròn dài
4	Màu vỏ trái khi chín	Đỏ cam	Xanh – xanh vàng	Vàng-xanh vàng

2.3 Cây sầu riêng Ri-6, cây vú sữa Lò Rèn, cây dâu Hạ Châu và cây thanh long

I	ĐẶC TÍNH NÔNG HỌC	Cây sầu riêng Ri- 6	Cây vú sữa Lò Rèn	Cây dâu Hạ Châu	Cây thanh long
1	Tuổi cây (năm)	16	14	60	8
2	Nguồn gốc cây	Ghép	Chiết cành	Hạt giống	Mua giống
3	Phương pháp nhân giống	Vô tính	Vô tính	Vô tính	Vô tính
II.1	THÂN CÂY				
1	Dạng tán	Hình chóp	Không đều	Không đều	Tròn
2	Đường kính tán (m)	6-7	8	10	2,5
3	Mật độ nhánh	Thưa	Dày	Thưa	Vừa
4	Màu tổng thể ngọn cây	Xanh đậm	Xanh đậm	Xanh/xanh nhạt	Xanh/xanh nhạt
5	Chiều cao cây (m)	9	7	14	1,5
6	Đường kính thân (cm)	31	24	42	12
II.2	LÁ				
1	Màu sắc lá non (mặt trên)	Xanh- xanh nhạt	Xanh- xanh nhạt	Xanh- xanh nhạt	-
2	Màu sắc lá trưởng thành (mặt trên)	Xanh- xanh đậm	Xanh- xanh đậm	Xanh- xanh đậm	-
3	Dài cánh lá (cm)	12-18	9-12	14-22	-
4	Rộng cánh lá (cm)	4-6	6-8	8-10	-
5	Dạng bìa lá	Nhẵn	Nhẵn	Nhẵn	-
6	Mút lá	Nhọn	Nhọn	Tròn	-
7	Lá phụ	Không	Không	Không	-
II.3	HOA				
1	Dạng cánh hoa	Hình chuông	Cuốn lòng thuyền	Cuốn lòng thuyền	Dài
2	Kích thước cánh hoa (cm)	3,2-3,4	0,2-0,5	0,4-0,5	10-12
3	Kích thước đài hoa (cm)	3-3,4	0,4-0,5	0,6	6-7
II.4	TRÁI				
1	Trọng lượng trái (kg)	2-4,5	0,18-0,2	0,03-0,04	0,4-0,7
2	Đường kính trái (cm)	24-36	8-12	2-2,6	12-14
3	Hình dạng trái	Không đều	Tròn	Tròn dài	Tròn dài
4	Màu vỏ trái khi chín	Xanh ngả vàng	Xanh ngả vàng hồng	Vàng nhạt	Đỏ Tím

CHƯƠNG 2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ DNA MÃ VẠCH VÀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN

1. Cây bưởi Da Xanh

Mẫu lá bưởi Da Xanh được thu ở 5 tỉnh ĐBSCL trong đó có 1 mẫu bưởi Da Xanh Tiền Giang được thu tại Viện Cây Ăn Quả Miền Nam và các giống bưởi khác như bưởi Ruby, bưởi Thanh Kiều, bưởi Đường Trắng, bưởi năm roi được thu ở các trại cây giống (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Kết quả thu và ký hiệu các mẫu bưởi

Tên giống	Ký hiệu	Địa điểm	Vĩ độ	Kinh độ
Bưởi Da Xanh	BDTG1	Viện Cây Ăn Quả	10°23'41.6"N	106°05'46.1"E
	BDTG2	Miền Nam		
Tiền Giang				
Bưởi Da Xanh	ST1.1	Kế Thành-Kế	10°01'40.5"N	105°40'11.8"E
	ST1.2	Sách- Sóc Trăng		
Sóc Trăng				
Bưởi Da Xanh	BDHG1.1	Long Phú-Châu	9°55'38"N	105°46'18"E
	BDHG1.2	Thành-Hậu Giang		
Hậu Giang				
Bưởi Da Xanh	BVL1.1	Loan Mỹ- Bình-	9°56'49"N	105°45'57"E
	BVL1.2	Vĩnh Long		
Vĩnh Long				
Bưởi Da Xanh	BDB1.1	Hòa Nghĩa-Chợ	10°00'53.4"N	105°35'43.7"E
	BDB1.2	Lách-Bến Tre		
Bến Tre				
Bưởi Ruby	BRB1	Thới An-Ô Môn-	10°02'20.4"N	105°50'12.9"E
	BRB2	Cần Thơ		
Bưởi Thanh Kiều				
Bưởi Thanh Kiều	BTK1	Thới An-Ô Môn-	10°11'11.9"N	106°12'55.5"E
	BTK2	Cần Thơ		

Tên giống	Ký hiệu	Địa điểm	Vĩ độ	Kinh độ
Bưởi Đường	BĐT1	Thới An-Ô Môn-	10°01'42.1"N	105°46'00.1"E
Trắng	BĐT2	Cần Thơ		
Bưởi 5 Roi	STR1	Thới An-Ô Môn-	10°00'53.4"N	105°35'43.7"E
	STR2	Cần Thơ		

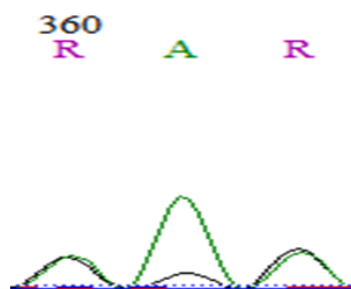
1.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs

Kết quả phân tích vùng trình tự *ycf1b* của các giống bưởi trong nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt quá lớn trong cùng một giống cũng như giữa các giống bưởi khác nhau của các đối tượng được nghiên cứu. Điểm sai khác duy nhất trong trình tự của các giống nghiên cứu xuất hiện ở trình tự của bưởi Ruby khi alignment có một sự sai khác xuất hiện tại vị trí 741 (Hình 2.1). Tuy nhiên qua kiểm tra lại peak vị trí này nằm ở peak thứ 741 trên trình tự bưởi Ruby vị trí này nằm trong 30 nucleotide cuối của trình tự (Hình 2.1) nên độ tin cậy cho sự sai khác này là không cao. Từ kết quả thu được có thể suy luận rằng vùng trình tự *ycf1b* có tính bảo tồn cao giữa các giống bưởi thu được trong khu vực ĐBSCL.



Hình 2.1. Kết quả so sánh vùng trình tự *ycf1b* của trình tự bưởi Da Xanh với các giống trong nghiên cứu

Một đoạn môi có tính bảo tồn cao nữa cũng được ghi nhận ở vùng trình tự là *psbK-psbI* không có sự sai khác trình tự nucleotide giữa các giống trong nghiên cứu, các trình tự giống nhau hoàn toàn khi phân tích trên chương trình alignment. Tuy vậy, đối với đoạn môi này trong quá trình nghiên cứu đã phát hiện ra khi so sánh trình tự giữa các giống có những vị trí ở tất cả các giống bưởi trong nghiên cứu xuất hiện đồng thời 2 loại nucleotide với các peak có chiều cao và kích thước giống nhau hoàn toàn (Hình 2.2). Khả năng cao ở các vị trí trên có xuất hiện sự đa hình của một gen có 2 alen khác nhau cần được nghiên cứu sâu hơn để đưa ra kết luận cụ thể.



Hình 2.2. Nucleotit với các peak bằng nhau

Kết quả phân tích vùng trình tự ITS khi phân tích bằng phần mềm Bioedit cho kết quả xuất hiện một số vị trí sai khác (Hình 2.3) ở giống bưởi Ruby và đột biến điểm mất 1 nucleotide ở giống bưởi Ruby, bưởi Thanh Kiều, bưởi Đường Trắng. Có 2 vị trí xuất hiện đột biến mất 1 nucleotit ở vị trí 10 hiện diện ở giống bưởi Ruby, bưởi Thanh Kiều và vị trí thứ 21 ở giống bưởi Đường Trắng (Bảng 2.2). Tuy nhiên sau khi kiểm tra lại kết quả phân tích ở 3 vị trí sai khác trên giống bưởi Ruby nhận thấy các sai khác này xuất hiện lần lượt ở các vị trí 261, 288, 333 với trình tự là G, T, G trong khi ở các giống bưởi khác trong nghiên cứu là C, G, A. Có 2 vị trí xuất hiện đột biến mất 1 nucleotit ở vị trí 10 hiện diện ở giống bưởi Ruby, bưởi Thanh Kiều và vị trí thứ 21 ở giống bưởi Đường Trắng. Nhưng các đột biến này xảy ra ở 30 Nucleotide đầu tiên trong trình tự. Ở các vị trí này rất khó để kết luận chắc rằng chúng có thực là đột biến điểm mất một nucleotide hay không vì các tính hiệu ở những vị trí dễ bị nhiễu do quá trình bắt môi giải trình tự, thực vậy khi kiểm tra lại các peak cho thấy ở các vị trí mất trên vẫn xuất hiện peak tương tự như các giống bưởi khác trong nghiên cứu nhưng máy giải trình tự đã không đọc được trình tự nucleotide trên, nguyên nhân chính là do tín hiệu bị nhiễu ở các vị trí đầu trình tự. Thêm vào đó ở các vị trí 261, 288 và 333 cho thấy sự khác biệt ở bưởi Da Xanh và các giống bưởi khác.



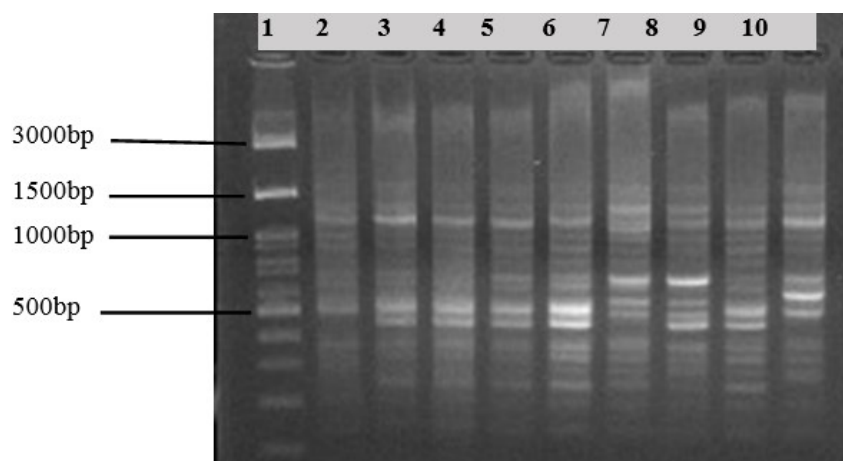
Hình 2.3. Kết quả so sánh vùng trình tự ITS của trình tự bưởi Da Xanh với các giống trong nghiên cứu

Bảng 2.2. Các vị trí sai khác trên vùng trình tự ITS các giống bưởi

Tên giống bưởi	Vị trí				
	10	21	261	288	333
Da Xanh	C	A	C	G	A
Ruby	—	.	G	T	G
Thanh Kiều	—
Đường Trắng	.	—	.	.	.

1.2. Đa dạng di truyền dấu phân tử ISSR

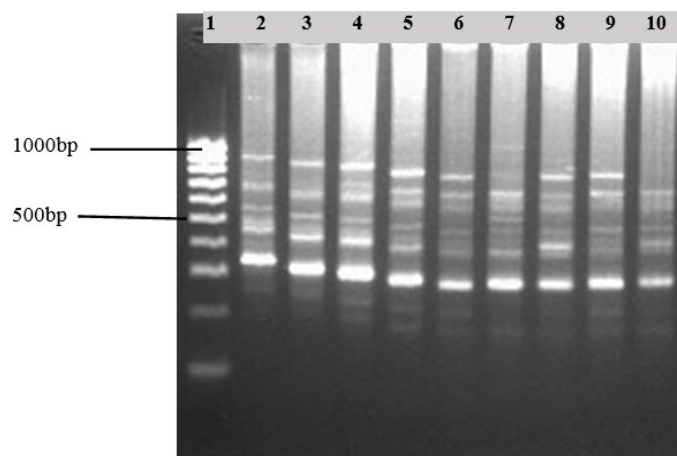
Kết quả điện di dấu phân tử ISSRK2 cho xuất hiện 11 băng trong đó có 8 băng đa hình chiếm tỷ lệ 72,73% so với tổng số (Hình 2.4).



Hình 2.4. Kết quả phân tích điện di ISSRK2

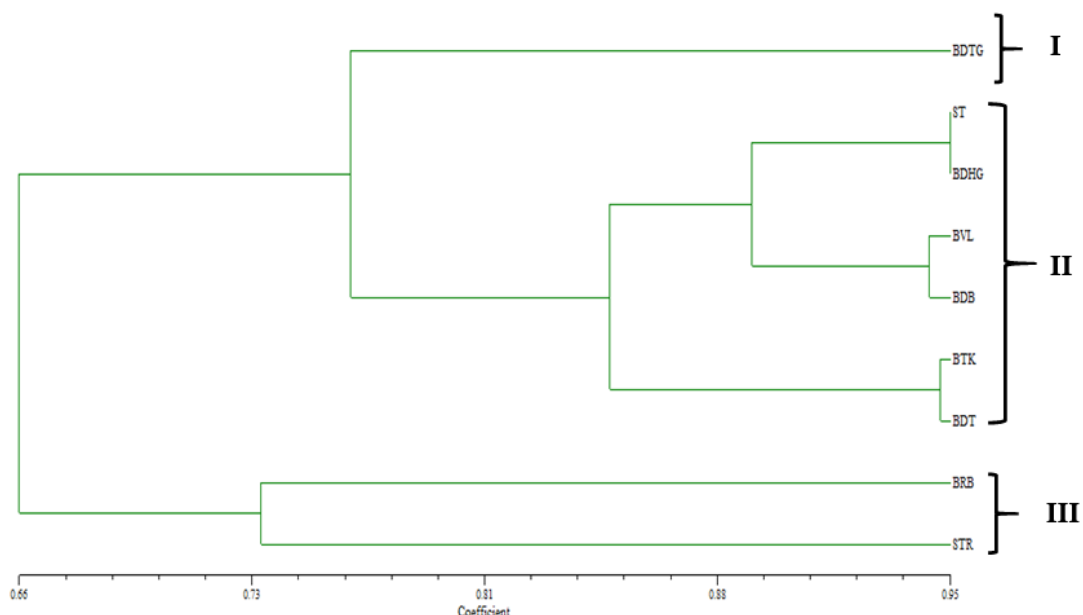
thang chuẩn 3kb; (2) bưởi Da Xanh Tiền giang (BDTG); (3) bưởi Da Xanh Sóc Trăng (ST); (4) bưởi Da Xanh Hậu Giang (BDHG); (5) bưởi Da Xanh Vĩnh Long (BVL); (6)) bưởi Da Xanh Bến Tre (BDB); (7) bưởi Ruby (BRB); (8) bưởi Thanh Kiều (BTK); (9) bưởi Đường Trắng (BDT); (10) bưởi 5 Roi (STR)

Kết quả điện di dấu phân tử ISSR22 cho xuất hiện 8 băng trong đó có 3 băng đa hình chiếm tỷ lệ 37,5% so với tổng số (Hình 2.5).



Hình 2.5. Kết quả phân tích điện di ISSR22

(1) thang chuẩn 100bp; (2) Da Xanh Tiền giang(BDTG); (3) Da Xanh Sóc Trăng (ST);(4)) Da Xanh Hậu Giang (BDHG); (5)) Da Xanh Vĩnh Long (BVL); (6)) Da Xanh Bến Tre (BDB); (7) bưởi Ruby (BRB); (8) bưởi Thanh Kiều (BTK); (9) bưởi Đường Trắng (BDT); (10) bưởi 5 Roi (STR)



Hình 2.6. Giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền của các giống bưởi

Theo kết quả ở Hình 2.6 với độ tương đồng dao động trong khoảng 0,66-0,95 với khoảng dao động là 0,07 được chia thành 3 nhóm chính: nhóm I với Nhóm 2 có hệ số tương đồng là 0,76, nhóm I, II với nhóm 3 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,66.

Nhóm I: chỉ có duy nhất mẫu bưởi Da Xanh Tiền Giang (BDTG)

Nhóm II: trong nhóm này lại được chia làm 3 nhóm nhỏ là: II.1: Gồm bưởi Da Xanh Sóc Trăng (ST) và bưởi Da Xanh Hậu Giang (BDHG) với hệ số tương đồng là 0,89. II.2: Gồm bưởi Da Xanh Vĩnh Long (BVL) và bưởi Da Xanh Bến Tre (BDB) với hệ số tương đồng là 0,94. II.3: Gồm bưởi Thanh Kiều (BTK) và bưởi Đường Trắng (BDT)

(BDT) với hệ số tương đồng gần 0,95. Nhóm III: chỉ có 2 giống là bưởi Ruby (BRB) và bưởi 5 Roi (STR) với hệ số tương đồng là 0,74.

Khảo sát vùng trình tự ITS, *ycf1b* và *psbK-I* cho thấy các vùng trình tự trên 9 mẫu bưởi thu được ở ĐBSCL tương đối đồng nhất với nhau về mặt di truyền qua phân tích trình tự. Tuy có một số sai khác nhưng những sai khác này đều chưa đủ độ tin cậy để xác định đây là mã vạch để nhận dạng bưởi Da Xanh với các giống bưởi khác.

Theo Dong *et al.*, 2015 *ycf1b* được xem như dấu phân tử có khả năng nhận diện cao hơn cả *matK* và *rbcL* đây là 2 vùng trình tự phổ biến được sử dụng rộng rãi để làm dấu phân tử, *ycf1b* được xem là dấu phân tử hiệu quả trong nhận diện phân tử ở các cấp độ phân loại thấp. Tuy nhiên, trong nghiên cứu được thực hiện ở cấp độ cao hơn trên cây có múi *ycf1b* lại không thể hiện được phong độ trước đó. Từ đó cho thấy rằng việc sử dụng *ycf1b* cho kết quả phân loại ở thực vật nói chung và cây có múi nói riêng kém hiệu quả so với phân loại ở các mức độ thực vật thấp hơn.

Ở vùng trình tự ITS có xuất hiện nhiều sai khác tuy chưa thể kết luận nó có phải là mã vạch trên cây có múi hay không, nhưng đây cũng cho thấy được sự đa dạng di truyền trên vùng trình tự ITS ở bưởi do vị trí sai khác có thể xuất hiện trong cùng giống hoặc khác giống. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Thanh Mến *et al.* (2008) tiến hành nghiên cứu đa dạng sinh học các giống bưởi ở Việt Nam.

Dựa vào giản đồ phả hệ có thể chia 9 mẫu bưởi thành 3 nhóm chính. Có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,66 – 0,95. Tuy nhiên kết quả trên cho thấy trong cùng một giống bưởi Da Xanh lại ở 2 nhóm khác nhau, là giống tại Tiền Giang (BDTG) có khác biệt lớn với hệ số tương đồng là 0,76 với các giống bưởi Da Xanh ở các tỉnh còn lại trong nghiên cứu là Sóc Trăng (ST), Hậu Giang (BDHG), Vĩnh Long (BVL), Bến Tre (BDB), trong khi 4 mẫu bưởi Da Xanh này lại cùng nằm trong nhóm II với bưởi Thanh Kiều (BTK) và bưởi Đường Tráng (BDT) nhưng vẫn có tách biệt với 4 mẫu bưởi Da Xanh với hệ số tương đồng là 0,85.

Từ giản đồ phả hệ cho thấy bưởi Da Xanh tập trung ở nhóm I và Nhóm II tách biệt hoàn toàn với nhóm III với hệ số tương đồng là 0,66 nên có thể sử dụng dấu phân tử ISSR để phân biệt bưởi Da Xanh Với 2 giống bưởi của nhóm III là bưởi Ruby và bưởi 5 Roi. Vì mẫu BDTG được thu từ Viện Cây Ăn Quả miền Nam còn 4 mẫu bưởi Da Xanh còn lại được thu trực tiếp tại vườn đây là nhóm bưởi Da Xanh phục vụ cho sản xuất. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt của bưởi Ruby so với bưởi năm roi cũng

như bưởi Da Xanh là do bưởi Ruby là giống cây có nguồn gốc từ thái lan được đem cây giống về Việt Nam không lâu nên dẫn đến việc có khác biệt di truyền so với các giống bưởi bản địa như bưởi Da Xanh và bưởi Năm Roi.

2. Cây cam Mật

Các mẫu trái cam, lá cam Mật, cam xoàn, cam sành, cam dây, cam cara được thu tại Cần Thơ, Hậu Giang, Bến Tre, Tiền Giang (Bảng 2.3).

Bảng 2.3. Danh sách giống cam được sử dụng trong thí nghiệm.

STT	Tên giống	Tọa độ		Địa điểm	Kí hiệu
		Vĩ độ	Kinh độ		
1	Cam Mật	10°23'41.6"N	106°05'46.1"E	Tiền Giang	CMTG
2	Cam Mật	10°01'40.5"N	105°40'11.8"E	Phong Điền- Cần Thơ	CMPD
3	Cam Mật	9°55'38"N	105°46'18"E	Hậu Giang	CMHG1
4	Cam Mật	9°56'49"N	105°45'57"E	Hậu Giang	CMHG2
5	Cam Mật	10°00'53.4"N	105°35'43.7"E	Cờ Đỏ-Cần Thơ	CMCT
6	Cam Mật	10°02'20.4"N	105°50'12.9"E	Trà Ôn-Vĩnh Long	CMVL
7	Cam Mật	10°11'11.9"N	106°12'55.5"E	Chợ Lách-Bến Tre	CMBT
8	Cam Cara	10°01'42.1"N	105°46'00.1"E	Cần Thơ	CCR
9	Cam Tứ Quý	10°00'53.4"N	105°35'43.7"E	Cờ Đỏ-Cần Thơ	CTQ
10	Cam Sành	10°23'51.2"N	106°16'47.1"E	VCAQMN (Tiền Giang)	CSVCAQ
11	Cam Dây	9°56'32.8"N	105°46'02.0"E	Hậu Giang	CDHG
12	Cam Xoàn	9°56'32.8"N	105°46'02.0"E	Hậu Giang	CXHG

2.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs

Dựa vào kết quả phân tích vùng gen *ycf1b* ở Bảng 2.4 cho thấy có 8 vị trí SNPs có thể phân biệt giữa các giống cam. Trong đó có 5 vị trí (577, 594, 597, 637 và 638) cho thấy cam Mật khác với các giống cam khác. Ở vị trí 577 và 594 nucleotide của cam Mật lần lượt là T và C, trong khi các giống cam khác là G. Ở vị trí 637 và 638 các giống cam khác mất 2 nucleotide G so với cam Mật. Đây là các vị trí SNPs quan trọng có thể dùng để phân biệt cam Mật và các giống cam khác trong nghiên cứu.

Bảng 2.4. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật với các giống cam khác ở vùng gen *ycf1b*

	Vị trí nucleotide							
MẪU	2	5	5	5	5	5	6	6
	6	5	5	7	9	9	3	3
	6	3	5	7	4	7	7	8
Cam Mật	G	A	A	T	C	G	G	G
Cam Cara	.	G	.	G	G	T	-	-
Cam Tứ Quý	T	.	G	G	G	T	-	-
Cam Sành	.	G	.	G	G	T	-	-
Cam Dây	T	G	.	G	G	T	-	-
Cam Xoàn	T	G	.	G	G	T	-	-

Ghi chú: Dấu chấm chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên được so sánh với cam Mật

Hai vùng *ycf1a* và *ycf1b* là các mã vạch hữu hiệu có thể sử dụng trong nhận dạng các loài thuộc chi Nhân sâm với mức độ phân biệt đạt được tương ứng là 83,33% và 91,67%. Theo Dong *et al.* (2012) bởi vì vùng *ycf1* quá dài (5709 bp trong *Nicotiana tabacum*) và quá thay đổi để thiết kế các đoạn mồi phổ biến, nó đã ít được chú ý đến trong mã vạch DNA hoặc hệ thống phân tử ở mức độ phân loại thấp; tuy nhiên, sự biến đổi cao của *ycf1* cho thấy giá trị tiềm năng của nó trong mã vạch DNA của thực vật. Dong *et al.* (2012) kết luận rằng *ycf1a* hoặc *ycf1b* là vùng gen plastid biến đổi nhất và có thể dùng làm mã vạch cốt lõi của thực vật.

Các trình tự ITS, rpoC1 không tìm thấy sự khác biệt giữa các giống cam nghiên cứu.

Ở vùng trình tự atpF-atpH có 26 vị trí sai khác của nucleotide giữa các trình tự. Các vị trí sai khác lần lượt là 420; 446; 449; 452; 457; 458; 460; 465; 469; 470; 471; 496; 503; 506; 512; 523; 531; 536; 537; 540; 549; 550; 553; 572; 574 và 575. (Bảng 2.5)

Bảng 2.5. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật không hạt với các giống cam khác ở vùng gen atpF-atpH

	Vị trí Nucleotide																											
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MÃU	2	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	9	0	0	1	2	3	3	3	3	4	4	5	5	7	7	7	
	0	6	9	2	7	8	0	5	9	0	1	6	3	6	2	3	1	6	7	0	9	0	3	2	4	5		
Cam Mật	A	T	A	T	A	A	G	C	A	A	A	T	A	C	A	T	C	T	A	A	C	C	C	G	G	A		
Cam Cara	G	C	.	A	G	G	.	.	T	G	.	G	T	.	C	G	.	A	A	.	A	G		
Cam tứ quý	.	.	G	A	.	.	.	A	T	T	G	.	T	A	.	G	A	.	A	T	.	G		
Cam sành	G	.	G	T	.	.	C	T	T	T	.	T	.	C	G	.	.	A	T	.	.		
Cam dây	G	C	.	.	G	.	A	.	T	G	G	C	T	.	T	G	.	A	C	G		
Cam xoàn	G	.	T	T	G	G	.	T	.	.	G	T	.	.	G	G	G	

Ghi chú: Dấu chấm chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên được so sánh

Ở vùng gen *atpF-atpH* của một số nghiên cứu khác, Wang *et al.* (2010) đã nhận định *atpF-atpH* có thể đóng vai trò như một dấu hiệu mã vạch DNA phổ biến để xác định của bèo tấm (*Lemnoideae*) ở cấp độ loài. Đoạn trình tự *atpF-atpH* và *psbK-psbI* được đề xuất làm mã vạch cho thực vật ở hội thảo quốc tế Barcode of life lần thứ hai (Lee *et al.*, 2007). Cả hai đoạn đều nằm trong vùng trình tự đơn bản lớn của hệ gen lục lạp. Đoạn gen *atpF-atpH* mã hóa cho hai tiểu đơn vị tổng hợp ATP và CFO I và CFO III. Đoạn trình tự liên gen này cũng có chiều dài thay đổi giữa các loài, khoảng 579-622bp với đoạn *atpF-atpH* (Wang *et al.*, 2010). Trình tự này trước đó không được sử dụng rộng rãi trong hệ thống học và phân loại học thực vật, do vậy không có nhiều kết quả được công bố. Theo nghiên cứu của nhóm nghiên cứu thực vật CBOL, *atpF-atpH* cho kết quả khiêm tốn nhất trong việc phân biệt giữa các loài và mức độ phổ biến cũng như chất lượng trình tự chỉ ở ngưỡng trung bình. (Hollingsworth, 2011).

Ở vùng trình tự *trnH-psbA*, có 12 vị trí sai khác của nucleotide giữa các trình tự. Các vị trí sai khác lần lượt là 338; 340; 353; 358; 369; 372; 380; 381, 382; 383; 384 và 389 (Bảng 2.6).

Bảng 2.6. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật không hạt với các giống cam khác ở vùng gen *trnH-psbA*

	Vị trí Nucleotide											
MẪU	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	3	4	5	5	6	7	8	8	8	8	8	8
	8	0	3	8	9	2	0	1	2	3	4	9
	A	A	A	A	A	G	A	C	C	T	G	C
Cam Mật	G	.	C	T	.	.	C	.	C	C	.	G
Cam Cara	G	T	T	.	T	T	.	G	G	C	.	T
Cam Tứ Quý	.	T	C	T	C	T	.	G	G	C	T	T
Cam Sành	G	.	C	T	T	T	.	G	G	.	.	T
Cam Dây	G	T	C	T	.	.	G	T	T	G	.	.

Ghi chú: Dấu chấm chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên được so sánh

Ở một số nghiên cứu khác trên vùng gen *psbA-trnH*, Vũ Huyền Trang và cs. (2013) đã nghiên cứu xây dựng mã vạch DNA cho Sâm Ngọc linh trên cơ sở 5 chỉ thị DNA mã vạch *psbA-trnH*, *matK*, *trnL*, *rbcL* và ITS. Nhóm tác giả đã chứng minh trong 5 chỉ thị mã vạch nghiên cứu, *psbA-trnH* là chỉ thị có tiềm năng nhất, cho phép phân biệt Sâm Ngọc linh với các loài sâm khác trên thế giới với độ chính xác cao.

Vùng *psbK-psbI* có 18 vị trí sai khác của nucleotide giữa các trình tự, từ vị trí 206 đến 213 các giống cam nghiên cứu đều bị đột biến mất nucleotide, chỉ có giống cam dây không bị mất. Ngược lại từ vị trí 277 đến 284; 358 và 359 các giống cam đều xuất hiện nucleotide, chỉ giống cam dây bị mất đột biến mất nucleotide (Bảng 2.7).

Bảng 2.7. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống cam Mật không hạt với các giống cam khác ở vùng gen *psbK-psbI*

	Vị trí Nucleotide																	
MẪU	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
	0	0	0	0	1	1	1	1	7	7	7	8	8	8	8	8	5	5
	6	7	8	9	0	1	2	3	7	8	9	0	1	2	3	4	8	9
Cam Mật	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	T	G	T	T	T	G	T	T
Cam Cara	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam Tứ Quý	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam Sành	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam Dây	T	A	A	T	C	A	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam Mật	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: Dấu chấm chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên được so sánh

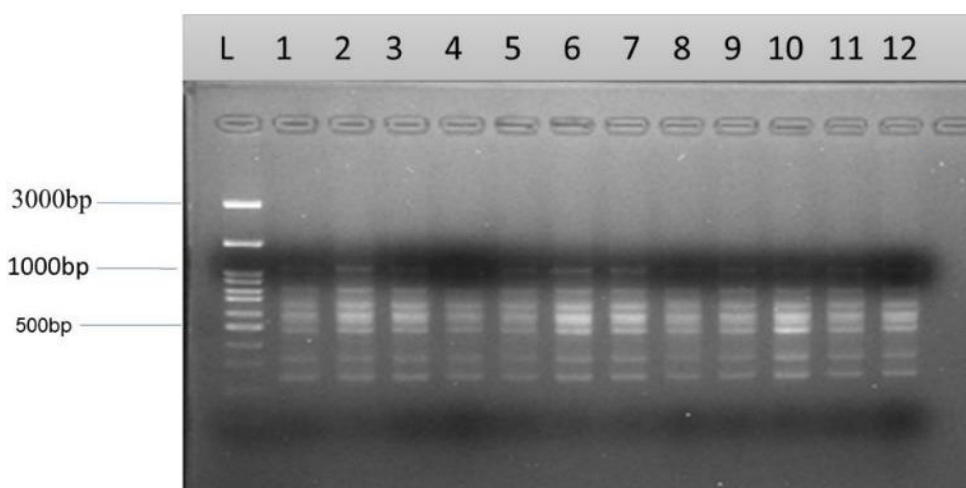
Đoạn trình tự *psbK-psbI* được đề xuất làm mã vạch cho thực vật ở hội thảo quốc tế Barcode of life lần thứ hai (Lee *et al.*, 2007). Hai gen *psbK-psbI* mã hóa cho hai polypeptide có khối lượng phân tử thấp là K và I của hệ thống quang hóa II (Lahaye *et al.*, 2008). Giống như *psbA-trnH*, đoạn trình tự liên gen này cũng có chiều dài thay đổi giữa các loài 185-576bp đối với *psbK-psbI* (Wang *et al.*, 2010). Trình tự này trước đó không được sử dụng rộng rãi trong hệ thống học và phân loại học thực vật, do vậy

không có nhiều kết quả được công bố. Theo nghiên cứu của nhóm nghiên cứu thực vật CBOL, *psbK-psbI* cho kết quả phân biệt tốt nhưng tính phổ biến không cao (Hollingsworth, 2011).

2.2. Đa dạng di truyền các giống cam dựa vào dấu phân tử ISSR

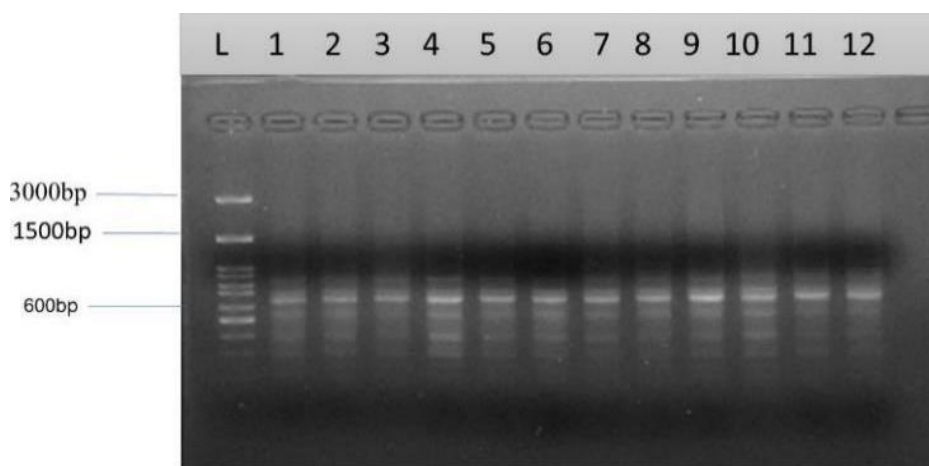
Dấu phân tử ISSR được Capparelli *et al.* (2004) sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu chanh thu thập tại Italy, góp phần vào việc phân biệt và chọn các giống khác nhau về các đặc điểm hình thái nông học cũng như góp phần vào nguồn thông tin cho việc tiến hóa và nguồn gốc phát sinh loài.

Kết quả phân tích dấu ISSR trên các mẫu cam cho thấy ISSR03, ISSRK2 và ISSRK3 đều xuất hiện các băng đa hình cho thấy sự đa dạng di truyền giữa các giống và đủ điều kiện để xây dựng bản đồ phả hệ (Hình 2.7, Hình 2.8 và Hình 2.9).



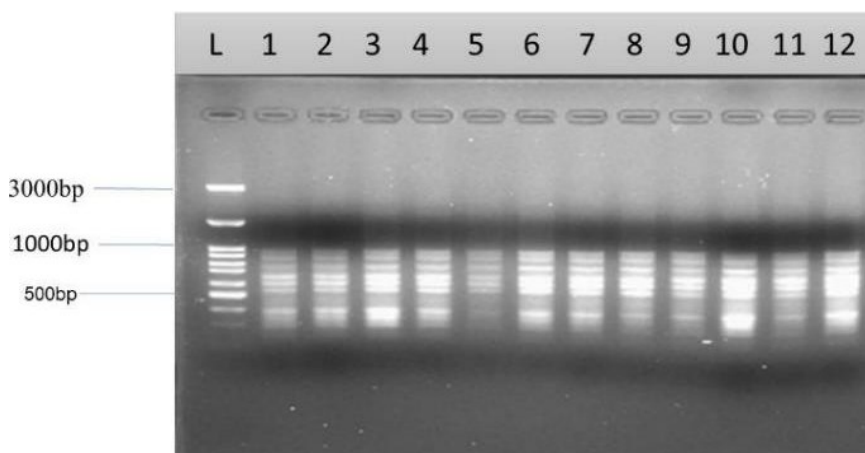
Hình 2.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR03

L.Thang chuẩn 100bp 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN); 11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG.)



Hình 2.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR K2

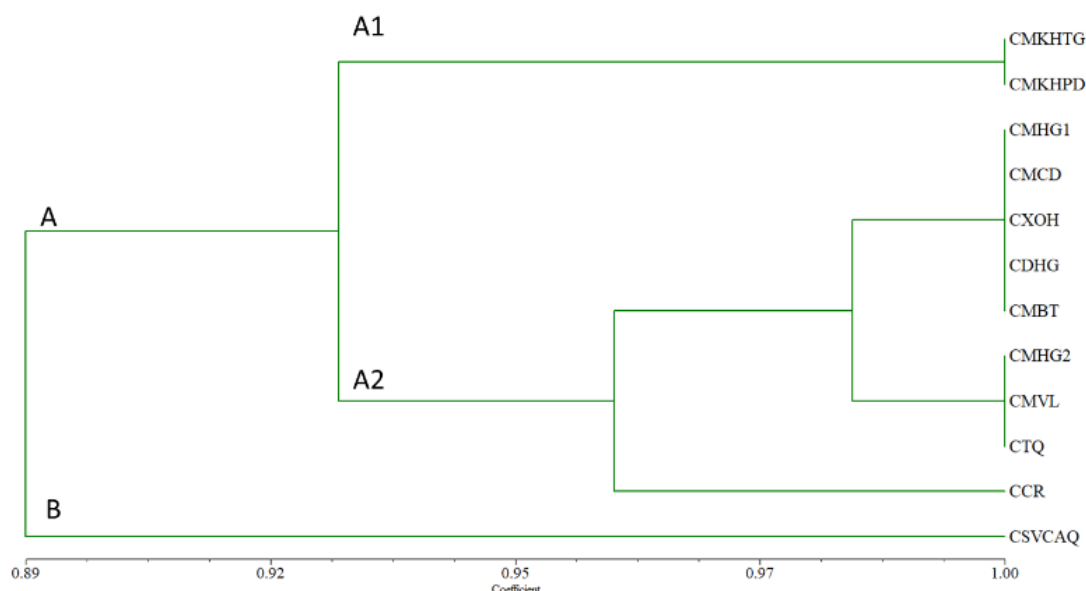
L.Thang chuẩn 100bp 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN); 11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG.)



Hình 2.9. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR K3

L.Thang chuẩn 100bp 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN); 11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG.)

Từ kết quả của Hình 2.10 cho thấy mức độ tương đồng của các mẫu biến thiên từ 0,89 đến 1. Tại mức tương đồng 0,89 có sự phân chia nhóm thành hai nhóm chính và nhiều nhóm phụ.



Hình 2. 10. Hình giản đồ thể hiện mối tương quan di truyền của các mẫu cam

Nhóm A có mức độ tương đồng từ 0.89 đến 1. Nhóm A chia thành 2 nhóm phụ A1 và A2. Nhóm phụ A1 có mức độ tương đồng từ 0.927 đến 1 gồm các mẫu CMTG, CMPD. Nhóm phụ A2 có mức độ tương đồng từ 0.927 đến 1 gồm các mẫu CMHG1, CMCD, CXOH, CDHG, CMBT, CMHG2, CMVL, CTQ. Nhóm phụ A2 chia ra nhóm phụ là CCR với mức độ tương đồng 0.965 đến 1. Nhóm phụ B với mức độ tương đồng từ 0.89 đến 1.

Thông qua phổ điện di của sản phẩm với các môi ISSR và giản đồ phả hệ của 12 mẫu cam nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu cam Mật không hạt và các mẫu cam khác trong nghiên cứu. Ở nghiên cứu của Vũ Văn Hiếu và cs. (2015) cho thấy các mẫu cam sành có sự đa dạng về mặt di truyền cao với hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,62 - 0,98 thông qua các phân tích chỉ thị ISSR. Rima *et al.* (2011) đã sử dụng 11 môi SSR và 10 môi 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 độ đa dạng di truyền thấp nhất.

Từ những kết quả trên, ISSR đã phát hiện thành công sự biến đổi giữa các mẫu cam Mật, mà đặc điểm hình thái trái khó có thể phân biệt được. Trong phân loại và các lĩnh vực khác, di truyền học và hình thái học có thể tương tác hiệu quả như công cụ bổ sung để hiểu được nguồn gốc của sự khác biệt kiểu hình (Klingenberg, 2010). Cần tiếp

tục đánh giá đa dạng di truyền giống cam Mật không hạt bằng các dấu phân tử ISSR với các mẫu khác nhau và từ đó ứng dụng vào chọn tạo giống cây cam Mật không hạt trong tương lai.

3. Cây chôm chôm Nhãn

Thí nghiệm được thực hiện trên mẫu lá tươi của các giống chôm chôm bao gồm: Chôm chôm Nhãn, chôm chôm Java, chôm chôm Thái, chôm chôm Tta, chôm chôm Indo, chôm chôm rừng ruột vàng và chôm chôm vỏ vàng. Thu mẫu lá cây của các giống trên tại các vườn chôm chôm đầu dòng ở các vùng trọng điểm trồng chôm chôm của cả nước, bao gồm: huyện Chợ Lách - tỉnh Bến Tre, cù lao An Bình - tỉnh Vĩnh Long, huyện Phong Điền - thành phố Cần Thơ và huyện Krông Năng - tỉnh Đắk Lắk (Bảng 2.8).

Bảng 2.8. Danh sách các giống chôm chôm được sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên giống	Toạ độ thu mẫu		Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu mẫu
		Kinh độ	Vĩ độ		
1	CC. Nhãn	9°59'32.9''N	105°42'05.6''E	Phong Điền, Cần Thơ	NC
		10°15'58.0''N	106°05'43.1''E	Chợ Lách, Bến Tre	NB
		10°16'51.1''N	105°58'23.3''E	Long Hồ, Vĩnh Long	NV
2	CC. Thái	9°59'32.9''N	105°42'05.6''E	Phong Điền, Cần Thơ	TC
		10°15'58.0''N	106°05'43.1''E	Chợ Lách, Bến Tre	TB
		10°16'51.1''N	105°58'23.3''E	Long Hồ, Vĩnh Long	TV
3	CC. Java	9°59'32.9''N	105°42'05.6''E	Phong Điền, Cần Thơ	JC

		10°15'57.3''N	106°05'41.5'' E	Chợ Lách, Bến Tre	JB
		10°16'51.1''N	105°58'23.3'' E	Long Hồ, Vĩnh Long	JV
4	CC. Indo	10°16'51.1''N	105°58'23.3'' E	Long Hồ, Vĩnh Long	I
5	CC. Ta	9°59'32.9''N	105°42'05.6'' E	Phong Điền, Cần Thơ	O
6	CC. Vò Vàng	9°59'20.1''N	105°41'31.2'' E	Phong Điền, Cần Thơ	V
7	CC. Rừng	13°05'13.1''N	108°25'23.1'' E	Krông Năng, Đắk Lắk	R
8	CC. lai Tiến Cường	10°14'37.0''N	106°07'14.8'' E	Chợ Lách, Bến Tre	L

3.1. Kết quả phân tích vùng trình tự DNA mã vạch

Kết quả phân tích cho thấy, bằng việc sử dụng cặp mồi *matK*-4600/*trnK*-2R, có chín vị trí SNP đáng tin cậy được ghi nhận. Các vị trí SNP khác được thể hiện trong phần phụ lục 4, tuy nhiên khi kiểm tra song song trình tự tại các vị trí này, nhận thấy các peak đều bị nhiễu hoặc không rõ, cũng như không có độ tin cậy cao do trình tự giống lặp lại không trùng khớp. Vì những lý do trên, chỉ có 9 SNP được sử dụng để phân tích khả năng nhận diện của cặp mồi trên các giống loài chôm chôm trong nghiên cứu.

Trong đó, có một số SNP chỉ hiện diện ở một giống duy nhất, thể hiện tính đặc trưng cho giống, có thể kể đến là: Vị trí 454 sau khi alignment, trong khi các giống loài chôm chôm khác đều là nu. A, thì nu. G lại xuất hiện ở duy nhất giống chôm chôm rừng. Vị trí 637, chỉ có giống chôm chôm Java xuất hiện nu. A. Tại các vị trí 669, 670 và 718 chỉ có giống chôm chôm lai Tiến Cường xuất hiện SNP đặc trưng lần lượt là C, A và A (Bảng 2.9).

