

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ISSR (INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT) ĐỂ ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÂY CHÔM CHÔM (*Nephelium lappaceum* L.)

Phan Thị Thu Hiền¹

TÓM TẮT

Cây chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) là loại cây ăn quả nhiệt đới có hương vị thơm ngon, giàu vitamin và khoáng chất. Nghiên cứu này đã sử dụng 3 môi ISSR 03, ISSR 22 và ISSR 31 để đánh giá sự đa dạng di truyền của 15 mẫu giống chôm chôm. Kết quả điện di cho thấy, mỗi ISSR 03 có 7 băng đa hình (chiếm 77,7%) trên 9 băng được khuếch đại; mỗi ISSR 22 có 4 băng đa hình, chiếm 50% tổng số băng được khuếch đại và mỗi ISSR 31 có 5 băng đa hình (chiếm 71,42%) trên tổng 7 băng được khuếch đại. Tổng hợp kết quả phân tích đa hình đã thu được 24 băng ADN được khuếch đại, trong đó có 16 băng đa hình, chiếm 66,6% tổng số băng khuếch đại. Kết quả xây dựng giản đồ phân nhánh UPGMA với 3 chỉ thị ISSR cho thấy, mức độ tương đồng của các mẫu dao động trong phạm vi 0,75 - 0,96, cho thấy sự tương đồng di truyền khá cao giữa các mẫu giống nghiên cứu. Phân tích kết hợp cả 3 chỉ thị ISSR 03, ISSR 22 và ISSR 31 có thể giúp phân biệt được các mẫu giống chôm chôm trong nghiên cứu. Kết quả của nghiên cứu này góp phần khẳng định thêm ý nghĩa của chỉ thị ISSR trong nghiên cứu đa dạng di truyền, nhận biết giống cây trồng nói chung và cây chôm chôm nói riêng tại Việt Nam.

Từ khóa: *Nephelium lappaceum* L., ISSR, đa dạng di truyền.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chôm chôm (*Nephelium lappaceum* L.) là một loại trái cây nhiệt đới thuộc họ Sapindaceae - Bò Hòn, là một loại trái cây có nguồn gốc từ Malaysia, có tên bắt nguồn từ tiếng Malay “Rambut” có nghĩa là “Hair” (tóc), liên quan đến những chiếc gai mềm bao phủ bề mặt trái cây. Quả chôm chôm có hình trứng với vỏ màu đỏ hoặc vàng. Quả được bao phủ bởi những chiếc gai mềm có màu sắc khác nhau từ vàng đến đỏ hoặc xanh lá cây [4]. Cây có chiều cao trung bình với những chiếc lá thường xanh mọc từ 12-20 m. Lá rộng 5 - 15 cm và dài 10 - 30 cm, lá đơn, phiến lá hình trái xoan, đầu và đuôi lá nhọn, mọc cách. Lá nhỏ màu xanh non, khi già xanh đậm [4].

Hiện nay, việc áp dụng các chỉ thị phân tử vào việc phân tích đa dạng đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới. Trong các loại chỉ thị phân tử thường được sử dụng, chuỗi lặp lại đơn giản giữa (ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat) thường được sử dụng để đánh giá sự sai khác di truyền ở thực vật. Kỹ thuật ISSR được sử dụng khá rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền, nghiên cứu đặc điểm di truyền trong

quần thể, lấy dấu di truyền, đánh dấu gen, xác định cây trồng, phân tích nguồn gốc, xác định sự thay đổi genome và đánh giá con lai [6].

Andi và cs (2018) đã sử dụng 6 trong 31 đoạn môi ISSR để đánh giá đặc tính di truyền của chôm chôm gồm có ISSR 1, ISSR 5, ISSR 10, ISSR 15, ISSR 23, UBC 807. Mức độ tương đồng về chỉ số giữa các giống chôm chôm từ dữ liệu ISSR của các nghiên cứu trên thế giới dao động từ 48-93%, do vậy chỉ thị ISSR có tiềm năng trong việc xác định đặc tính của cây chôm chôm [1]. Chỉ thị ISSR cũng được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền đối với những loài cây trồng khác. Mahdi Hadipour và cs (2020) [5] đã đánh giá sự đa dạng di truyền của cây Anh túc (*Papaver bracteatum* L.) bằng cách sử dụng phương pháp AFLP và ISSR (ISSR 1, ISSR 6, ISSR 9, ISSR 13, ISSR 23, ISSR 27, ISSR 30). Ứng dụng ISSR phát hiện biến dị di truyền cũng được sử dụng rộng rãi trong giai đoạn đầu của những nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng như *Cucumis* spp., *Cicer arietinum* [3] và *Sorghum bicolor* [2].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

15 mẫu thuộc 4 giống chôm chôm Nhân, chôm chôm Java, chôm chôm Thái và chôm chôm được thu

¹ Khoa Sinh - KTN, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2
Email: phanthithuhien@hpu2.edu.vn

mẫu ở các tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long, Hậu (khoảng thứ 3, 4 từ các đợt non), các lá thu được đảm Giang và thành phố Cần Thơ. Chọn các lá lựa bảo không có sâu, bệnh.