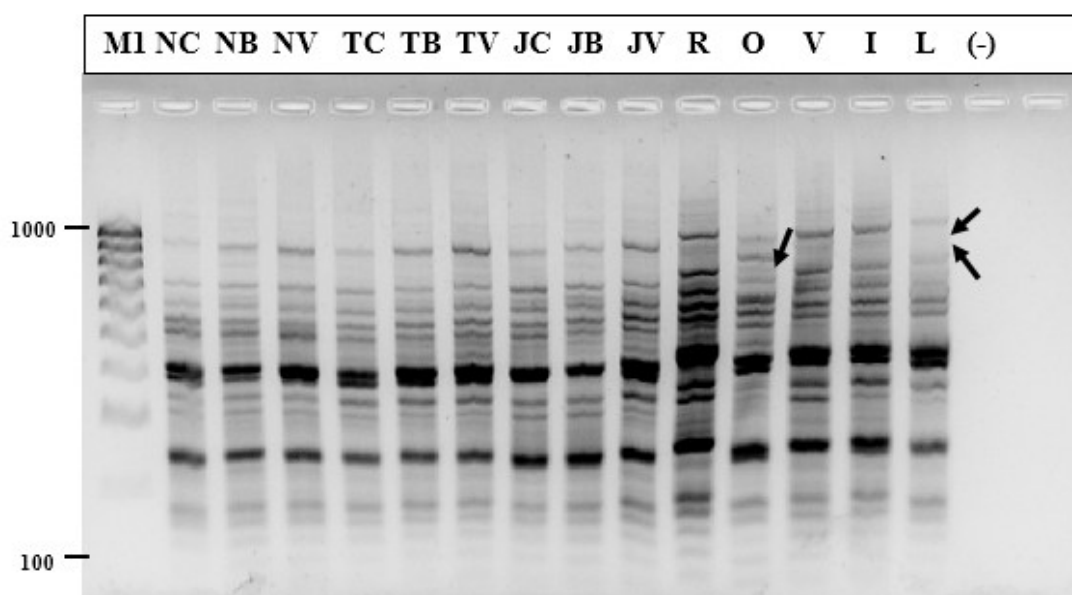
Bảng 2.9. Thống kê các dấu SNP đặc trưng trên gen *matK* của 15 trình tự thuộc chi *Nephelium*

Vị trí SNP đặc trưng	106	170	257	454	637	669	670	707	718
Chôm chôm Nhân	T	T	G	A	-	A	T	G	G
Chôm chôm Thái	T	T	G	A	-	A	T	G	G
Chôm chôm Java	C	C	T	A	A	A	T	A	G
Chôm chôm Ta	C	C	T	A	-	A	T	A	G
Chôm chôm Vô Vàng	C	C	T	A	-	A	T	A	G
Chôm chôm Rừng Ruột Vàng	T	C	G	G	-	A	T	G	G
Chôm chôm Tiến Cường	T	T	G	A	-	C	A	G	A
MT936934.1 (NCBI)	T	T	G	A	-	A	T	G	G
AY724316.1 (NCBI)	T	C	G	A	-	A	T	G	G
AF314801.1 (NCBI)	C	C	T	A	-	A	T	A	G

Từ kết quả này, một kết luận được đưa ra: Cặp mồi *matK*-4600/*trnK*-2R khuếch đại gen *matK*, có thể được sử dụng làm DNA mã vạch để nhận diện giống chôm chôm rừng ruột vàng, chôm chôm Java và giống chôm chôm lai Tiến Cường của Việt Nam. Ngoài ra, những dấu SNP này còn là cơ sở để vẽ cây quan hệ di truyền, từ đó khảo sát được sự đa dạng về kiểu gen của các giống chôm chôm được sử dụng trong đề tài.

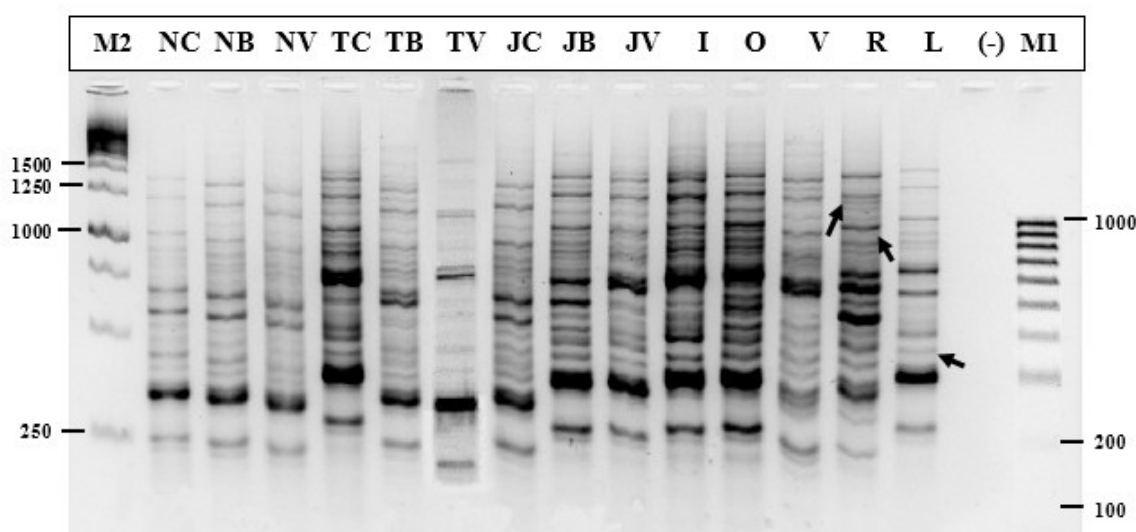
3.2. Kết quả phân tích đa hình bằng dấu phân tử ISSR

Để khuếch đại DNA của các mẫu chôm chôm Việt Nam nhằm phân tích đa hình, 2 mồi ISSR đã được sử dụng theo lược khảo từ nghiên cứu của Madihah *et al.* (2018). Nghiên cứu của Madihah đã chỉ ra 6 mồi ISSR cho kết quả biểu hiện thành công sự đa hình giữa các giống chôm chôm, trong đó 2 mồi ISSR 10 và ISSR 23 là cho tỉ lệ băng đa hình cao nhất, lần lượt là 92% và 100% băng đa hình trên tổng số băng. Dựa trên kết quả này, đề tài cũng khảo sát đa hình các giống chôm chôm tại Việt Nam bằng 2 mồi ISSR 10 (Hình 2.11) và ISSR 23 (Hình 2.12).



Hình 2.11. Kết quả điện di với môi ISSR 10

M1: marker 1kb, **NC:** cc. Nhãn Cần Thơ, **NB:** cc. Nhãn Bến Tre, **NV:** cc. Nhãn Vĩnh Long, **TC:** cc. Thái Cần Thơ, **TB:** cc. Thái Bến Tre, **TV:** cc. Thái Vĩnh Long, **JC:** cc. Java Cần Thơ, **JB:** cc. Java Bến Tre, **JV:** cc. Java Vĩnh Long, **O:** cc. ta, **R:** cc. rừng, **V:** cc. vỏ vàng, **I:** cc. Indo, **L:** cc. lai Tiến Cường



Hình 2.12. Kết quả điện di với môi ISSR 23

M2: marker 3kb, **NC:** cc. Nhãn Cần Thơ, **NB:** cc. Nhãn Bến Tre, **NV:** cc. Nhãn Vĩnh Long, **TC:** cc. Thái Cần Thơ, **TB:** cc. Thái Bến Tre, **TV:** cc. Thái Vĩnh Long, **JC:** cc. Java Cần Thơ, **JB:** cc. Java Bến Tre, **JV:** cc. Java Vĩnh Long, **O:** cc. ta, **R:** cc. rừng, **V:** cc. vỏ vàng, **I:** cc. Indo, **L:** cc. lai Tiến Cường, **M1:** marker 1kb

Ở nghiên cứu này, mỗi môi ISSR cho trung bình 11 băng đa hình, chiếm 47,8% so với tổng số băng khuếch đại được trên mỗi mẫu. Kết quả này khá tương đồng với

một số nghiên cứu như: Napitu *et al.* (2016) trên 5 giống chôm chôm, thu thập tại 5 tỉnh của Indonesia. Cũng với 2 môi ISSR được sử dụng, tỉ lệ băng đa hình quan sát được dao động từ 25 – 87,5% trên tổng số băng. Trong đó, 3 trên 5 tỉnh có tỉ lệ băng đa hình gần giống với kết quả đề tài này là 44-56% và số băng đa hình mỗi môi thu được là 13 và 21 băng. Nghiên cứu của Qiu *et al.* (2007) trên đối tượng *Dipteronia dyerana* (kim tiền túc) thuộc họ *Sapindaceae* tại tỉnh Vân Nam, Trung Quốc cũng cho 70,8% là băng đa hình với 10 môi ISSR và 15,4 băng được tạo ra trên mỗi môi. Còn theo Madihah *et al.* (2018), 6 dấu phân tử ISSR được chọn đã khuếch đại được 87% trên tổng số băng là băng đa hình của 30 mẫu chôm chôm Indonesia và số lượng băng trung bình quan sát được ở mỗi môi là 9 băng.

Trong khi đó, nghiên cứu của Degani *et al.* (2003) trên 66 giống và dòng vải, cùng họ *Sapindaceae* với chôm chôm, cho kết quả 64% băng đa hình được ghi nhận nhờ 32 môi ISSR, trung bình mỗi môi chỉ cho từ 3,7 đến 5,5 băng đa hình, ít hơn nhiều so với 11 băng thu được từ các giống chôm chôm Việt Nam.

Dựa trên các tài liệu này, ta nhận thấy tỉ lệ băng đa hình quan sát được và số lượng băng đa hình trung bình trên mỗi môi có một vài điểm khác biệt. Nguyên nhân của các sai lệch này có thể là do sự khác nhau trong độ dài và trình tự mỗi ISSR được sử dụng ở mỗi nghiên cứu. Cụ thể là, ở nghiên cứu Degani *et al.* (2003), có 32 môi ISSR được sử dụng tất cả đều có độ dài lớn và trình tự phức tạp, trong đó 27/32 môi gồm 2 nu. lặp lại và 1 đến 3 vị trí neo (anchor), do đó tất cả đều có kích thước lên đến 17 - 19 nu.. Các môi còn lại, dù không có vị trí neo nhưng số lượng nu. lặp lại là 3 đến 5 nu., tạo thành các poly-nucleotide primer với kích thước từ 15 đến 18 nu.. Từ đó, số lượng băng đa hình từ nghiên cứu Degani *et al.* (2003) thu được cũng ít và dao động từ 1-5 băng mỗi môi. Còn ở đề tài này, 2 môi ISSR 10 và 23 được sử dụng, cả hai đều có kích thước 14 nu. với cấu tạo trình tự đơn giản, do đó dễ dàng bắt cặp được với nhiều vị trí hơn trên bộ gen chôm chôm, từ đó thu được nhiều băng hơn. Tuy nhiên, các băng lại không rõ nét như kết quả của Degani *et al.* (2003), từ đó cho thấy tầm quan trọng của việc thiết kế trình tự ISSR phù hợp với mẫu nghiên cứu để cho ra kết quả đa hình đáng tin cậy.

Phương pháp phân tích đa hình dựa trên môi ISSR này đã chia tám giống – 14 mẫu chôm chôm thành bốn nhóm lớn. Với hệ số tương đồng giữa các giống dao động từ 72 đến 100%. Ở mức tương đồng 84,8%, có hai giống chôm chôm thuộc nhóm 1,

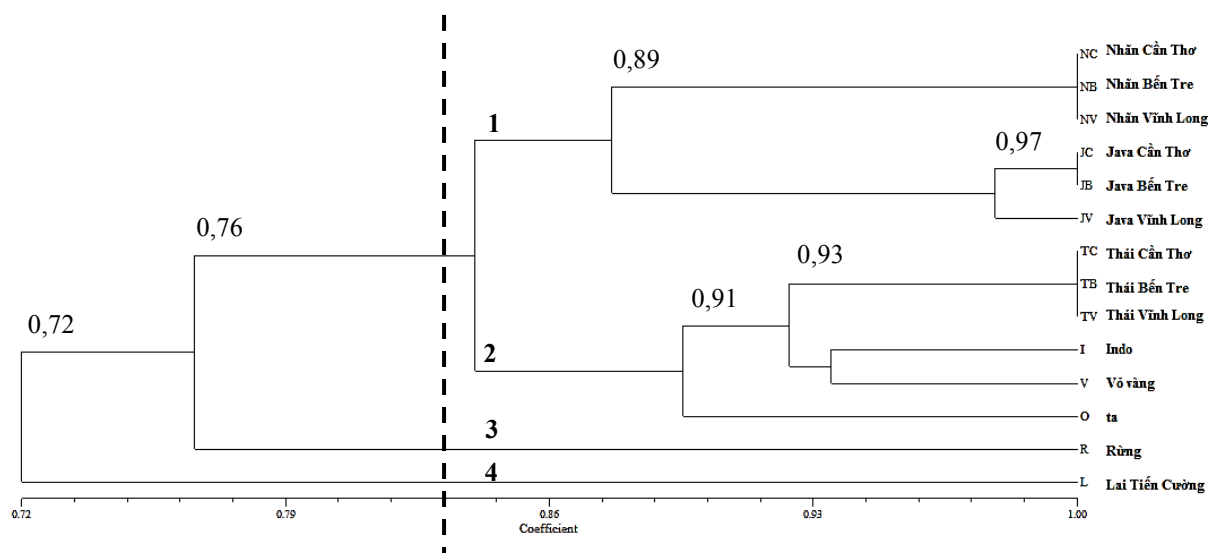
nhóm 2 có bốn giống, nhóm 3 chỉ có giống chôm chôm rừng và nhóm 4 chỉ gồm duy nhất giống lai Tiến Cường (Hình 2.13).

Nhóm 1 của giản đồ phân nhánh bao gồm sáu mẫu chôm chôm thuộc hai giống chôm chôm Nhãn và chôm chôm Java được thu ở ba tỉnh của Đồng bằng sông Cửu Long là Cần Thơ, Bến Tre và Vĩnh Long. Với mức độ tương đồng là 97% và 100%, các mẫu chôm chôm cùng giống nhưng thu tại các tỉnh khác nhau gần như đồng nhất và cho phổ điện di với 2 môi ISSR 10 và ISSR 23 như nhau, hay nói cách khác chúng không có hoặc rất ít khác biệt về di truyền dựa trên ISSR 10 và ISSR 23 ở các lần thu mẫu lặp lại. Tuy nhiên, mức độ tương đồng giữa chôm chôm nhãn và chôm chôm Java lại khá lớn, rơi vào khoảng 89%.

Nhóm 2 trên giản đồ phân nhánh gồm 4 giống chôm chôm còn lại: chôm chôm Thái, chôm chôm Indo, chôm chôm ta và chôm chôm vỏ vàng. Với 2 môi ISSR 10 và ISSR 23, mức độ tương đồng giữa các giống Thái thu ở các tỉnh khác nhau là 100%; còn mức độ tương đồng giữa giống chôm chôm Thái với giống Indo và giống vỏ vàng là 93,5%.

Dựa vào giản đồ phân nhánh, có thể nhận thấy mức độ tương đồng giữa giống chôm chôm ta này với chôm chôm Thái, Indo và vỏ vàng khoảng 91,3%, gần nhất so với các giống còn lại. Bên cạnh đó, băng đa hình xuất hiện tại mẫu chôm chôm ta bằng môi ISSR 10 đã góp phần vào các nghiên cứu nhận diện giống chôm chôm này trong tương lai. Hình 21, biểu hiện giống chôm chôm ta thiếu một băng tại vị trí khoảng 750 bp, trong khi các giống còn lại đều có băng này.

Ở nhóm 3 và 4, mỗi nhóm chỉ gồm một giống nằm trên một nhánh riêng biệt trên giản đồ. Điều đó cho thấy, các giống này có sự khác biệt nhiều về mặt di truyền so với sáu giống còn lại. Trong đó, giống chôm chôm lai Tiến Cường có sự khác biệt nhiều nhất với mức độ tương đồng khoảng 72%, còn giống chôm chôm rừng cũng chỉ có mức độ tương đồng so với các giống khác vào khoảng 76%. Đặc biệt giống lai Tiến Cường có thể nhận diện được với các giống khác nhờ vào sự xuất hiện của các băng đa hình đặc trưng với môi ISSR 10 và ISSR 23. Cụ thể, ở hình phổ điện di với môi ISSR 10, trong khi các mẫu khác đều cho ra 2 băng ở vị trí khoảng 800-900 bp, thì mẫu chôm chôm lai lại không có 2 băng này.



Hình 2.13. Giản đồ phân nhánh của 8 giống chôm chôm bằng phương pháp UPGMA

Ở hình phổ điện di ISSR 23, tại vị trí khoảng 230 bp, chôm chôm lai Tiến Cường lại thiếu mất một băng trong khi các mẫu chôm chôm khác đều có. Tương tự, giống chôm chôm rừng cũng có thể được nhận diện với các giống chôm chôm khác nhờ mỗi ISSR 23. Cụ thể, tại vị trí 1100 bp, mẫu chôm chôm rừng xuất hiện một băng đa hình chỉ có ở giống này, các giống khác đều không xuất hiện và đồng thời mẫu này lại thiếu một băng tại vị trí khoảng 850 bp, trong khi các giống khác đều có. Kết quả sáu vị trí băng đa hình này có thể được xem như những khảo sát cơ bản của việc ứng dụng dấu phân tử ISSR 10 và ISSR 23 vào việc nhận diện giống chôm chôm lai Tiến Cường và chôm chôm rừng ruột vàng so với các giống chôm chôm khác được sử dụng trong nghiên cứu.

4. Cây dâu hạ châu

Tổng cộng đã thu được 12 mẫu dâu (dâu Hạ Châu, dâu đỏ, dâu xanh, dâu vàng, dâu Xiêm) từ 2 tỉnh Hậu Giang, Bến Tre và Thành phố Cần Thơ. Kết quả thu mẫu được trình bày trong Bảng 2.10.

Bảng 2.10. Các mẫu dâu đã thu được

STT	TÊN	ĐỊA ĐIỂM	KÍ HIỆU	N	E
1	Dâu xanh (cái)	Vườn dâu Thiên Ân ,Phong Điền, Hậu Giang	DXAHG	9°50'34.22"	105°45'39.15"
2	Dâu vàng (cái)	Vườn trái cây Vàm Xáng, Phong Điền Cần Thơ	DDVX	9°59'36.32"	105°40'12.69"
3	Dâu Xiêm (cái)	Vườn trái cây Vàm Xáng, Phong Điền Cần Thơ	DXVX	9°59'36.32"	105°40'12.69"
4	Hạ Châu (đực)	Vườn trái cây Vàm Xáng, Phong Điền Cần Thơ	DHCVX	9°59'36.32"	105°40'12.69"
5	Hạ Châu (cái)	Vườn trái cây Vàm Xáng, Phong Điền Cần Thơ	CHCVX	9°59'36.32"	105°40'12.69"
6	Dâu xanh (cái)	Vườn trái cây Vàm Xáng, Phong Điền Cần Thơ	DXAVX	9°59'48.36"	105°40'07.18"
7	Hạ Châu (cái)	Ô Môn, Cần Thơ	CHCOM	10°06'59.4"	105°40'02.4"
8	Dâu Xiêm (đực)	Ô Môn, Cần Thơ	DDXOM1	10°06'59.4"	105°40'02.4"
9	Dâu Xiêm (đực)	Ô Môn, Cần Thơ	DDXOM2	10°06'59.4"	105°40'02.4"
10	Dâu Xanh (cái)	Bến Tre	DXABT	10°14'27.94"	106°10'11.48"
11	Hạ Châu (cái)	Vườn trái cây 9 Hồng, Phong Điền, Cần Thơ	CHC9H	9°59'48.36"	105°40'07.18"
12	Dâu Vàng (cái)	Vườn trái cây 9 Hồng, Phong Điền, Cần Thơ	DV9H	9°59'48.36"	105°40'07.18"

4.1. Kết quả phân tích vùng trình tự DNA mã vạch

Ở các vị trí nucleotide số 393, 716, 723, 736, 742, 743, 745, 747, 762, 767 và 768 của dâu Hạ Châu khác biệt hoàn toàn với các mẫu dâu còn lại (Bảng 2.11).

Bảng 2. 11. So sánh trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu khác

Mẫu	Vị trí nucleotide														
	393	716	723	736	742	743	745	746	747	758	762	767	768	771	
Dâu hạ châu	G	T	T	C	G	A	T	C	C	G	T	G	T	A	
Dâu vàng	A	A	-	G	A	T	C	-	G	T	-	-	C	-	
Dâu xiêm	A	A	-	G	A	T	C	-	G	.	-	-	C	.	
Dâu xanh	A	A	-	G	A	T	C	.	G	T	-	-	C	-	

Ghi chú: Dấu chấm “.” chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu dâu tiên. Dấu “-” chỉ vị trí nucleotide bị mất

Dựa vào kết quả trên, thấy được trình tự của dâu Hạ Châu khác biệt hoàn toàn với các mẫu dâu đối chứng ở 11 vị trí nucleotide. Vùng trình tự *atpF-atpH* cũng đã xác thực thành công một số cây thuốc trong nghiên cứu công bố trước đây (Techaen *et al.*, 2014). Qua đó có thể nói vùng gen *atpF-atpH* có khả năng được sử dụng để phân biệt dâu Hạ Châu với các giống dâu khác.

Ở vùng trình tự *psbK-psbI* cho thấy được sự khác biệt hoàn toàn giữa trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu đối chứng tại vị trí nucleotide số 94, 95, 113, 121, 215 và 431 (Bảng 2.12).

Bảng 2.12. So sánh trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu đối chứng

Mẫu	Vị trí nucleotide											
	54	94	95	113	121	215	244	249	289	291	301	431
Dâu hạ châu	A	C	C	C	A	A	T	T	G	T	T	A
Dâu vàng	C	G	A	A	C	G	T
Dâu xiêm	C	A	A	A	T	G	G	.	A	C	C	T
Dâu xanh	C	A	A	A	T	G	G	.	A	C	C	T

Ghi chú: Dấu chấm “.” chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên. Dấu “-” chỉ vị trí nucleotide bị mất

Kết quả phân tích trình tự gen *rbcL* ở các mẫu dâu cho thấy, chỉ có vị trí nu 35 có thể phân biệt được dâu hạ châu (nu A) và các dâu khác (nu C) (Bảng 2.13).

Bảng 2.13. So sánh trình tự của dâu Hạ Châu với các mẫu dâu đối chứng ở gen *rbcL*

Mẫu	Vị trí nucleotide							
	35	65	101	113	302	511	523	526
Dâu hạ châu	A	A	G	G	G	T	T	A
Dâu vàng	C	-	-	-
Dâu xiêm	C
Dâu xanh	C

Ghi chú: Dấu chấm “.” chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên. Dấu “-” chỉ vị trí nucleotide bị mất

4.2. Đa dạng di truyền dựa vào dấu phân tử ISSR

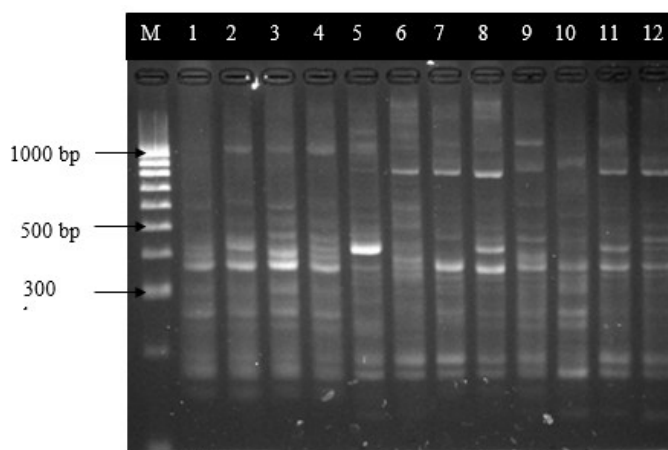
Kết quả điện di PCR của 8 mồi ISSR trên 12 mẫu dâu, cho thấy có 7 mồi cho kết quả đa hình, mồi ISSR 27 cho ra kết quả đơn hình. Tổng số băng được khuếch đại là 91 băng trong đó có 55 băng cho kết quả đa hình (chiếm tỉ lệ 60,44%), trung bình 6,88 băng đa hình cho mỗi mồi. Kết quả này là khá tốt khi ở nghiên cứu của Hoàng Đăng Hiếu *et al.* (2016) khi sử dụng 10 mồi ISSR trong việc đánh giá di truyền ở quần thể Ba Kích nhưng chỉ có 6 mồi cho ra kết quả đa hình.

Trong 8 môi, môi ISSR 03 thể hiện sự đa hình giữa các mẫu cao (Hình 2.14). Tất cả các băng được khuếch đại đều là băng đa hình (chiếm tỉ lệ 100%) và có chỉ số PIC = 0,52 cao nhất trong các mẫu. Trọng lượng phân tử lớn nhất ở kích thước khoảng 850 bp và nhỏ nhất khoảng 220 bp. Hầu hết ở các mẫu dâu đều có sự khác biệt về số lượng băng và vị trí kích thước trên gel. Do đó, có thể sử dụng môi này cho các nghiên cứu đa dạng trên các giống dâu sau này.

Ngoài ra, các môi ISSR 12, ISSR 22, ISSR 31, ISSR K1, ISSR K2 cũng cho thấy sự đa hình rõ nét, băng đa hình chiếm tỉ lệ khá cao lần lượt là 54,55%, 63,64%, 69,23%, 68,75% và 55,56% (Hình 2.15). Đặc biệt ở hai môi ISSR 22 và ISSR K2 có sự khác biệt so với các môi còn lại là chỉ 11/12 mẫu dâu được khuếch đại, mẫu dâu Xiêm (Xi2) không cho băng trên gel, chứng tỏ cả hai môi ISSR 22 và ISSR K2 đều không bắt cặp với DNA khuôn từ mẫu dâu này hay nói cách khác trên bộ gen của mẫu này không có trình tự bổ sung bởi hai môi ISSR này.

Còn lại môi ISSR K3 cho ra kết quả đa hình nhưng không cao (chiếm tỉ lệ 22,22%) và có chỉ số PIC ở mức độ thấp (0,14), hầu hết các mẫu đều khuếch đại cho số băng giống nhau, chỉ có vài mẫu có sự khác biệt nhỏ (Hình 2.16). Và môi ISSR 27 cho ra kết quả đơn hình ở tất cả các băng được khuếch đại (Hình 2.17).

Chỉ số PIC của 8 môi cũng cho thấy sự đa hình khá cao của các môi khi 7 môi trong số đó có chỉ số PIC dao động từ 0,14 – 0,52 trong khi ở nghiên cứu của Lê Y Phụng *et al.* (2018) trên các giống Thanh trà thì chỉ số PIC của các môi ISSR được sử dụng của dao động từ 0,26 – 0,37. Điều này cho thấy mức độ đa hình của các giống dâu trong nghiên cứu là khá cao. Môi ISSR 03 có chỉ số PIC = 0,52, là môi có chỉ số PIC cao nhất trong các môi được sử dụng, riêng môi ISSR 27 do không cho ra được kết quả đa hình nên môi này có chỉ số PIC = 0.

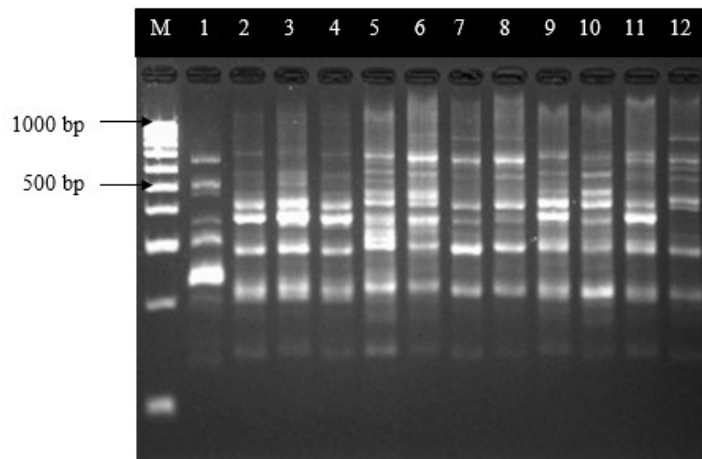


Hình 2.14. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 03

(*M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2*)

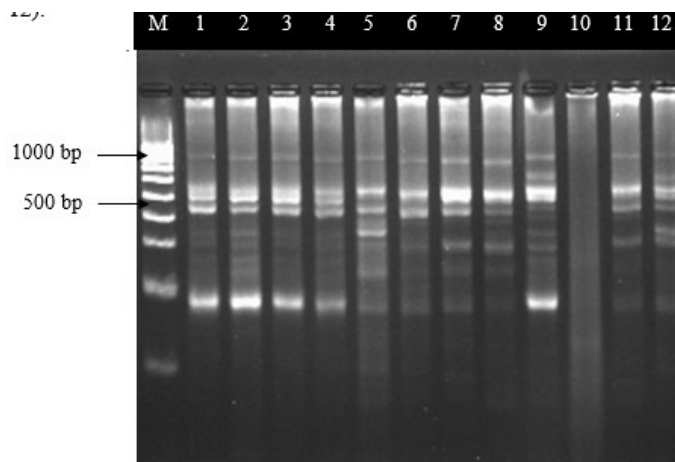
Ở môi ISSR 03 cho ra kết quả khuếch đại ở tất cả các mẫu dâu được thực hiện phản ứng PCR. Kích thước của tất cả các băng được khuếch đại dao động từ 220 – 850 bp. Tất cả các băng được khuếch đại ở môi này đều là băng đa hình. Những băng có kích thước 320 bp không có xuất hiện ở 4 mẫu dâu Hạ Châu (HC1, HC2, HC3, HC4) mà chỉ xuất hiện ở các mẫu dâu còn lại. Còn những băng có kích thước khoảng 850 bp thì chỉ xuất hiện băng ở 3 mẫu dâu Xanh (X2, X3, X4) và ở các giống dâu Xiêm, dâu Vàng thì chỉ có xuất hiện băng ở cây đực (Xi2, V2), còn các mẫu còn lại thì không ghi nhận được có sự xuất hiện của băng có kích thước như trên (Hình 31).

Các sản phẩm PCR được khuếch đại ở môi ISSR 13 được thể hiện trên phổ điện di ở Hình 2.15. Kích thước của các băng được khuếch đại dao động từ 250 – 1050 bp. Môi này tạo ra được 6 băng đa hình và 5 băng đơn hình. Những băng có kích thước khoảng 480 bp thì chỉ xuất hiện ở 2 mẫu dâu Hạ Châu (HC3, HC4) và 2 mẫu dâu Xanh cái (X1, X3) mà không xuất hiện ở các mẫu còn lại. Và ở những băng có kích thước 800 bp thì chỉ ghi nhận được sự xuất hiện ở 3 mẫu dâu Xanh (X2, X3, X4), 1 mẫu dâu Xiêm cái (Xi1) và ở cả 2 mẫu dâu Vàng (V1, V2).

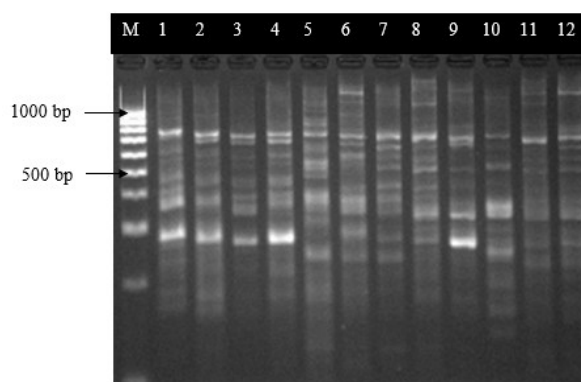


Hình 2.15. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 13
(M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2)

Ở phổ điện di của môi ISSR 22 thì chỉ có 11/12 mẫu dâu được khuếch đại trên gel điện di. Mẫu dâu Xiêm (Xi2) không xuất hiện băng trên gel. Còn lại cái băng được khuếch đại có kích thước nằm trong khoảng 280 – 900 bp. Ở băng có kích thước 700 bp thì chỉ có mẫu dâu Xiêm cái (Xi1) và dâu Vàng đực (V2) có xuất hiện băng.



Hình 2.16. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 22
(M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2)

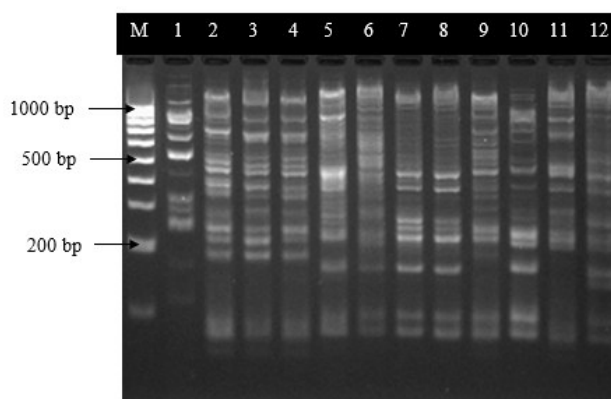


Hình 2.17. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 31

(M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2)

Ở môi ISSR 31 (Hình 2.17) thì các băng được khuếch đại có kích thước dao động từ 250 – 750 bp. Băng có kích thước khoảng 480 bp được ghi nhận là chỉ xuất hiện ở các mẫu của giống dâu Hạ Châu (HC1, HC2, HC3, HC4). Và băng có kích thước 700 bp thì xuất hiện ở 4 mẫu dâu Hạ Châu, mẫu dâu Xanh đực (X6) và mẫu dâu Vàng cái (V1), còn ở tất cả các mẫu dâu còn lại ko xuất hiện băng có kích thước như trên.

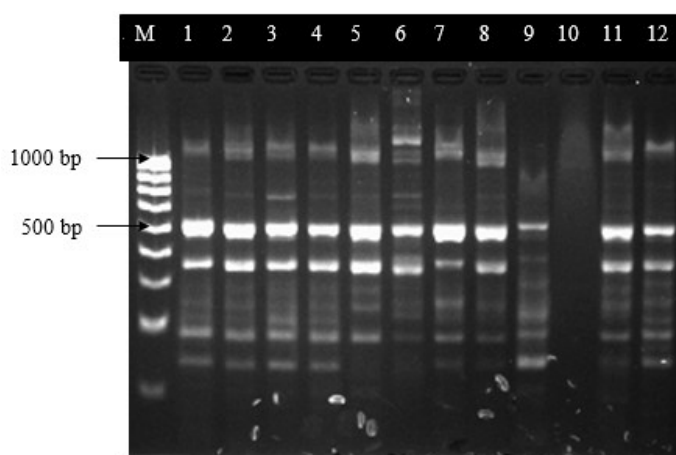
Còn ở môi ISSR K1 thì kết quả khuếch đại cho ra rất nhiều băng trên phổ điện di có kích thước dao động từ 150 – 1000 bp. Ở cả hai kích thước 900 bp và 1000 bp thì đều không có cho băng xuất hiện ở 4 mẫu dâu Hạ Châu (HC1, HC2, HC3, HC4) và ở các mẫu còn lại đều có sự hiện diện của hai băng này. Băng có kích thước 510 bp thì chỉ xuất hiện ở 1 mẫu dâu Hạ Châu (HC1), còn lại các mẫu khác thì không xuất hiện băng. Và ở băng có kích thước 150 bp thì chỉ có 4 mẫu dâu Xanh và 1 mẫu dâu Xiêm đực (Xi2) được ghi nhận là có sự hiện diện còn cái mẫu khác thì không (Hình 2.18).



Hình 2.18. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR K1

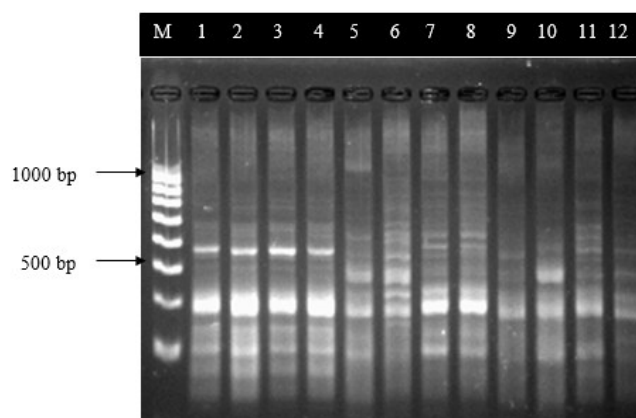
(M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, .X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2)

Phổ điện di của mỗi ISSR K2 giống với mỗi ISSR 22 ở chỗ mẫu dâu Xiêm (Xi2) không cho băng khuếch đại ở trên gel điện di. Các băng được khuếch đại có kích thước từ 140 – 680 bp. Ở kích thước 600 bp thì chỉ ghi nhận được sự hiện diện băng ở các mẫu dâu Xanh (X2, X3, X4), dâu Xiêm cái (Xi1) và dâu Vàng cái (V2) (Hình 2.19).

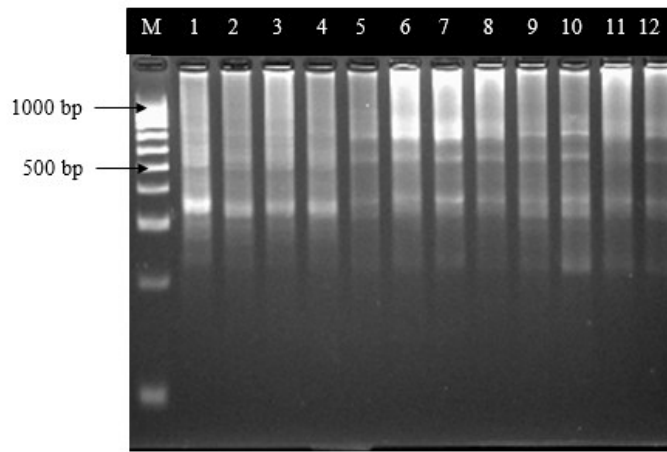


Hình 2.19. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với mỗi ISSR
(*M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2*)

Ở mỗi ISSR K3 khuếch đại được các băng có kích thước từ 200 – 700 bp, nhưng hầu như là các băng đơn hình, có rất ít băng đa hình. Băng đa hình thể hiện rõ nhất ở trên gel điện di là băng có kích thước 550 bp khi chỉ có 4 mẫu dâu Hạ Châu (HC1, HC2, HC3, HC4) được ghi nhận là có sự hiện diện của băng trong khi các mẫu còn lại đều không xuất hiện băng này (Hình 2.20).

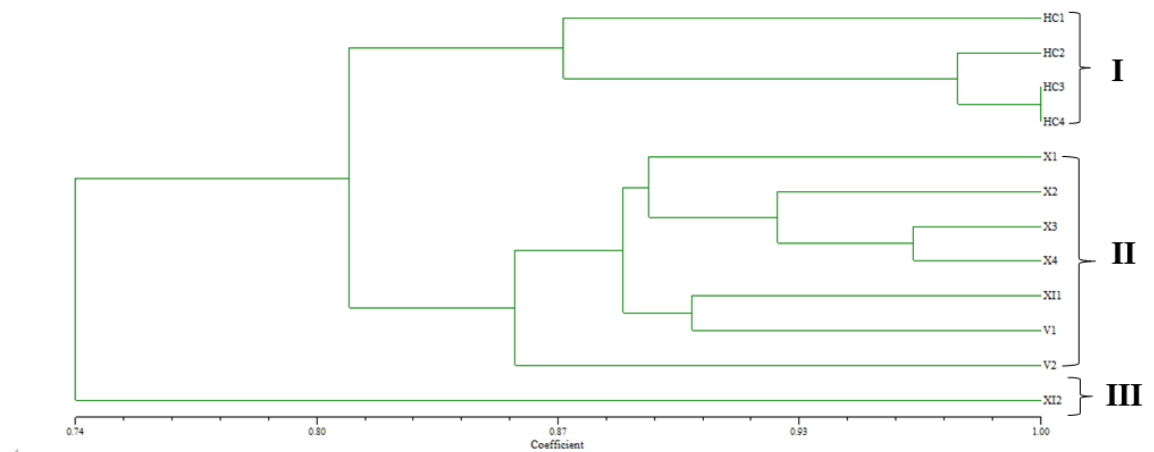


Hình 2.20. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với mỗi ISSR K3
(*M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2*)



Hình 2. 21. Phổ điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu dâu với môi ISSR 27
(M. Thang chuẩn Bioline 100bp DNA Ladder, 1.HC1, 2.HC2, 3.HC3, 4.HC4, 5.X1, 6.X2, 7.X3, 8.X4, 9.Xi1, 10.Xi2, 11.V1, 12.V2)

Còn môi ISSR 27 thì chỉ khuếch đại được các băng đơn hình và các băng này có kích thước dao động từ 220 – 900 bp (Hình 2.21).



Hình 2.22. Biểu đồ phân nhóm các mẫu dâu

Dựa vào sự khác biệt của các băng thể hiện trên gel trong sản phẩm PCR cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu.

Biểu đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền giữa 12 mẫu dâu dựa vào 8 môi ISSR được sử dụng

Dựa trên biểu đồ, cho thấy sự đa dạng di truyền giữa 12 mẫu dâu thể hiện qua hệ số tương đồng là 74% hay nói cách khác 12 mẫu dâu này có khoảng cách di truyền là 26% (Hình 2.22). Các mẫu dâu được chia thành 3 nhóm bao gồm:

Nhóm I: gồm 4 mẫu dâu Hạ Châu (HC1, HC2, HC3, HC4) có hệ số tương đồng khá cao từ 0,875 - 1. Đặc biệt là giữa 2 mẫu dâu Hạ Châu HC3 (cái) và HC4 (đực) có

sự tương đồng nhau đến 100% thể hiện không có sự khác biệt giữa giới tính đực và cái của 2 mẫu dâu này. Trong khi đó, 2 mẫu dâu còn lại là HC1 (cái) và HC2 (đực) có sự tương đồng nhau là 87,5% chứng tỏ rằng vẫn có sự khác biệt đôi chút giữa 2 mẫu dâu này.

Nhóm II: gồm các mẫu dâu Xanh, dâu Xiêm và dâu Vàng có hệ số tương đồng từ 0,86 - 0,965. Trong nhóm này có thể phân ra thêm các nhóm nhỏ khi các mẫu dâu xanh được tách thành 1 nhóm riêng có hệ số tương đồng nằm trong khoảng 0,89-0,965. Nhóm này cho thấy có sự khác tương đối giữa 2 mẫu dâu Xanh là X3 (cái) và X4 (đực) khi chúng có sự tương đồng là 96,5%, có khoảng cách di truyền là 3,5% giữa 2 mẫu này. Và ở 2 mẫu dâu còn lại thể hiện sự khác biệt rõ hơn của X1 (cái) và X2 (đực) khi 2 mẫu dâu này có sự tương đồng là 89%, có khoảng cách di truyền là 11% giữa 2 mẫu này. Và 2 mẫu dâu Xiêm (Xi1) và dâu Vàng (V1) tách thành 1 nhóm riêng có hệ số tương đồng là 0,9. Trong khi đó mẫu dâu Vàng (V2) lại bị phân thành 1 nhánh riêng trong nhóm II.

Nhóm III: chỉ có mẫu dâu Xiêm (Xi2) với hệ số tương đồng với các mẫu dâu khác trong nghiên cứu là 0,74.

Dựa vào giản đồ trên, cho thấy có sự tác động của môi trường lên trình tự của một số mẫu dâu khi không thể phân chia hoàn toàn các giống dâu vào các nhóm khác nhau. Hai mẫu dâu Vàng là V1 (cái) và V2 (đực) có sự tương đồng là 86%, 14% là khoảng cách di truyền giữa 2 mẫu này. Đặc biệt là mẫu dâu Vàng (V1) lại có mức độ tương đồng với mẫu dâu Xiêm (Xi1) (90%) cao hơn với cùng giống dâu Vàng (V2) (86%). Và sự khác biệt rõ nhất được thể hiện là ở mẫu dâu Xiêm (Xi2) (đực) khi được tách ra thành một nhánh riêng trên giản đồ và có sự tương đồng với mẫu dâu Xi2 (cái) chỉ là 74%, khoảng cách di truyền có đến tận 26% giữa 2 mẫu này. Con số 26% cũng là khoảng cách di truyền giữa mẫu dâu Xiêm (Xi2) với 11 mẫu dâu còn lại trên giản đồ. Điều này cho thấy có những tác động của yếu tố môi trường đến trình tự gen của các mẫu dâu dẫn đến khi phân tích không có được kết quả tương đồng cao trong cùng giống.

Các mẫu dâu Hạ Châu có hệ số tương đồng với nhau khá cao nằm trong khoảng từ 0,875 - 1 và nằm chung ở 1 nhóm trên giản đồ. Trong khi đó ở một nghiên cứu khác về đa dạng di truyền của dâu *Baccaurea ramiflora* Lour. của Đặng Minh Khang (2020) thì mức độ tương đồng của các mẫu khảo sát chỉ là 0,78 và các mẫu dâu Hạ

Châu đực và cái nằm ở 2 nhóm riêng trên giản đồ. Và một nghiên cứu khác của Chikmawati *et al.* (2019) về đa dạng di truyền trên các mẫu dâu *Baccaurea angulata* ở Indonesia cũng cho thấy mức độ tương đồng chỉ ở mức 0,67. Điều này chứng tỏ các mẫu dâu được sử dụng để khảo sát trong nghiên cứu này có sự bảo tồn di truyền cao hơn so với các mẫu dâu được sử dụng trong các nghiên cứu trước.

Các mẫu dâu Xanh có mối quan hệ về di truyền gần gũi với dâu Xiêm và dâu Vàng hơn dâu Hạ Châu, mức độ tương đồng của dâu Xanh với dâu Xiêm và dâu Vàng là 89% trong khi giữa dâu Xanh và dâu Hạ Châu lại có độ tương đồng ở mức 81%. Điều này chứng tỏ dâu Hạ Châu có sự khác biệt so với các giống dâu còn lại.

Kết quả PCR của 8 môi ISSR trên 12 mẫu dâu trong nghiên cứu, tổng số băng được khuếch đại là 91 băng trong đó có 55 băng cho kết quả đa hình (chiếm tỉ lệ 60,44%), trung bình 6,88 băng đa hình cho mỗi môi. Trong khi ở nghiên cứu của Chikmawati *et al.* (2019) khi khảo sát 25 môi ISSR trên 75 mẫu dâu *Baccaurea angulata* cho tổng số băng khuếch đại được là 234 băng trong đó 230 băng là băng đa hình (chiếm tỉ lệ 98,28%), với trung bình 9,2 băng đa hình cho mỗi môi.

Qua các kết quả trên, ta có thể thấy một vài mẫu dâu có độ tương đồng rất cao lên đến 100%, tuy nhiên giữa một số mẫu khác có độ khác biệt tương đối cao ở cấp độ dưới loài. Chứng tỏ sự đa dạng di truyền của các mẫu dâu nghiên cứu khá cao.

5. Cây măng cầu xiêm

Có 5 giống cây được sử dụng trong thí nghiệm: măng cầu ta, măng cầu Xiêm, na, na Đài Loan và bình bát. Các mẫu lá được thu ở các vườn trái cây, trại cây giống tại TP Cần Thơ, tỉnh Hậu Giang và tỉnh Vĩnh Long (Bảng 2.14).

Bảng 2.14. Danh sách các mẫu được sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên mẫu	Nơi thu mẫu	Kinh độ	Vĩ độ	Ký hiệu mẫu
1	Bình bát	Long Mỹ – Hậu Giang	9°41'34.3"N	105°35'37.1"E	B-LM
2	Măng cầu ta	Long Mỹ – Hậu Giang	9°41'34.3"N	105°35'37.1"E	MT-LM
3	Na	Long Mỹ – Hậu Giang	9°41'34.3"N	105°35'37.1"E	N-LM
4	Măng cầu ta	Phong Điền – Cần Thơ	10°00'03.6"N	105°40'08.3"E	MT-CT
5	Na	Phong Điền – Cần Thơ	10°00'03.6"N	105°40'08.3"E	N-CT
6	Bình bát	Phong Điền – Cần Thơ	10°00'03.6"N	105°40'08.3"E	B-CT
7	Măng cầu Xiêm	Vĩnh Long	10°04'21.5"N	105°49'55.5"E	MX-VL
8	Măng cầu Xiêm	Ngã Bảy – Hậu Giang	9°49'48"N	105°49'03"E	MX-NB
9	Na Đài Loan	Ngã Bảy – Hậu Giang	9°48'41.2"N	105°48'39.6"E	NDL-NB
10	Măng cầu Xiêm	Phụng Hiệp – Hậu Giang	9°47'37.1"N	105°48'49.6"E	MX-PH
11	Na Đài Loan	Hiệp Thành – Hậu Giang	9°48'19"N	105°49'28"E	NDL-HT

5.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs

Kết quả cho thấy sự đa dạng di truyền được thể hiện rõ giữa các loài khác nhau, gồm có 9 vị trí nucleotide khác biệt (SNPs) 6, 105, 111, 135, 202, 218, 219, 438, 441 (Bảng 2.15). Trong đó, vị trí nucleotide 6, 105, 111 ở trình tự loài bình bát tương ứng là T, T, C có sự sai khác với loài măng cầu và na là nucleotide C, A, T. Trong các trình tự loài măng cầu, có 6 vị trí SNPs so với loài na là các vị trí 135, 202, 218, 219, 438, 441. Nucleotide ở các vị trí tương ứng của loài măng cầu là C, C, C, T, G, T khác biệt so với loài na là T, A, T, C, A, C. Riêng mẫu na Đài Loan – Ngã bảy không có sự sai khác ở bất kì vị trí nucleotide nào so với loài măng cầu. Kết quả trên cho thấy khả năng phân biệt loài dựa trên vùng gen *rbcL* còn thiếu hiệu quả ở một vài loài, điều này phù hợp với kết luận của Larranaga và Hormaza (2015) về mã vạch *rbcL* dùng cho chi *Annona* có hiệu quả phân biệt loài kém hơn so với vùng gen *matK*.

Bảng 2.15. Kết quả so sánh các trình tự *rbcL* của các loài cây thuộc chi Na

Tên trình tự	Vị trí								
	6	105	111	135	202	218	219	438	441
B-LM	T	T	C	T	C	C	C	G	T
B-CT
MT-LM	C	A	T	C	.	.	T	.	.
MT-CT	C	A	T	C	.	.	T	.	.
MX-VL	C	A	T	C	.	.	T	.	.
MX-NB	C	A	T	C	.	.	T	.	.
MX-PH	C	A	T	C	.	.	T	.	.
N-CT	C	A	T	.	A	T	.	A	C
N-LM	C	A	T	.	A	T	.	A	C
NDL-NB	C	A	T	C	.	.	T	.	.
NDL-HT	C	A	T	A	C

Chú thích: (.): Vị trí nucleotide tương đồng.

Kết quả thu được sau khi so sánh các trình tự vùng gen *rpoC1* của các loài thuộc chi *Annona* nghiên cứu là 7 vị trí SNPs lần lượt là 23, 136, 154, 184, 303, 399, 435 (Bảng 2.16). Trong đó, bình bát có 2 vị trí 23 và 136 là nucleotide G, C khác biệt so với 2 loài còn lại là nucleotide A, T. Các mẫu măng cầu có 4 vị trí SNPs (154, 184, 303, 435) là các nucleotide C, G, T, G tương ứng với các 2 loài khác là các nucleotide T, A, C, A. Trong các mẫu na, ở vị trí 399, mẫu na là nucleotide A và na Đài Loan là nucleotide G.

Bảng 2.16. Kết quả so sánh các trình tự *rpoC1* của các loài cây thuộc chi Na

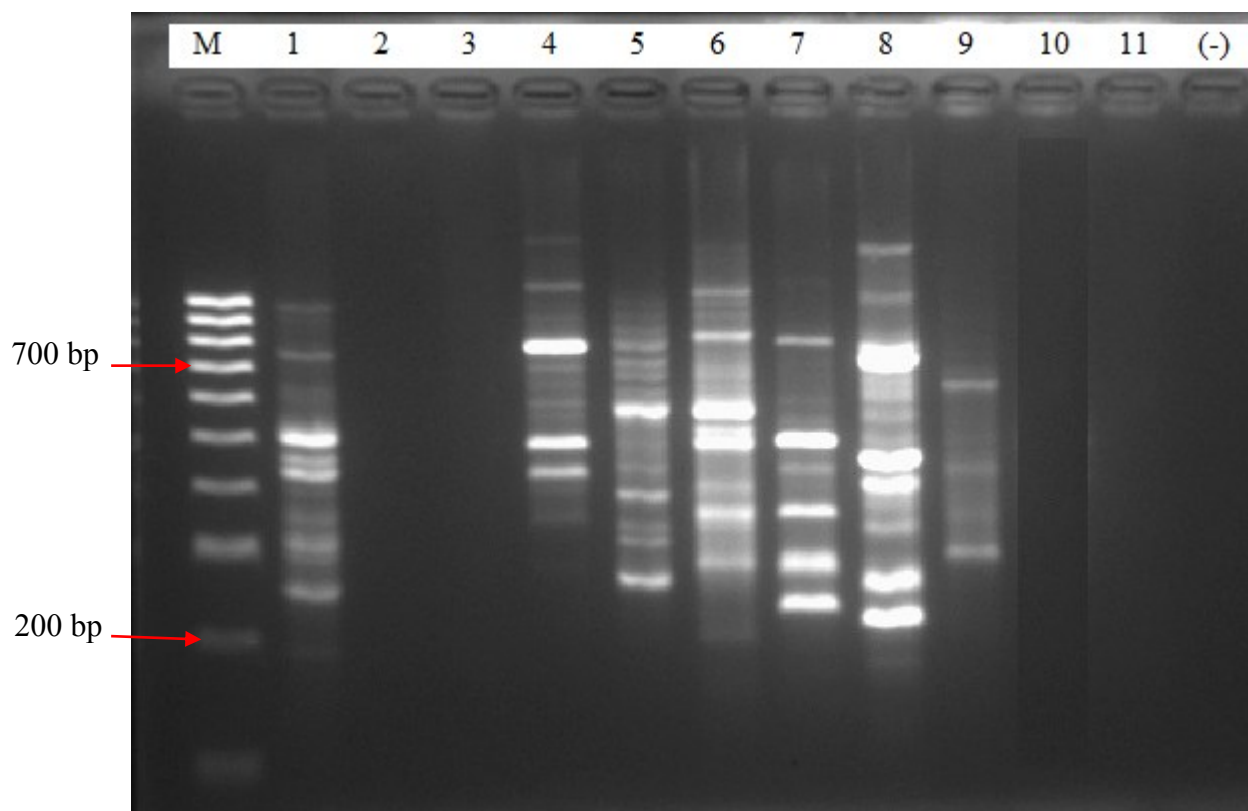
Tên trình tự	Vị trí						
	23	136	154	184	303	399	435
B-LM	G	C	T	A	C	G	A
B-CT
MT-LM	A	T	C	G	T	–	–
MT-CT	A	T	C	G	T	.	G
MX-VL	A	T	C	G	T	.	G
MX-NB	A	T	C	G	T	.	G
MX-PH	A	T	C	G	T	.	G
N-LM	A	T	.	.	.	A	.
N-CT	A	T	.	.	.	A	.
NDL-NB	A	T
NDL-HT	A	T	.	.	.	–	–

Chú thích: (–): Vị trí không xuất hiện nucleotide, (.): Vị trí nucleotide tương đồng.

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra được 9 vị trí nucleotide khác biệt của vùng gen *rbcL* ở các loài thuộc chi *Annona*. Trong đó có 3 vị trí có khả năng nhận diện loài bình bát, 2 vị trí đặc trưng cho loài măng cầu, 4 vị trí có tiềm năng nhận diện loài na. Đối với vùng gen *rpoC1*, kết quả nghiên cứu đã đưa ra 7 vị trí sai khác nucleotide. Trong đó có 2 vị trí đặc trưng cho loài bình bát, 4 vị trí có khả năng nhận diện loài măng cầu

5.2. Phân tích đa dạng di truyền bằng dấu phân tử ISSR

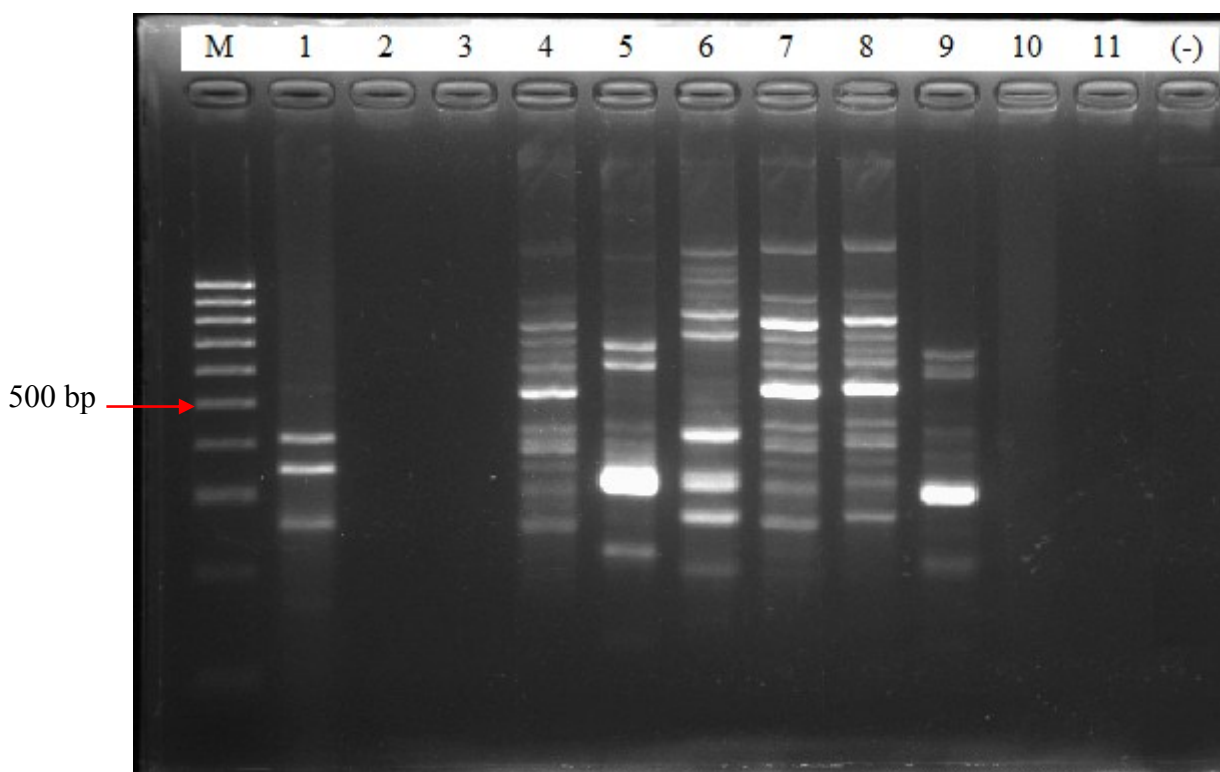
Sản phẩm khuếch đại của mỗi ISSR 3 và ISSR 31 được điện di trên gel agarose 3%, đa số các mẫu cho phổ băng rõ, vị trí các băng có sự khác biệt giữa các loài. Khi so sánh với thang chuẩn cho thấy kích thước băng trải dài từ 1000 – 100 bp (Hình 2.23 và Hình 2.24).



Hình 2.23. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại với mỗi ISSR 3

M. Thang chuẩn 100bp, 1. Bình bát (Long Mỹ), 2. Măng cầu ta (Long Mỹ), 3. Na (Long Mỹ), 4. Măng cầu ta (Cần Thơ), 5. Na (Cần Thơ), 6. Bình bát (Cần Thơ), 7. Măng cầu Xiêm (Vĩnh Long), 8. Măng cầu Xiêm (Ngã Bảy), 9. Na Đài Loan (Ngã Bảy), 10. Măng cầu Xiêm (Phụng Hiệp), 11. Na Đài Loan (Hiệp Thành), (-). Đối chứng âm

Đối với kết quả điện di với mỗi ISSR 3, đoạn mỗi khuếch đại được tổng cộng 15 băng, trong đó có 8 băng đa hình, chiếm tỉ lệ 53,34%. Măng cầu xuất hiện 4 băng đa hình ở vị trí lần lượt là 700 bp, 450 bp, 400 bp, 200 bp. Các băng ở vị trí 500 bp, 350 bp là 2 băng đa hình đặc trưng cho bình bát. Na có 2 băng đa hình ở vị trí lần lượt là 425 bp và 300 bp.

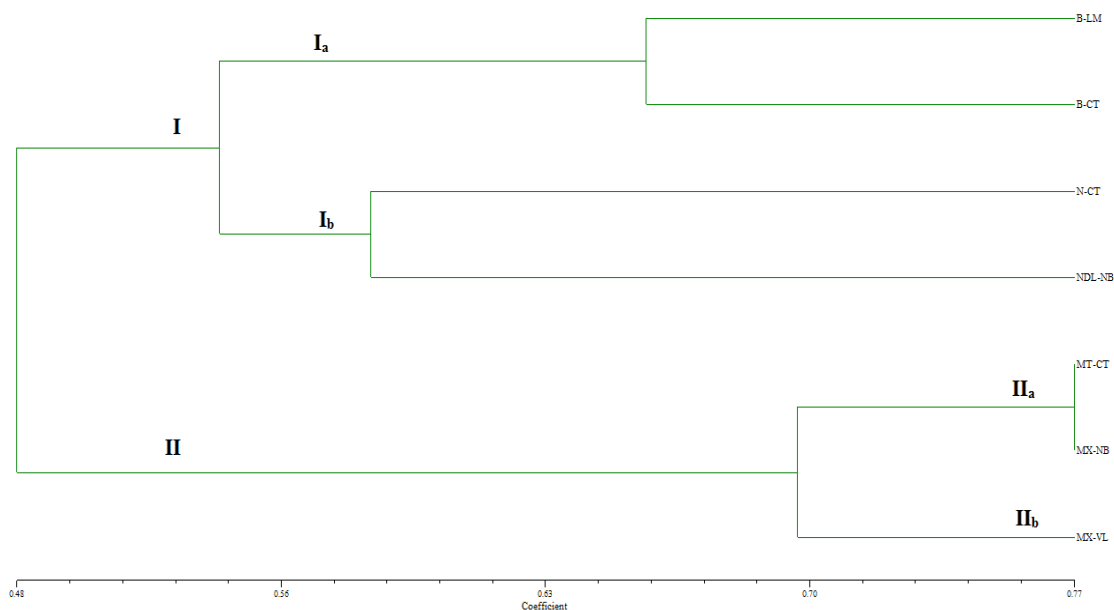


Hình 2.24. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại với môi ISSR 31

M. Thang chuẩn 100bp, 1. Bình bát (Long Mỹ), 2. Mãng cầu ta (Long Mỹ), 3. Na (Long Mỹ), 4. Mãng cầu ta (Cần Thơ), 5. Na (Cần Thơ), 6. Bình bát (Cần Thơ), 7. Mãng cầu Xiêm (Vĩnh Long), 8. Mãng cầu Xiêm (Ngã Bảy), 9. Na Đài Loan (Ngã Bảy), 10. Mãng cầu Xiêm (Phụng Hiệp), 11. Na Đài Loan (Hiệp Thành), (-). Đối chứng âm

Đối với kết quả điện di với môi ISSR 31, đoạn môi khuếch đại được tổng số 18 băng, trong đó có 12 băng đa hình, chiếm tỷ lệ 66,67%. Các băng ở vị trí 1100 bp, 1000 bp, 800 bp, 425 bp, 350 bp là 4 băng đa hình đặc trưng cho bình bát. Mãng cầu xuất hiện 6 băng đa hình ở vị trí lần lượt là 900 bp, 800 bp, 725 bp, 525 bp, 375 bp, 275 bp. Na có 2 băng đa hình ở vị trí lần lượt là 300 bp và 225 bp.

Giản đồ phân nhánh (Hình 2.25) được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng, trong đó 7 mẫu phân ra làm 2 nhánh chính với hệ số tương đồng nằm trong khoảng từ 0,48 đến 0,77. Giản đồ phân ra thành 2 nhóm lớn (I và II). Nhóm I phân thành 2 nhóm nhỏ: I_a có 2 mẫu (bình bát – Cần Thơ và bình bát – Long Mỹ) với hệ số tương đồng 66,50% và I_b có 2 mẫu (na – Cần Thơ và na Đài Loan – Ngã Bảy) với hệ số tương đồng là 59,50%. Nhóm II cũng được chia thành 2 nhóm nhỏ: II_a gồm 2 mẫu (mãng cầu ta – Cần Thơ và mãng cầu Xiêm – Ngã Bảy) với hệ số tương đồng cao nhất là 77,00% và II_b gồm 1 mẫu mãng cầu Xiêm – Vĩnh Long. Mãng cầu Xiêm – Vĩnh Long so với 2 mẫu mãng cầu có hệ số tương đồng là 69,50%.



Hình 2.25. Giản đồ phân nhánh của các loài cây thuộc chi Na qua phân tích dấu phân tử ISSR bằng phần mềm NTSYSpc 2.10

Kết quả trên cho thấy ISSR phù hợp để đánh giá đặc tính của ba loài *Annona* và có sự khác biệt đáng kể về đa dạng di truyền giữa các loài. Điều này giống với nghiên cứu của Ahmad *et al.* (2010) rằng nhìn chung các loài *Annona* có sự đa dạng giữa các loài nhiều hơn là sự đa dạng của các giống cùng loài.

6. Cây quýt hồng Lai Vung

Tổng cộng đã thu được 11 mẫu quýt (quýt hồng và quýt đường) từ 3 tỉnh Đồng Tháp, Tiền Giang và TP. Cần Thơ. Kết quả thu mẫu được trình bày trong Bảng 2.17.

Bảng 2.17. Kết quả thu mẫu quýt trong nghiên cứu

STT	Giống quýt	Địa điểm thu mẫu	Kí hiệu mẫu	Kinh độ	Vĩ độ
1	Quýt hồng	Long Hậu, Lai Vung, Đồng Tháp	QHLH (DT)	10 ⁰ 24'03.37"	106 ⁰ 13'43.25"
2	Quýt hồng	Vĩnh Thới, Lai Vung, Đồng Tháp	QHVL (DT)	10 ⁰ 24'03.37"	106 ⁰ 13'43.25"
3	Quýt hồng	Tân Thành, Lai Vung, Đồng Tháp	QHTT (DT)	10 ⁰ 22'18.79"	105 ⁰ 56'47.35"
4	Quýt hồng	Tân Phước, Lai Vung, Đồng Tháp	QHTP (DT)	10 ⁰ 21'25.74"	105 ⁰ 56'25.34"
5	Quýt đường	Lai Vung, Đồng Tháp	QDDT	10 ⁰ 21'25.74"	105 ⁰ 56'25.34"
6	Quýt hồng	Phong Điền, Cần Thơ	QHPD (CT)	10 ⁰ 02'44.13"	105 ⁰ 50'09.04"
7	Quýt hồng	Vườn Vàm Xáng, Cái Răng, Cần Thơ	QHVX (CT)	10 ⁰ 03'22.16"	105 ⁰ 50'48.19"
8	Quýt hồng	Cái Răng, Cần Thơ	QHCR (CT)	10 ⁰ 02'44.13"	105 ⁰ 50'09.04"
9	Quýt đường	Cần Thơ	QDCT	10 ⁰ 03'22.16"	105 ⁰ 50'48.19"
10	Quýt đường	Chợ Gạo, Tiền Giang	QDCG (TG)	9 ⁰ 59'48.36"	105 ⁰ 40'07.18"
11	Quýt đường	Cái Bè, Tiền Giang	QGCB (TG)	9 ⁰ 59'36.32"	105 ⁰ 40'12.69"

6.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs

Dựa vào kết quả phân tích trình tự vùng ITS ở Bảng 2.18 cho thấy có 14 vị trí khác nhau giữa quýt hồng và các giống quýt khác. Các vị trí SNPs có thể dùng nhận diện

quýt hồng Lai Vung với các quýt khác gồm 571, 573, 610, 616, 618, còn các vị trí còn lại chỉ phân biệt được quýt hồng và quýt đường. Trong nghiên cứu của Gonzalez *et al* (2009), trong số 285 loài được chọn để khảo sát ở rừng Amazonian, ở vùng gen ITS phân biệt được 41%. Tương tự, vùng gen ITS cũng phân biệt được 50% các loài lan hải Ấn Độ (Parveen *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu của Newmaster *et al* (2006), ITS đã được khuyến nghị sử dụng làm DNA mã vạch cho thực vật vì sự nhận diện cao ở mức độ loài.

Bảng 2.18. Vị trí khác biệt trên trình tự DNA của giống quýt hồng ở vùng gen ITS so với các giống khác

Mẫu	Vị trí nucleotide														
	383	388	407	542	551	571	573	575	592	610	616	618	627	628	
Quýt hồng	G	G	G	A	G	C	C	C	C	T	A	C	A	C	
Quýt đường	A	A	A	G	A	G	-	.	T	G	G	-	-	-	
FJ641932.1	G	-	.	.	G	G	-	-	-	
FJ641932.1	G	-	T	.	G	G	-	-	-	
HQ893877.1	G	-	.	.	G	G	-	-	-	
MF155026.1	G	-	.	.	G	G	-	C	T	
MH712728.1	G	-	T	.	G	G	-	-	-	

Ghi chú: dấu chấm “.” chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên; dấu “-” chỉ vị trí nucleotide bị mất

Cho thấy sự đa dạng di truyền thể hiện ở các giống khác nhau, bao gồm 13 vị trí có khác biệt. Đặc biệt, ở giống quýt hồng có thể nhận diện nhanh bởi sự khác biệt ở nucleotide vị trí 108 (quýt hồng là nu G, các giống còn lại bị đột biến mất điểm), vị trí 834 (quýt hồng là nu G, các giống còn lại bị đột biến mất điểm), vị trí 841 (quýt hồng là nu C, các giống còn lại là nu A). Kết quả được thể hiện qua Bảng 2.19. Nguyễn Bá Phú (2011), đã khuếch đại thành công quýt đường có hạt và không hạt Lai Vung ở vùng gen *matK*, tuy nhiên không phân biệt được 2 giống này ở vùng gen *matK*. Lahaye *et al* (2008), đã khảo sát hơn 1036 loài thực vật ở Mesoamerican (Trung bộ

Châu Mỹ), kết quả là *matK* có khả năng nhận diện được tương đối cao (80,56%). Tuy nhiên khi kết hợp *matK* và *trnH-psbA* thì khả năng nhận diện hiệu quả hơn (trên 90%).

Bảng 2.19. Vị trí khác biệt trên trình tự DNA của giống quýt hồng ở vùng gen *matK* so với các giống khác

Mẫu	Vị trí nucleotide												
	108	169	170	171	172	173	174	175	176	177	290	834	841
Quýt hồng	G	T	T	T	T	T	T	T	T	A	G	G	C
Quýt đường	-	A	-	A
FJ641932.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A
FJ641932.1	-	G	-	A
HQ893877.1	-	G	-	A
MF155026.1	-	G	-	A
MH712728.1	-	G	-	A

Ghi chú: dấu chấm “.” chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên; dấu “-” chỉ vị trí nucleotide bị mất

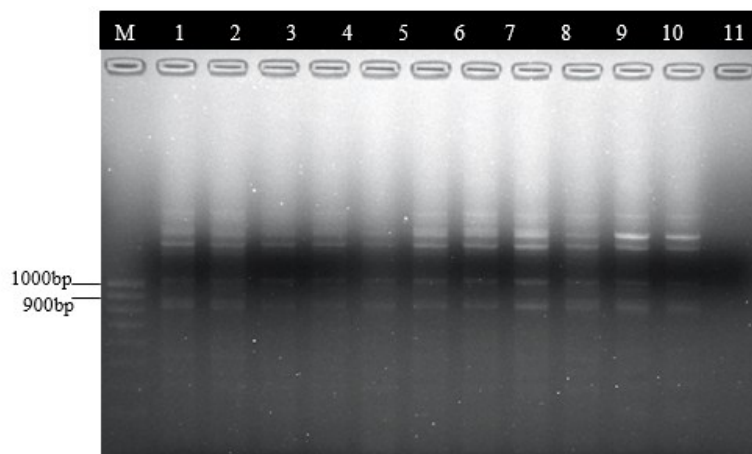
Vùng trình tự *atpF-atpH*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf1b* và *psbK-psbI* không thể dùng để nhận diện quýt hồng và quýt đường vì trình tự DNA của hai giống trên không có sự khác biệt ở vùng gen này. Vùng gen này không được chọn làm DNA mã vạch do có độ bảo tồn cao với giống quýt. Trong nghiên cứu của Lê Thanh Hương *et al* (2017), về các loài Sâm thì cho kết quả tỉ lệ tương đồng giữa các mẫu nghiên cứu cao (99.27%), do đó vùng trình tự *atpF-atpH* không được đề xuất dùng để phân biệt các loài Sâm. Trong nghiên cứu của Kim *et al* (2015), đã đề xuất sử dụng vùng gen *atpF-atpH* làm DNA mã vạch, sau khi vùng gen này phân biệt được 100% 28 mẫu của 4 loài thuộc họ hoa lan Hàn Quốc. Tuy nhiên, vùng gen này lại không thích hợp để làm DNA mã vạch để nhận diện phong lan *Holcoglossum* (Hao, 2010) và không thích hợp để giải các trình tự hai chiều (CBOL, 2009). Vùng *psbK-psbI* có khả năng nhận diện tốt ở mức độ loài nhưng lại có tỉ lệ khuếch đại thành công trình tự thấp và gặp khó khăn trong việc giải trình tự hai chiều (CBOL, 2009). Nếu khắc phục được những hạn chế trên, đây là

vùng gen tiềm năng để nhận diện hoa lan (Kim *et al.*, 2014). Vùng *rbcL* có khả năng nhận diện tốt ở cấp độ chi, nhưng lại không thể hiện khả năng nhận diện tốt ở mức độ loài đối với thực vật (Von Crautlein *et al.*, 2011). Vùng *rbcL* không được ưa chuộng vì trình tự quá dài và chứa các vùng bảo tồn cao (Wu *et al.*, 2010). Tuy nhiên, *rbcL* lại được đánh giá cao trong việc kết hợp nhiều DNA mã vạch (Singh *et al.*, 2012). Lee *et al* (2012), đã sử dụng đoạn gen *rpoC1* để xác định cây sâm Hàn Quốc. Đoạn gen *rpoC1* cũng được sử dụng để định danh cây sâm đất trong nghiên cứu của Nguyễn Kiều Linh *et al* (2017). Tuy nhiên, theo Jin *et al* (2020) thì ở trình tự gen *rpoC1* không có sự phân biệt giữa các mẫu ở chi *Dendrobium* trong nghiên cứu của họ.

6.2. Kết quả phân tích đa dạng di truyền dựa vào dấu phân tử ISSR

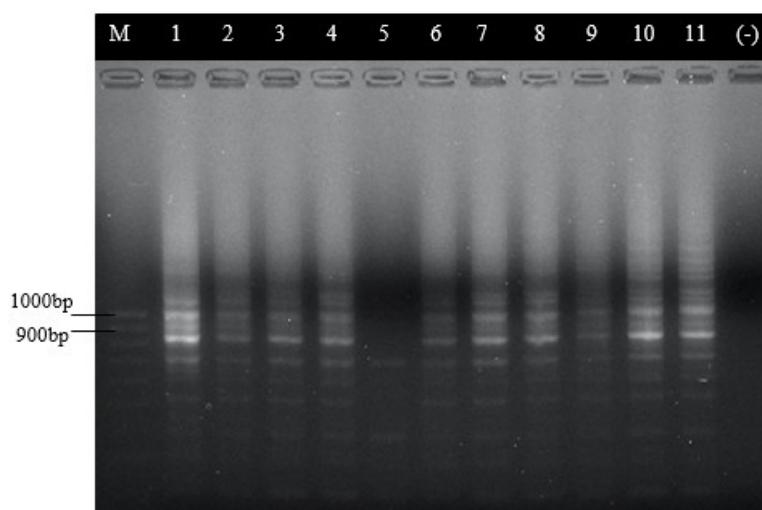
Kết quả kiểm tra PCR với môi ISSR cho thấy các giếng có xuất hiện các băng đa hình thể hiện được sự đa dạng di truyền giữa các giống và kết quả này có thể sử dụng để xây dựng sơ đồ phả hệ.

Kết quả kiểm tra PCR với môi ISSR được thể hiện qua các Hình 2.26, 2.27, 2.28



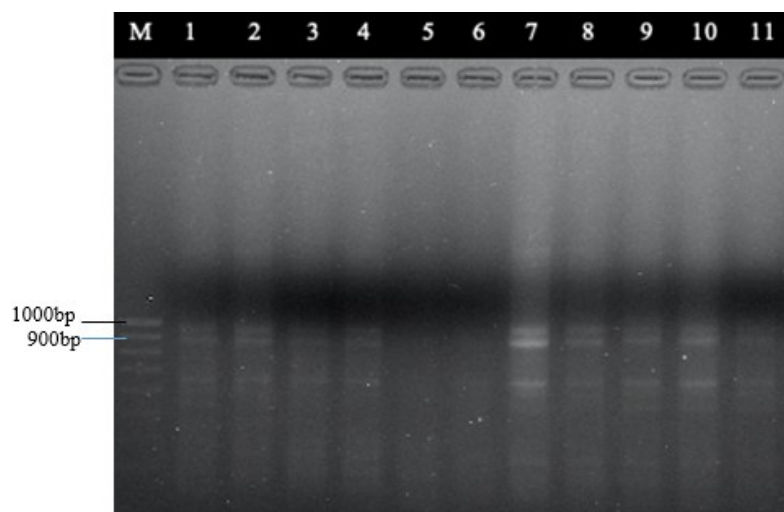
Hình 2.26. Kết quả điện di PCR với môi ISSRK1

1. *QHLH* (DT), 2. *QHVT* (DT), 3. *QHTT* (DT), 4. *QHTP* (DT), 5. *QDDT*, 6. *QHDP* (CT), 7. *QHVX* (CT), 8. *QHCR* (CT), 9. *QDCT*, 10. *QDCG* (TG), 11. *QDCB* (TG)



Hình 2.27. Kết quả điện di PCR với môi ISSRK2

1. *QHLH (DT)*, 2. *QHVT (DT)*, 3. *QHTT (DT)*, 4. *QHTP (DT)*, 5. *QDDT*, 6. *QHPD (CT)*, 7. *QHVX (CT)*, 8. *QHCR (CT)*, 9. *QDCT*, 10. *QDCG (TG)*, 11. *QDCB (TG)*



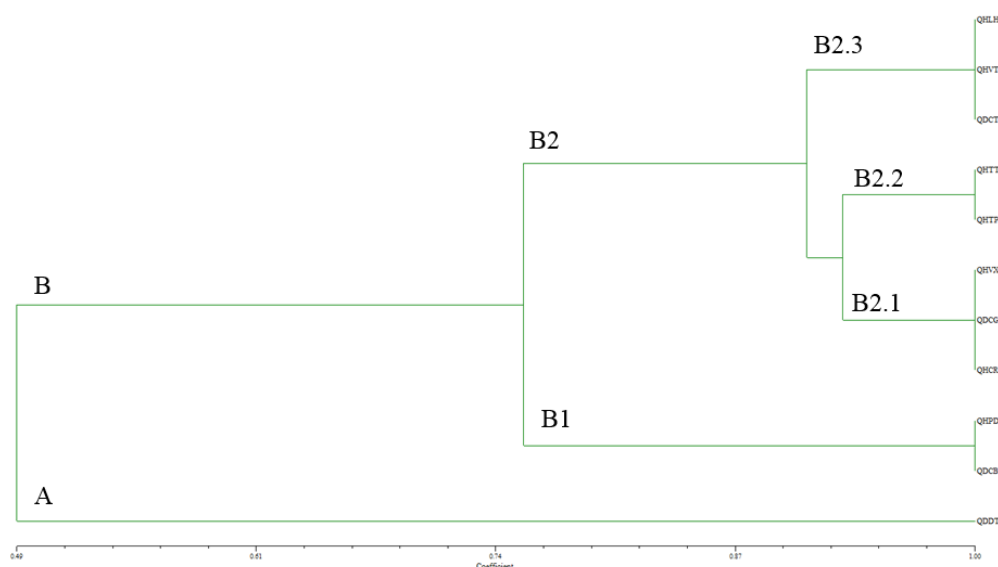
Hình 2.28. Kết quả điện di PCR với môi ISSRK3

1. *QHLH (DT)*, 2. *QHVT (DT)*, 3. *QHTT (DT)*, 4. *QHTP (DT)*, 5. *QDDT*, 6. *QHPD (CT)*, 7. *QHVX (CT)*, 8. *QHCR (CT)*, 9. *QDCT*, 10. *QDCG (TG)*, 11. *QDCB (TG)*

Kết quả kiểm tra ISSR cho thấy có 15 băng được tạo ra, trong đó có 11 băng đa hình chiếm tỷ lệ 73,33%. Số băng mỗi đoạn môi ISSR đạt từ 4 đến 6 băng, trung bình mỗi môi đạt 5 băng. Từ kết quả điện di cho thấy, ISSR K1 có 5 băng DNA được khuếch đại, trong đó chỉ có 1 băng đa hình (chiếm tỷ lệ 20%), còn lại 4 băng đồng hình (chiếm tỷ lệ 80%). Đối với môi ISSR K2, có 6 băng DNA được khuếch đại, trong đó tất cả các băng đều là băng đa hình (chiếm tỷ lệ 100%), thể hiện tính đa hình cao với các mẫu nghiên cứu. Đối với môi ISSR K3, có 4 băng DNA được khuếch đại,

trong đó tất cả các băng đều là băng đa hình (chiếm tỷ lệ 100%), thể hiện tính đa hình cao với các mẫu nghiên cứu.

Từ kết quả ly trích DNA, có 11 mẫu được chọn để thực hiện phản ứng PCR với 3 đoạn mồi ISSRK1, ISSRK2, ISSRK3 và xử lý số liệu mã hóa dưới dạng hệ số nhị phân 0:1. Sau đó được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc2.1 và xây dựng được giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền giữa các mẫu, được trình bày trong Hình 2.29.



Hình 2.29. Sơ đồ phả hệ mối tương quan di truyền dựa vào dấu phân tử ISSR

Mức độ tương đồng phản ánh mức độ di truyền của các giống với nhau. Hai giống có mức độ tương đồng càng lớn thì càng gần nhau về mặt di truyền và ngược lại, hai giống có mức độ tương đồng càng thấp thì càng xa nhau về mặt di truyền.

Từ kết quả xây dựng giản đồ phả hệ ISSR cho thấy, mức độ tương đồng của các mẫu biến thiên từ 0,49 đến 1,00. Tại mức độ tương đồng 0,49 chia thành 2 nhánh chính (nhánh A và B) và nhiều nhánh phụ (nhánh B1 và B2).

Ở nhánh A, chỉ có duy nhất mẫu QDDT.

Nhánh nhỏ B1 bao gồm các mẫu: QDCB và QHDP, với độ tương đồng là 1,00.

Nhánh nhỏ B2 có mức độ tương đồng từ 0,75 đến 1,00. Bao gồm các mẫu: QHCR, QDCB, QHVS, QHTT, QHTP, QDCT, QHVT, QHLLH. Trong nhánh nhỏ B2 lại chia thành nhiều nhánh nhỏ khác (B2.1, B2.2, B2.3). Ở nhánh B2.1 bao gồm các mẫu: QHCR, QDCB, QHVS. Ở nhánh B2.2 bao gồm các mẫu: QHTT, QHTP. Ở nhánh B2.3 bao gồm: QDCT, QHVT, QHLLH. Nhánh B2.1 và B2.2 có mức độ tương

đồng với nhau là 0,93. Nhánh B2.3 có mức độ tương đồng với B2.1 và B2.2 là 0,9. Kết quả khuếch đại DNA với mỗi ISSR này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Thu Thủy (2016) đã thực hiện trên cam quýt Việt Nam. Hệ số tương đồng cũng phù hợp với nghiên cứu trên (0,49 đến 1,00 so với 0,57 đến 0,98).

7. Cây sầu riêng Ri-6

Mẫu lá sầu riêng được thu từ các tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long và Cần Thơ có ký hiệu và nơi thu nhận (Bảng 2.20). Riêng mẫu lá đầu dòng sầu riêng Ri-6 được thu ở Viện Cây ăn quả miền Nam.

Bảng 2.20. Vị trí và kí hiệu của 20 mẫu lá sầu riêng dùng trong nghiên cứu

TÊN MẪU	TỌA ĐỘ		ĐỊA ĐIỂM THU	KÝ HIỆU
	KINH ĐỘ	VĨ ĐỘ		
RI 6	10°07'49.8"N	106°04'53.9"E	Mang Thít - Vĩnh Long	R6-VL
	10°19'29.0"N	106°07'25.6"E	Cai Lậy - Tiền Giang	R6-TG
	10°15'48.7"N	106°06'49.8"E	Chợ Lách - Bến Tre	R6-BT
	9°59'43.4"N	105°38'47.4"E	Phong Điền - Cần Thơ	R6-CT
	10°23'50.6"N	106°16'46.6"E	Viện CAQMN	R6-VCAQMN
MONTHONG	10°16'20.3"N	106°00'16.3"E	Long Hồ - Vĩnh Long	MT-VL
	10°19'29.0"N	106°07'25.6"E	Cai Lậy - Tiền Giang	MT-TG
	9°59'43.4"N	105°38'47.4"E	Phong Điền - Cần Thơ	MT-CT
KHỔ QUẢ XANH	10°10'36.9"N	106°06'48.8"E	Vũng Liêm - Vĩnh Long	KQX-VL
	10°16'13.9"N	106°14'34.2"E	Châu Thành - Bến Tre	KQX-BT
	9°59'43.4"N	105°38'47.4"E	Phong Điền - Cần Thơ	KQX-CT
CHÍN HÓA	10°18'27.9"N	106°15'52.2"E	Châu Thành - Bến Tre	9H-BT
	9°59'43.4"N	105°38'47.4"E	Phong Điền - Cần Thơ	9H-CT

SỮA HẠT	10°16'13.9"N	106°14'34.2"E	Châu Thành - Bến Tre	SHL-BT
LÉP	9°59'43.4"N	105°38'47.4"E	Phong Điền - Cần Thơ	SHL-CT
CHUÔNG	10°18'21.1"N	106°07'03.2"E	Cai Lậy - Tiền Giang	CB-TG
BÒ	10°16'13.9"N	106°14'34.2"E	Châu Thành - Bến Tre	CB-BT
BÍ	10°16'13.9"N	106°14'34.2"E	Châu Thành - Bến Tre	BI-BT
MUSANG KING	10°16'20.9"N	106°00'16.3"E	Long Hồ - Vĩnh Long	MK-VL
SÁU HỮU	10°19'29.0"N	106°07'25.6"E	Cai Lậy - Tiền Giang	6H-TG

7.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs

Qua kết quả phân tích và so sánh 14 trình tự dựa trên vùng ITS, có độ dài dao động từ 600 - 700 bp sau khi được hiệu chỉnh. Phát hiện 6 SNPs giữa các trình tự của các mẫu sầu riêng. Trong đó có một SNP đặc trưng cho giống sầu riêng Ri-6 là vị trí 444, ở sầu riêng Ri-6 là G trong khi các giống còn lại là C (Bảng 2.21).

Bảng 2.21. Bảng các vị trí SNPs trong trình tự nucleotide dựa trên vùng ITS của các giống sầu riêng

Mẫu	Vị trí nucleotide					
	8	444	583	614	717	718
Sầu riêng Ri-6	C	G	G	G	C	A
Sầu riêng Monthong	.	C
Sầu riêng Chín Hóa	.	C
Sầu riêng Khổ qua xanh	.	C
Sầu riêng chuồng bò	.	C	A	A	-	-
Sầu riêng sữa hạt lép	.	C	.	.	.	G
Sầu riêng bí	.	C
Sầu riêng 6 Hữu	—	C

Ghi chú: Dấu “-” là nucleotide bị mất, dấu “.” Là nucleotide giống với nucleotide trên trình tự của Ri-6

Kết quả cho thấy có 9 SNPs, trong các trình tự của giống Ri-6, có 6 vị trí khác biệt ở giống này. Vị trí 662 của trình tự Ri-6, sau khi kiểm tra peak cho thấy nu G có tín hiệu thấp. Tuy nhiên vẫn thể hiện được sự khác biệt với các vị trí trình tự còn lại. Vị trí 739 và 740 của trình tự Ri-6, sau khi xem tín hiệu peak ở vị trí 760, 761 trên Chromatogram cho thấy chỉ xuất hiện đỉnh cho một nu A nên hai vị trí này có thể do đột biến. Vị trí 759 cũng ở trình tự Ri-6 là nu G các trình tự khác là nu T, sau khi kiểm tra cho thấy tín hiệu nu G chưa tốt và bị nhiễu. Vị trí 780 xuất hiện nu C trên trình tự Ri-6 các trình tự còn lại là nu G, kiểm tra peak cho thấy tín hiệu nu C thấp nhưng không có tín hiệu nhiễu bên dưới. Trong trình tự giống Chín Hóa, cho thấy 2 điểm không xuất hiện nu là 750 và 763, sau khi kiểm tra peak (đoạn trình tự 765 – 805) tín hiệu khá tốt các peak có đỉnh cao và phân biệt được các nu, nên đây có thể là hai vị trí đột biến cho thấy được khác biệt của giống Chín Hóa với các giống còn lại. Trình tự các giống Sữa Hạt Lép, cho thấy có 2 vị trí khác biệt. Vị trí 798 xuất hiện sai khác giữa nu G và T, nên trình tự Sữa hạt lép nên được thay thế bằng ký tự K. Trình tự sấu riêng 6 Hữu xuất hiện sai khác tại vị trí 793 là nu G các trình tự còn lại là nu C, kiểm tra cho thấy tín hiệu nu G thấp nhưng có tín hiệu của nu A bên dưới mà không phải là nu C.