Bảng 1. Danh sách các mẫu giống chôm chôm được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu mẫu giống	Tên mẫu giống	Tên giống	Địa điểm thu thập
1	PT	Thái Phong Điền	Chôm chôm Thái	Vườn trái cây 9 Hồng, Phong Điền, Cần Thơ
2	PN	Nhân Phong Điền	Chôm chôm Nhân	
3	PJ	Java Phong Điền	Chôm chôm Java	
4	Pt	ta Phong Điền	Chôm chôm Ta	
5	VT	Thái Vĩnh Long	Chôm chôm Thái	Long Hồ, Vĩnh Long
6	VN	Nhân Vĩnh Long	Chôm chôm Nhân	
7	VJ	Java Vĩnh Long	Chôm chôm Java	
8	HT	Thái Hậu Giang	Chôm chôm Thái	Vườn chôm chôm 9 Hùng, Ngã Bảy, Hậu Giang
9	HN	Nhân Hậu Giang	Chôm chôm Nhân	
10	HJ	Java Hậu Giang	Chôm chôm Java	
11	BT	Thái Bến Tre	Chôm chôm Thái	Chợ Lách, Bến Tre
12	BN	Nhân Bến Tre	Chôm chôm Nhân	
13	BJ	Java Bến Tre	Chôm chôm Java	
14	TN	Nhân Tiền Giang	Chôm chôm Nhân	Vườn trái cây Chính Thương, Cai Lậy, Tiền Giang
15	Tt	ta Tiền Giang	Chôm chôm Ta	

2.2. Phương pháp

Chỉ thị phân tử ISSR

Mẫu lá chôm chôm của các giống được thu tại thực địa (Bảng 1), mẫu được đánh số thứ tự, ghi rõ nguồn gốc. Quy trình tách chiết ADN tổng số được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Rogers và Bendich (1988) (qui trình CTAB) có cải biến [8]. Phân tích kiểu gen bằng chỉ thị phân tử ISSR sử dụng 3 mồi theo trình tự trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Trình tự 3 mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')
ISSR 03	GAGAGAGAGAGAGAT
ISSR 22	TGTGTGTGTGTGTGCC
ISSR 31	AGAGAGAGAGAGAGT

Phản ứng PCR được tiến hành với thành phần thể hiện ở bảng 3 và chu trình nhiệt ở bảng 4. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 3% với sự hiện diện của Ethidium Bromide, hiệu điện thế U = 60 V. Kết quả điện di được chụp ảnh dưới đèn UV, các đoạn ADN khuếch đại sẽ được ghi nhận và phân tích.

Bảng 3. Thành phần của 1 phản ứng PCR với chỉ thị phân tử ISSR

Thành phần	Nồng độ cuối cùng	Thể tích (μL)
H ₂ O		12
Mồi ISSR	20 pmol/μl	1
Master Mix	2X	10
ADN tổng số	50 ng	2
Tổng thể tích 1 phản ứng		25

Bảng 4. Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR với chỉ thị phân tử ISSR

Trình tự khuếch đại	Nhiệt độ, thời gian biến tính ban đầu	40 chu kỳ			Nhiệt độ, thời gian kéo dài cuối cùng	Bảo quản
		Biến tính	Bắt cặp	Kéo dài		
ISSR	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	10°C
	4 phút	1 phút	45 giây	2 phút	7 phút	∞

Sản phẩm khuếch đại của chỉ thị phân tử ISSR của các giống chôm chôm được phân tích đa dạng di truyền bằng phần mềm NTSYSpc2.1

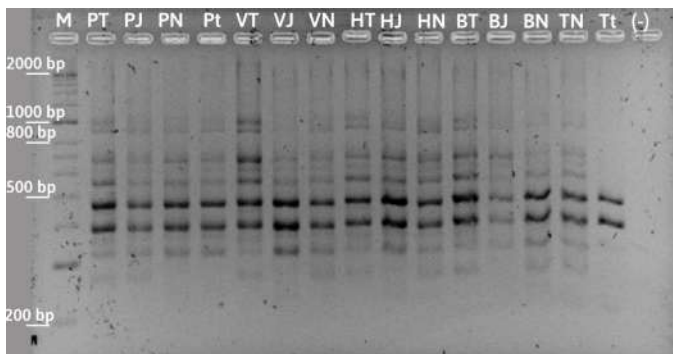
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả điện di và phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử ISSR

Kết quả điện di của các mẫu trên gel agarose 3% đều cho ra băng sáng, rõ đủ điều kiện để phân tích và xây dựng giản đồ phân nhánh giữa các giống chôm chôm. Tuy nhiên ở mỗi ISSR 31, hai mẫu PT và Tt không cho sản phẩm PCR, có thể do chất lượng ADN không đồng đều ảnh hưởng đến quá trình bắt cặp của mẫu. Do đó, nghiên cứu chỉ sử dụng 13 mẫu giống còn lại để phân tích đa dạng di truyền bằng phương pháp UPGMA.