Qua kết quả so sánh và kiểm tra đối chứng giữa 17 trình tự vùng gen *matK* có độ dài khoảng 800 bp. Tìm được một số vị trí sai khác giữa các trình tự trong cùng giống Ri-6 (R6_CT, R6_VCAQMN), giống Sữa Hạt Lép (SHL_BT) và cá hai thể của giống Chín Hóa (9H-BT) và giống Sáu Hữu (6H_TG). Trong các điểm sai khác chưa tìm được vị trí đặc trưng cho giống sấu riêng Ri-6 nên vẫn chưa thể nhận diện được giống sấu riêng Ri-6 với các giống sấu riêng được sử dụng trong nghiên cứu. Tuy nhiên, có thể nhận diện được hai cá thể Chín Hóa_Bến Tre và Sáu Hữu_Tiền Giang. Qua kết quả phân tích cho thấy sự đa dạng trong trình tự vùng gen *matK* giữa các cá thể sấu riêng với nhau (Bảng 2.22).

Bảng 2.22. Bảng các vị trí SNPs trong trình tự nucleotide dựa trên gen matK của các giống sầu riêng

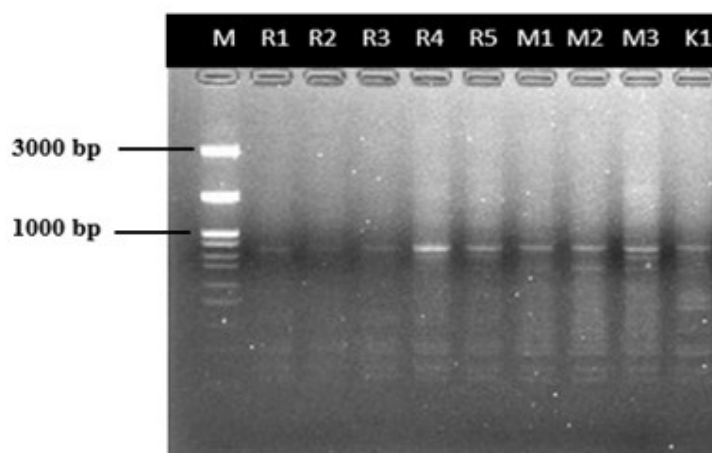
Mẫu	Vị trí nucleotide								
	662	739	740	750	759	763	780	793	798
Sầu riêng Ri-6	G	T	G	C	T	A	G	A	T
Sầu riêng Monthong	C
Sầu riêng Chín Hóa	-	.	.
Sầu riêng Khổ qua xanh	.	.	-	-	-	-	.	.	.
Sầu riêng chuồng bò	.	-	K
Sầu riêng sữa hạt lép
Sầu riêng bí
Sầu riêng 6 Hữu	G	.

Ghi chú: Dấu “-“ là nucleotide bị mất, dấu “.” Là nucleotide giống với nucleotide trên trình tự của Ri-6

Sau khi phân tích bằng phần mềm BioEdit do không có sự khác biệt trong trình tự giữa 20 giống sầu riêng trong nghiên cứu, nên chỉ sử dụng một trình tự đại diện cho các mẫu để so sánh với cơ sở dữ liệu trên NCBI. Kết quả khi so sánh bằng công cụ BLAST cho thấy độ tương đồng 99.78% với các loài *Durio zibethinus* với độ bao phủ 100% ở trình tự vùng gen *rpoC1* với các mã số (MG138151.1 và MT321069.1).

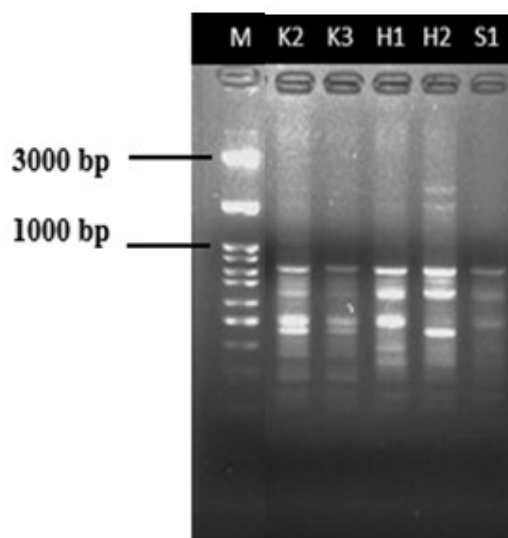
7.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với dấu phân tử ISSR

ISSR trong phản ứng PCR trên DNA của bộ gen thu được từ các mẫu lá sầu riêng. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,5%. Kết quả, sản phẩm của 2 môi (ISSR31 và ISSRK1) không khuếch đại được trong tất cả các mẫu hoặc không hoàn toàn, hoặc do sản phẩm quá ít không thể ghi nhận được kết quả. Còn lại phổ điện di của 5 môi (ISSR03, ISSR13, ISSR22, ISSRK1 và ISSRK2) được tiếp tục sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của 20 mẫu sầu riêng (Hình 2.30, 2.31 và 2.32).



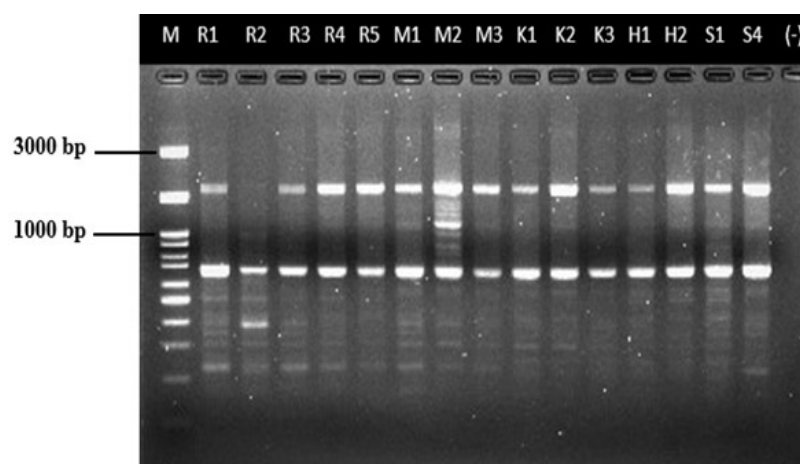
Hình 2.30. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi ISSR03

M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long).



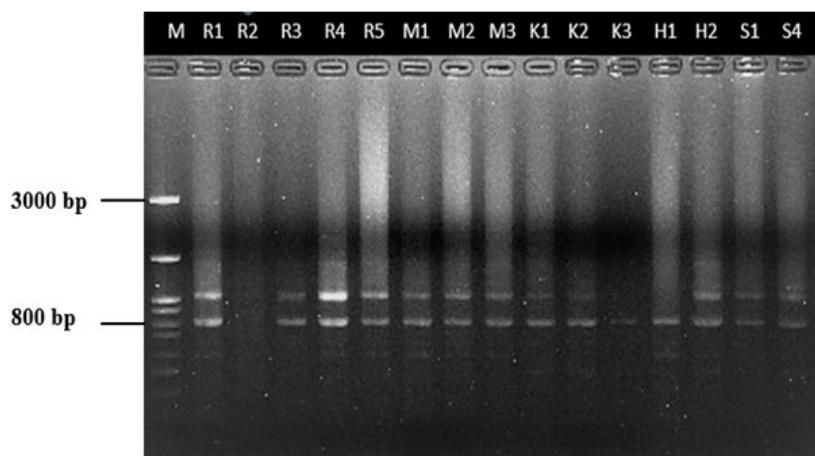
Hình 2.31. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi ISSR03

M. Thang chuẩn 3 kb, K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre)



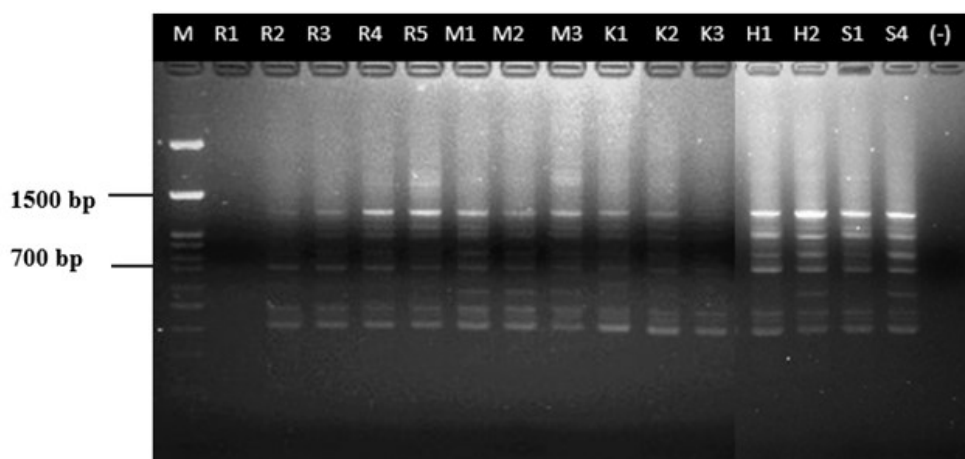
Hình 2.32. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR13

M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ), (-). Đối chứng âm.



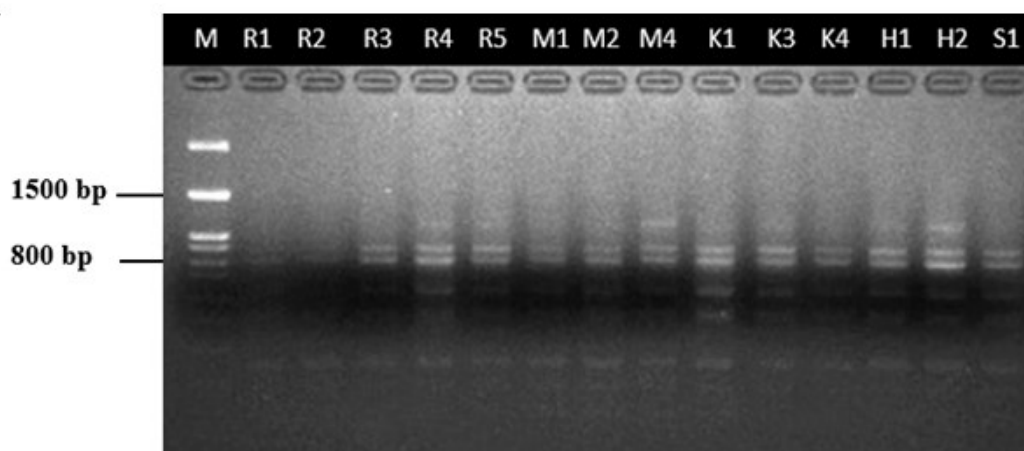
Hình 2.33. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR22

M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ), (-). Đối chứng âm.



Hình 2.34. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi ISSRK2

M. Thang chuẩn 1kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ), (-). Đối chứng âm.



Hình 2.35. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi ISSRK3

M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ), (-). Đối chứng âm.

Theo kết quả Bảng 2.23, có tổng số 57 phân đoạn được nhân lên với trung bình 11,4 băng/đoạn mồi. Trong đó có 40 phân đoạn đa hình chiếm tỉ lệ 72%. Số lượng băng đa hình dao động từ 6 (ISSR22) đến 20 (ISSR13) với trung bình đạt 8, kích thước

các băng dao động trong khoảng 200 - 2500 bp. Trong số 5 chỉ thị của nghiên cứu này, ISSR13 cho nhiều phân đoạn nhất với 20 phân đoạn, trong đó có 11 phân đoạn đa hình chiếm 65%, kể đến là ISSRK2 cho 15 phân đoạn với 11 phân đoạn đa hình chiếm 73,3%. Còn lại ISSR22, ISSRK3 và ISSR03 cho số phân đoạn thấp hơn lần lượt là 6,7 và 9. Kết quả này cao hơn trong một nghiên cứu tương tự trên sầu riêng của Vanijajiva (2012), với 5 chỉ thị ISSR đã khuếch đại được 50 phân đoạn, có kích thước từ 50-2000bp và có 19 phân đoạn đa hình chiếm 38%. So sánh với quần thể 55 giống sầu riêng được nghiên cứu ở Indonesia của Angeliena *et al.* (2019), đã sử dụng 11 đoạn mồi ISSR cho 83 alen đa hình (93,25%).

Bảng 2.23. Kết quả 5 mồi được phân tích sự đa dạng giữa 20 giống sầu riêng

TT	Primers	Tổng số băng DNA	Băng đa hình	Tỉ lệ đa hình (%)
1	ISSR03	9	6	66,7
2	ISSR13	20	13	65,0
3	ISSR22	6	5	83,3
4	ISSRK2	15	11	73,3
5	ISSRK3	7	5	71,4
Tổng cộng		57	40	
Trung bình		11,4	8	72,0

Từ phổ điện di của các phân đoạn được mã hóa dưới dạng hệ số nhị phân 0:1. Sau đó được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc2.10 thu được hệ số tương đồng của 20 giống sầu riêng. Sự khác biệt của 20 giống sầu riêng được ghi nhận dựa trên sự đa hình về kiểu gen được khuếch đại bởi 5 mồi ISSR có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,61-0,97. Cây phân loại được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng với phương pháp UPGMA (Hình 2.36). Dựa vào giản đồ hình cây, 20 mẫu sầu riêng được chia thành 5 nhóm chính và nhiều nhóm phụ như sau:

- Nhóm I: Gồm 3 mẫu thuộc cùng giống Ri-6 (R6_VL, R6_TG và R6_BT). Hệ số tương đồng của 3 giống nằm trong khoảng 0.84 - 0.97.
- Nhóm II: Gồm 9 mẫu được phân chia thành hai nhóm phụ là II.A và II.B:

+ Nhóm II.A: Gồm 4 mẫu (R6_CT, H1_BT, K2_BT và K3_VL). Hệ số tương đồng của 4 giống này 0.86 – 0.90. Trong đó hai mẫu cùng giống KQ_BT và KQX_VL.

+ Nhóm II.B: Gồm 5 mẫu (R6_AQMN, 6H_TG, M1_VL, M3_CT và H2_CT). Hai giống có quan hệ gần nhất và cùng giống là M1_VL và M3_CT.

- Nhóm III: Gồm 6 mẫu với hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0.83 – 0.91 và được phân thành hai nhóm phụ III.A và III.B:

+ Nhóm III.A: Gồm 3 mẫu (K3_CT, S1_BT và S4_CT). Trong đó, 2 mẫu của giống sầu riêng Sữa hạt lép nằm gần nhau được thu ở Bến Tre và Cần Thơ.

+ Nhóm III.B: Gồm 3 mẫu (B1_TG, BI_BT và B2_BT). Trong đó, có hai mẫu cùng giống sầu riêng Chuồng Bò được thu ở Tiền Giang và Bến Tre. Cho thấy sầu riêng Chuồng Bò có quan hệ gần gũi với sầu riêng Bí.

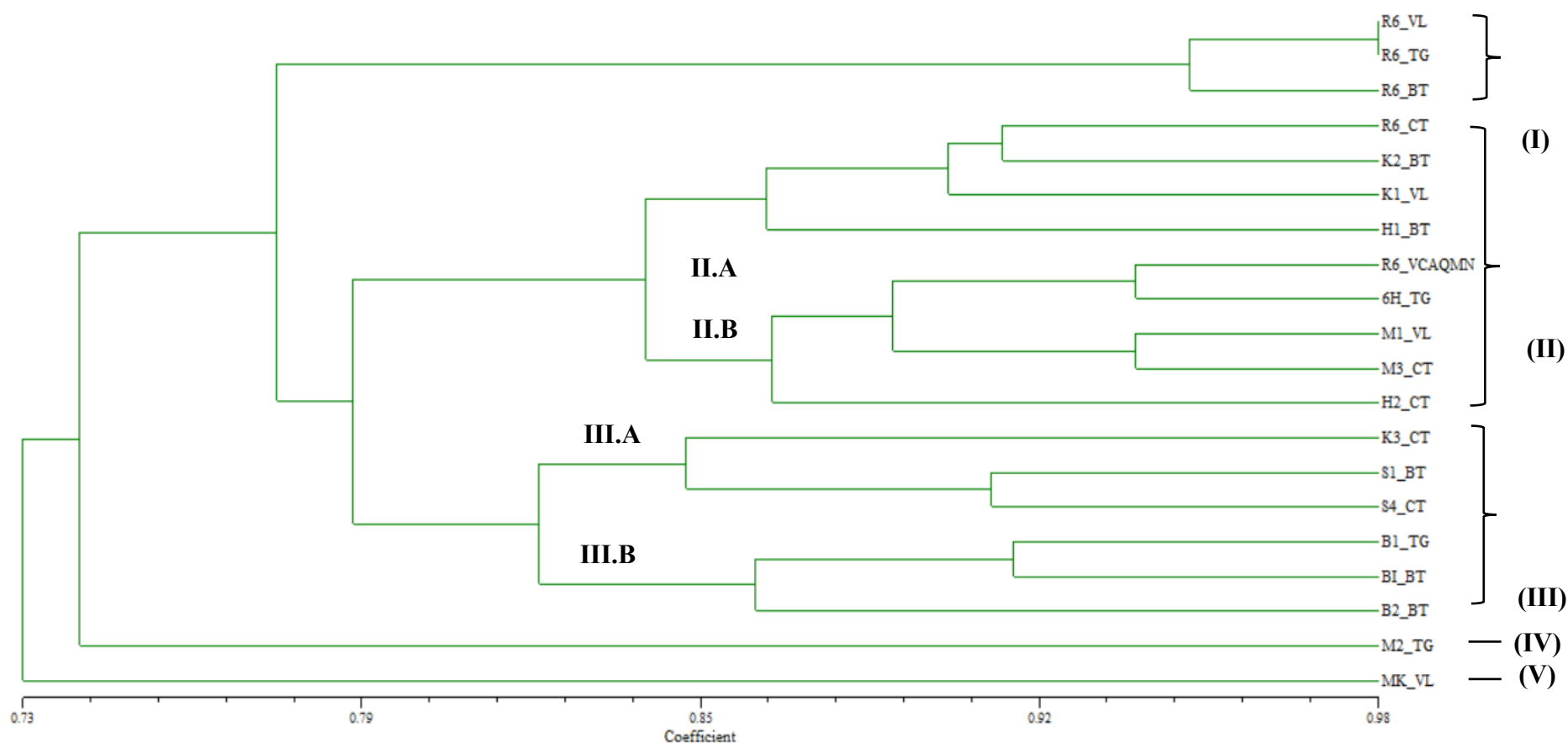
- Nhóm IV: Nhóm này có duy nhất một mẫu M2_TG. Giống này có khoảng cách di truyền gần nhất với M3_CT với hệ số tương đồng 0.82 và xa nhất với giống K3_CT với hệ số tương đồng 0.61.

- Nhóm V: Chỉ duy nhất một mẫu MK_VL, có khoảng cách di truyền xa nhất với M2_TG với hệ số tương đồng 0.62 và gần nhất với K3_CT với hệ số tương đồng 0.84. Giống này là Musang King được du nhập từ Malaysia và được thu ở trại giống Hạnh Tâm thuộc tỉnh Vĩnh Long.

Qua kết quả phân nhóm trên cho thấy, các mối ISSR đã dùng trong nghiên cứu có thể nhận diện được hai cá thể của từng giống đơn lẻ như Musang King ở Vĩnh Long và Monthong ở Cần Thơ. Các mẫu của giống sầu riêng Ri-6 nằm ở 3 nhánh khác nhau, trong đó có 3 cá thể nằm cùng nhánh là Ri-6 (Vĩnh Long, Tiền Giang và Bến Tre) thuộc nhóm I, còn 2 cá thể của giống này nằm ở nhóm II.A (Ri-6_Cần Thơ) và II.B (Ri-6_Viện CAQMN). Các mẫu của hai giống sầu riêng Sữa Hạt Lép (Bến Tre và Cần Thơ) và Chín Hóa (Bến Tre và Cần Thơ) không đi cùng một nhóm, qua đó ta có thể nhận định hai giống này không có cùng nguồn gốc. Hai mẫu sầu riêng Chuồng Bò (Tiền Giang và Bến Tre) và sầu riêng Bí (Bến Tre) nằm cùng nhánh III.B cho thấy rằng hai giống này có mối quan hệ họ hàng gần gũi. Đặc biệt qua phổ điện di có thể phân biệt được mẫu MK_VL của giống Musang King, giống này nằm riêng một nhánh trong cây phân loại và đây là giống sầu riêng nhập ngoại từ Malaysia. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Giang *et al.* (2016) trên các giống được thu

từ Malaysia, Thái Lan và Việt Nam trong đó giống D197 (Musang King) của Malaysia cũng nằm riêng một nhánh.

Kết quả phân tích dựa vào dấu phân tử ISSR đã phân chia 20 giống sầu riêng thu được ở bốn tỉnh của vùng ĐBSCL chia thành các 5 nhóm có hệ số tương đồng dao động khá xa trong khoảng 0,61 – 0,97. Nguyên nhân do các mẫu thu tại các nhà vườn được trồng bằng các phương pháp khác nhau như ghép cành, trồng từ hạt và nguồn gốc giống đến từ nhiều nơi khác nhau nên có sự đa dạng trong vật liệu di truyền trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Cũng giống như một nghiên cứu về mối quan hệ di truyền của 14 giống sầu riêng ở Thái Lan có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,632 - 1,00 (Vanijajiva, 2012). Một số nghiên cứu trên các giống cây ăn quả khác dựa vào dấu phân tử ISSR cũng cho kết quả tương tự. Nghiên cứu của Trần Nhân Dũng và Trần Thị Lệ Quyên (2012) trên các giống Mãng cụt cho thấy mức độ tương đồng của 32 dòng Mãng cụt trong nghiên cứu nằm trong khoảng 0,75-1,00. Trong nghiên cứu trên 12 mẫu Thanh trà Lê Y Phụng *et al.* (2018) đã chỉ ra mức độ đa hình của quần thể có sự đa dạng cao và mức độ tương đồng dao động từ 0,58- 0.86. Trong nghiên cứu của Hồ Viết Thế *et al.* (2019) phân tích đa dạng di truyền ở Chanh dây đã kết luận chỉ thị ISSR và RAPD tạo ra đều cho mức độ đa hình cao và kết quả phân tích cây phả hệ có sự biến động lớn trong thông tin di truyền giữa các mẫu phân tích và không tuân theo quy luật về vị trí thu mẫu. Khi nghiên cứu về mối liên hệ di truyền của các giống cây trồng trong canh tác nông nghiệp cho thấy con người là yếu tố quan trọng trong việc di chuyển giống cây trồng giữa các vùng địa lý (Stankiewicz *et al.*, 2001). Theo kết quả cho thấy, có nhiều yếu tố tạo nên sự khác biệt trong quần thể như khả năng phát tán, ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến quá trình sinh trưởng và phát triển (Kerdelhué *et al.*, 2002).



Hình 2.36. Giảm đồ hình cây thể hiện mối tương quan di truyền giữa 20 mẫu sầu riêng

R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ), B1. Chuồng Bò (Tiền Giang), B2. Chuồng Bò (Bến Tre), B1. Bí (Bến Tre), MK. Musang King (Vĩnh Long), 6H. Sáu Hữu (Tiền Giang).

8. Cây thanh long ruột đỏ

Dựa trên kết quả bình tuyển cây đầu dòng của Viện cây ăn quả miền Nam và khảo sát các tỉnh trồng thanh long trọng điểm, đề tài đã tiến hành thu 10 mẫu thanh long đại diện cho 4 giống phổ biến ở Nam Bộ hiện nay là thanh long ruột đỏ, ruột tím hồng, ruột trắng và vỏ vàng ruột trắng. Thông tin về các mẫu được sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2.24. Về đặc điểm hình thái, các giống được phân biệt chủ yếu bởi màu sắc vỏ, ruột và hình dạng trái.

Bảng 2.24. Danh sách mẫu thanh long được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Kí hiệu	Dạng trái	Màu vỏ trái	Màu thịt trái	Nơi thu mẫu
1.	DF1	Bầu dục	Đỏ	Đỏ	VCAQMN
2.	DF2	Bầu dục	Đỏ	Đỏ	Bến Tre
3.	DF3	Bầu dục	Đỏ	Đỏ	Cà Mau
4.	DF4	Tròn	Đỏ	Đỏ	Cà Mau
5.	DF5	Bầu dục	Đỏ	Tím hồng	Tiền Giang
6.	DF6	Bầu dục	Đỏ	Trắng	Bến Tre
7.	DF7	Bầu dục	Đỏ	Trắng	Cà Mau
8.	DF8	Bầu dục	Vàng	Trắng	Tiền Giang
9.	DF9	Bầu dục	Vàng	Trắng	Đồng Tháp
10.	DF10	Bầu dục	Đỏ	Trắng	An Giang

8.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch, xác định SNPs

Dựa trên chromatogram, chất lượng của trình tự DNA đã được khẳng định, vùng psbA-trnH với nhiều ký tự không xác định trong khi atpF-H, matK, rpoC1 và rbcL thể hiện tín hiệu nucleotide rõ ràng. Các vị trí bảo tồn và thay đổi trong số các trình tự này đã được kiểm tra do kết quả liên kết. Nhìn chung, có sự bảo thủ cao giữa các loài *Hylocereus* đối với bốn trình tự mã vạch DNA. Tuy nhiên, sự xuất hiện của SNPs và đột biến indel cho thấy sự đa dạng nucleotide của các loài *Hylocereus* như vậy. Vùng trình tự

atpF-H thay đổi cao nhất với 6 vị trí thay đổi. Ba gen bao gồm matK, rpoC1 và rbcL có một lượng nhỏ các vị trí thay đổi so với atpF-H. Về đột biến indel, 9 đột biến đã được phát hiện trên trình tự này trong khi tần số của đột biến này khá thấp ở ba locus khác (Bảng 2.25). Do đó, có thể thấy rằng trình tự không mã hóa biến đổi nhiều hơn trình tự mã hóa và được đề xuất như một trình tự mã vạch tiềm năng để phân biệt loài.

Bảng 2.25. Đa hình trình tự DNA mã vạch của 4 locus trong nghiên cứu

Locus	Chiều dài (bp)	Vị trí bảo tồn	Vùng biến đổi		Đột biến Indel
			Singleton sites	Parsimony informative sites	
atpF-H	585	571	5 (0.85%)	1 (0.17%)	9 (1.54%)
matK	782	778	1 (0.13%)	3 (0.38%)	0 (0%)
rbcL	506	502	1 (0.20%)	3 (0.59%)	2 (0.40%)
rpoC1	452	450	1 (0.22%)	1 (0.22%)	2 (0.44%)

Một phát hiện mới từ trình tự atpF-H là sự chèn một đoạn DNA ngắn gồm 9 nucleotide đột biến ATTAGGTAC ở *Hylocereus* sp. DF4 (ruột đỏ và quả tròn) so với 9 giống thanh long còn lại (Bảng 2.26). Các đột biến đã làm cho giống này trở nên đặc biệt so với những giống khác. Kết quả này khẳng định rằng vùng đệm atpF-H có tính đa hình cao và có thể xác định được giống thanh long này. Hơn nữa, năm đột biến thay thế đã được phát hiện và phân loại thành ba SNPs như T / C, C / A và G / A.

Bảng 2.26. Đa hình nucleotide ở trình tự atpF-H

Mẫu	Vị trí														
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	5
	8	8	8	8	7	7	8	8	8	8	8	8	8	9	9
	1	2	3	4	8	9	0	1	2	3	4	5	6	5	7
DF1	T	T	T	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	T
DF2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
DF3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
DF4	C	A	A	A	A	T	T	A	G	G	T	A	C	A	C
DF5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
DF6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
DF7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	C
DF8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
DF9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
DF10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.

DF1 – *H. polyrhizus* SORFI; DF2 – *H. polyrhizus* BT; DF3 – *H. polyrhizus* CM; DF4 – *Hylocereus* sp.; DF5 – *Hylocereus* sp. SORFI;

DF6 – *H. undatus* BT; DF7 – *H. undatus* CM; DF8 – *H. megalanthus* DT; DF9 – *H. megalanthus* TG; DF10 – *Hylocereus* sp. AG;

Phân tích trình tự từ gen *rbcL* đã chứng minh rằng gen có nguồn gốc từ lạp thể này có giá trị trong việc phân định loài (Bảng 2.27). Hai giống *H. polyrhizus* DF1 (ruột đỏ) và *Hylocereus* sp. DF5 (ruột tím hồng) từ Viện cây ăn quả Miền Nam đã được phân biệt với các giống khác khác bởi 4 SNPs, bao gồm G / C, A / C, G / T, T / C và 2 đột biến thêm nucleotide A và G.

Bảng 2.27. Đa hình nucleotide ở trình tự gen *rbcL*

Mẫu	Vị trí					
	194	241	489	490	491	492
DF1	G	A	A	G	G	T
DF2	.	C	-	-	.	.
DF3	.	C	-	-	.	.
DF4	.	C	-	-	.	.
DF5
DF6	C	.	-	.	T	C
DF7	.	C	-	-	.	.
DF8	.	.	-	-	.	.
DF9	.	.	-	-	.	.
DF10	.	C	-	-	.	.

DF1 – *H. polyrhizus* SORFI; DF2 – *H. polyrhizus* BT; DF3 – *H. polyrhizus* CM; DF4 – *Hylocereus* sp.; DF5 – *Hylocereus* sp. SORFI; DF6 – *H. undatus* BT; DF7 – *H. undatus* CM; DF8 – *H. megalanthus* DT; DF9 – *H. megalanthus* TG; DF10 – *Hylocereus* sp. AG; MT884001 – *H. undatus*.

Gen *rpoC1*, một trình tự mã hóa khác trong bộ gen plastid cho thấy hiệu quả xác định giữa các loài thanh long khác nhau rất thấp. DF1, DF5, DF6 và DF10 là các loài khác nhau trong khi chuỗi nucleotide của chúng không có rất ít sự khác biệt có ý nghĩa. Do đó, gen *rpoC1* không phải là mã vạch thích hợp cho các loài thanh long. Khoảng cách di truyền thấp giữa các loài khác nhau cũng được ghi nhận từ trình tự gen *matK*; tuy nhiên, đột biến mất 1 Adenine ở vị trí 817 trong giống tím hồng *Hylocereus* sp. DF5 so với giống ruột đỏ *H. polyrhizus* DF1 SORFI giúp phân biệt 2 giống thanh long này (Bảng 2.28).

Bảng 2.28. Đa hình nucleotide ở gen matK

Mẫu	Vị trí								
	738	784	787	799	800	801	809	817	826
DF1	A	A	A	-	A	T	-	A	A
DF2	.	.	.	G	.	.	-	.	.
DF3	.	C	.	A	T	G	G	.	.
DF4	.	.	.	-	.	.	-	.	.
DF5	.	.	.	-	.	.	-	-	.
DF6	.	.	.	-	.	.	-	-	-
DF7	.	.	.	-	.	.	A	.	-
DF8	.	.	.	-	.	.	-	.	.
DF9	-	.	-	-	.	.	-	.	.
DF10	.	.	.	-	.	.	-	.	.

DF1 – *H. polyrhizus* SORFI; DF2 – *H. polyrhizus* BT; DF3 – *H. polyrhizus* CM; DF4 – *Hylocereus* sp.; DF5 – *Hylocereus* sp. SORFI; DF6 – *H. undatus* BT; DF7 – *H. undatus* CM; DF8 – *H. megalanthus* DT; DF9 – *H. megalanthus* TG; DF10 – *Hylocereus* sp. AG; MT884001 – *H. undatus*.

So sánh với trình tự quả thanh long từ cơ sở dữ liệu của NCBI, cho thấy năm loài bao gồm *H. undatus* (NC_053698.1), *Hylocereus tricae* (LT745724.1), *Hylocereus ocamponis* (LT745687.1) (Korotkova *et al.*, 2017), *Hylocereus costaricensis* (JQ590992.1) và *Hylocereus peruvianus* (AY015310.1) (Nyffeler, 2002) cho thấy độ tương đồng dao động từ 97-100% so với các giống trong nghiên cứu. *H. costaricensis* là giống thanh long ruột tím ở Costa Rica (Esquivel *et al.*, 2007), loài này chứa lượng hợp chất hoạt tính sinh học cao và không có tác dụng gây độc tế bào (Paško *et al.*, 2021). *H. tricae* là giống thanh long hoang dã ở Belize (Gómez-Hinostrosa *et al.*, 2014) và *H. ocamponis* là giống thanh long ruột đỏ ở Mexico (Ibrahim *et al.*, 2018). Dựa trên độ tương đồng, có thể thấy mối quan hệ di truyền khá gần gũi giữa các loài thanh long ở các

gia khác và thanh long trong nghiên cứu này. Tương tự, ba locus bao gồm *matK*, *atpF-H* và *rbcL* có thể phân biệt các loài như vậy trong khi *rpoC1* hoàn toàn bảo tồn cho tất cả các trình tự. Sự lai tạp giữa các loài trong và ngoài đặc hiệu cao, tạo ra sự nhầm lẫn về phân loại, dẫn đến sự phức tạp của các loài và giống thanh long (Tel-Zur *et al.*, 2004). Do đó, một locus duy nhất không đủ khả năng phân biệt để xác định các loài này. Trong nghiên cứu này, giống *H. polyrhizus* SOFRI được xác định bởi ba locus, *atpF-H* + *rbcL* + *matK*. Dữ liệu từ 12 chi thực vật cho thấy trình tự bộ gen lục lạp rất biến đổi và các vùng như vậy nên được ưu tiên khi tìm kiếm các locus thích hợp để định danh các giống hoặc loài thực vật có quan hệ di truyền gần gũi và tiềm năng là mã vạch DNA đặc trưng cho thực vật (Dong *et al.*, 2016). Việc sử dụng nhiều locus được coi là một giải pháp tiềm năng để xác loài chính xác hơn, nhiều nghiên cứu đã kết luận rằng rằng mã vạch DNA đơn chỉ xác định được một số trong số 18 loài trong chi *Melilotus*, một loại cây thảo được ở Bắc Phi (Fazekas *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2017). Theo nghiên cứu này, sự kết hợp của năm locus, *matK* + *rbcL* + *trnL-F* + *trnH-psbA* + ITS cho độ chính xác cao nhất trong khi *rbcL* đơn lẻ là ít nhất. Vu *et al.* (2020) cho rằng sự kết hợp ITS + *matK* là mã vạch DNA tiềm năng nhất cho các loài *Paphiopedilum* Việt Nam. Do đó, những kết quả này phản ánh rằng khả năng nhận diện của mã vạch DNA phụ thuộc vào loài, vì vậy một DNA mã vạch hiệu quả cho loài này có thể có một số hạn chế đối với những loài khác.

9. Cây vú sữa lò rèn

Tổng cộng có 19 mẫu vú sữa gồm các giống vú sữa Lò Rèn, vú sữa bơ hồng, vú sữa bơ tím và vú sữa tím được thu mẫu ở Viện cây ăn quả Miền Nam, thu nhà vườn và trại giống ở các tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long, Cần Thơ (Bảng 2.29).

Bảng 2.29. Ký hiệu và địa điểm thu các mẫu của bốn giống vú sữa

Stt	Tên mẫu vú sữa	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ thu mẫu	
				N	E
1	Lò Rèn	S1	Viện CAQMN, Châu Thành, Tiền Giang	10 ⁰ 23'50.68"	106 ⁰ 16'47.15"
2	Lò Rèn	S2	Trại giống Số 1, Châu Thành, Tiền Giang	10 ⁰ 24'03.37"	106 ⁰ 13'43.25"
3	Bơ hồng	S3	Trại giống Số 1, Châu Thành, Tiền Giang	10 ⁰ 24'03.37"	106 ⁰ 13'43.25"
4	Bơ tím	S4	Trại giống Số 1, Châu Thành, Tiền Giang	10 ⁰ 24'03.37"	106 ⁰ 13'43.25"
5	Lò Rèn	S5	Vườn huyện Cái Bè, Tiền Giang	10 ⁰ 22'18.79"	105 ⁰ 56'47.35"
6	Bơ hồng	S6	Vườn huyện Cái Bè, Tiền Giang	10 ⁰ 21'25.74"	105 ⁰ 56'25.34"
7	Bơ tím	S7	Vườn huyện Cái Bè, Tiền Giang	10 ⁰ 21'25.74"	105 ⁰ 56'25.34"
8	Lò Rèn	S8	Vườn huyện Bình Minh, Vĩnh Long	10 ⁰ 02'44.13"	105 ⁰ 50'09.04"
9	Bơ hồng	S9	Vườn huyện Bình Minh, Vĩnh Long	10 ⁰ 03'22.16"	105 ⁰ 50'48.19"
10	Bơ tím	S10	Vườn huyện Bình Minh, Vĩnh Long	10 ⁰ 02'44.13"	105 ⁰ 50'09.04"
11	Tím	S11	Vườn huyện Bình Minh, Vĩnh Long	10 ⁰ 03'22.16"	105 ⁰ 50'48.19"

Stt	Tên mẫu vú sữa	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ thu mẫu	
				N	E
12	Lò Rèn	S12	Vườn Phong Điền, Cần Thơ	9 ⁰ 59'48.36"	105 ⁰ 40'07.18"
13	Bơ hồng	S13	Vườn Phong Điền, Cần Thơ	9 ⁰ 59'36.32"	105 ⁰ 40'12.69"
14	Bơ tím	S14	Vườn Phong Điền, Cần Thơ	9 ⁰ 59'36.32"	105 ⁰ 40'12.69"
15	Tím	S15	Vườn Phong Điền, Cần Thơ	9 ⁰ 59'48.36"	105 ⁰ 40'07.18"
16	Lò Rèn	S16	Vườn Chợ Lách, Bến Tre	10 ⁰ 14'27.94"	106 ⁰ 10'11.48"
17	Bơ hồng	S17	Vườn Chợ Lách, Bến Tre	10 ⁰ 14'27.94"	106 ⁰ 10'11.48"
18	Mica	S18	Trại giống Chợ Lách, Bến Tre	10 ⁰ 15'08.23"	106 ⁰ 08'18.60"
19	Cà na	S19	Vườn Phong Điền, Cần Thơ	9 ⁰ 59'36.32"	105 ⁰ 40'12.69"

9.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch, xác định SNPs

Sau khi giải trình tự sản phẩm PCR tám môi ITS, matK, rbcL, atpF-atpH, ycf1b, rpoC1, trnH-psbA và psbI-psbK của sáu giống vú sữa: vú sữa Lò Rèn, vú sữa bơ hồng, vú sữa bơ tím, vú sữa tím, vú sữa Mica và vú sữa cà na thu được tổng cộng 113 trình tự DNA, trong đó số trình tự đã giải và sau kiểm tra được sử dụng có số lượng lần lượt là ITS 19, matK 18, rbcL15, atpF-atpH 16, rpoC1 12, psbI-psbK 18, trnH-psbA 15. Kích thước của các trình tự được thể hiện trong Bảng 2.30.

Theo tác giả Vivas và cộng sự (2014), nghiên cứu các loài trong họ Sapotaceae giải trình tự cho kết quả *rbcL* 100% và *matK* 98,7% cho kết quả tốt nhất, tiếp theo là ITS 92,3% và *trnH-psbA* 86,3%. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này tỉ lệ giải trình tự có phần khác so với tác giả trên cao nhất là ITS, *matK*, *atpF-atpH* đều có tỉ lệ là 100%, tiếp theo là *psbI-psbK* 94,44%, *trnH-psbI* 94,11% và có tỉ lệ thấp nhất là *rbcL* 77,77% và *rpoC1* 75,00% có thể do điều kiện thí nghiệm khác nhau nên cho kết quả là không giống nhau, cũng có thể có thể là do sự hiện diện của các lần lặp lại mononucleotide (> 10 bp) làm suy yếu các phản ứng giải trình tự.

Bảng 2.30. Kích thước điện di sản phẩm PCR và kích thước giải trình tự của các mẫu

STT	Vùng trình tự	Số trình tự được giải và sử dụng được	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Kích thước giải trình tự	
				Trình tự được giải	Trình tự dùng để phân tích
1	ITS	19	700	700-707	659
2	<i>matK</i>	18	900	709-915	677
3	<i>rbcL</i>	15	650	569-578	526
4	<i>atpF-atpH</i>	16	600	561-577	504
5	<i>rpoC1</i>	12	550	500-508	476
6	<i>psbI-psbK</i>	18	480	447-455	403
7	<i>trnH-psbA</i>	15	650	608-614	535

Theo nghiên cứu khảo sát vùng trình tự phân tử để nhận diện các giống vú sữa ở Việt Nam (Vũ Thị Huyền Trang *et al.*, 2019) vùng trình tự *matK* có kích thước 867 bp lớn hơn so với kích thước 677 bp trong nghiên cứu này có thể do các trình tự trong nghiên cứu giải chưa được chuẩn. Vùng trình tự *trnH-psbA* sau khi hiệu chỉnh có kích thước 535 bp, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Swenson và cộng sự (2008) cùng trên đối tượng *Chrysophillum cainito*. Ở nghiên cứu tìm mã vạch để xác định các loài trong họ Sapotaceae của thực vật rừng Đại Tây Dương (Vivas *et al.*, 2015)

xác định kích thước vùng *rbcL* của loài *Chrysophyllum splendens* thuộc chi Vú sữa là 586 bp điều này khá phù hợp với kích thước của nghiên cứu này là 526 bp.

Ở nghiên cứu xác định loài trong họ Sapotaceae bằng DNA mã vạch ở rừng Đại Tây dương đã xác định rằng vùng trình tự ITS là lựa chọn tốt nhất để phân biệt các loài (Vivas *et al.*, 2014). Nhưng trong nghiên cứu này cho thấy vùng ITS có độ bảo tồn cao các trình tự nucleotide của các giống đều giống nhau. Tổ chức mã vạch DNA quốc tế (CBOL) khuyến cáo sử dụng các vùng gen *rbcL* và *matK* trong nghiên cứu thực vật (Wu *et al.*, 2019) và hai vùng gen này đã giúp định danh chính xác tới 69,4-74,9% các loài cây có hoa ở Anh (De Vere *et al.*, 2012); tương tự, vùng gen *trnH-psbA* có sự khác biệt cao giữa các loài và được Kress và cộng sự (2017) đề xuất làm DNA mã vạch cho thực vật có hoa và phân biệt hiệu quả tuy nhiên đối với các giống trong loài vú sữa thì trình tự nucleotide của các gen này không có sự khác biệt, có thể do các mẫu trong nghiên cứu là dưới loài nên không có sự sai khác về trình tự nucleotide.

Sản phẩm sau khi giải trình tự được kiểm tra chỉ có mỗi *atpF-atpH* cho kết quả khác nhau ở các giống.

Phân tích trình tự DNA của vùng gen *atpF-atpH* sau khi được hiệu chỉnh có kích thước 504 bp, thực hiện phân tích bằng phần mềm MEGA X cho kết quả vùng bảo tồn là 489/504 vị trí, vùng biến đổi là 15/504 trong đó 8 vị trí khác biệt trên trình tự DNA của 1 giống so với các giống còn lại và 3 vị trí có sự khác biệt giữa 2 giống so với các giống còn lại (Bảng 2.31).

Bảng 2.31. Các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của các giống vú sữa Lò Rèn với các giống khác

Mẫu	113	225	260	289	303	309	326	430	462	468
S1	A	A	A	C	A	T	A	T	T	T
S2
S3
S4
S5
S6	T	T	G	C	.
S7
S8	G	.	.	.	A
S9
S10	.	.	.	A
S11	T	C	T	C	.	.
S12	T	G
S13
S15
S17
S18	C

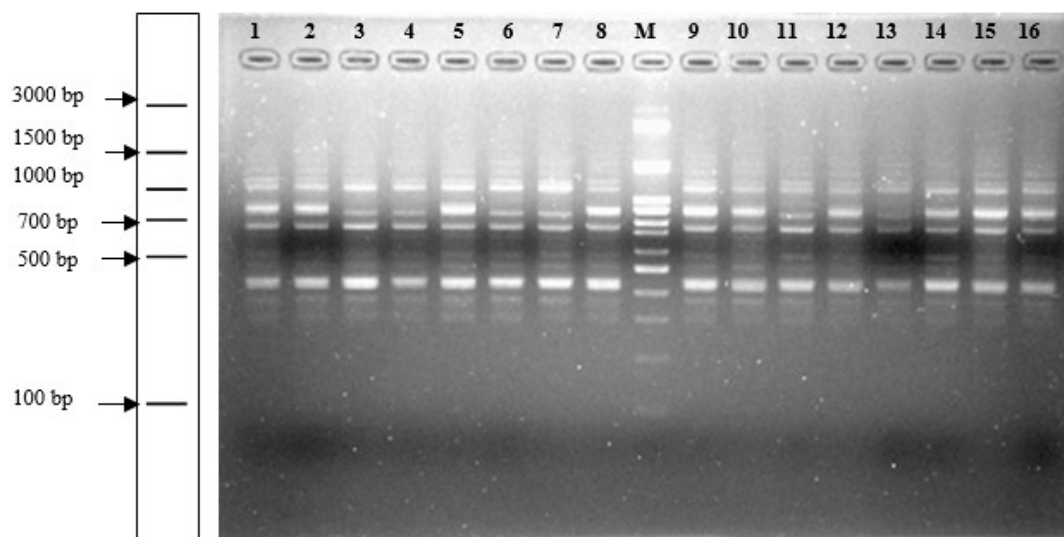
Chú thích: (.) vị trí nucleotide tương đồng

Khi dựa trên trình tự DNA vùng *atpF-atpH* cho thấy có sự khác biệt giữa năm giống vú sữa Lò Rèn, vú sữa bơ hồng, vú sữa bơ tím, vú sữa tím và vú sữa Mica. Điều này cũng cho thấy đặc điểm hình thái có thể tương tự nhau nhưng khi xét về di truyền phân tử thì có sự khác nhau. Kết quả này chứng tỏ có thể sử dụng vùng gen *atpF-atpH* để đánh giá mối quan hệ di truyền và xác định một số cá thể của các giống vú sữa.

Qua Bảng 2.31 cho thấy vú sữa Lò Rèn Viên cây ăn quả có các vị trí sai khác so với cả 3 giống vú sữa thu được ở Vĩnh Long là vú sữa Lò Rèn – S8 (tại nucleotide 468), vú sữa bơ tím – S10 (tại nucleotide 289) và vú sữa tím – S11 (tại nucleotide 303, 309, 326, 430); khác với vú sữa Lò Rèn – S12 ở Cần Thơ ở 2 vị trí (tại nucleotide 113 và 309); khác với vú sữa Mica – S18 tại một vị trí (tại nucleotide 303). Đối với vú sữa bơ hồng ở Cái Bè – S6 có nhiều vị trí sai khác nhất bao gồm năm vị trí sai khác (tại nucleotide 1, 113, 25, 260, 462). Giống vú sữa bơ hồng (S6 - Cái Bè, Tiền Giang) và vú sữa tím (S11 - Vĩnh Long) có nhiều vị trí sai khác về trình tự nucleotide nên có thể phân biệt được các cá thể này trong các cá thể thuộc nhóm giống vú sữa bơ hồng và vú sữa tím. Còn các cá thể vú sữa Mica (S18 - Bến Tre), vú sữa Lò Rèn (S12 -Cần Thơ, Vĩnh Long) và vú sữa bơ tím (S10 - Vĩnh Long) có một đến hai vị trí nucleotide thay đổi có thể do đột biến.

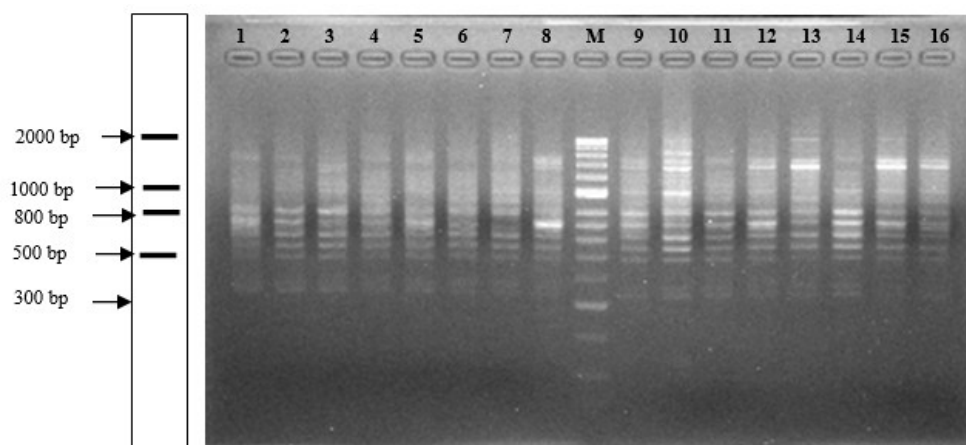
9.2. Kết quả phân tích sự đa hình chỉ thị ISSR

Sau khi điện di sản phẩm PCR mỗi ISSRK1 và mỗi ISSRK2 đều cho kết quả băng sáng, rõ, các băng gel đều xuất hiện băng đơn hình và đa hình (Hình 2.37 và Hình 2.38), cho thấy sự đa dạng di truyền giữa các giống và đủ điều kiện xây dựng sơ đồ phả hệ.



Hình 2. 37. Kết quả điện di với sản phẩm PCR mỗi ISSRK1

Giống: 1. VS. S1, 2. S2, 3. S3, 4. S4, 5. S5, 6. S7, 7. S9, 8. S10, 9. S8, 10. S11, 11. S13, 12.S12, 13. S14, 14. S15, 15. S17; 16. S16; M. Thang chuẩn 100bp



Hình 2.38. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi ISSRK2

Giếng: 1. VS. S1, 2. S2, 3. S3, 4. S4, 5. S5, 6. S7, 7. S9, 8. S10, 9. S8, 10. S11, 11. S13, 12. S12, 13. S14, 14. S15, 15. S17; 16. S16; M. Thang chuẩn 100bp

Qua phân tích đã ghi nhận được tổng cộng có 24 băng được ghi nhận với kích thước các đoạn phân tử biến động trong khoảng 270-1600 bp (Bảng 2.32).

Bảng 2.32. Môi ISSRK1 và môi ISSRK2 và kết quả khuếch đại

Môi	Số băng	Số băng đa hình	Tỉ lệ băng đa hình (%)	Kích thước (bp)
ISSRK1	12	4	33,33	300-1600
ISSRK2	12	5	41,66	270-1500
Tổng	24	9	37,50	

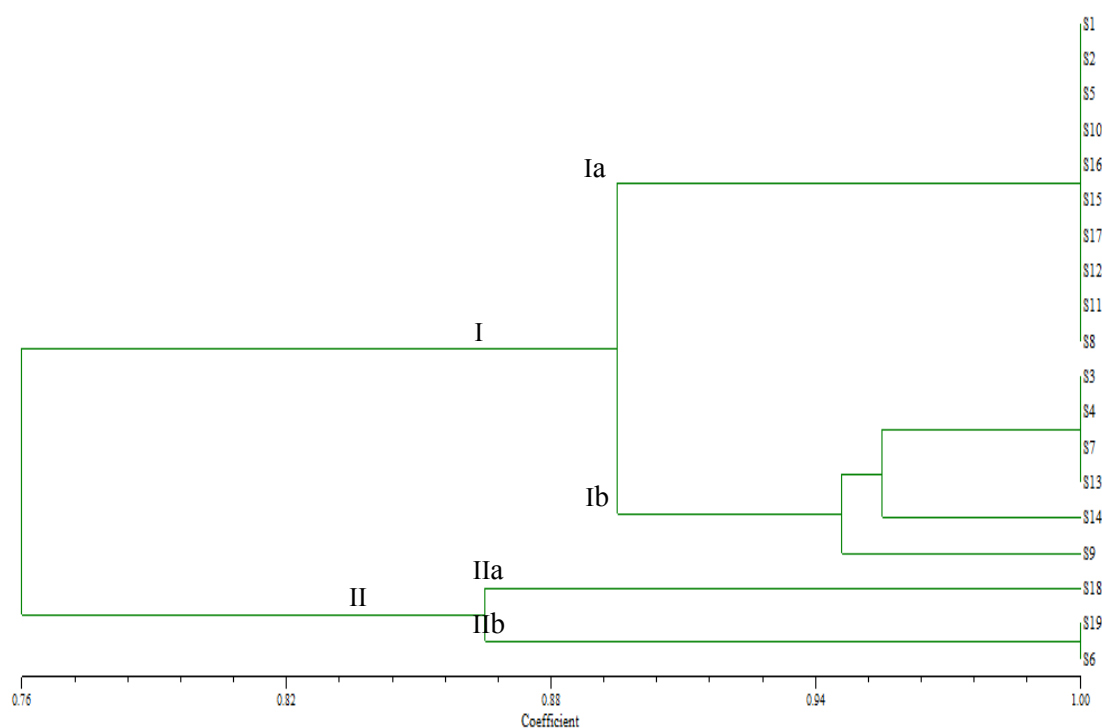
Môi ISSRK1 trên hoa lan có tỉ lệ băng đa hình là 100% (Thauja *et al.*, 2018) còn trong nghiên cứu này tỉ lệ băng đa hình thấp hơn 33,33%.

Khi xem xét các băng điện di môi ISSRK1 và ISSRK2 cho thấy ở vị trí có kích thước 300 bp và 370 bp không xuất hiện băng ở ba mẫu vú sữa bơ hồng (Bến Tre), vú sữa Mica (Bến Tre) và vú sữa cà na (Cần Thơ), khi các mẫu vú sữa còn lại đều xuất hiện băng. Như vậy, tại kích thước băng ở vị trí trên có thể phân biệt được nhóm các cá thể gồm vú sữa bơ hồng (Bến Tre), vú sữa Mica (Bến Tre) và vú sữa cà na (Cần Thơ). Ở kích thước băng 680 bp của môi ISSRK2 chỉ có một mẫu vú sữa bơ hồng (Cần Thơ) không xuất hiện băng nên có thể nhận biết được riêng cá thể này trong tất cả các mẫu.

Tương tự, mỗi ISSRK2 ở vị trí băng có kích thước 710 bp không xuất hiện băng ở hai mẫu gồm vú sữa bơ hồng (Cái Bè) và vú sữa bơ hồng (Bến Tre) nên có thể nhận diện được nhóm hai cá thể này trong các mẫu được nghiên cứu.

Sự giống nhau về mặt di truyền của các giống vú sữa được ghi nhận dựa trên sự đa hình về kiểu gen được khuếch đại bởi hai môi và có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,68 – 1,00.

Vì các mẫu vú sữa được nghiên cứu dưới loài nên kết quả cây phát sinh chủng loài cho thấy cả sáu giống vú sữa có mối quan hệ di truyền rất gần. Dựa trên sơ đồ hình cây (Hình 2.39) biểu thị đa hình DNA giữa sáu giống vú sữa nghiên cứu, nhận thấy các giống vú sữa khảo sát được chia thành hai nhóm lớn ở độ tương đồng 0,76. Nhóm thứ nhất chỉ có ba giống vú sữa bơ hồng (Cái Bè, Tiền Giang), vú sữa Mica (Bến Tre) và vú sữa cà na (Cần Thơ), còn nhóm thứ hai là các giống vú sữa Lò Rèn (Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long, Cần Thơ), vú sữa bơ hồng (trại giống Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long, Cần Thơ).



Hình 2.39. Sơ đồ phân nhóm của các mẫu vú sữa

Nhóm thứ nhất chia thành hai phân nhóm bậc I ở độ tương đồng 0,89. Phân nhóm Ia có bốn giống vú sữa Lò Rèn (Viện CAQMN, Vĩnh Long, Bến Tre, Cần Thơ và Tiền Giang), vú

sữa bơ hồng (Bến Tre), vú sữa bơ tím (Vĩnh Long) và vú sữa tím (Cần Thơ và Vĩnh Long) với hệ số tương đồng là 1,00. Phân nhóm Ib, ở hệ số tương đồng 0,95 chia làm hai phân nhánh, nhánh 1 hệ số tương đồng gần nhất là 1,00 của hai giống vú sữa bơ hồng (Cần Thơ và Tiền Giang) và vú sữa bơ tím (trại giống Tiền Giang và Cái Bè) hệ số tương đồng 0,96 là giống vú sữa bơ tím (Cần Thơ); nhánh 2 có một giống vú sữa là vú sữa bơ hồng Vĩnh Long.

Nhóm thứ hai, ở độ tương đồng 0,87 chia làm hai phân nhóm IIa và IIb. Phân nhóm IIa là giống vú sữa mica, còn phân nhóm IIb là hai giống vú sữa bơ hồng (Cái Bè, Tiền Giang) và vú sữa cà na (Cần Thơ).

10. Cây xoài cát hòa lộc

Các giống xoài được thu ở các tỉnh Tiền Giang (huyện Cái Bè và Viện Cây ăn quả miền Nam), Bến Tre, Vĩnh Long, Hậu Giang, Sóc Trăng, Cần Thơ (Cờ Đỏ, Ninh Kiều và Bình Thủy) và An Giang. Mẫu cây đầu dòng xoài cát Hòa Lộc được cung cấp từ Viện Cây ăn quả miền Nam (Bảng 2.33).

Bảng 2.33. Danh sách các giống xoài được dùng trong thí nghiệm

TÊN MẪU	TỌA ĐỘ		ĐỊA ĐIỂM THU	KÝ HIỆU
	KINH ĐỘ	VĨ ĐỘ		
XOÀI CÁT HÒA LỘC	10°23'51.2"N	106°16'47.1"E	Viện Cây ăn quả miền Nam	X.HOALOC- VCAQ
	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.HOALOC-TG
	10°01'28.8"N	105°45'49.3"E	An Khánh - Cần Thơ	X.HOALOC-CT
	10°16'11.7"N	106°04'09.1"E	Bến Tre	X.HOALOC-BT
	10°24'33.4"N	104°59'35.0"E	Tri Tôn - An Giang	X.HOALOC-AG
XOÀI BUỔI	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.BUOI-TG
	10°06'34.7"N	105°27'34.2"E	Cờ Đỏ - Cần Thơ	X.BUOI-CD
	10°00'39.3"N	105°46'00.6"E	Ninh Kiều - Cần Thơ	X.BUOI-NK
	9°36'57.5"N	105°47'15.9"E	Sóc Trăng	X.BUOI-ST

	10°24'33.4"N	104°59'35.0"E	Tri Tôn - An Giang	X.BUOI-AG
	9°56'34.7"N	105°46'09.6"E	Hậu Giang	X.BUOI-HG
	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.DAILOANDO-TG
XOÀI	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.DAILOAN-TG
ĐÀI LOAN	10°06'34.7"N	105°27'34.2"E	Cờ Đỏ - Cần Thơ	X.DAILOAN-CT
	10°24'33.4"N	104°59'35.0"E	An Giang	X.DAILOAN-AG
XOÀI	10°24'33.4"N	104°59'35.0"E	An Giang	X.THANHCA-AG
THANH CA	9°56'34.7"N	105°46'09.6"E	Hậu Giang	X.THANHCA-HG
	10°06'34.7"N	105°27'34.2"E	Cờ Đỏ - Cần Thơ	X.UC-CT
XOÀI ÚC	10°02'33.1"N	105°49'00.7"E	Vĩnh Long	X.UC-VL
XOÀI	10°00'39.3"N	105°46'00.6"E	Ninh Kiều - Cần Thơ	X.TUQUY-CT
TÚ QUÝ	9°56'34.7"N	105°46'09.6"E	Hậu Giang	X.TUQUY-HG
XOÀI	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.CATCHU-TG
CÁT CHU				
XOÀI CHÂU	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.CHAU-TG
XOÀI ĐÁ	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.DA-TG
XOÀI ĐU ĐỦ	10°24'33.4"N	104°59'35.0"E	An Giang	X.DUDU-AG
XOÀI GHÉP	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.GHEP-TG
XOÀI HÔI	10°03'45.8"N	105°44'00.2"E	Bình Thủy - Cần Thơ	X.HOI-CT
XOÀI KEO	10°24'33.4"N	104°59'35.0"E	An Giang	X.KEO-AG
XOÀI	9°56'34.7"N	105°46'09.6"E	Hậu Giang	X.KIMSODEI-HG
KIMSODEI				

XOÀI LAI	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.LAI-TG
XOÀI NGOC VÂN	10°23'51.2"N	106°16'47.1"E	Viện Cây ăn quả miền Nam	NGOCVAN- VCAQ (X.NV)
XOÀI THÁI	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.THAI-TG
XOÀI THOM	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.THOM-TG
XOÀI Û	10°21'33.3"N	105°58'03.4"E	Tiền Giang	X.U-TG

10.1. Kết quả phân tích trình tự DNA mã vạch và SNPs

Kết quả cho thấy các giống xoài khác nhau ở 52 vị trí biến đổi đối với trình tự ITS (Bảng 2.34). Đặc biệt là ở giống Hòa Lộc, có thể nhận diện nhanh bởi sự khác biệt ở nucleotide vị trí 624 (Hòa Lộc là nu A, tất cả trình tự còn lại là nu G, riêng trình tự X.UC và X.CHAU-TG, X.NGOCVAN-VCAQMN là C. Ngoài ra, tại vị trí 559, 589, 633 (tương ứng AAC, tương ứng) khác với vị trí nucleotide Hòa Lộc (GGG, tương ứng) khi so sánh trình tự HOALOC với các trình tự của X.DUDU-AG, X.UC, X.CHAU-TG, X.NV-VCAQMN, X.CHAU-TG.

Bảng 2.34. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống xoài cát Hòa Lộc với các giống xoài khác ở vùng ITS

Mẫu	Vị trí																			
	526	550	557	558	559	562	566	568	589	598	600	601	603	604	610	618	619	675	678	681
1	C	C	G	C	G	A	G	T	G	T	G	T	C	G	G	G	G	A	T	G
2	.	T
3
4	.	T	T	.	.	G
5	G	C	C	.	A	G	C	.	.	.	C	.	.	C	.	.
6	G
7
8	G	.	C	G	C	C	C	.	A	G	C	.	G	C	C	C	.	C	.	A
9
10	A	.	.	.	T	.	.	G
11	T	.	.	G
12	.	T
13
14

15	G	T
16	A	G	C	.	G	G	.
17
18
19	A	.	.	.

Ghi chú: Dấu chấm chỉ nucleotide tương đồng với nucleotide của mẫu đầu tiên được so sánh (CONSENSUS-HOALOC).

1: X.HOALOC, 2: X.BUOI, 3: X.DAILOAN, 4: X.THANHCA, 5: X.UC, 6: X.TUQUY, 7: X.CATCHU-TG, 8: X.CHAU-TG, 9: X.DA-TG, 10: X.DUDU-AG, 11: X.GHEP-TG, 12: X.HOI-CT, 13: X.KEO-AG, 14: X.KIMSODEI-HG, 15: X.LAI-TG, 16: X.NGOCVAN-VCAQ, 17: X.THAI-TG, 18: X.THOM-TG, 19: X.U-TG

Qua kết quả phân tích vùng trình tự matK xuất hiện đa dạng vị trí biến đổi xảy ra ở hầu hết các vị trí ở 16 trình tự, trong đó có 27 vị trí có thể nhận diện xoài cát Hòa Lộc với các mẫu còn lại. Tại vị trí nucleotide 54, 55, 58, 59, 60, 65, 247, 250, 251, 280, 302, 305, 308, 500, 816, 817, 818, 820 sự sai khác về nucleotide giữa X.HOALOC với 15 trình tự còn lại thể hiện rõ. Riêng vị trí nu 55, X.BUOI có nucleotide giống với X.HOALOC khi kiểm tra peak thì vị trí của các mẫu X.Bưởi rất tốt. Ngoài ra, tại vị trí nucleotide 291, 292, 293, 482, 483, 484, 485, 486, 487 thì ở CONSENSUS-X.HOALOC có nucleotide những mẫu còn lại bị đột biến mất nu tại những vị trí này (Bảng 2.35).

Bảng 2.35. Bảng các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của giống xoài cát Hòa Lộc với các giống xoài khác ở vùng trình tự matK

MẪU	Vị trí nucleotide																										
	5	5	5	5	6	6	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	8	4	4	5	8	8	8	8
	4	5	8	9	0	5	4	5	5	8	9	9	9	0	0	0	8	8	8	4	8	8	0	1	1	1	2
							7	0	1	0	1	2	3	2	5	8	2	3	4	5	6	7	0	6	7	8	0
1	T	T	A	A	T	A	C	T	C	A	G	A	A	C	A	C	T	T	T	C	A	C	A	A	T	T	A
2	A	T	G	A	A	T	A	C	A	-	-	-	-	G	T	C	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
3	G	G	C	G	G	C	A	S	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	C	T	C	C	G
4	G	G	C	G	C	-	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
5	G	G	C	G	C	-	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
6	G	A	C	C	C	-	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
7	G	A	C	G	C	-	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
8	-	-	C	-	-	-	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
9	-	G	-	G	G	-	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
10	S	A	C	S	C	C	A	C	A	-	-	-	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	T	C	C	G
11	A	A	C	G	A	G	G	A	A	T	-	-	-	T	T	T	-	-	-	-	-	-	C	T	A	-	T

	5	5	5	5	6	6	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	8	4	4	5	8	8	8	8
	4	5	8	9	0	5	4	5	5	8	9	9	9	0	0	0	8	8	8	4	8	8	0	1	1	1	2
							7	0	1	0	1	2	3	2	5	8	2	3	4	5	6	7	0	6	7	8	0
12	A	A	T	G	A	G	G	A	A	T	-	-	-	T	T	T	-	-	-	-	-	-	C	T	A	-	T
13	A	A	T	G	A	G	G	A	A	T	-	-	-	T	T	T	-	-	-	-	-	-	C	T	A	-	T
14	A	A	T	G	A	G	G	A	A	T	-	-	-	T	T	T	-	-	-	-	-	-	C	T	A	A	T
15	A	A	T	G	A	G	G	A	A	T	-	-	-	T	T	T	-	-	-	-	-	-	C	T	A	-	T
16	A	A	T	G	A	G	G	A	A	T	-	-	-	T	T	T	-	-	-	-	-	-	C	T	A	-	T

Ghi chú: 1: X.HOALOC, 2: X.BUOI, 3: X.THANHCA, 4: X.DA-TG, 5: X.DUDU-AG, 6: X.HOI-CT, 7: X.THOM-TG, 8: X.KIMSODEI-HG, 9: X.U-TG, 10: X.TUQUY, 11: X.THAI-TG, 12: X.CATCHU-TG, 13: X.CHAU-TG, 14: X.GHEP-TG, 15: X.LAI-TG, 16: X.NGOCVAN-VCAQMN.

Kết quả của nhóm nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Hữu Thuần Anh *et al* (2013) với đề tài Khảo sát một số vùng trình tự phân tử trong việc nhận diện các giống xoài ở Việt Nam. Khi phân tách các giống xoài thu được ở các quốc gia khác nhau Malaysia, Ấn độ, Indonesia, Thái Lan, Đài Loan thành 3 nhóm khác nhau dựa trên vùng trình tự ITS Vùng trình tự ITS đã giúp phân định và tách các mẫu xoài Việt Nam thành các nhóm riêng. Qua đó, vùng trình tự ITS có khả năng phân định các giống xoài cao, thể hiện sự đa dạng cao trong đặc điểm trình tự DNA và có thể áp dụng hiệu quả trong nhận diện phân tử các giống xoài Việt Nam (Hidayat *et al.*, 2011).

Đối với vùng trình tự matK, qua việc phân tích thì kết quả cho thấy sự nhận diện sử dụng mỗi matK thì cho kết quả khả quan hơn mỗi ITS, tuy nhiên có một số mẫu không thu được sản phẩm khuếch đại như ý và mỗi matK được khuyến cáo là vùng trình tự đa dạng cao, khó khuếch đại ở một số nhóm thực vật trước đây (Kress *et al*, 2009).

Trình tự DNA ở vùng gen *rbcL* của các mẫu xoài trong nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt về vị trí nucleotide giữa các mẫu, các trình tự giống nhau hoàn toàn. Trên thực tế, nghiên cứu của Hollingworth *et al.* (2009) cũng đã cho thấy trình tự *rbcL* tuy được sử dụng phổ biến là mã vạch điển hình ở thực vật

nhưng mức độ phân biệt lại không cao, thường được sử dụng kết hợp với đoạn trình tự khác (ví dụ *matK*) như một cặp mã vạch cốt lõi dùng để phân biệt nhiều loài thực vật (CBOL Plants Working Group, 2009). Mức độ tương đồng cao trên 99% của trình tự *rbcL* ở các loài trong nghiên cứu cho thấy đoạn trình tự này bảo tồn cao trên xoài.

Sau khi so sánh trình tự tương đồng, kết quả cho thấy giữa các giống xoài có 2 vị trí khác nhau (Bảng 2.36). Riêng ở giống xoài cát Hòa Lộc, có thể nhận diện sự khác biệt ở nu vị trí thứ 53 và 72. Tại vị trí nu 53, X.HOALOC, X-DL, X-THOM đều xuất hiện nu G, riêng các trình tự X-CATCHU, X-NV-VCAQ, X-THANHCA, X-UC không xuất hiện nu, sau khi kiểm tra lại peak của X-DL và X-THOM thì tại vị trí xuất hiện nu G, peak bị nhiễu ở cả 2 trình tự. Tại vị trí nu 72, tất cả các trình tự là nu A, riêng X-THANHCA xuất hiện nu G.

Bảng 2.36. Các vị trí khác biệt trên trình tự nucleotide của các giống xoài cát Hòa Lộc với các giống khác trên trình tự rpoC1

Mẫu	Vị trí nucleotide	
	53	72
X-HOALOC	G	A
X-CATCHU	-	.
X-DL	G	.
X-NV-VCAQ	-	.
X-THANHCA	-	G
X-THOM	G	.
X-UC	-	.

Chú thích : (-): vị trí không xuất hiện nu; (.): vị trí nu tương đồng.

Có 5 vị trí khác biệt trong trình tự gen *atpF-atpH* tương ứng với các vị trí peak là 34, 35, 51, 784, 812. Trong đó, X-HOALOC có thể nhận diện được sự khác biệt với các giống khác ở 3 vị trí 40, 787 và 816. Tại vị trí 40, X-HOALOC xuất hiện nu A, ở các giống còn lại không biểu hiện nu, riêng trình tự xoài X-

NGOCVAN biểu hiện nu G. Ngoài ra, tại vị trí 787 và 816, trình tự X-HOALOC là nu A, các giống còn lại không biểu hiện nu (Bảng 2.37).

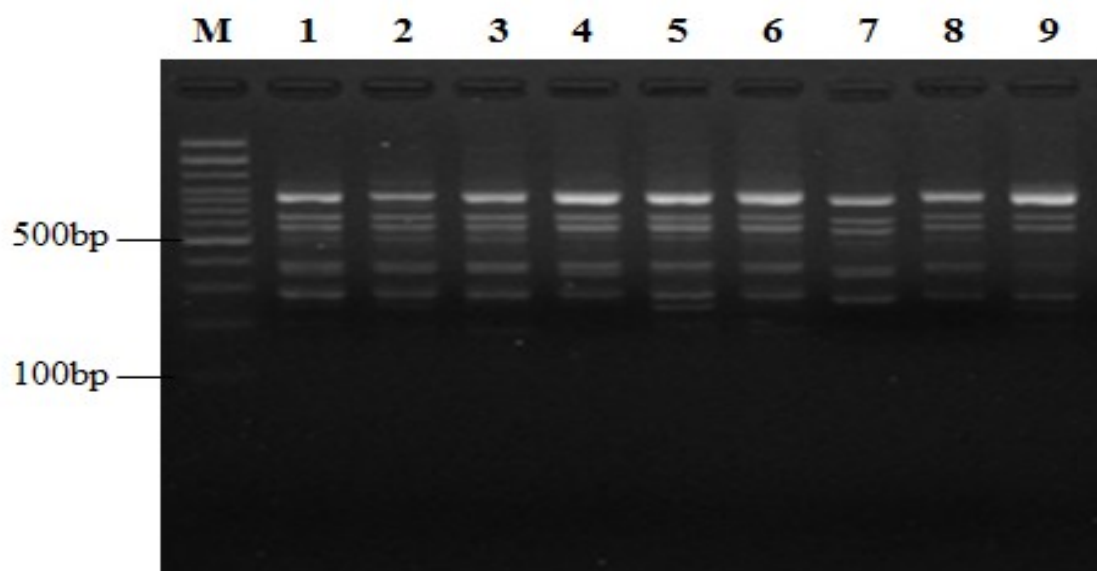
Bảng 2.37. Kết quả so sánh trình tự xoài cát hòa lộc với các giống xoài khác

MẪU	Vị trí nucleotide				
	40	41	57	787	816
X-HOALOC	A	G	-	A	A
X-CATCHU	-	.	-	-	-
X-DAILOAN	-	.	-	-	-
X-NGOCVAN	G	A	T	-	-
X-THANHCA	-	.	-	-	-
X-THOM	-	.	-	-	-
X-UC	-	.	-	-	-

Chú thích: (-): Vị trí không xuất hiện nu, (.): Vị trí nu tương đồng.

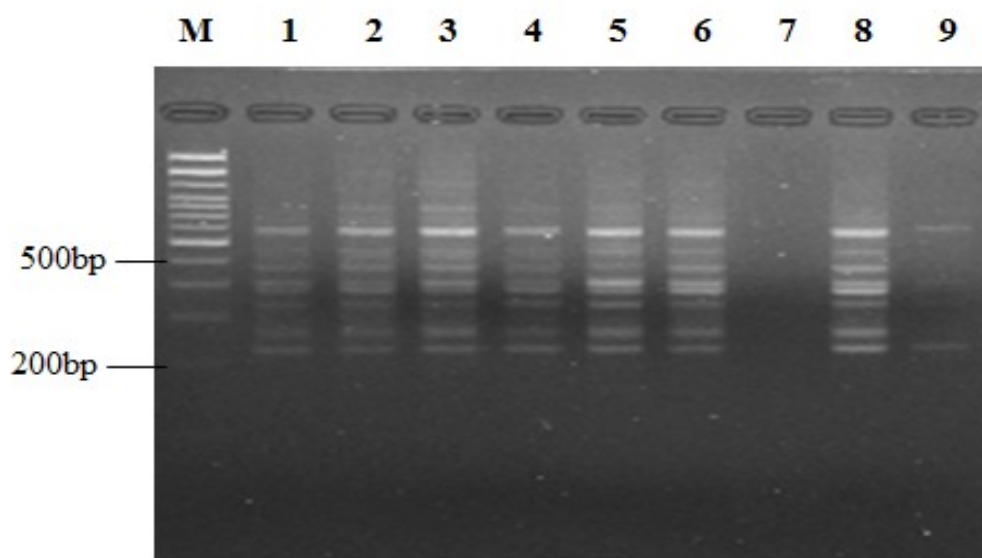
10.2. Kết quả phân tích đa dạng dấu phân tử ISSR

Kết quả điện di dấu phân tử ISSR của các giống xoài được thể hiện trong Hình 2.40, 2.41, 2.42, 2.43 và 2.44. Đối với chỉ thị phân tử ISSR, mục tiêu là xác định mối quan hệ di truyền, thông qua đó có thể nhận diện sự khác nhau giữa các giống xoài. Trong đó, đánh giá sự đa dạng di truyền là rất quan trọng nhằm lựa chọn các kiểu gen ưu tú để chọn lọc và lai tạo trong các chương trình cải tiến cây trồng. Nó cũng có thể hữu ích trong việc bảo vệ đa dạng sinh học của các giống cây trồng quan trọng về kinh tế nông nghiệp.



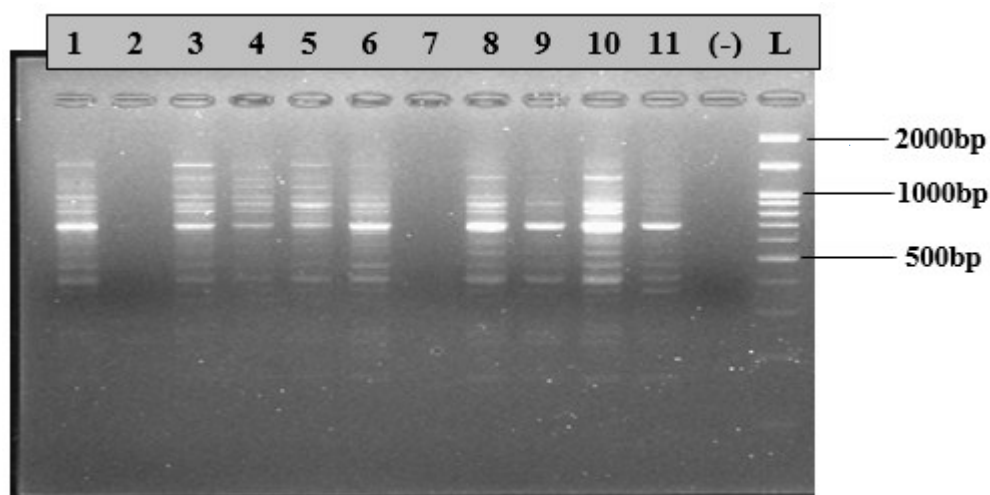
Hình 2.40. Kết quả điện di mẫu PCR với mồi ISSR K1

M.Thang chuẩn 100 bp, 1. Xoài Đài Loan (Tiền Giang), 2. Xoài Thơm (Tiền Giang), 3. Xoài Cát Chu (Tiền Giang), 4. Xoài Thanh Ca (Tiền Giang), 5. Xoài Úc (Cần Thơ), 6. Xoài cát Hòa Lộc (An Giang), 7. Xoài cát Hòa Lộc (Bến Tre), 8. Xoài cát Hòa Lộc (VCAQMN), 9. Xoài Ngọc Vân (VCAQ), (-) đối chứng âm



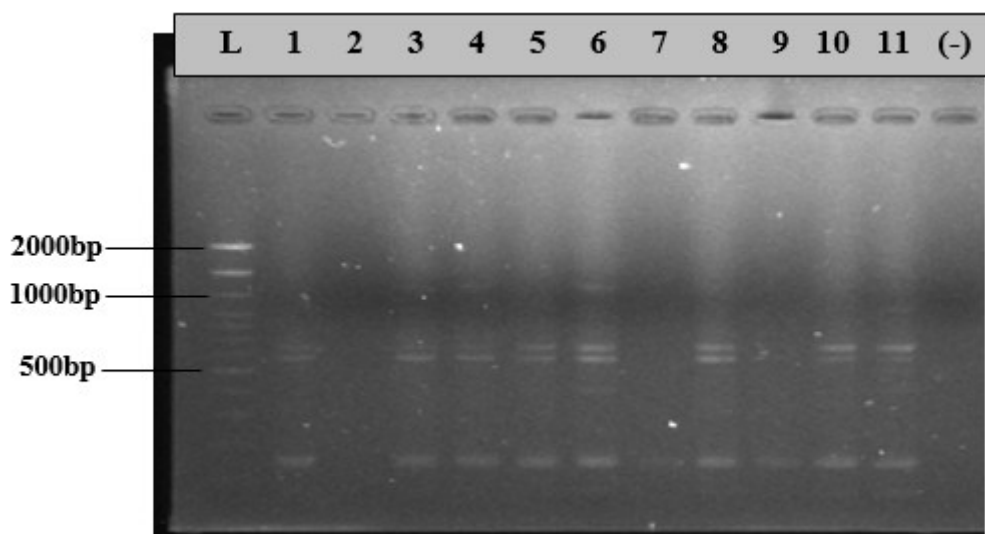
Hình 2.41. Kết quả điện di mẫu PCR với mồi ISSR K2

M.Thang chuẩn 100bp, 1. Xoài Đài Loan (Tiền Giang), 2. Xoài Thơm (Tiền Giang), 3. Xoài Cát Chu (Tiền Giang), 4. Xoài Thanh Ca (Tiền Giang), 5. Xoài Úc (Cần Thơ), 6. Xoài cát Hòa Lộc (An Giang), 7. Xoài cát Hòa Lộc (Bến Tre), 8. Xoài cát Hòa Lộc (VCAQMN), 9. Xoài Ngọc Vân (VCAQ), (-) đối chứng âm



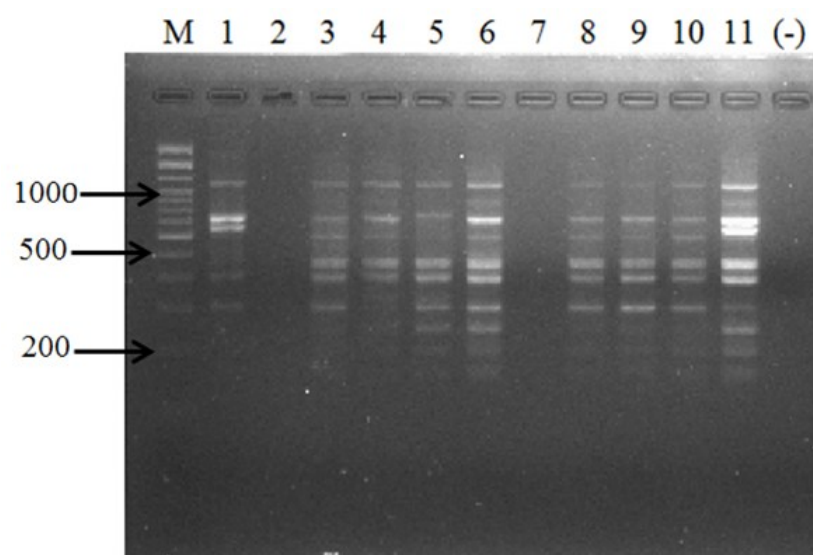
Hình 2.42. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR03

1. xoài Đài Loan xanh (TG); **2.** xoài cát Hòa Lộc (TG); **3.** xoài Thơm (TG); **4.** xoài cát Chu (TG); **5.** xoài Thanh ca (TG); **6.** xoài Úc (Cờ Đỏ-CT); **7.** xoài cát Hòa Lộc (Ninh Kiều-CT); **8.** xoài cát Hòa Lộc (AG); **9.** xoài cát Hòa Lộc (BT); **10.** xoài cát Hòa Lộc (VCAQMN); **11.** xoài Ngọc Vân (VCAQMN); **L.** Thang chuẩn 100bp, (-) đối chứng âm



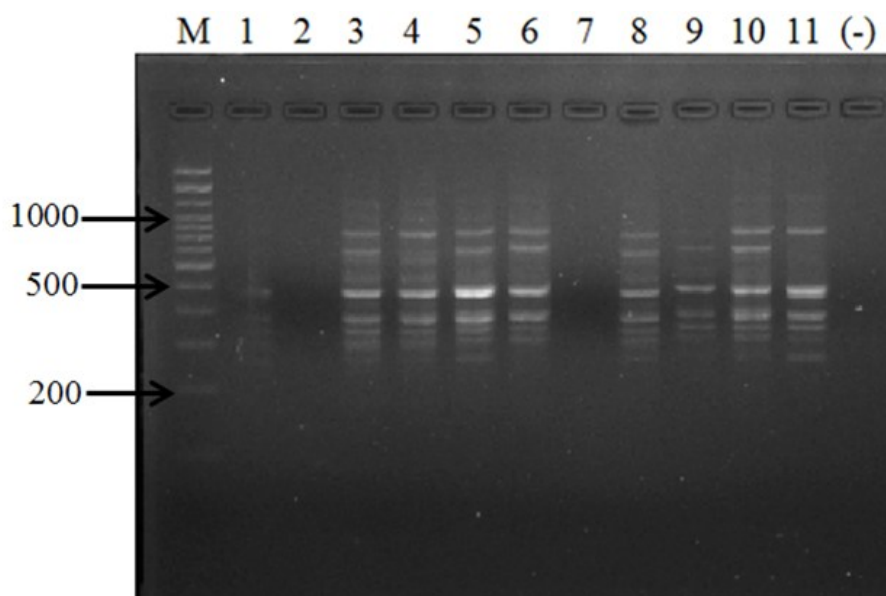
Hình 2.43. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ISSR31

L. Thang chuẩn 100bp; **1.** xoài Đài Loan xanh (TG); **2.** xoài cát Hòa Lộc (TG); **3.** xoài Thơm (TG); **4.** xoài cát Chu (TG); **5.** xoài Thanh ca (TG); **6.** xoài Úc (Cờ Đỏ-CT); **7.** xoài cát Hòa Lộc (Ninh Kiều-CT); **8.** xoài cát Hòa Lộc (AG); **9.** xoài cát Hòa Lộc (BT); **10.** xoài cát Hòa Lộc (VCAQMN); **11.** xoài Ngọc Vân (VCAQMN) , (-) đối chứng âm



Hình 2.44. Kết quả điện di với mồi ISSR K3

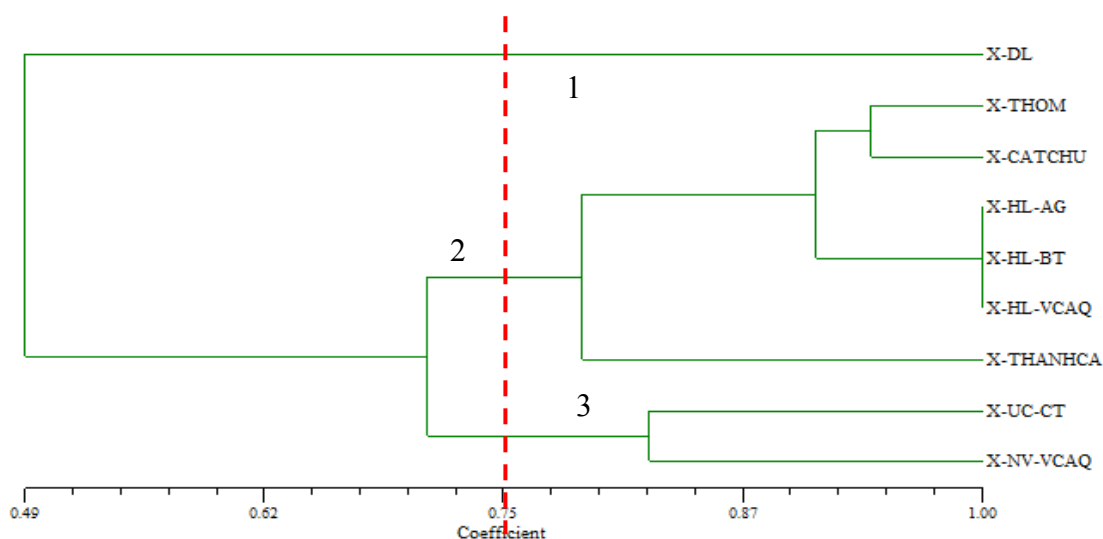
1. Xoài Đài Loan (Tiền Giang), 2. Cát Hòa Lộc (Tiền Giang), 3. Xoài Thơm (Tiền Giang), 4. Cát Chu (Tiền Giang), 5. Xoài Thanh Ca (Tiền Giang), 6. Xoài Úc (Cần Thơ), 7. Cát Hòa Lộc (Ninh Kiều), 8. Cát Hòa Lộc (An Giang), 9. Cát Hòa Lộc (Bến Tre), 10. Cát Hòa Lộc (VCAQMN), 11. Xoài Ngọc Vân (VCAQ), M. Thang chuẩn 100bp



Hình 2.45. Kết quả điện di với mồi ISSR K13

1. Xoài Đài Loan (Tiền Giang), 2. Cát Hòa Lộc (Tiền Giang), 3. Xoài Thơm (Tiền Giang), 4. Cát Chu (Tiền Giang), 5. Xoài Thanh Ca (Tiền Giang), 6. Xoài Úc (Cần Thơ), 7. Cát Hòa Lộc (Ninh Kiều), 8. Cát Hòa Lộc (An Giang), 9. Cát Hòa Lộc (Bến Tre), 10. Cát Hòa Lộc (VCAQMN), 11. Xoài Ngọc Vân (VCAQ), 12. Đối chứng âm, 13. Đối chứng dương, M. Thang chuẩn

Theo kết quả ở Hình 2.46 có thể chia thành 2 nhóm chính dựa vào hệ số tương đồng trung bình là 0,67. Nhóm I gồm 3 mẫu là X.UC, X.HAG, X.HVCAQ, trong đó hệ số tương đồng là 0,94 giữa 2 mẫu xoài X.HAG và X.HVCAQ, hai mẫu này có hệ số tương đồng là 0,78 với mẫu X.UC. Nhóm II gồm các mẫu còn lại; trong đó 2 mẫu X.DL và X.THOM có hệ số tương đồng tuyệt đối là 1,00 và 2 mẫu này có hệ số tương đồng là 0,93 so với mẫu X.THCA; xa nhất là 0,67 giữa mẫu xoài X.NV với các mẫu trong nhóm 2. Từ giản đồ phả hệ cho thấy, giống xoài cát Hòa Lộc-An Giang và VCAQ nằm trong cùng nhánh chứng tỏ 2 môi ISSR03 và ISSR31 đã phân biệt được 2 giống xoài Hòa lộc này với các giống xoài còn lại. Riêng giống xoài cát Hòa Lộc-Bến Tre không nằm trong cùng nhánh với 2 giống xoài Hòa Lộc trên.



Hình 2.46. Giản đồ mối tương quan di truyền của các giống xoài

Dựa vào dấu phân tử ISSR đã chia các giống xoài thành 3 nhóm chính. Tỷ lệ phần trăm đa hình cao 76, 47% xấp xỉ với tỉ lệ nghiên cứu trên xoài sử dụng 100 môi ISSR thu được tỉ lệ 213 băng đơn hình trên tổng số 335 băng thu được, chiếm tỉ lệ 63,58% (Damodaran *et al.*, 2012) qua đó thể hiện được sự đa dạng của các giống xoài về mặt di truyền.

Đa số giống xoài được biết ở Việt Nam là *M. indica* với nhiều thứ dưới loài (Phạm Hoàng Hộ, 1999). Trong nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử ISSR, giản đồ cho thấy xoài cát Hòa Lộc nằm chung nhánh với 3 giống xoài khác nên việc khẳng định xoài Việt Nam đều thuộc *M. indica* là chưa có cơ sở phân tử rõ ràng, cần có thêm nhiều nghiên cứu phân tử về nhóm cây này.

Có nhiều yếu tố tạo nên sự khác biệt trong quần thể như khả năng phát tán và ảnh hưởng của môi trường sống (Kerdelhué *et al.*, 2002); hoặc có thể do địa bàn lân cận giữa các địa phương nên hạt giống được người dân mang từ nơi này tới nơi khác để canh tác. Quan điểm này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Stankiewicz *et al.* (2001), khi nghiên cứu về mối liên hệ di truyền của các giống cây trồng trong canh tác nông nghiệp cho thấy con người là yếu tố quan trọng trong việc di chuyển giống cây trồng giữa các vùng địa lý.

Trong nghiên cứu của Pandit *et al.* (2007) đã sử dụng 33 môi ISSR để phân tích đa dạng di truyền trên 70 giống xoài ở Ấn Độ, kết quả cho số băng đa hình là 408 băng, chiếm tỉ lệ 97,14%. Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn chưa phân biệt được các giống xoài giữa miền Bắc và miền Nam Ấn Độ. Điều này cho thấy sự đa hình trong trình tự lặp trên các giống xoài. Một số kết quả nghiên cứu về đa dạng di truyền sử dụng dấu phân tử ISSR trên các giống cây ăn trái khác dựa vào dấu phân tử ISSR cũng cho kết quả khả quan với độ tương đồng cao. Trong nghiên cứu trên 12 mẫu Thanh trà (Lê Y Phụng *et al.*, 2018) đã chỉ ra mức độ đa hình của quần thể có sự đa dạng cao và mức độ tương đồng dao động từ 0,58- 0,86. Trong nghiên cứu của Hồ Viết Thế *et al.* (2018) với mục tiêu phân tích đa dạng ở Chanh dây đã kết luận chỉ thị ISSR và RAPD đều cho mức độ đa hình cao và kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy có sự biến động lớn trong thông tin di truyền giữa các mẫu phân tích và không tuân theo quy luật về vị trí thu mẫu.

CHƯƠNG III. CƠ SỞ DỮ LIỆU DNA MÃ VẠCH

3.1 Giới thiệu

Cơ sở dữ liệu được viết dưới dạng trang web trong server của trường Đại học Cần Thơ bằng ứng dụng Joomla. Cơ sở dữ liệu được viết bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh. Cấu trúc của cơ sở dữ liệu như sau :

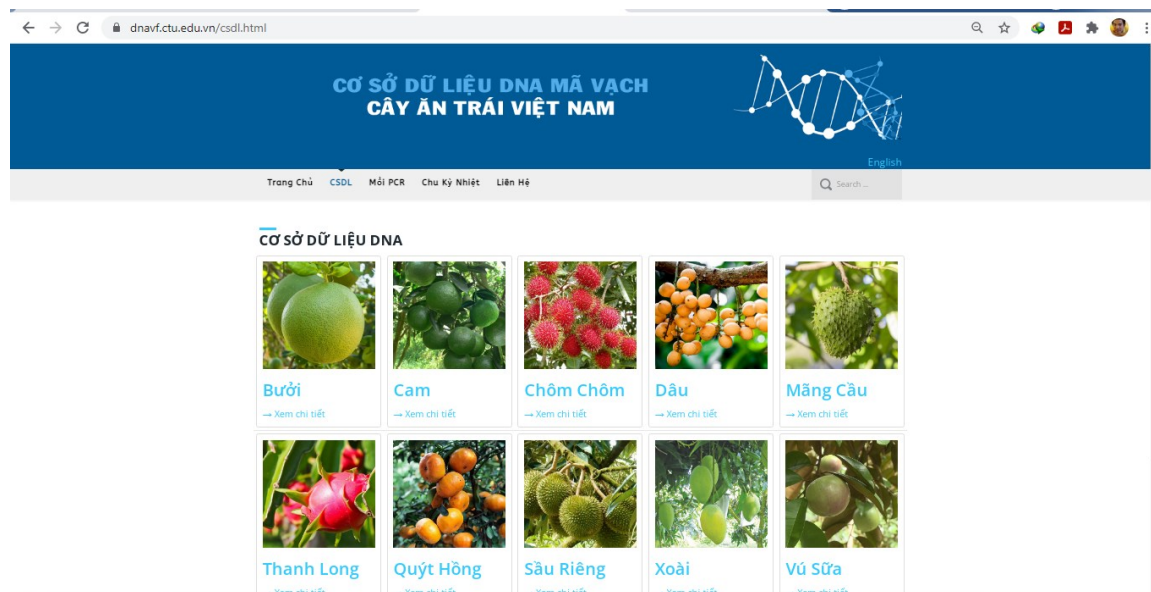
Trang chủ bao gồm phần giới thiệu chung về cơ sở dữ liệu.



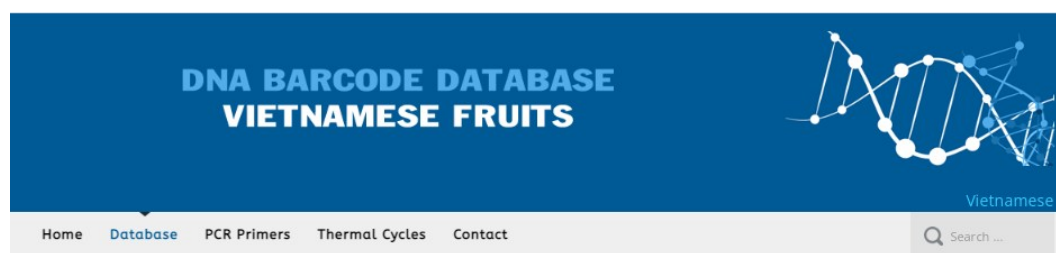
3.2 Cơ sở dữ liệu

Phần cơ sở dữ liệu gồm trình tự DNA mã vạch của 6 vùng trình tự thuộc 10 cây ăn trái.

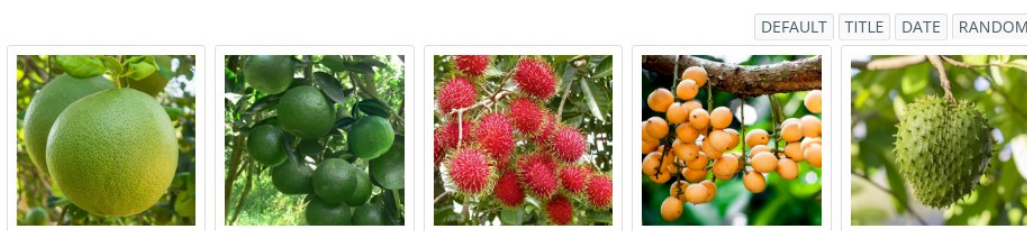
Trang tiếng Việt: <https://dnarf.ctu.edu.vn>



Trang tiếng Anh: <https://dnnavf.ctu.edu.vn/en>



DNA Database



Danh sách các mẫu DNA mã vạch và chu trình nhiệt cũng được đưa vào cơ sở dữ liệu.

Tên mẫu	Trình tự (5'-3')
ITS	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
matK	matK-390F: CGATCTATTCATTCAATATTTC
	matK-1326R: TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
atpF-atpH	atpF: ACTCGCACACACTCCCTTTCC
	atpH: GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT
rbcL	rbcLaF: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
	rbcLaR: GTAAAATCAAGTCCACCRCG
psbK-psbI	psbKF: TTAGCCTTTGTTTGGCAAG
	psbIR: AGAGTTTGAGAGTAAGCAT
trnH-psbA	psbA3F: GTTATGCATGAACGTAATGCTC
	trnHF05R: CGCGCATGGTGGATTACAAATCC
ycf1b	ycf1bF: TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT
	ycf1bR: ATACATGTCAAGTGATGGAAAA
rpoC1	rpoC1_2F: GGCAAAGAGGGAAGATTTTCG
	rpoC1_4R: CCATAAGCATATCTTGAGTTGG

Trình tự khuếch đại	Nhiệt độ, thời gian biến tính ban đầu	30 chu kỳ			Nhiệt độ, thời gian kéo dài cuối cùng	Trữ mẫu
		Biến tính	Bắt cặp	Kéo dài		
ITS (35 Chu kỳ)	95oC	95oC	55oC	72oC	72oC	10oC 30 phút
	5 phút	30 giây	30 giây	1 phút	7 phút	
matK	94oC	94oC	50oC	72oC	72oC	
	1 phút	30 giây	40 giây	40 giây	5 phút	
rpoC1	95oC	95oC	52oC	72oC	72oC	
	2 phút	30 giây	30 giây	1 phút	5 phút	
atpF-atpH	94oC	94oC	51oC	72oC	72oC	
psbK-psbI	4 phút	30 giây	40 giây	40 giây	5 phút	
rbcL	94oC	94oC	55oC	72oC	72oC	
trnH-psbA (35 chu kỳ)	4 phút	30 giây	30 giây	1 phút	10 phút	
ycf1b	94oC	94oC	52oC	72oC	72oC	
	4 phút	30 giây	40 giây	1 phút	10 phút	

Để sử dụng cơ sở dữ liệu, người dùng truy cập vào trang web: <http://www.dnavf.ctu.edu.vn>. Cơ sở dữ liệu có phiên bản tiếng Việt và tiếng Anh. Các tính năng của cơ sở dữ liệu bao gồm: tải trình tự về dưới định dạng fasta và hiển thị vùng trình tự đặc trưng của mỗi trình tự.

PHẦN III. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Đã xác định được cây đầu dòng và đặc điểm nông học của 10 loại cây ăn trái trong nghiên cứu ở các tỉnh thuộc khu vực Nam Bộ.

Các trình tự DNA mã vạch của 10 loại cây ăn trái đặc trưng của Việt Nam vùng Nam Bộ đã được giải và phân tích. Cụ thể:

- Bưởi Da Xanh: Dựa trên mức độ sai khác về nucleotide, ITS là trình tự tiềm năng để nhận diện giống bưởi Da Xanh. với độ tương đồng dao động trong khoảng 0,66-0,95 với khoảng dao động là 0,07 được chia thành 3 nhóm chính: nhóm I với Nhóm 2 có hệ số tương đồng là 0,76, nhóm I, II với nhóm 3 có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,66.

- Cam Mật: gen ycf1b cho thấy có 5 SNPs có thể phân biệt giữa các giống cam Mật với các giống khác. Giản đồ phả hệ dựa trên dấu ISSR cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa các mẫu cam Mật không hạt và các mẫu cam khác trong nghiên cứu.

- Chôm chôm: Gene matK có thể được sử dụng làm DNA mã vạch để nhận diện giống chôm chôm rừng ruột vàng, chôm chôm Java và giống chôm chôm lai Tiến Cường của Việt Nam. Phương pháp phân tích đa hình dựa trên môi ISSR này đã chia tám giống – 14 mẫu chôm chôm thành bốn nhóm lớn. Với hệ số tương đồng giữa các giống dao động từ 72 đến 100%

- Dâu hạ châu: Trình tự atpF-H thấy được trình tự của dâu Hạ Châu khác biệt hoàn toàn với các mẫu dâu đối chứng ở 11 vị trí nucleotide. Dựa trên giản đồ, cho thấy sự đa dạng di truyền giữa 12 mẫu dâu thể hiện qua hệ số tương đồng là 74%. Các mẫu dâu Hạ Châu có hệ số tương đồng với nhau khá cao nằm trong khoảng từ 0,875 - 1 và nằm chung ở 1 nhóm trên giản đồ.

- Mãng cầu xiêm: Kết quả phân tích cho thấy gene rpoC1, kết quả nghiên cứu đã đưa ra 7 vị trí sai khác nucleotide. Trong đó có 2 vị trí đặc trưng cho loài bình bát, 4 vị trí có khả năng nhận diện loài mãng cầu. Kết quả trên cho thấy ISSR phù hợp để đánh giá đặc tính của ba loài Annona và có sự khác biệt đáng kể về đa dạng di truyền giữa các loài

- Quýt hồng: Kết quả phân tích trình tự vùng ITS ở cho thấy có 14 vị trí khác nhau giữa quýt hồng và các giống quýt khác. Từ kết quả xây dựng giản đồ phả hệ ISSR cho thấy, mức độ tương đồng của các mẫu biến thiên từ 0,49 đến 1,00.
- Sầu riêng Ri-6: Phát hiện 6 SNPs giữa các trình tự của các mẫu sầu riêng. Trong đó có một SNP đặc trưng cho giống sầu riêng Ri-6 là vị trí 444, ở sầu riêng Ri-6 là G trong khi các giống còn lại là C. Kết quả phân tích dựa vào dấu phân tử ISSR đã phân chia 20 giống sầu riêng thu được ở bốn tỉnh của vùng ĐBSCL chia thành các 5 nhóm có hệ số tương đồng dao động khá xa trong khoảng 0,61 – 0,97.
- Thanh long ruột đỏ: Giống thanh long ruột đỏ Viện Cây ăn quả miền Nam được xác định bởi ba locus, *atpF-H* + *rbcL* + *matK*.
- Vú sữa lò rèn: Khi dựa trên trình tự DNA vùng *atpF-atpH* cho thấy có sự khác biệt giữa năm giống vú sữa Lò Rèn, vú sữa bơ hồng, vú sữa bơ tím, vú sữa tím và vú sữa Mica. Phân tích đa dạng di truyền bằng dấu ISSR cho thấy các giống vú sữa có độ tương đồng từ 0,68 đến 1,00 trong đó các giống vú sữa Lò Rèn được tách thành một nhánh riêng.
- Xoài cát Hòa Lộc: Qua kết quả phân tích vùng trình tự *matK* xuất hiện đa dạng vị trí biến đổi xảy ra ở hầu hết các vị trí ở 16 trình tự, trong đó có 27 vị trí có thể nhận diện xoài cát Hòa Lộc với các mẫu còn lại. Dựa trên dấu phân tử ISSR, các mẫu xoài được chia thành 2 nhóm với hệ số tương đồng trung bình là 0,67.
- Các trình tự đã được xây dựng thành cơ sở dữ liệu có thể sử dụng trong tra cứu và phát triển công cụ nhận dạng cây ăn trái.

2. Đề nghị

- Khai thác cơ sở dữ liệu để phát triển công cụ nhận diện cây ăn trái.
- Tối ưu phản ứng PCR phân lập các vùng trình tự chưa được giải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adewole¹, S.O. and Caxton-Martins, E.A., 2006. Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *African Journal of Biomedical Research*. 9: 173 – 187.
- Agostino, N., Tamburino, R., Cantarella, C., and Carluccio, V. D., Sannino, L., Cozzolino, S., Cardi, T., and Scotti, N., 2018. The Complete Plastome Sequences of Eleven *Capsicum* Genotypes: Insights into DNA Variation. *Genes*, 9(10): 503.
- Alvarez, I., Wendel, J. F and Ribosomal., (2003). ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol*; 29 :417–434.
- Amin, R., and Nabi, M. N., 2015. Evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of different fractions of methanolic extract of *Baccaurea ramiflora* (Lour.) fruits. *International Current Pharmaceutical Journal*. 4(6): 386-389.
- Arohak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E., Swamy, M. and Karihaloo, J.L., 2003. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. *Euphytica*, 130(3): 397- 404.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Miss. Bot. Gard*. 82: 247–277.
- Báo cáo xuất nhập khẩu Việt Nam, 2017. Cục xuất nhập khẩu. Báo công thương. Nhà xuất bản bộ Công thương, 202 trang.
- Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R. and Federici, C. T, 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8): 1519-1531.

- Barrett, H.C. and Rhodes, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst Bot*, 1: 105–136.
- Bausher, M.G., Singh, N.D., Lee, S.B., Jansen, R.K., Daniell, H. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC plant biology*, 6, 21.
- Bhandari, H.R., Bhanu, A.N., Srivastava, K, et al. 2017. Assessment of genetic diversity in crop plants - an overview. *Adv Plants Agric Res*. 7(3): 279-286.
- Bhowmick, N., P. Deb and S. Pradhan, 2013. Changes in physico-chemical attributes of Burmese Grape (*Baccaurea sapida* Muell. Arg.) during growth and development. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 4(2): 179-181.
- Bolson, M., Smidt, Ed.C., Brotto, M.L., Silva-Pereira, V. 2015. ITS and *trnH-psbA* as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLoS ONE*, 10(12): e0143049.
- Buerki, S., Forest, F., Acevedo-Rodríguez, P., Callmander, M.W., Nylander, J.A.A., Harrington, M., Sanmartín, I., Küpfer, P. and Alvarez, P., 2009. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (*Sapindaceae*). *Molec. Phylogen. Evol.* 51: 238–258.
- Buerki, S., Lowry, P.P., Alvarez, N., Razafimandimbison, S.G., Küpfer, P. and Callmander, M.W., 2010. Phylogeny and circumscription of *Sapindaceae* revisited: Molecular sequence data, morphology, and biogeography support recognition of a new family, *Xanthoceraceae*. *Pl. Ecol. Evol* 143 (2): 148–159.

- Bùi Thị Thu Giang và Nguyễn Thị Thanh Thủy. 2016. Đánh giá đa dạng di truyền một số nguồn gene Xoài ở Việt Nam bằng chỉ thị SCoT. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, (10): 3-8.
- Burgess, K.S., Fazekas, A.j., Kesanakurti, P.r., *et al.*, 2011. “Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL*+ *matK* DnA barcode”, *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4), pp.333-340.
- Capparelli, R., Viscardi M., Amoroso M.G. and 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.
- CBOL, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106.31: 12794-12797.
- Cisneros, A., & Tel-Zur, N., 2012. Evaluation of Interspecific-Interploid Hybrids (F1) and Back Crosses (BC1) in *Hylocereus* Species (Cactaceae). *Meiosis: Molecular mechanisms and cytogenetic diversity*, 367-388.
- Chen, C.-D., W.-H. Jian, Z.-K. Kun, Z.-X. Zhi, W.-F. Hua, 2018. Complete plastome sequence of *Hydnocarpus hainanensis* Merr (Achariaceae): an endemic ‘vulnerable’ tree in South China. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(2): 1042-1043.
- Daniell, H., K.J Wurdack, A. Kanagaraj, S.B Lee, C. Saski, R.K. Jansen, 2008. The complete nucleotide sequence of the cassava (*Manihot esculenta*) chloroplast genome and the evolution of *atpF* in Malpighiales: RNA editing and multiple losses of a group II intron. *Theor Appl Genet*, 116(5): 723–737.
- De Vere, N., Rich, T.C., Ford, C.R., Trinder, A.S., Long, C., More, C.W., Salterthwaite, D., *et al.*, 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PLOS ONE*, 7 (6): e37945.
- Dean, G.H, R. Asmarayani, M. Ardiyani, Y. Santika, T. Triono, S. Mathew, C.O. Webb, 2018. Generating DNA sequence data with limited resources for

- molecular biology: Lessons from a barcoding project in Indonesia. *Applications in Plant Sciences*, 6(7): e1167.
- Deependra Y., Kulveer S.Y., and S.P. Singh, 2018. Mango: Taxonomy and botany. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 7(2) 3253-3258.
- Dehesdtani, A., Kazemitabar S.K., and 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.
- Dong, W., Liu J., Yu J., Wang L. & Zhou S., 2012. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding . *PLOS ONE* 7 , e35071.
- Dong, W., Liu, H., Xu, C., Zuo, Y., Chen, Z., Zhou, S., 2014. A chloroplast genome strategy for designing taxon specific DNA mini-barcodes: a case study on ginsengs. *BMC Genetics*, 15: 138
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., ... and Zhou, S., 2015. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific reports*. 5, 8348.
- Dyal, S.D., Brown, M.T., Johnson, P.J. 2004. Ancient invasions: from endosymbiont to organelles. *Science*, 304: 253-257.
- Đỗ Tấn Khang và Trần Nhân Dũng, 2012. Đa dạng di truyền các giống xoài (*Mangifera* sp.) bằng kỹ thuật sinh học phân tử. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ*, số 22a:175-185.
- Đường Hồng Dật, 2003. Cam, chanh, quýt, bưởi và kỹ thuật trồng. Nhà xuất bản Lao Động - Xã Hội, Hà Nội, 96 trang.
- Edwards, K. J., and Gadek, P. A., 2001. Evolution and biogeography of *Alectryon* (*Sapindaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 14-26.

- Esquivel, P., Stintzing FC, Carle R. Comparison of morphological and chemical fruit traits from different pitaya genotypes (*Hylocereus* sp.) grown in Costa Rica. *JABFQ* 2007; 81(1): 7-14.
- Fang, D.Q. and Roose, M.L., 1997. Identification of closely related *Citrus* cultivars with
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., ... and Barrett, S. C., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PloS one*, 3(7), e2802.
- Federici, C.T., Fang D.Q., Scora R.W. & Roose M.L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Ruceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96: 812–822.
- Gardes, M. and T.D. Bruns (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol*, 2, 113-118.
- Gómez-Hinostrosa, C, Hernández HM, Terrazas T, Correa-Cano ME. Studies on Mexican Cactaceae. V. Taxonomic notes on *Selenicereus tricae*. *Brittonia* 2014; 66(1): 51-59.
- Gonzalez, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S. A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C and Chave, J., (2009). Identification of amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS One*; 4 :7483
- Goyal, Arvind K., Tanmayee Mishra, and Arnab Sen, 2013. Antioxidant profiling of Latkan (*Baccaurea ramiflora* Lour.) wine. *Indian Journal of Biotechnology*. 12: 137-139.
- Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., 2009. "A DNA barcode for land plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31): 12794-12797.

- Gulsen, O. & Roose M.L. (2000). The origin of Interdonato lemon inferred from cpRFLP, SSR, isozyme and ISSR markers. *Proc. Int. Soc. Citricult. IX Congr.* pp. 158–159.
- Giang, V.Q., M.V.T., Ky, H., Muoi, P.T., and Hien, N.L., 2016. Genetic diversity among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars originated from Vietnam, Thailand and Malaysia as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Vietnam agricultural Science and Technology*. 1: 22.
- Hà Văn Huân, Hoàng Minh Trang và Bùi Thị Mai Hương, 2020. Nghiên cứu xác định đoạn DNA Barcode cho loài Hoàng đàn (*Cupressus tonkinensis*) phục vụ giám định loài. *Tạp chí khoa học và công nghệ Lâm nghiệp*. 1: 111-121.
- Hebert, P.D.N. and Gregory, T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol*, 54: 852-859.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Waard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 270: 313-321.
- Hidayat, T., Pancoro, A., Kusumawaty, D. and Eiadthong, W., 2012. Development *matK* Gene as DNA Barcode to Assess Evolutionary Relationship of Important Tropical Forest Tree Geneus Mangifera. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*. 59: 17–20
- Hoàng Minh Trang. 2016. Xác định một số đoạn mã vạch ADN cho một số loài trà hoa vàng ở vườn quốc gia Tam Đảo. Tóm tắt luận văn thạc sĩ Khoa học. Đại học Khoa học Tự nhiên.
- Hollingsworth, P. M., Group, C. P. W., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
- Hollingsworth, P.M., Graham S.W., and Little D.P., 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*, 6 (5), pp. e19254.

- Hồ Viết Thế, Ngô Thị Kim Anh, Phan Hoàng Minh Châu và Trần Võ Thị Trang, 2019. Bước đầu sử dụng chỉ thị phân tử để nhận diện giống Mít không hạt. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2019: 473-476.
- Huang, X, X. Ci, G.J Cornan, J. Li, 2015. Application of DNA Barcodes in Asian Tropical Trees – A Case Study from Xishuangbanna Nature Reserve, Southwest China. *PLoS ONE* 10(6): E0129295.
- Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Trường Giang, Dương Hoa Xô, Hà Thị Loan, Phan Đình Yên, Trần Trọng Tuấn và Đỗ Đăng Giáp, 2019. Nghiên cứu sử dụng một số DNA barcode trong phân tích di truyền và nhận diện một số loài lan kim tuyến (*Anoectochilus spp.*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 1: 14-23.
- Hvarleva, T., Kapari-Isaia, T., Papayiannis, L., Atanassov, A., Hadjinicoli, A. and Kyriakou, A., 2008. Characterization of citrus cultivars and clones in Cyprus through microsatellite and RAPD analysis. *Biotechnol & Biotechnol*, 22: 787-794.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Khedr, A. I. M., Zayed, M. F. and El-Kholy, A. A. E. S., 2018. Genus *Hylocereus*: Beneficial phytochemicals, nutritional importance, and biological relevance—A review. *Journal of food biochemistry*, 42(2), e12491.
- Jin, D-M., S. Wicke, L. Gan, J-B. Yang, J-J. Jin, T-S. Yi, 2020 The Loss of the Inverted Repeat in the Putranjivoid Clade of Malpighiales. *Front. Plant Sci.* 11:942.
- Kerdelhué, C., Roux, G., Forichon, J., Chambon, J., Robert, A. and Lieutier, F., 2002. (Curculionidae: Scolytinae) on different pine species and validation of *T. destruens* (woll.). *Molecular Ecology*, (11):483-494.
- Kikuchi, S., Bédard, J., Hirano, M., et al., 2013. Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. *Science* 339, 571–574.

- Korotkova, N, Borsch THOMAS, Arias S. A phylogenetic framework for the Hylocereeae (Cactaceae) and implications for the circumscription of the genera. *Phytotaxa* 2017; 327(1): 1-46.
- Kress, W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(23): 8369-8374.
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O. and Bermingham, E, 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, and Center for Tropical Forest Science – Asia Program, Harvard University Herbaria.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS vol.105 no., 8*: 2761–2762.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2012. DNABarcodes: Methods and protocols.
- Kress, W.J., 2017. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 291-307.
- Kumar, A., Simons, K., Drader, T., Wang, Y., Dvorak, J., Ghavami, F *et al.*, 2012. Physical mapping resources for large plant genomes: radiation hybrids for wheat D-genome progenitor *Aegilops tauschii* accession AL8/78. *BMC Genomic*, 13: 597.
- Kheshin, M.A.E., H.A. Sayed and A.M.A. Allatif. 2016. Morphological and Molecular Analysis of Genetic Diversity among some ‘Sukkay’ Mango (*Mangifera indica* L.) Genotypes. *Journal of Horticultural Science & Ornamental plant*, 8(1):1-10.
- Khuất Hữu Trung, Hà Trọng Huy, Nguyễn Trường Khoa, Ngô Hồng Bình, Nguyễn Thanh Bình, Đặng Trọng Lương và 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.

- Lahaye, R.R., Savolainen V., Duthoit S., Maurin O., and Van Der Bank M., 2008. A test of psbK-psbI and atpF-atpH as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park (South Africa) as a model system.
- Larranaga, N. and Hormaza, J.I., 2015. DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus *Annona* (Annonaceae). *Frontiers in plant science*. 6: 589.
- Lee, H., Yi D., Kim J., and Kim K., 2007. *Development of plant DNA barcoding markers from the variable noncoding regions of chloroplast genome, in Abstract presented at the second international barcode of life conference. Academia Sinica, Taipei, Taiwan.*
- Lê Thanh Phong, 2011. Cây ăn trái. Nhà xuất bản đại học Cần Thơ, Cần Thơ. 205 trang.
- Lê Thị Thu Hiền, Hugo de Boer, Nông Văn Hải, Lê Thanh Hương, Nguyễn Mai Hương và Lars Bjork, 2012. Mã vạch phân tử DNA và hệ thống dữ liệu mã vạch sự sống. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 10: 393-405.
- Lê Thị Thu Hồng, 2000. Nghiên cứu một số biện pháp Bảo vệ thực vật trong sản xuất cây ăn quả có múi ở Đồng bằng Sông Cửu Long, Luận án tiến sĩ Nông nghiệp, viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam.
- Lê Văn Hậu, Lê Lưu Phương Hạnh, Ngô Huỳnh Phương Thảo, Nguyễn Phúc Cẩm Tú và Nguyễn Quốc Bình, (2018). Ứng dụng marker phân tử DNA barcode trong định danh các mẫu *Moina* spp. phân lập tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(2): 36-44
- Li, W., Liu, Y., Yang, Y., Xie, X., Lu, Y., Yang, Z., and Jin, X. 2018. Interspecific chloroplast genome sequence diversity and genomic resources in *Diospyros*. *BMC Plant Biol* 18, 210.
- Lu, X., Liu, L., Zhao, L., Song, X., Zhu, X., 2009. Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers. *Sci. Hort.*, 122(4): 645-648.

- Luro, F., Rist, D. and Ollitrault, P., 2000. Sequence tagged microsatellites polymorphism: an alternative tool for cultivar identification and evaluation of genetic relationships in *Citrus*. Proc. Int. Soc. Citricult. IX. Congr. Florida, USA, 30: 170–171.
- Madesis, P., Ganopoulos, I., Ralli, P., Tsaftaris, A. 2012. Barcoding the major Mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and nuclear DNA sequence targets. Genet Mol Res. 11(3): 2548-2558
- Madiah, A.M., Chikmawati, T., Hartana, A., 2018. Characterization of Rambutan Cultivars (*Nephelium lappaceum*) Based on Leaf Morphological and Genetic. Biosaintifika 10 (2): 252-259.
- Mahdy, N.E.S.H., 2018. A Comparative Pharmacognostical Study of *Chrysophyllum oliviforme* L. and *Chrysophyllum cainito* L. (Family Sapotaceae) grown in Egypt. A Thesis Submitted.
- Mann, S., Satpathy, G., & Gupta, R. K., 2016. Evaluation of nutritional and phytochemical profiling of *Baccaurea ramiflora* Lour. syn. *Baccaurea sapida* (Roxb.) Mull. Arg. fruits. Indian Journal of Traditional Knowledge. 15(1): 135-142.
- Mansour, M., O.M. Ismail and S.M.M. EL-Din. 2008. Diversity Assessment among Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars in Egypt using ISSR and Three-Primer Based RAPD Fingerprints. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(2):87-92.
- Merrill, E.D., 1923. An enumeration of Philippine flowering plants. Bur. Printing, Manila, Philippines.
- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Mani, D.N., Shukla, A.K., Tiwari, R. and Sundaresan, V., 2016. DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal*, 14: 8-21.
- Morton, J., 1987. ‘Star Apple’ in Morton J., Fruits of Warm Climates, Miami, FL, 408–410.

- Mukherjee, S.K., 1951. Origin of Mango. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 11: 49-56.
- Natasha, D.V., Tim, C.G.R., Sarah, A.T. and Charlotte, L., 2015. DNA Barcoding for Plants. Article in *Methods in Molecular Biology*, 19:101-118.
- Nei, M and W.H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10): 5269-5273.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J and Ragupathy, S., (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Can J Bot*; 84 :335–341.
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G. & Tribulato E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155–1166.
- Niu, Y.F., Li, K.X. and Liu, J., 2020. The complete chloroplast genome of *Annona muricata* L.: a tropical fruit with important medicinal properties. *Mitochondrial DNA*. 5(3): 3348–3350.
- Novelli, V. M., Cristofani, M., Souza, A. A. and Machado, M. A., 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 29: 90-96.
- Nyffeler, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *Am J Bot* 2002; 89(2), 312-326.
- Ngô Xuân Bình, 2009. Chọn tạo giống cam quýt, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên.
- Nguyễn Bá Phú, Nguyễn Bảo Vệ, Bùi Thị Cẩm Hường và Trần Nhân Dũng, 2011. Nhận diện và xác định mối quan hệ di truyền của hai cá thể quýt đường không hạt được phát hiện ở Đồng bằng sông Cửu Long bằng dấu phân tử DNA. *Tạp chí Khoa học*, 20a: 108-118.

- Nguyễn Bá Phú, Nguyễn Quốc Sĩ và Nguyễn Bảo Vệ, 2016. Khảo sát đặc tính hình thái thực vật của quýt Đường không hạt được phát hiện năm 2014 tại xã Tân Thành, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. Tạp chí Khoa học, trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3): 100-106.
- Nguyễn Bảo Vệ và Lê Thanh Phong, 2004. Giáo trình cây đa niên. Khoa Nông Nghiệp, trường Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ.
- Nguyễn Danh Vàn, 2008. Kỹ thuật canh tác cây ăn trái cây sầu riêng, Quyển 7
- Nguyễn Đức Thành, 2014. Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. Viện Công Nghệ Sinh Học, Viện Hàn Lâm KH & CN Việt Nam, tạp chí sinh học 2014, 36(3): 265-294.
- Nguyễn Hữu Thọ, 2015. Nghiên cứu đặc điểm nông học và một số biện pháp kỹ thuật đối với giống bưởi diễm (*Citrus Grandis*) tại tỉnh Thái Nguyên. Luận án tiến sĩ nông nghiệp.
- Nguyễn Hữu Thuận Anh, Nguyễn Hữu Vinh, Nguyễn Minh Hiền, Nguyễn Thanh Diễm, Lê Thị Ngọc Diệp và Vũ Thị Huyền Trang. 2013. Khảo sát một số vùng trình tự phân tử trong việc nhận diện các giống xoài (*Mangifera indica* L.) ở Việt Nam. *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*
- Nguyễn Mạnh Chinh và Nguyễn Đăng Nghĩa, 2006. Trồng – chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh xoài, vú sữa, sáo, dừa. Nhà xuất bản Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh, 98 trang.
- Nguyễn Nghĩa Thìn, 2005. Đa dạng sinh học và tài nguyên di truyền thực vật. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội, 214 trang.
- Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Quỳnh Nga, Trần Ngọc Lân, Nguyễn Thị Thu, Ninh Thị Phíp, Đoàn Thị Thanh Nhân, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Nhật Linh, 2018. Đặc điểm hình thái và mã vạch DNA của loài cây bảy lá một hoa, *Paris vietnamensis* (takht.) H.li, ở việt nam. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2018, 16(4): 282-289.

- Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang Sơn và Phan Kế Long, 2011. Phát hiện về một loài sâm mới *Panax sp.* (*Araliaceae*) ở Việt Nam. Tạp chí Dược học, 10:59-63.
- Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Hoàng Việt, 2015. Đặc điểm nông sinh học của các giống thanh long (*Hylocereus spp.*) trồng ở miền Bắc Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2015, tập 13, số 7: 1070-1080.
- Nguyễn Thị Tuyết, Nguyễn Thị Xuyến, Nguyễn Thị Lan Hoa, Bùi Thị Thu Giang, Trần Danh Sửu, 2018. Đánh giá đa dạng di truyền một số nguồn gen bưởi (*Citrus spp.*) bằng chỉ thị SSR. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam - Số 1.
- Nguyễn Văn Vũ và Nguyễn Văn Thành, 2018. Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang dâu Hạ Châu (*Baccaurea ramiflora* L.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(7B): 22-32.
- Oliver, M. J., Murdock, A.G., Mishler, B.D., et al., 2010. Chloroplast genome sequence of the moss *Tortula ruralis*: gene content, polymorphism and structural arrangement relative to other green plant chloroplast genomes. BMC Genomics 11, 143.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. and Anthony, S., 2009. A groforestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0. Available from <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp> (accessed 25 January 2010).
- Pan, L., Fu, J., Zhang, R., Qin, Y., Lu, F., Jia, L., and Liang, G., 2017. Genetic diversity among germplasms of *Pitaya* based on SSR markers. Scientia Horticulturae, 225, 171-176.
- Pandit, S. S., Mitra, S., Giri, A. P., Pujari, K. H., Patil, B. P., Jambhale, N. D and Gupta, V.S. 2007. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers. Current science, 1135-1141.

- Parveen, I., Singh, H. K., Raghuvanshi, S., Pradhan, U. C and Babbar, S. B., (2012). DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Mol Ecol Resour*; 12 :82–90.
- Paško, P, Galanty A, Zagrodzki P, Ku YG, Luksirikul P, Weisz M, Gorinstein S. Bioactivity and cytotoxicity of different species of pitaya fruits—A comparative study with advanced chemometric analysis. *Food Biosci* 2021; 40: 100888.
- Petersen, J.J., Parker, I.M. and Potter, D., 2012. Origins and close relatives of a semi-domesticated neotropical fruit tree: *Chrysophyllum cainito* (Sapotaceae). *American Journal of Botany*, 99: 585–604
- Petersen, J.J., Parker, I.M. and Potter, D., 2014. Ten polymorphic microsatellite primers in the tropical tree caimito, *Chrysophyllum cainito* (Sapotaceae). *Applications Plant Sciences*.
- Pinto, A.C. de Q., Cordeiro, M.C.R., de Andrade, S.R.M., Ferreira, F.R., Filgueiras, H.A. de C., Alves, R.E., Kinpara, D.I., 2005. *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton. Southampton, 31 pages.
- Pradha, S., N. Bhowmick., B. Deb, A. Ghosh, P.K. Pal, B. Roy *et al.*, 2015. Fruit growth and development of Burmese grape (*Baccaurea sapida* Müell. Arg.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1): 86-91.
- Phạm Hoàng Hộ, 1999. Cây cỏ Việt Nam quyển 1. Nhà xuất bản Trẻ. Hà Nội, 1027 trang.
- Phạm Hoàng Hộ. 1999. Cây cỏ Việt Nam, quyển II. Nhà xuất bản trẻ, TP.HCM, (2): tr.363-369.
- Qian, W., Ge, S., Hong, D. Y., 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102(2-3): 440-449.
- Quảng Ngọc Vàng và Võ Công Thành. 2005. Đa dạng di truyền của tập đoàn giống Xoài tại vùng Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học, trường Đại học Cần Thơ*, (3): 26-32.

- Rao, V.R. and Hodgkin, T., 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1–19.
- Ravi V., Khurana JP., Tyagi AK., Khurana P. 2008. An update on chloroplast genomes. *Plant Syst Evol* 271: 101-122.
- Reddy P. M., Sarla N., Siddiq, E. A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128-2: 9-17.
- Shah, H.A., M.B. Patel, R.J Patel and P.K. Parmar., 2010. *Mangifera indica* (Mango). *Pharmacogn*, 4(7): 42-48
- Shahsavar, A.R., Izadpanah K., Tafazoli E., and Tabatabaei B.E.S., 2007. Characterization of Citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci. Hortic.*, 112: 310-314.
- Siew, G.Y., Ng, W.L., Salleh, M.F., Tan, S.W., Ky, H., Alitheen, N.B.M., and Yeap, S.K., 2018. Assessment of the genetic variation of Malaysian durian varieties using Inter-Simple Sequence Repeat Markers and chloroplast DNA sequences. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 41(1).
- Singh, H.K., P.Iffat, R. Saurabh, B.B Shashi, 2012. The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *PMC Research Note*, 5: 42.
- Singh, L.B. 1986. The mango: Botany, cultivation, and utilization. Leonard Hill. London, 438pp.
- Snkiewicz, M., Gadamski, G. and Gawronski, S. W., 2001. Genetic variation and phylogenetic relationships of triazine resistant and triazine susceptible biotypes of *Solanum nigrum* analysis using RAPD markers. *Weed Res.*, 41:287-300.
- Storchova, H. and M. S. Olson, 2007. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non coding region in angiosperms. *Plant systematic and evolution. Biomedical and life sciences*, 268 (4): 235-256.
- Sugiura, M. 1995. The chloroplast genome. *Essays Biochem* 30: 49-57.

- Sukmandari, N.S., Dash, G.K., Jusof, W.H.W., Hanafi, M., 2017. A Review on *Nephelium lappaceum* L. Research J. Pharm. and Tech. 2017; 10(8): 2819-2827.
- Sundari, S., Wahyudi, D., Arumingtyas, E. L., Hakim, L., and Azrianingsih, R., 2019. Assessment for identification of genus *Durio* spp. from North Maluku Indonesia using three barcode DNA. Malays. Appl. Biol. 48(5): 77-87.
- Sunita, S. and Deepti, G., 2014. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Chrysophyllum cainito* Linn. leaves. *Herbal Research Lab, Ramnarain Ruia College, Matunga (E), Mumbai, India*.
- Swenson, N.G., 2012. Phylogenetic analyses of ecological communities using DNA barcode data. In: Kress WJ, Erickson DL eds. DNA barcodes: Methods and protocols. *New York: Humana Press, Springer Science & Publishing Media, LLC*, 409–419.
- Swenson, U.L.F., James, E.R. and Igor V.B., 2008. Multi-gene phylogeny of the pantropical subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae): evidence of generic polyphyly and extensive morphological homoplasy. *Department of Phanerogamic Botany, Swedish Museum of Natural History*.
- Tao, J., Qiao, G., Wen, X. P., Gao, G. L., Liu, T., Peng, Z. J., ... and Zhang, B. X., 2014. Characterization of genetic relationship of dragon fruit accessions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 170, 82-88.
- Techen, N., P. Iffat, P. Zhiqiang, K.A. Ikhalas, 2014. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 103-110.
- Tel-Zur, N, Abbo S, Bar-Zvi D, Mizrahi Y. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): Evidence from hybridization and cytological studies. *Ann. Bot.* 2004; 94(4): 527–534.

- Tsumura, Y., Kawahara, T., Wickneswari, R., Yoshimura, K. 1996. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor Appl Genet.* 93(1-2): 22-29.
- Thiều Thị Tạo, 1996. So sánh số lượng nhiễm sắc thể ở các loài cam chanh Việt Nam. Kết quả nghiên cứu khoa học 1986 – 1996. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội, Hà Nội; trang 109-112.
- Thimmappaiah, S., Shobha, W.G., and Melwyn, G.S., 2009. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sci. Hortic*, 120: 411-417.
- Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang. 2012. Đa dạng di truyền các giống xoài (*Mangifera sp*) bằng kỹ thuật sinh học phân tử. *Tạp chí khoa học, trường Đại học Cần Thơ*, 22a: 175-185.
- Trần Thanh Mến, Nguyễn Thị Pha, Trần Nhân Dũng, Hà Thanh Toàn, Tina Kyndt, Godelieve Gheysen, Marcelle Holsters, 2008. Nghiên cứu đa dạng sinh học các giống bưởi (*Citrus maxima* (Burm) Merr.) ở Việt Nam bằng phương pháp PCR-RFLP. Hội nghị khoa học” cây ăn trái quan trọng ở ĐBSCL”, tr 14-20.
- Trần Thế Tục và Chu Doãn Hoàn, 2004. Cây sầu riêng ở Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
- Trần Thế Tục, Cao Anh Long, Phạm Văn Côn, Hoàng Ngọc Thuận và Đoàn Thế Lư, 1998. *Giáo trình cây ăn quả*. Nxb Nông Nghiệp Hà Nội, tr. 106, 107, 110 - 118.
- Trần Thế Tục. 1998. *Giáo trình cây ăn quả. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội*.
- Trần Thị Thu Thủy, 2016. Đánh giá đa hình di truyền của một số giống cam bằng kỹ thuật RAPD và ISSR. Luận văn tốt nghiệp ngành công nghệ sinh học. Đại học Nông Lâm, Thái Nguyên.
- Trần Thượng Tuấn, Lê Thanh Phong, Dương Minh, Trần Văn Hòa và Nguyễn Bảo Vệ (1994). *Cây ăn trái đồng bằng sông Cửu Long*, Tập 1. Sở Khoa Học Công Nghệ và Môi Trường tỉnh An Giang, tr. 42, 43, 59 - 70.

- Trần Thượng Tuấn, Nguyễn Bảo Vệ, Lê Thị Xua, Nguyễn Thị Xuân Thu, Lê Thanh Phong, Nguyễn Hồng Phú, Lê Vĩnh Thúc và Bùi Văn Tùng. 1999. Điều tra, thu thập, bảo tồn và đánh giá một số giống cây ăn quả đặc sản của các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (Báo cáo khoa học, đề tài nghiên cứu cấp bộ). Khoa Nông nghiệp, trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.
- Trần Văn Hâu và Lê Minh Quốc, 2009. Đặc tính sự ra hoa và phát triển trái dâu Hạ Châu (*Baccaurea ramiflora* Lour.) tại Phong Điền, thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học*, số 11: 270-277.
- Trần Văn Hâu, Trần Thị Phương Thảo và Trần Sỹ Hiếu, 2014. Đặc điểm hình thái của hạt phấn và một số biện pháp cải thiện sự đậu trái và hạn chế rụng trái dâu hạ châu (*Baccaurea ramiflora* Lour.) Tại huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Nông nghiệp* (4): 135-141.
- Tripathi, A.M., Tyagi, A., Kumar, A., Singh, A., and Singh, S., 2013. The Internal Transcribed Spacer (ITS) Region and *trnH-psbA* Are Suitable Candidate Loci for DNA Barcoding of Tropical Tree Species of India. 8.
- United Nations (1992) Environment and Development (Terminology bulletin: 344). United Nations, New York, USA.
- Uran, A., Yesiloglu T., Polat I., Aka-Kacar Y., Gulsen O., Yildirim B., Tuzcu O., Tepe S., Canan I. & Anil S. 2011. Evaluation of genetic diversity in lemons and some of their relatives based on SRAP and SSR markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 29: 693–701.
- Uzun, A., Gulsen O., Yesiloglu T., Aka-Kacar Y. & Tuzcu O. 2010. Distinguishing grapefruit and pummelo accessions using ISSR markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 46: 170–177.
- Uzun, A., Yesiloglu T., Aka-Kacar Y., Tuzcu O., Gulsen O., Kafa G., Yildirim B. & Anil S. 2011. Genetic diversity of grapefruit and pummelo accessions based on SRAP markers. *Ac Hort.* 892: 49-56.

- Uzun, A., 2009. Turunçgillerde genetik çe itlili in SRAP markõrlarõ ile karakterizasyonu (Characterization of genetic diversity of Citrus by SRAP markers) Ph.D. Thesis. University of Cukurova, Institute of Natural and Applied Sciencies: 369. (in Turkish).
- Vardi, A., Lenvin, H., and Carmi, H., 2008. Introduction of Seedlessness in *Citrus*: From Classical Techniques to Emerging. Biotechnological Approaches, *Hort Sci*, 133(1): 117 – 126.
- Vijayan, K. and Tsou, C.H., 2010. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current science*, vol.99, no.11, 13: 1530-1541.
- Vivas, C.V., Moraes, R.C.S., Araújo, A.A., Alves, M., Neto, E.M., Van den Berg, C. and Gaiotto, F.A., 2014. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? *Genetics and Molecular Biology*, 34: 662-670.
- Võ Công Thành và Huỳnh Kỳ. 2001. Tìm qui trình phân tích các tiểu đơn vị protein trên lá xoài.
- Võ Ngọc Loan Anh, 2010. Khảo sát phẩm chất trái quýt đường Lai Vung – Đồng Tháp, Phụng Hiệp – Hậu Giang, Trà Ôn – Vĩnh Long. Luận văn tốt nghiệp ngành trồng trọt. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Von, C., M., Korpelainen, H., Pietilainen, M and Rikkinen, J., 2011. “DNA barcoding: A tool for improved taxon identification and detection of species diversity”, *Biodiversity Conservation*, 20(2), pp.373-380.
- Vũ Công Hậu, 2000. *Trồng cây ăn quả ở Việt Nam*. Tái bản lần 3. NXB Nông Nghiệp TP. Hồ Chí minh, 100-116.
- Vũ Thị Huyền Trang, Trương Quốc Thịnh, Nguyễn Thanh Điềm, Lê Tuấn Lộc, Lê Thị Ngọc Điệp, Trần Hoàng Dũng, Tôn Nữ Thùy An, 2019. Khảo sát một số vùng trình tự phân tử trong việc nhận diện các giống vú sữa *Chrysophillum cainito* L. ở Việt Nam. Tuyển tập Báo cáo toàn văn hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2019, ngày 01 tháng 11 năm 2019, thành phố Hồ Chí

- Minh. Nhà xuất bản đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Thành phố Hồ Chí Minh. Trang 582-587.
- Vũ Thị Như Trang và Chu Hoàng Mậu, 2018. Sử dụng mã vạch matK để nhận diện mẫu cỏ nhân (Talinum paniculatum) thu tại một số địa phương phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 184(08): 101-106.
- Vũ Văn Hiếu, Nông Thị Huệ, Nguyễn Thị Oanh, Ninh Thị Thảo, Vũ Quang Sáng và Nguyễn Thị Phương Thảo. 2015. Phân tích đa dạng di truyền của các mẫu giống cam sành tại Hà Giang bằng chỉ thị RAPD và ISSR. *Tạp chí Khoa học và Phát triển 2015*, 13: 25-27.
- Vu, HT, Vu QL, Nguyen TD, Tran N, Nguyen TC, Luu PN, Le L. Genetic Diversity and Identification of Vietnamese Paphiopedilum Species Using DNA Sequences. *Biology* 2020; 9(1): 9.
- Wang, A., Wu, H., Zhu, X., Lin, J., Schneeweiss, G.M., Werner, T., and Braukmann, A., 2018. Species Identification of *Conyza bonariensis* Assisted by Chloroplast Genome Sequencing. 9: 1–8.
- Wang, W., Wu, Y., Yan and Y., 2010. DNA barcoding of the *Lemnaceae*, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biol* 10, 205.
- Wu, F, Ma J, Meng Y, Zhang D, Pascal-Muvunyi B, Luo K, Zhang J. Potential DNA barcodes for Melilotus species based on five single loci and their combinations. *PLoS One* 2017; 12(9): e0182693.
- Wu, F., L. A. Mueller, D. Crouzillat, V. Petiard and S. D. Tanksley, 2006. Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: A test case in the euasterid plant clade. *Genetics*, 174: 1407-1420.
- Wu, F., Li, M., Liao, B., Shi, X., Xu, Y., 2019. DNA barcoding analysis and phygenetic relation of mangoves in Guangdong province, China. *Forest* 10 (1), 56.

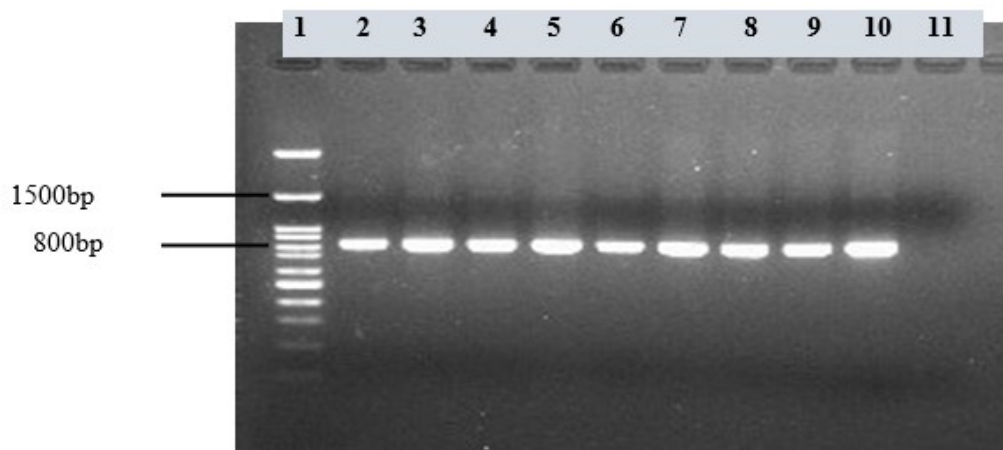
- Wu, F.H., Chan, m.T., Liao, D.C., Hsu, C.T., *et al.*, 2010. “Complete chloroplast genome of *Oncidium Gower ramsey* and evaluation of molecular markers for identification and breeding in oncidinae”, *BMC Plant Biol.*, 10, pp.68-80.
- Xi. Z., R.R. Brad, S. Hanno, A.M. Andre, W.Z. Kenneth, E.K. Peter, *et al.*, 2012. Phylogenomics and a posteriori data partitioning resolve the Cretaceous angiosperm radiation Malpighiales. *Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS*, 109 (43): 17519-17524.
- Xu, S-R., Huang, C-Y., Deng, Y-T., Zhou, L-L., Pan, D-M., and Pan, H-L., 2016. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. ‘Guanximiyou’. *Mitochondrial DNA Part B*, 5:1, 482-483.
- Yahia, E.M. and Gutierrez-Orozco, F., 2011. Star apple (*Chrysophyllum cainito* L.). *Autonomous University of Queretaro, Mexico*.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., ... & Chen, S. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*, 5(10), e13102.
- Yao, Y., Demoinet, E., Saveanu, C., Lenormand, P., Jacquier, A., & Fromont-Racine, M. 2010. Ecm1 is a new pre-ribosomal factor involved in pre-60S particle export. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(5), 1007–1017.
- Yonemori, K.,C. Honsho, S. Kanzaki, W. Eiadthong and A. Sugiura., 2002. Phylogenetic relationship of Mangifera species revealed by ITS sequences of nuclear ribosome DNA and a possibility of their hybrid origin. *Plant Syst*, 231: 59- 75.
- Yong, H. L., R. Jinlan, C. Shilin, S. Jingyuan, L. Kun, L. Dong and Y. Hui, 2010. Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24): 2706-2709.
- 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.

- Yu, J., Yan, H., Lu, Z. and Zhou, Z., 2011. Screening potential DNA barcode regions of chloroplast coding genome for Citrus and its related genera. *Scientia Agricultura Sinica*. 44: 341-348.
- Zhang, X., L. Shuyu, T. Yang, L.Yi, Z. Jianguo, W. Zhaoshan, 2019. The complete chloroplast genome sequence of *Flacourtia jangomas*. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2): 3232-3233.
- Zheng, C., Liu, Z-Y., and Liu, J., 2020. The complete chloroplast genome sequence of *Chrysophyllum cainito*, a semidomesticated species, *Mitochondrial DNA Part B*, 5:3, 2199 – 2200.

PHỤ LỤC

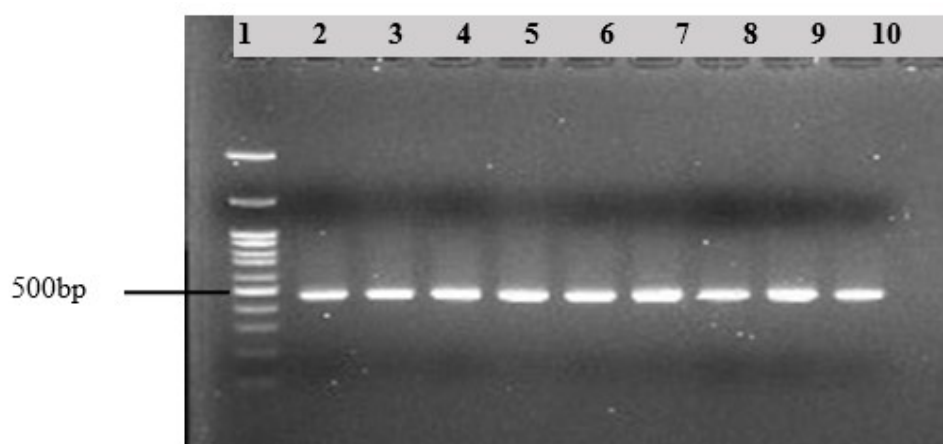
1. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch bươm da xanh

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự được thực hiện trên gel agarose 2%, sau khi kiểm tra kết quả cho thấy với 3 môi trên điều cho hiện các băng DNA sáng rõ rệt, lượng DNA thu được đủ số lượng cần cho giải trình tự và khuếch đại đúng đoạn DNA mục tiêu cần khảo sát. Đối chứng dương xuất hiện băng rõ rệt cho biết quá trình PCR diễn ra một cách thành công không có sai sót về thao tác cũng như chất lượng hóa chất đã sử dụng trong PCR được đảm bảo, đối chứng âm không xuất hiện băng thể hiện thấy sản phẩm PCR không bị nhiễm tạp chất. Khi so sánh với thang chuẩn thương mại có kích thước 3kb cho kết quả khuếch đại được chiều dài các đoạn gen lần lượt là 900bp, 500bp, 700bp tương ứng với 3 môi là *ycf1b* (Hình 1), *psbK-psbI* (Hình 2) và ITS (Hình 3). Từ những kết quả đạt được cho thấy sản phẩm PCR trên đã đủ điều kiện để tiến hành bước giải trình tự.



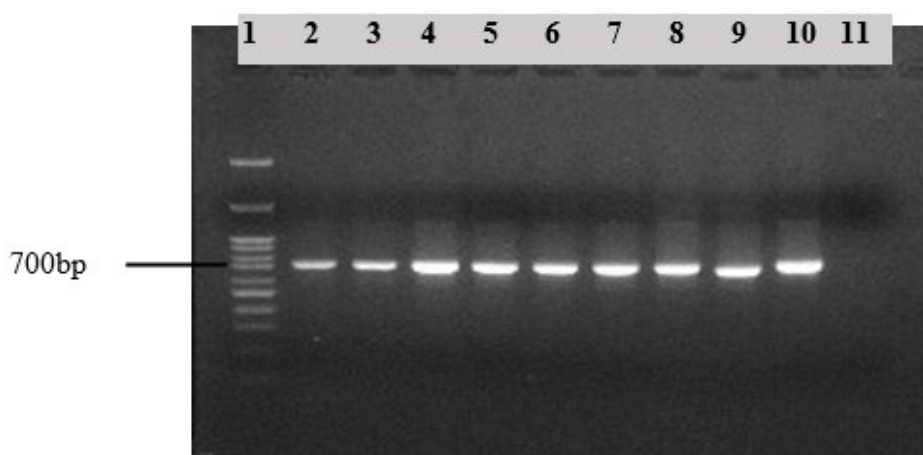
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi *ycf1b* các giống bươm

Ghi chú: (1) thang chuẩn 3kb; (2) bươm Da Xanh Tiền giang(BDTG) + đối chứng dương; (3) bươm Da Xanh Sóc Trăng (ST);(4) bươm Da Xanh Hậu Giang (BDHG); (5) bươm Da Xanh Vĩnh Long (BVL); (6) bươm Da Xanh Bến Tre (BDB); (7) bươm Ruby (BRB1); (8) bươm Thanh Kiều (BTK); (9) bươm Đường Trắng (BDT); (10) bươm 5 Roi (STR); (11) Đối chứng âm;



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR mồi psbK-psbI các giống bưởi

Ghi chú: (1) thang chuẩn 3kb; (2) bưởi Da Xanh Tiền giang (BDTG) + đối chứng dương; (3) bưởi Da Xanh Sóc Trăng (ST); (4) bưởi Da Xanh Hậu Giang (BDHG); (5) bưởi Da Xanh Vĩnh Long (BVL); (6) bưởi Da Xanh Bến Tre (BDB); (7) bưởi Ruby (BRB1); (8) bưởi Thanh Kiều (BTK); (9) bưởi Đường Trắc (BDT); (10) bưởi 5 Roi (STR); (11) Đối chứng âm;



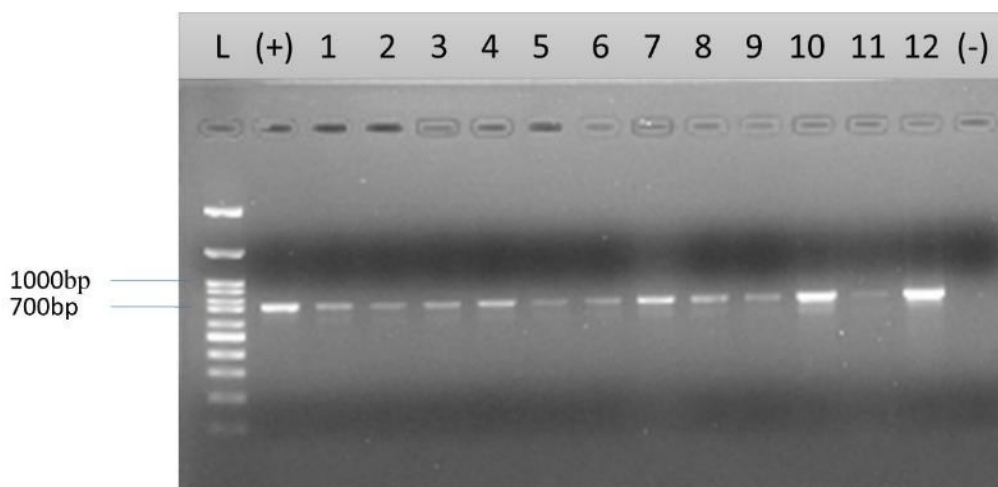
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR mồi ITS

Ghi chú: (1) thang chuẩn 3kb; (2) bưởi Da Xanh Tiền giang (BDTG) + đối chứng dương; (3) bưởi Da Xanh Sóc Trăng (ST); (4) bưởi Da Xanh Hậu Giang (BDHG); (5) bưởi Da Xanh Vĩnh Long (BVL); (6) bưởi Da Xanh Bến Tre (BDB); (7) bưởi Ruby (BRB1); (8) bưởi Thanh Kiều (BTK); (9) bưởi Đường Trắc (BDT); (10) bưởi 5 Roi (STR); (11) Đối chứng âm;

2. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch các giống cam

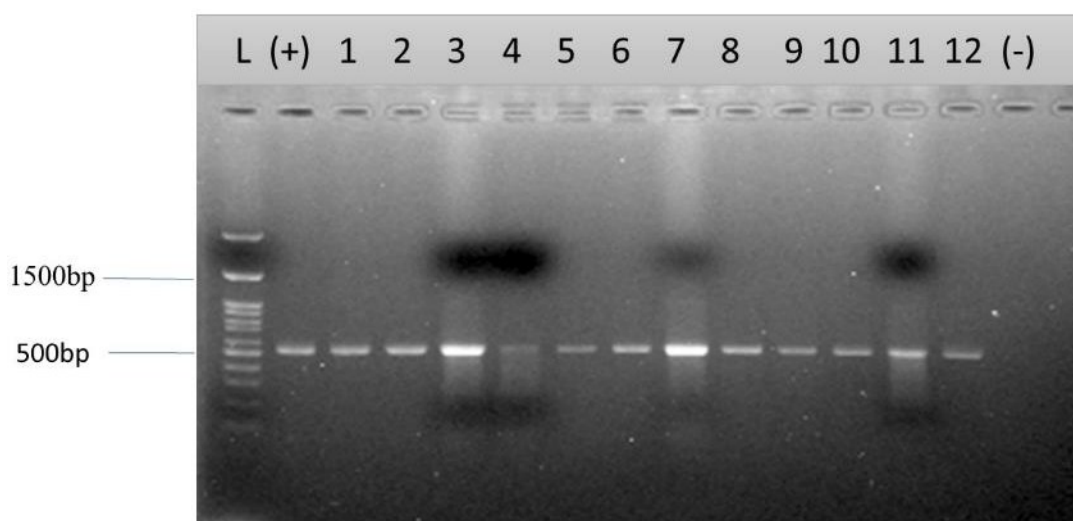
Vùng trình tự ITS khuếch đại được có kích thước khoảng 700bp (Hình 4). Đoạn trình tự rpOc1 có kích thước khoảng 550bp (Hình 5). Ở nghiên cứu của Huỳnh

Hữu Đức và cs. (2019) vùng rpoC1 cho tỷ lệ khuếch đại trên mẫu lan thuộc chi *Anoectochilus*, *Lusidia* rpoC1 với kích thước 500bp và 600bp. Vùng trình tự atpF-atpH khuếch đại mẫu có kích thước khoảng 650 bp (Hình 6). Trình tự psbK-psbI được khuếch đại có kích thước khoảng 450bp (Hình 7). Theo nghiên cứu của Enan *et al.* (2016) khi khảo sát ở chà là Emirati (*Phoenix dactylifera* L.) trên vùng gen psbK-psbI cho kết quả khuếch đại DNA từ 346 bp ở giống Umsalla đến 417 bp ở giống Abukebal, với chiều dài trung bình là 374 bp. Vùng trình tự psbA-trnH khuếch đại mẫu có kích thước khoảng 550 bp (Hình 8). Khi khảo sát *Citrus aurantium* (cam chua) với *C. sinensis* trên vùng trình tự này thì có kích thước khoảng 525 bp (Gori *et al.*, 2019). Ở nghiên cứu khác, loài cây Bảy lá một hoa *Paris vietnamensis* (Takht.) H. Li khi khảo sát trên vùng trình tự psbA-trnH cho kích thước khoảng 803bp (Nguyễn Tiến Dũng *et al.*, 2018). Trong nghiên cứu định loài Chi Nhân sâm (*Panax* L.), Lê Thanh Hương *et al.*, (2016) đã khảo sát được kích thước khoảng 390 bp trên vùng gen này. Vùng gen ycf1b khuếch đại mẫu có kích thước khoảng 850 bp (Hình 9).



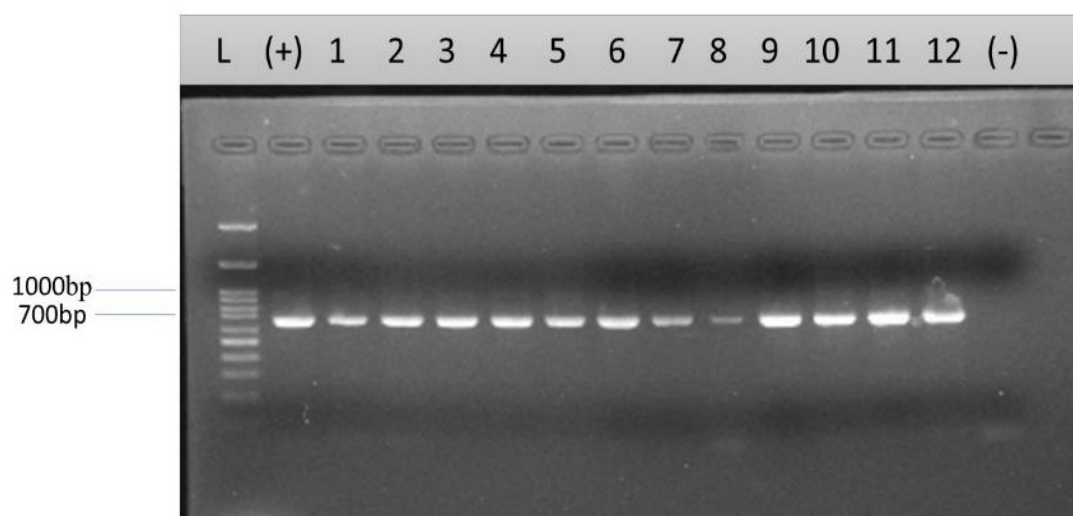
Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi ITS.

*L.*Thang chuẩn 100bp; (+).đối chứng dương; 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN);11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG); (-).đối chứng âm.



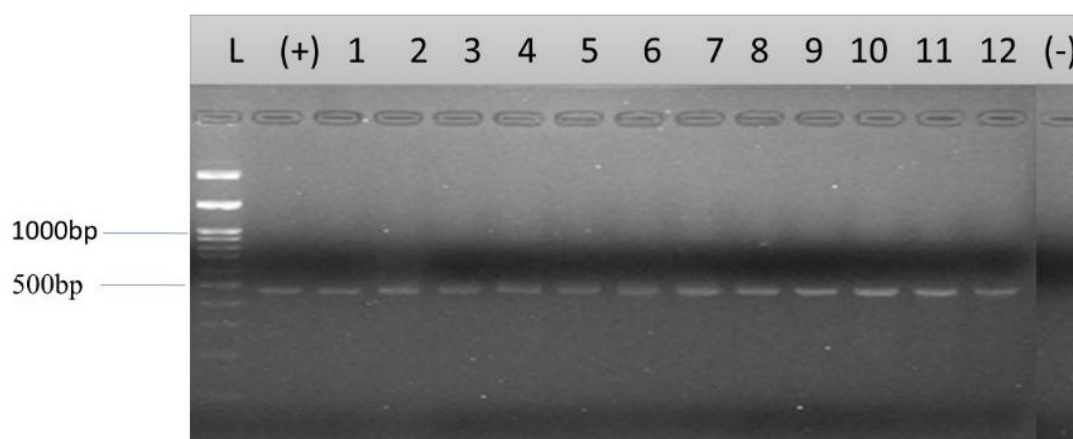
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi rpoC1.

L.Thang chuẩn 100bp; (+).đối chứng dương; 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN);11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG); (-).đối chứng âm.



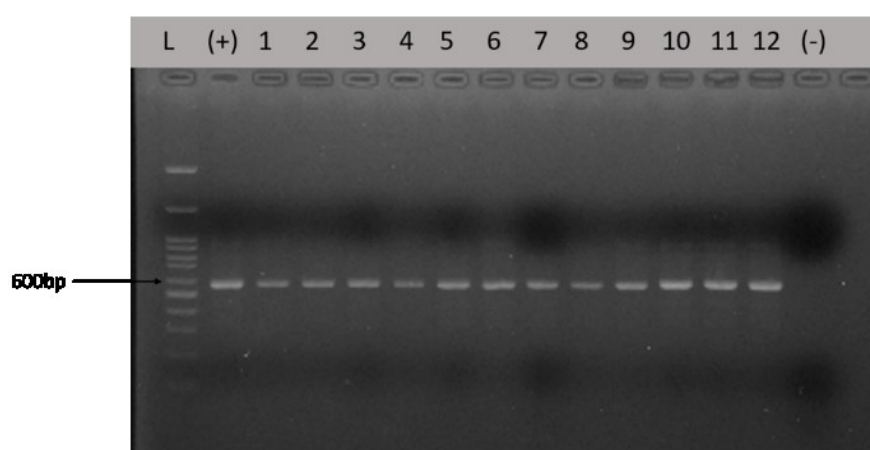
Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi atpF-atpH

L.Thang chuẩn 100bp; (+).đối chứng dương; 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN);11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG); (-).đối chứng âm.



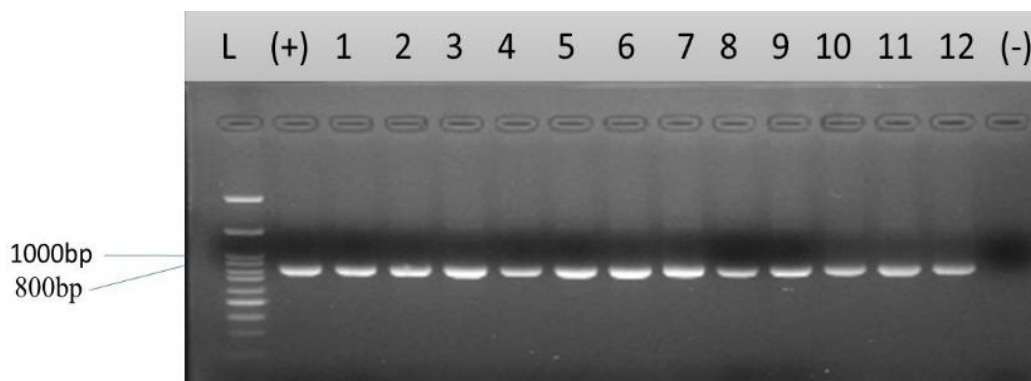
Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi psbK-psbI.

L.Thang chuẩn 100bp; (+).đối chứng dương; 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN);11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG); (-).đối chứng âm.



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi psbA-trnH

L.Thang chuẩn 100bp; (+).đối chứng dương; 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN);11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG); (-).đối chứng âm.

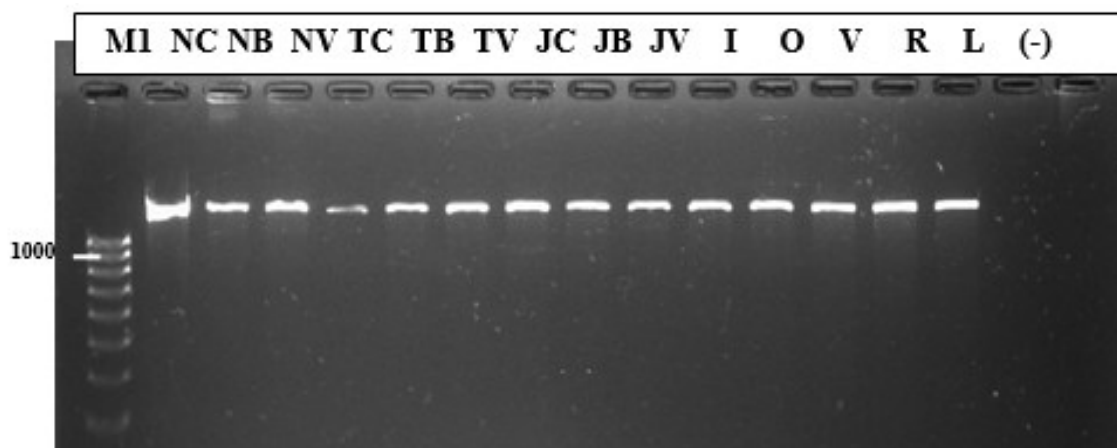


Hình 9. Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi ycf1b

L.Thang chuẩn 100bp; (+).đối chứng dương; 1.Cam Mật (TG); 2.Cam Mật (Phong Điền-CT); 3.Cam Mật (HG); 4.Cam Mật (HG); 5.Cam Mật (Cờ Đỏ-CT); 6.Cam Mật (Trà Ôn-VL); 7.Cam Mật (Chợ Lách-BT); 8.Cam cara (Khoa NN-DHCT); 9.Cam tứ quý (Cờ Đỏ-CT); 10.Cam sành (VCAQMN);11.Cam dây (HG); 12. Cam xoàn (HG); (-).đối chứng âm.

3. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch các giống chôm chôm

Trình tự *matK* cho các băng đều có kích thước trên 1000 bp (Hình 10), rơi vào khoảng 1500 bp, phù hợp với kích thước đoạn gen *matK* khuếch đại được với cặp môi *matK*-4600/*trnK*-2R được công bố bởi Edwards và Gadek (2001). Các sản phẩm PCR này đủ điều kiện giải trình tự.

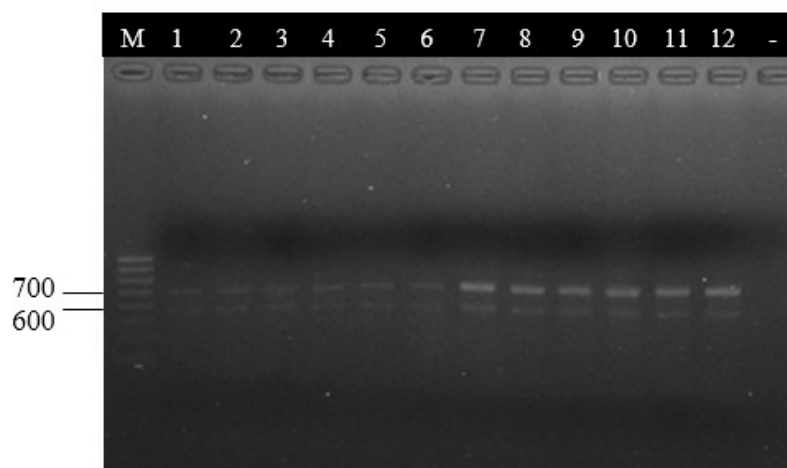


Hình 10. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với môi matK

MI: marker 1kb, *NC*: cc. nhãn Cần Thơ, *NB*: cc. nhãn Bến Tre, *NV*: cc. nhãn Vĩnh Long, *TC*: cc. Thái Cần Thơ, *TB*: cc. Thái Bến Tre, *TV*: cc. Thái Vĩnh Long, *JC*: cc. Java Cần Thơ, *JB*: cc. Java Bến Tre, *JV*: cc. Java Vĩnh Long, *O*: cc. ta, *R*: cc. rừng, *V*: cc. vỏ vàng, *I*: cc. Indo, *L*: cc. lai Tiến Cường

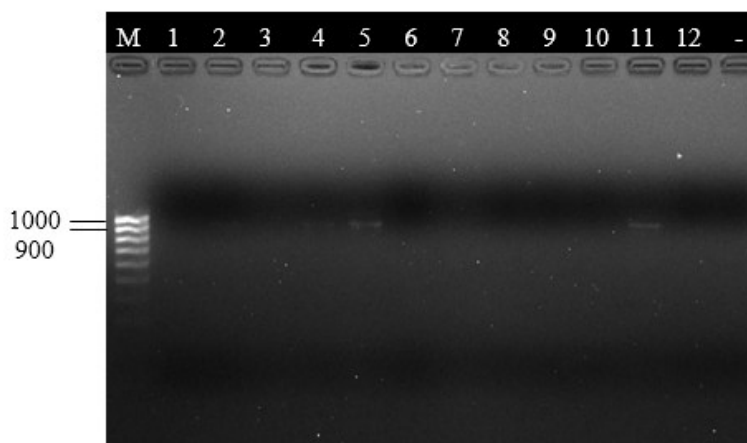
4. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch các giống dâu

Sản phẩm PCR với mỗi ITS có kích thước khoảng 600-700 bp, mỗi *matK* có kích thước khoảng 900-1000 bp, mỗi *atpF-atpH* có kích thước khoảng 900-800 bp, mỗi *psbK-psbI* có kích thước khoảng 400-500 bp, mỗi *rbcL* có kích thước khoảng 600-700 bp, mỗi *rpoC1* có kích thước khoảng 500-600 bp, mỗi *ycf1b* có kích thước khoảng 900-800 bp (Hình 11 – 17).



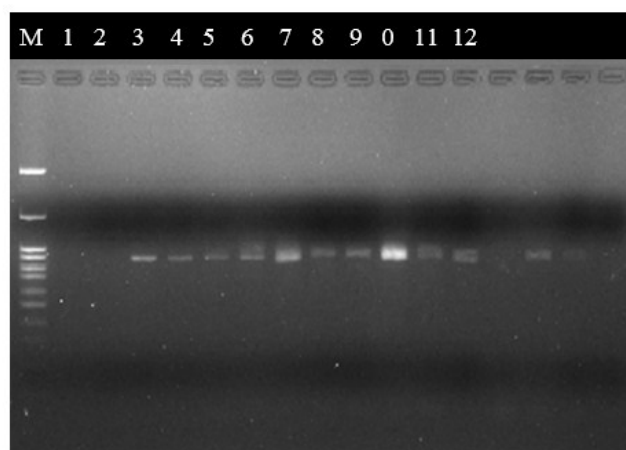
Hình 11. Kết quả điện di PCR với mỗi ITS

(1: DXAHG, 2: DDVX, 3: DXVX, 4: DHCVX, 5: CHCVX, 6: DXAVX, 7: CHCOM, 8: DDXOM1, 9: DDXOM2, 10: DXABT, 11: CHC9H, 12: DV9H)



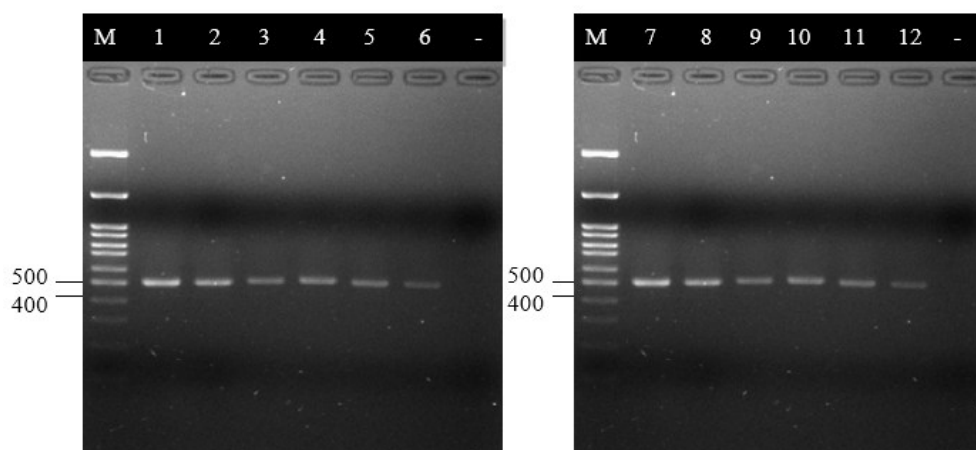
Hình 12. Kết quả điện di PCR với mỗi matK

(1: DXAHG, 2: DDVX, 3: DXVX, 4: DHCVX, 5: CHCVX, 6: DXAVX, 7: CHCOM, 8: DDXOM1, 9: DDXOM2, 10: DXABT, 11: CHC9H, 12: DV9H)



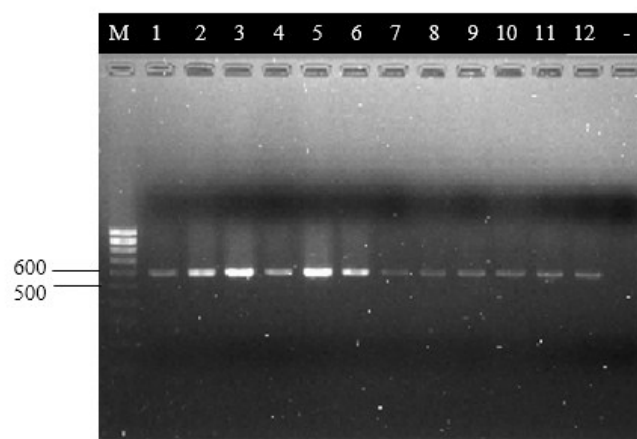
Hình 13. Kết quả điện di PCR với môi atpF-atpH

(1: *CHC9H*, 2: *DV9H* 3: *DXAHG*, 4: *DDVX*, 5: *DXVX*, 6: *DHCVX*, 7: *CHCVX*, 8: *DXAVX*, 9: *CHCOM*, 10: *DDXOM1*, 11: *DDXOM2*, 12: *DXABT*)



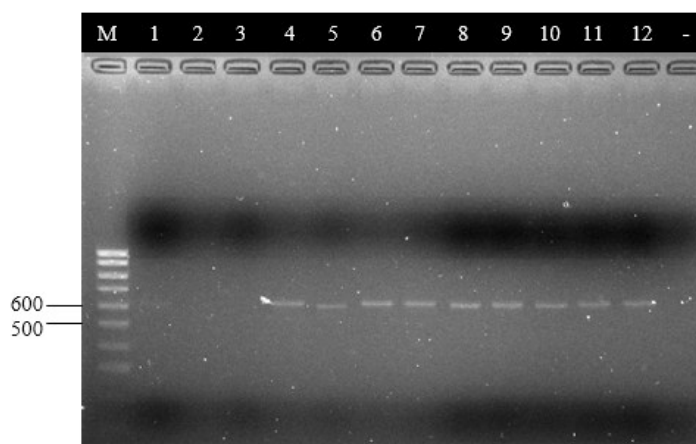
Hình 14. Kết quả điện di PCR với môi psbK-psbI

(1: *CHC9H*, 2: *DV9H* 3: *DXAHG*, 4: *DDVX*, 5: *DXVX*, 6: *DHCVX*, 7: *CHCVX*, 8: *DXAVX*, 9: *CHCOM*, 10: *DDXOM1*, 11: *DDXOM2*, 12: *DXABT*)



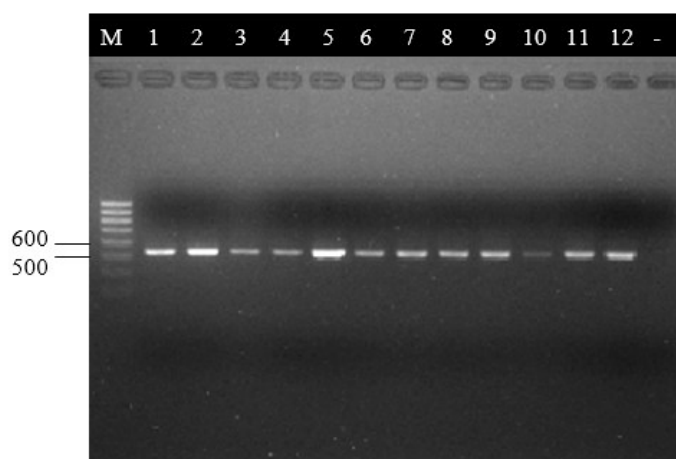
Hình 15. Kết quả điện di PCR với môi rbcL

(1: *DXAHG*, 2: *DDVX*, 3: *DXVX*, 4: *DHCVX*, 5: *CHCVX*, 6: *DXAVX*, 7: *CHCOM*, 8: *DDXOM1*, 9: *DDXOM2*, 10: *DXABT*, 11: *CHC9H*, 12: *DV9H*)



Hình 16. Kết quả điện di PCR với môi *trnH-psbA*

(1: *CHCOM*, 2: *DXABT*, 3: *DXVX*, 4: *DXAHG*, 5: *DDVX*, 6: *DHCVX*, 7: *CHCVX*, 8: *DXAVX*, 9: *DDXOM1*, 10: *DDXOM2*, 11: *CHC9H*, 12: *DV9H*)

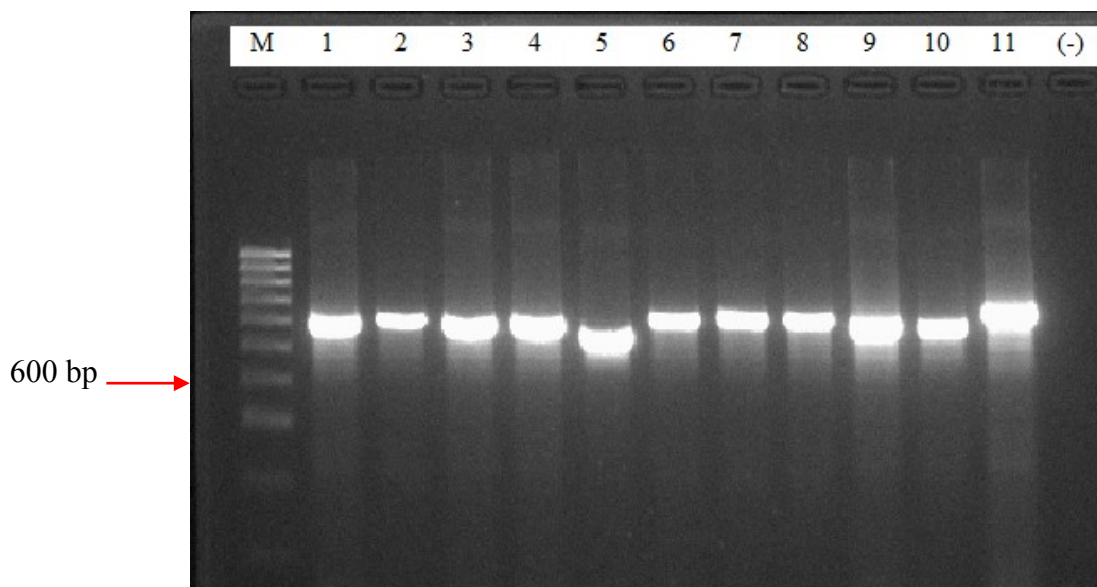


Hình 17. Kết quả điện di PCR với môi *rpoC1*

(1: *DXAHG*, 2: *DDVX*, 3: *DXVX*, 4: *DHCVX*, 5: *CHCVX*, 6: *DXAVX*, 7: *CHCOM*, 8: *DDXOM1*, 9: *DDXOM2*, 10: *DXABT*, 11: *CHC9H*, 12: *DV9H*)

5. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch các giống măng cầu

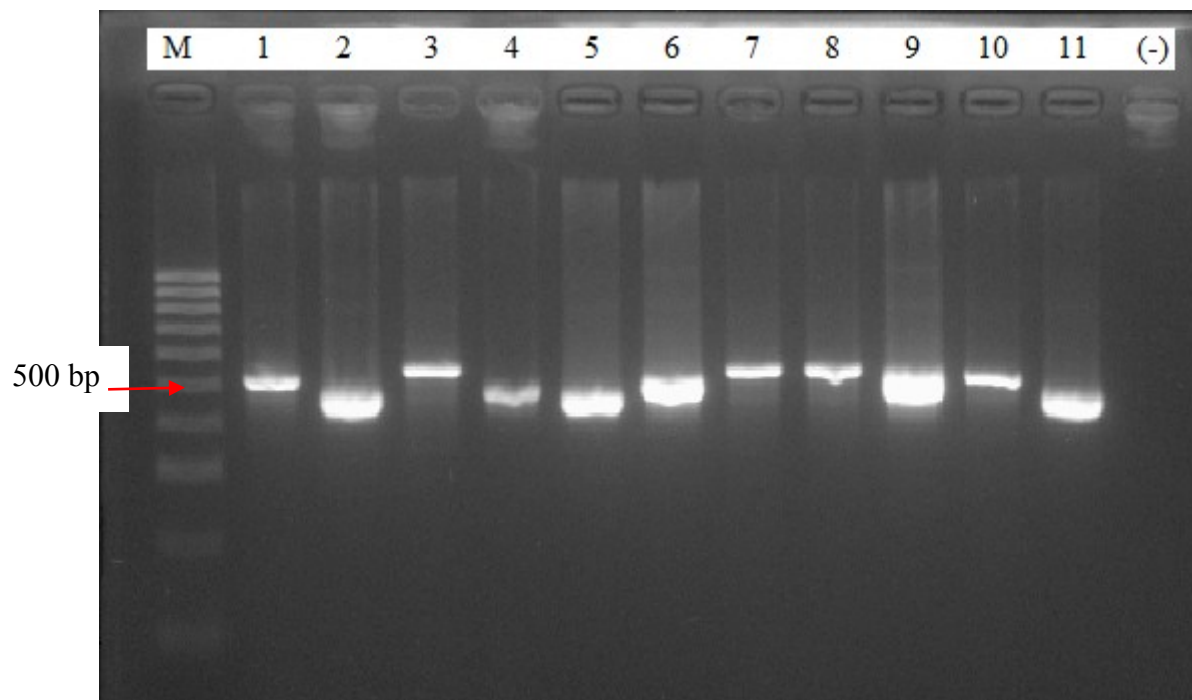
Kết quả khuếch đại vùng gen *rbcL* được kiểm tra trên gel agarose 2% với thang chuẩn 100 bp (Hình 18) cho kết quả các băng DNA rõ nét và sáng. So sánh kích thước băng sản phẩm PCR với kích thước băng trên thang chuẩn cho thấy đoạn gen *rbcL* có kích thước khoảng 550 – 600 bp.



Hình 18. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại vùng gen *rbcL*

M. Thang chuẩn 100 bp, 1. Bình bát (Long Mỹ), 2. Mãng cầu ta (Long Mỹ), 3. Na (Long Mỹ), 4. Mãng cầu ta (Cần Thơ), 5. Na (Cần Thơ), 6. Bình bát (Cần Thơ), 7. Mãng cầu Xiêm (Vĩnh Long), 8. Mãng cầu Xiêm (Ngã Bảy), 9. Na Đài Loan (Ngã Bảy), 10. Mãng cầu Xiêm (Phụng Hiệp), 11. Na Đài Loan (Hiệp Thành), (-). Đối chứng âm

Vùng gen *rpoC1* cho kết quả các băng DNA rõ nét và sáng. So sánh kích thước băng sản phẩm PCR với kích thước băng trên thang chuẩn cho thấy đoạn gen *rpoC1* có kích thước khoảng 500 – 550 bp.

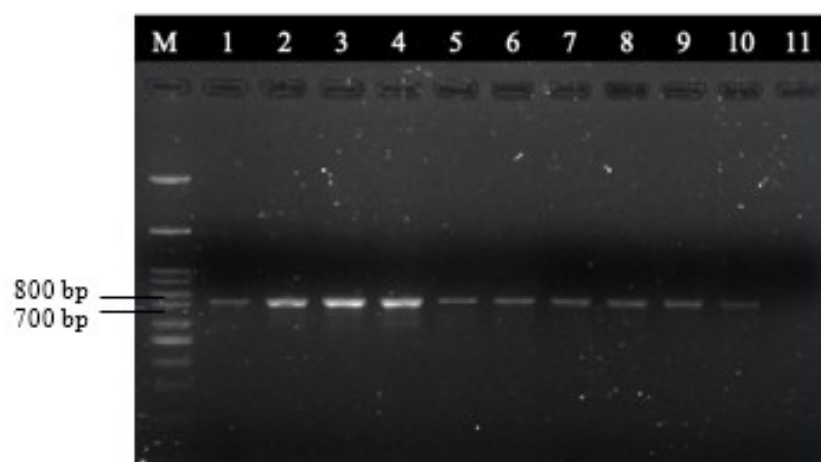


Hình 19. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại vùng trình tự *rpoC1*

M. Thang chuẩn 100 bp, 1. Bình bát (Long Mỹ), 2. Măng cầu ta (Long Mỹ), 3. Na (Long Mỹ), 4. Măng cầu ta (Cần Thơ), 5. Na (Cần Thơ), 6. Bình bát (Cần Thơ), 7. Măng cầu Xiêm (Vĩnh Long), 8. Măng cầu Xiêm (Ngã Bảy), 9. Na Đài Loan (Ngã Bảy), 10. Măng cầu Xiêm (Phụng Hiệp), 11. Na Đài Loan (Hiệp Thành), (-). Đối chứng âm

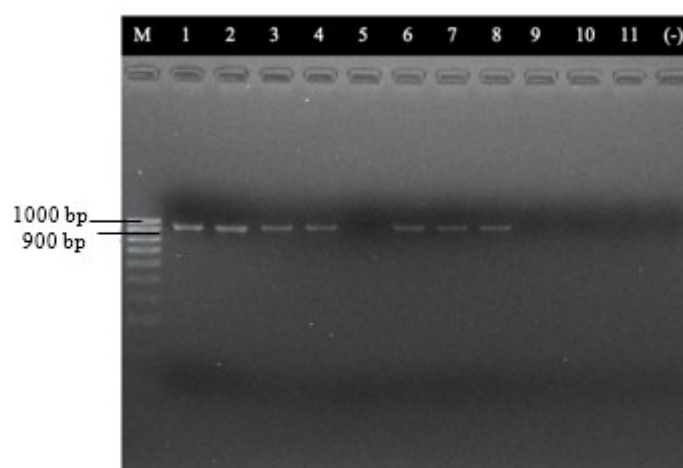
6. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch các giống quýt

Cặp mồi được sử dụng trong phản ứng PCR tại vùng trình tự ITS là ITS1 và ITS4 (White *et al.*, 1990). So sánh kích thước băng trên gel với thang chuẩn cho thấy sản phẩm PCR với mồi ITS có kích thước khoảng 700 - 800 bp (Hình 20), mồi *matK* có kích thước khoảng 900 - 950 bp (Hình 21). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Bá Phú (2011) khi thực hiện với giống quýt đường không hạt. sản phẩm PCR với mồi *atpF-atpH* có kích thước khoảng 500 - 550 bp (Hình 22). Theo Vijayan and Tsou (2010) với cặp mồi *atpF* và *atpH*, chiều dài trình tự khuếch đại chất lượng tốt nhất ở độ dài trong khoảng 196 - 573 bp. Sản phẩm PCR với mồi *psbK-psbI* có kích thước khoảng 450 - 500 bp (Hình 23), mồi *rbcL* có kích thước khoảng 500 - 600 bp (Hình 24). Hai cặp mồi xuôi ngược *rbcL-aF* và *rbcL-aR* được sử dụng theo nghiên cứu của Kress *et al.* (2009). Kết quả cho thấy kích thước khuếch đại này phù hợp với chiều dài lý thuyết là 550 - 600 bp, mồi *rpoC1* có kích thước khoảng 500 - 600 bp (Hình 25). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chen *et al.*, (2016), mồi *yef1b* có kích thước khoảng 800 - 900 bp (Hình 52), tương ứng với công bố của Van de Wiel *et al.*, (2009).



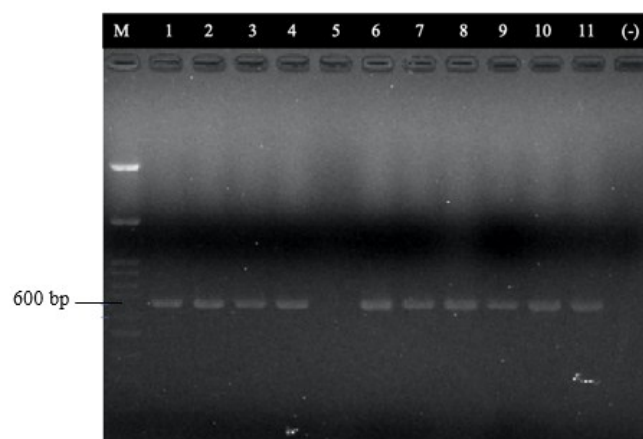
Hình 20. Kết quả điện di PCR với môi ITS

1. *QHLH* (DT), 2. *QHVT* (DT), 3. *QHTT* (DT), 4. *QHTP* (DT), 5. *QDDT*, 6. *QHPD* (CT)
7. *QHVX* (CT), 8. *QHCR* (CT), 9. *QDCT*, 10. *QDCG* (TG), 11. *QDCB* (TG)



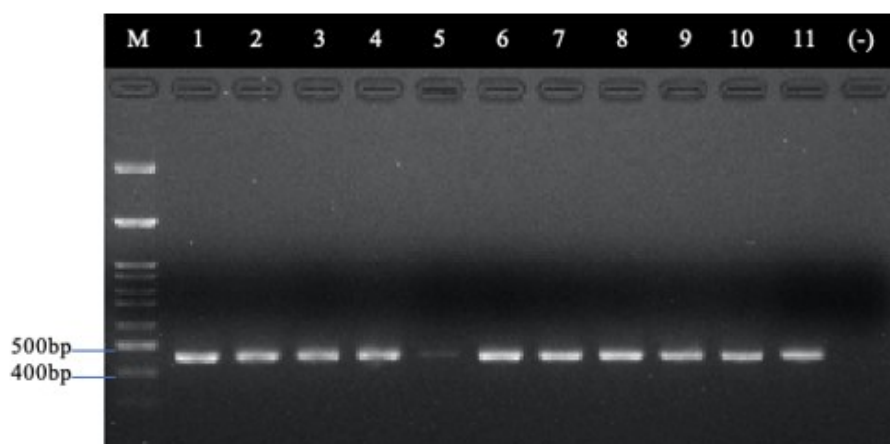
Hình 21 Kết quả điện di PCR với môi matK

1. *QHLH* (DT), 2. *QHVT* (DT), 3. *QHTT* (DT), 4. *QHTP* (DT), 5. *QDDT*, 6. *QHPD* (CT)
7. *QHVX* (CT), 8. *QHCR* (CT), 9. *QDCT*, 10. *QDCG* (TG), 11. *QDCB* (TG)



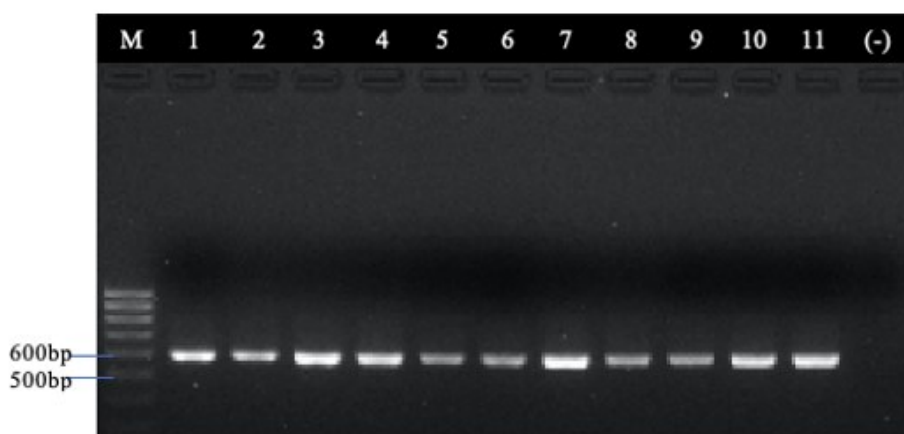
Hình 22. Kết quả điện di PCR với môi atpF-atpH

1. *QHLH* (DT), 2. *QHVT* (DT), 3. *QHTT* (DT), 4. *QHTP* (DT), 5. *QDDT*, 6. *QHPD* (CT)
7. *QHVX* (CT), 8. *QHCR* (CT), 9. *QDCT*, 10. *QDCG* (TG), 11. *QDCB* (TG)



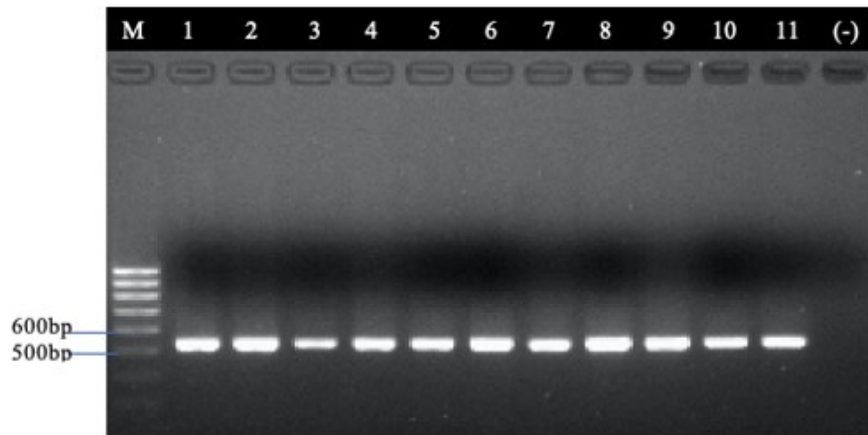
Hình 23. Kết quả điện di PCR với môi *psbK-psbI*

1. *QHLH* (DT), 2. *QHVT* (DT), 3. *QHTT* (DT), 4. *QHTP* (DT), 5. *QDDT*, 6. *QHPD* (CT)
7. *QHVX* (CT), 8. *QHCR* (CT), 9. *QDCT*, 10. *QDCG* (TG), 11. *QDCB* (TG)



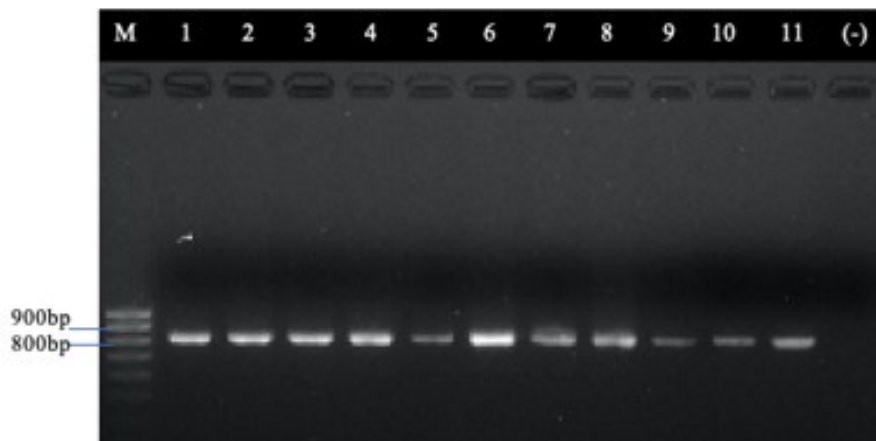
Hình 24. Kết quả điện di PCR với môi *rbcL*

1. *QHLH* (DT), 2. *QHVT* (DT), 3. *QHTT* (DT), 4. *QHTP* (DT), 5. *QDDT*, 6. *QHPD* (CT), 7. *QHVX* (CT), 8. *QHCR* (CT), 9. *QDCT*, 10. *QDCG* (TG), 11. *QDCB* (TG)



Hình 25. Kết quả điện di PCR với môi rpoC1

1. *QHLH (DT)*, 2. *QHVT (DT)*, 3. *QHTT (DT)*, 4. *QHTP (DT)*, 5. *QDDT*, 6. *QHPD (CT)*, 7. *QHVX (CT)*, 8. *QHCR (CT)*, 9. *QDCT*, 10. *QDCG (TG)*, 11. *QDCB (TG)*



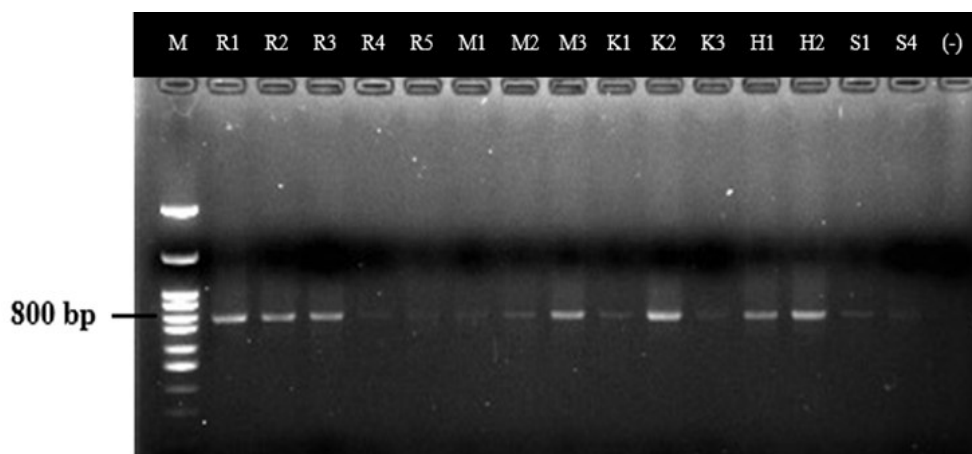
Hình 26. Kết quả điện di PCR với môi ycf1b

1. *QHLH (DT)*, 2. *QHVT (DT)*, 3. *QHTT (DT)*, 4. *QHTP (DT)*, 5. *QDDT*, 6. *QHPD (CT)*, 7. *QHVX (CT)*, 8. *QHCR (CT)*, 9. *QDCT*, 10. *QDCG (TG)*, 11. *QDCB (TG)*

7. Kết quả khuếch đại vùng trình tự DNA mã vạch các giống sầu riêng

Kết quả PCR các mẫu với môi ITS được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% cho thấy đa số các băng DNA xuất hiện rõ nét, không có băng phụ chứng tỏ môi được dùng để khuếch đại được thiết kế đặc hiệu. Mẫu đối chứng dương cho băng rõ nét, có kích thước bằng với các băng được khuếch đại, đối chứng âm không có băng xuất hiện chứng tỏ mẫu không bị ngoại nhiễm. So sánh với kích thước băng trên thang chuẩn 3 kb cho thấy đoạn gen ITS có kích thước

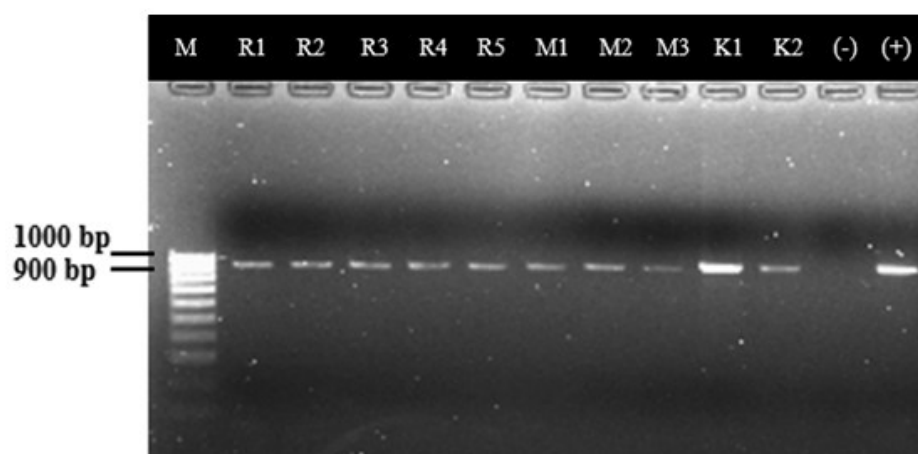
khoảng 800 bp (Hình 27). Các sản phẩm còn lại cho kết quả hiển thị tốt trên gel có băng sáng rõ đủ điều kiện đã được gửi giải trình tự.



Hình 27. Kết quả khuếch đại vùng ITS

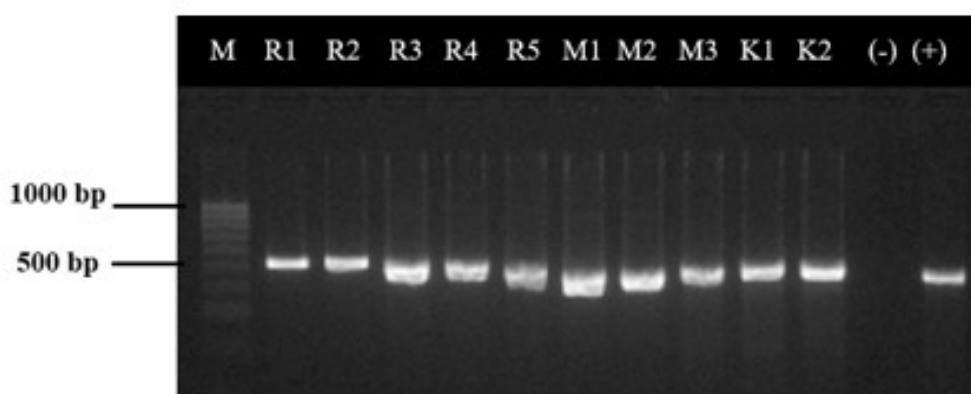
M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), K3. Khổ Qua Xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa Hạt Lép (Bến Tre), S4. Sữa Hạt Lép (Cần thơ) (-). Đối chứng âm.

Kết quả điện di sản phẩm PCR với môi *matK* được kiểm tra trên gel agarose 2% với thang chuẩn 1 kb cho thấy các băng DNA được khuếch đại cho kết quả rõ nét, kích thước đồng đều giữa các mẫu, không xuất hiện băng phụ chứng tỏ môi được thiết kế có tính đặc hiệu để DNA bắt được và nhân bản với các trình tự của sâu riêng. So sánh với kích thước băng chuẩn cho thấy sản phẩm có kích thước khoảng 900 bp (Hình 28). Trong đó có hai mẫu không xuất hiện băng là 11 và 16 đã được kiểm tra lại. Mẫu đối chứng dương có băng rõ nét, kích thước bằng với các băng được khuếch đại. Đối chứng âm không xuất hiện băng chứng tỏ mẫu không bị nhiễm, hóa chất sử dụng và điều kiện cho phản ứng PCR hoàn toàn bình thường và phù hợp cho phản ứng. Các sản phẩm cho kết quả hiển thị tốt trên gel có băng sáng rõ đủ điều kiện đã được gửi giải trình tự. So sánh với kích thước băng trên thang chuẩn cho thấy đoạn trình tự *rpoC1* khuếch đại được có kích thước khoảng 500 bp (Hình 29).



Hình 28. Kết quả khuếch đại gen matK

M. Thang chuẩn 1 kb, M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), (-). Đối chứng âm, (+). Đối chứng dương.



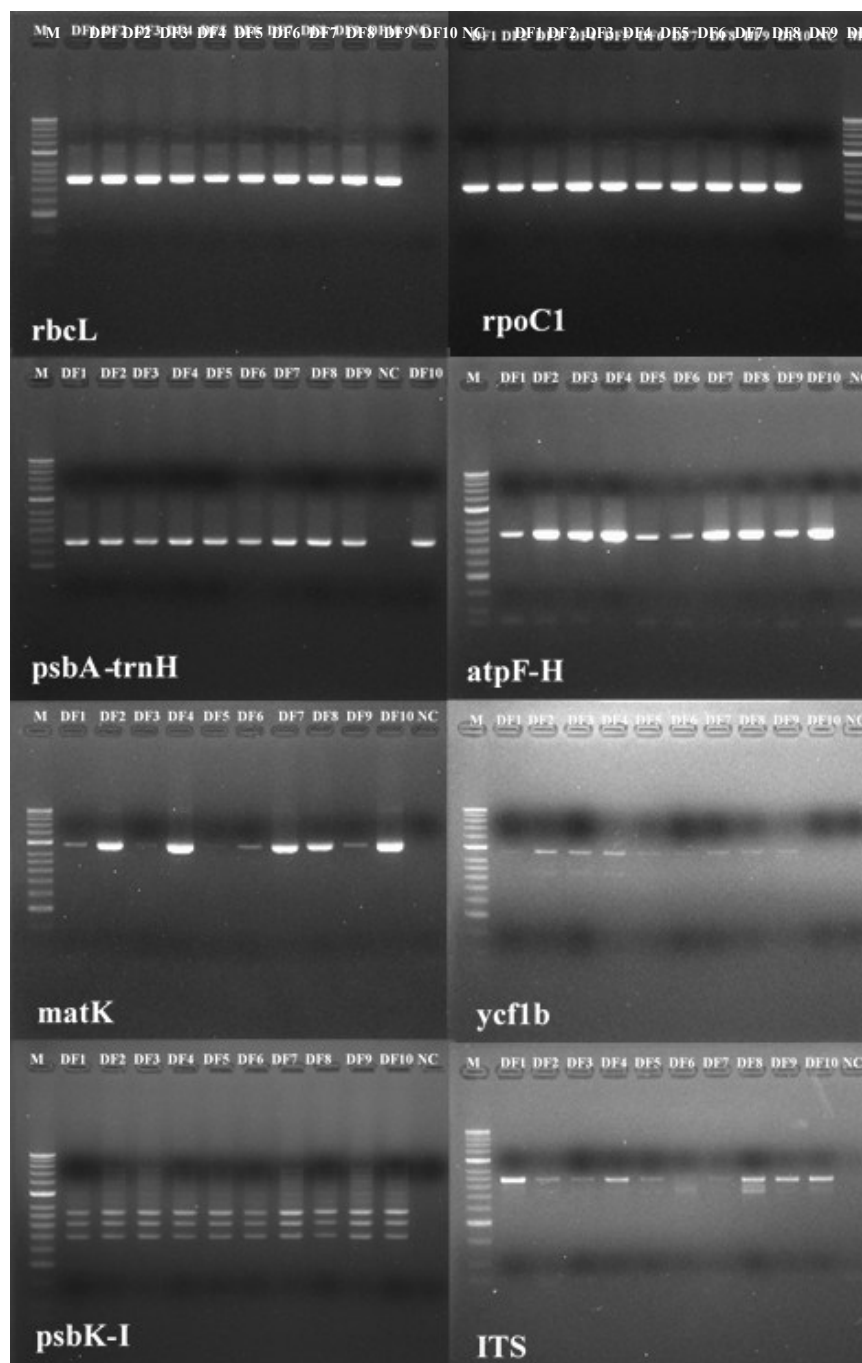
Hình 29. Kết quả khuếch đại vùng gen rpoC1

M. Thang chuẩn 1 kb, R1. Ri-6 (Vĩnh Long), R2. Ri-6 (Tiền Giang), R3. Ri-6 (Bến Tre), R4. Ri-6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ Qua Xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ Qua Xanh (Bến Tre), (-). Đối chứng âm, (+). Đối chứng dương.

8. Kết quả khuếch đại các trình tự DNA mã vạch các giống thanh long

Các trình tự DNA mã vạch bao gồm 4 gene mã hóa protein là *ycf1b*, *rbcL*, *rpoC1* và *matK*, nhóm không mã hóa gồm 3 trình tự *atpF-H*, *psbA-trnH* *psbK-I* và vùng ITS trong bộ gene nhân đã được khuếch đại. Thông qua độ sáng của sản

phẩm PCR trên gel agarose (Hình 30), cho thấy gen *rpoC1*, *rbcL* và 2 vùng *atpF-H*, *psbA-trnH* đạt hiệu quả khuếch đại cao. Băng điện di của gen *matK* và *ycf1b* có độ sáng kém hơn nhưng vẫn có thể quan sát rõ trên gel. Các trình tự *rpoC1*, *rbcL*, *atpF-H*, *psbA-trnH* và *matK* chỉ xuất hiện 1 băng duy nhất phản ánh tính đặc hiệu của mỗi trình tự trong quá trình PCR. Mẫu đối chứng âm không xuất hiện băng đảm bảo không xảy ra ngoại nhiễm trong quá trình PCR. Do đó, 5 vùng trên được sử dụng để giải trình tự và phân tích hiệu quả nhận diện loài trong nội dung nghiên cứu tiếp theo.

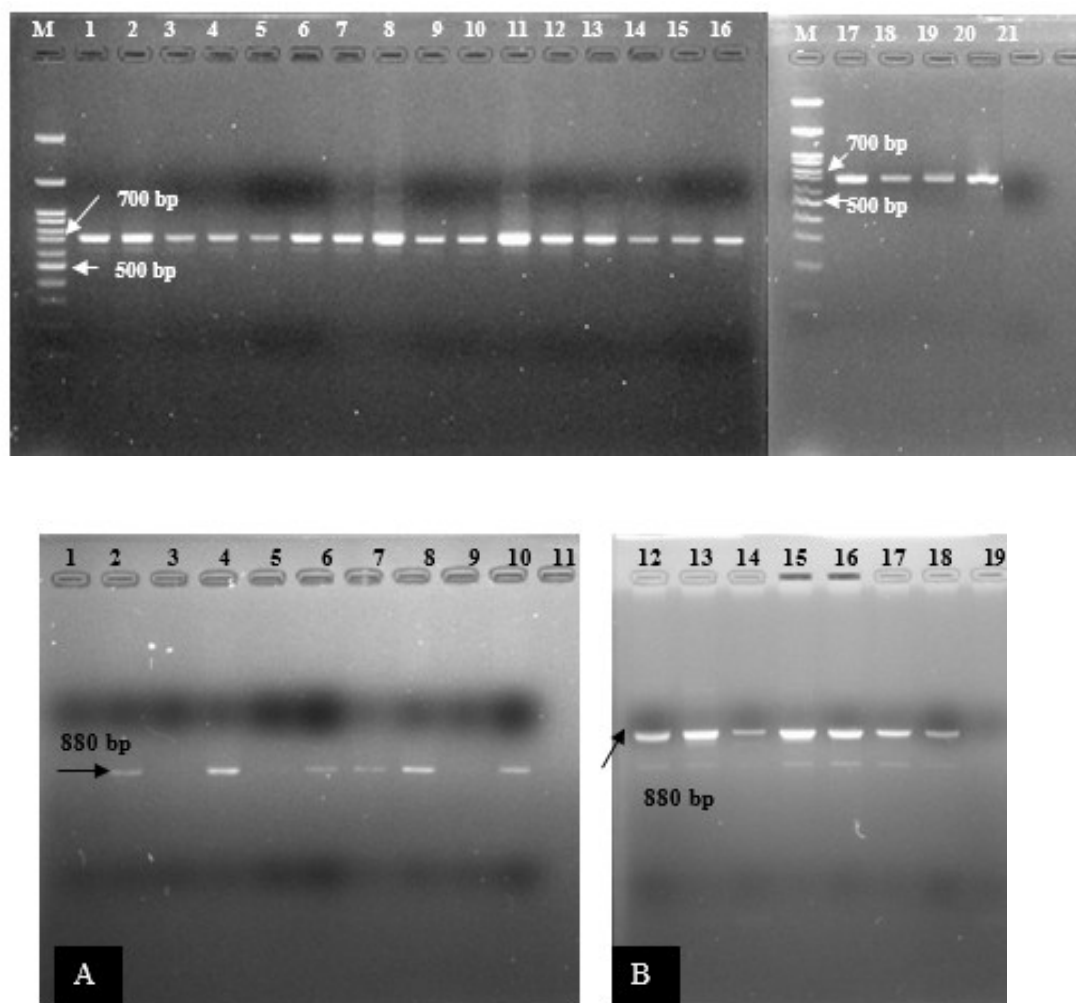


Hình 30. Phổ điện di 8 trình tự DNA mã vạch

M – Thang DNA chuẩn 50 bp hyperladder (Bioline, Anh); DF1 – Thanh long ruột đỏ, Viện cây ăn quả miền Nam, DF2 – Thanh long ruột đỏ, Bến Tre; DF3 – Thanh long ruột đỏ, Cà Mau; DF4 – Thanh long ruột đỏ, Cà Mau (trái tròn); DF5 – Thanh long ruột tím hồng, Tiền Giang; DF6 – Thanh long ruột trắng, Bến Tre; DF7 – Thanh long ruột trắng, Cà Mau; DF8 – Thanh long vỏ vàng ruột trắng, Đồng Tháp; DF9 – Thanh long vỏ vàng ruột trắng, Tiền Giang; DF10 – Thanh long mọc hoang, An Giang; NC – Negative control (đối chứng âm).

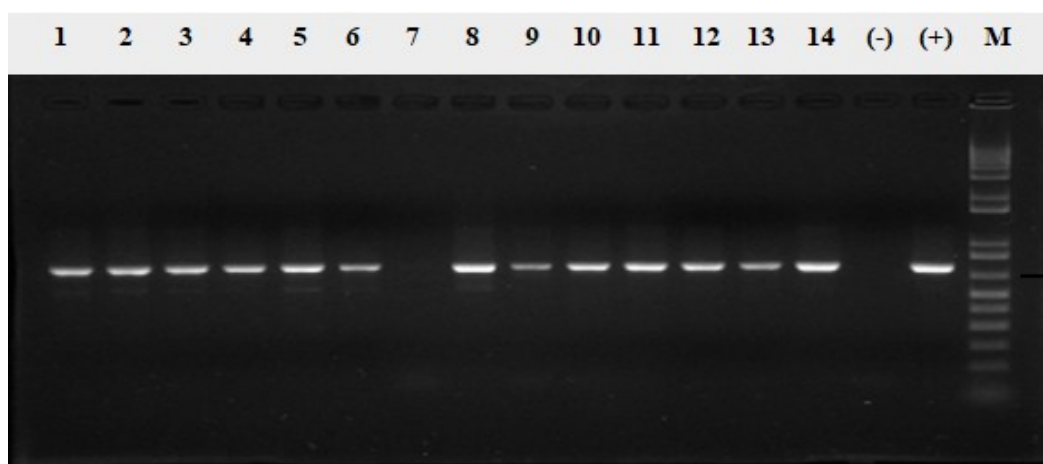
9. Kết quả PCR các vùng gen các giống vú sữa

Các mẫu nghiên cứu được khuếch đại trên tám vùng gen ITS, *matK*, *rbcL*, *atpF-atpH*, *ycf1b*, *rpoC1*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA*. Sau khi điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2% kết quả cho thấy đa số các mẫu có băng sáng, rõ. Kích thước sản phẩm của các vùng khoảng: ITS 700 bp, *matK* 900 bp, *rbcL* 650 bp, *atpF-atpH* 660 bp, *ycf1b* 900 bp, *psbI-psbK* 480 bp, *rpoC1* 550 bp, *trnH-psbA* 650 bp khi so với thang chuẩn 100 bp (Hình 31).



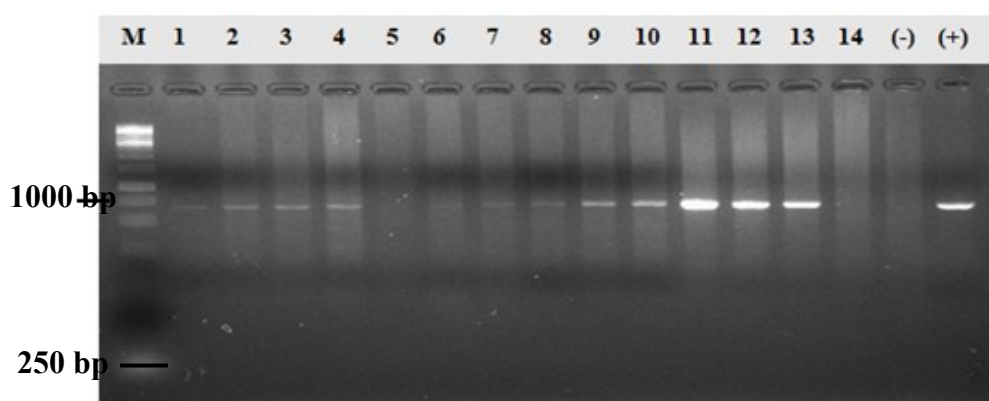
Hình 31. Kết quả giải trình tự các sản phẩm PCR vùng trình tự ITS và *matK*

Giếng M: thang chuẩn 100bp; giếng 1: đối chứng dương; giếng 2: S1; giếng 3: S2; giếng 4: S3; giếng 5: S4; giếng 6: S5; giếng 7: S6; giếng 8: S7; giếng 9: S8; giếng 10: S19; giếng 11: S10; giếng 12: S11; giếng 13: S12; giếng 14: S13; giếng 15: S14; giếng 16: S15; giếng 17: S16; giếng 18: S17; giếng 19: S18; giếng 20: S19; giếng 20: đối chứng âm



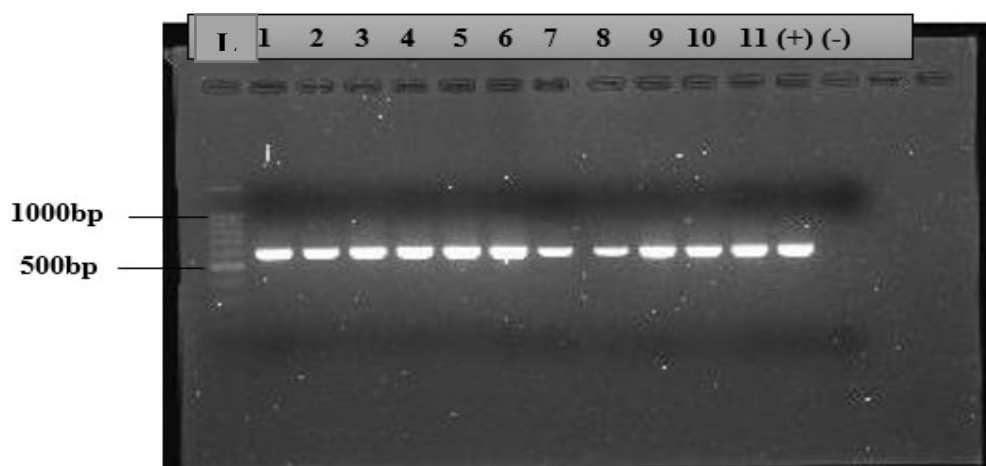
Hình 32. Kết quả điện di mẫu PCR với mồi ITS

1 *X.Hòa Lộc (Tiền Giang)*, 2. *X.Đài Loan (Tiền Giang)*, 3. *X.Đài Loan đỏ (Tiền Giang)*, 4. *X.Cát Chu (Tiền Giang)*, 5. *X.Ghép (Tiền Giang)*, 6. *X.Thanh Ca (Tiền Giang)*, 7. *X.Thơm (Tiền Giang)*, 8. *X.Châu (Tiền Giang)*, 9. *X.Bưởi (Cần Thơ)*, 10. *X.Lai (Tiền Giang)*, 11. *X.Úc (Cần Thơ)*, 12. *X.Úc (Vĩnh Long)* 13. *X.Đá (Tiền Giang)*, 14. *X.Ừ (Tiền Giang)*, (-).Đối chứng âm, (+).Đối chứng dương, M.Thang chuẩn 1kb.



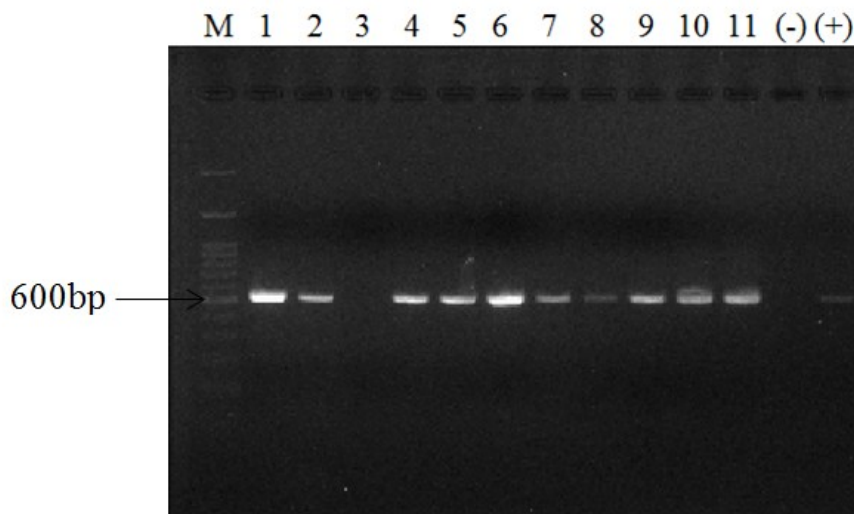
Hình 33. Kết quả điện di mẫu PCR với mồi matK (gel 5)

M.Thang chuẩn 1kb, 1.*Bưởi (NK-Cần Thơ)*, 2.*Hòa Lộc (Cần Thơ)*, 3.*Tứ Quý (NK-Cần Thơ)*, 4.*Hòa Lộc (Bến Tre)*, 5.*Keo (An Giang)*, 6.*Bưởi (An Giang)*, 7.*Tứ Quý (An Giang)*, 8.*Hòa Lộc (An Giang)*, 9.*Đu Đủ (An Giang)*, 10.*Đài Loan (An Giang)*, 11.*Hòa Lộc (Tiền Giang)*, 12.*Đài Loan (Tiền Giang)*, 13.*Cát Chu (Tiền Giang)*, 14.*Thơm (Tiền Giang)*, (-).Đối chứng âm, (+).Đối chứng dương.



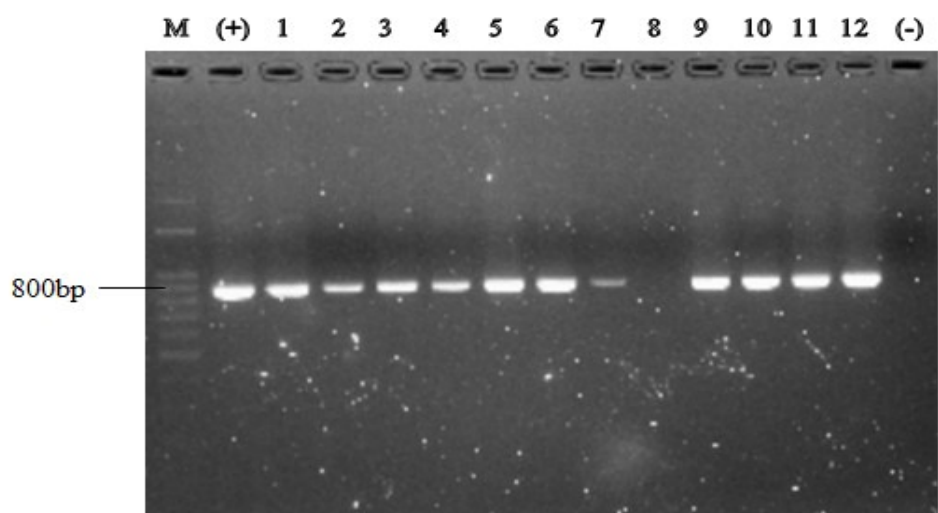
Hình 34. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen rbcL

L.Thang chuẩn 100bp; **1.**xoài Đài Loan xanh (TG); **2.**xoài cát Hòa Lộc (TG); **3.**xoài Thom (TG); **4.**xoài cát Chu (TG); **5.**xoài Thanh Ca (TG); **6.**xoài Úc (Cờ Đỏ-CT); **7.**xoài cát Hòa Lộc (Ninh Kiều-CT)); **8.**xoài cát Hòa Lộc (AG); **9.**xoài cát Hòa Lộc (BT); **10.**xoài cát Hòa Lộc (VCAQMN); **11.**xoài Ngọc Vân (VCAQMN); **(+).**đối chứng dương (sầu riêng Ri6); **(-).**đối chứng âm.



Hình 35. Kết quả điện di mẫu PCR với môi rpoC1

1. Xoài Đài Loan (Tiền Giang), **2.** Cát Hòa Lộc (Tiền Giang), **3.** Xoài Thom (Tiền Giang), **4.** Cát Chu (Tiền Giang), **5.** Xoài Thanh Ca (Tiền Giang), **6.** Xoài Úc (Cần Thơ), **7.** Cát Hòa Lộc (Ninh Kiều), **8.** Cát Hòa Lộc (An Giang), **9.** Cát Hòa Lộc (Bến Tre), **10.** Cát Hòa Lộc (VCAQMN), **11.** Xoài Ngọc Vân (VCAQ), **12.**Đối chứng âm, **13.**Đối chứng dương, **M.**Thang chuẩn 100bp.



Hình 36. Kết quả điện di mẫu PCR với môi ycf1b

M.Thang chuẩn 100 bp, 1. Xoài Đài Loan (Tiền Giang), 2. Xoài cát Hòa Lộc (Tiền Giang), 3. Xoài Thơm (Tiền Giang), 4. Xoài Cát Chu (Tiền Giang), 5. Xoài Thanh Ca (Tiền Giang), 6. Xoài Úc (Cần Thơ), 7. Xoài cát Hòa Lộc (Cần Thơ), 8. Xoài Tír Quýy (Ninh Kiều) 9.Xoài cát Hòa Lộc (An Giang), 10. Xoài cát Hòa Lộc (Bến Tre), 11. Xoài cát Hòa Lộc (VCAQMN), 12. Xoài Ngọc Vân (VCAQ),(+). Đối chứng dương,(-). Đối chứng âm.