Kết quả điện di cho thấy, mỗi ISSR 03 có 7 băng đa hình (chiếm 77,7%) trên 9 băng được khuếch đại. Mỗi ISSR 22 có 4 băng đa hình, chiếm 50% tổng số băng được khuếch đại. Mỗi ISSR 31 có 5 băng đa hình trên tổng 7 băng, số băng đa hình chiếm 71,42% trên tổng số băng được khuếch đại.

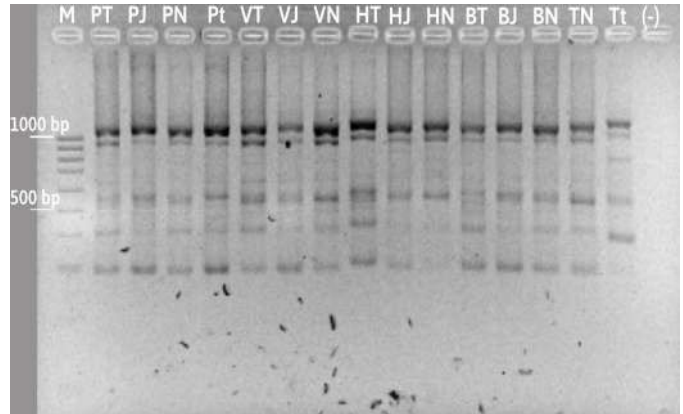
Kết quả phân tích trên 15 mẫu chôm chôm với 3 chỉ thị ISSR đã thu được tổng số 24 băng ADN được khuếch đại trong đó có 16 băng đa hình, chiếm 66,6% tổng số băng khuếch đại. Phân tích hình ảnh điện di có thể nhận thấy sự khác biệt khá rõ của mẫu giống chôm chôm ta Tiền Giang (Tt) so với các mẫu giống còn lại khi sử dụng chỉ thị ISSR 03 và ISSR 22, ISSR 31. Thêm vào đó, cả ba chỉ thị ISSR 03, ISSR 22 và ISSR 31 đều cho các băng ADN đặc trưng, cho phép phân biệt mẫu giống Thái Hậu Giang (HT) với các mẫu giống còn lại. Kết quả này góp phần khẳng định hiệu quả phân biệt, nhận biết các giống cây trồng của chỉ thị phân tử ISSR.



Hình 1. Kết quả điện di với mỗi ISSR 03

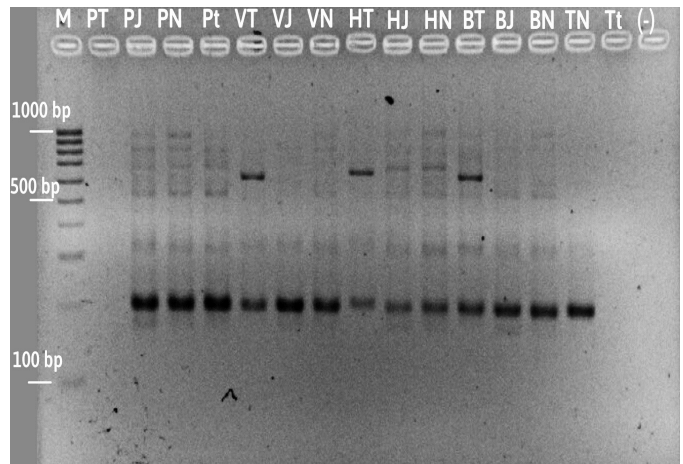
M: thang chuẩn 100 bp, PT: cc. Thái Phong Điền, PJ: cc. Java Phong Điền, PN: cc. Nhân Phong

Điền, Pt: cc. ta Phong Điền, VT: cc. Thái Vĩnh Long, VJ: cc. Java Vĩnh Long, VN: cc. Nhân Vĩnh Long, HT: cc. Thái Hậu Giang, HJ: cc. Java Hậu Giang, HN: cc. Nhân Hậu Giang, BT: cc. Thái Bến Tre, BJ: cc. Java Bến Tre, BN: cc. Nhân Bến Tre, TN: cc. Nhân Tiền Giang, Tt: cc. ta Tiền Giang



Hình 2. Kết quả điện di với mỗi ISSR 22

M: thang chuẩn 100 bp, PT: cc. Thái Phong Điền, PJ: cc. Java Phong Điền, PN: cc. Nhân Phong Điền, Pt: cc. ta Phong Điền, VT: cc. Thái Vĩnh Long, VJ: cc. Java Vĩnh Long, VN: cc. Nhân Vĩnh Long, HT: cc. Thái Hậu Giang, HJ: cc. Java Hậu Giang, HN: cc. Nhân Hậu Giang, BT: cc. Thái Bến Tre, BJ: cc. Java Bến Tre, BN: cc. Nhân Bến Tre, TN: cc. Nhân Tiền Giang, Tt: cc. ta Tiền Giang

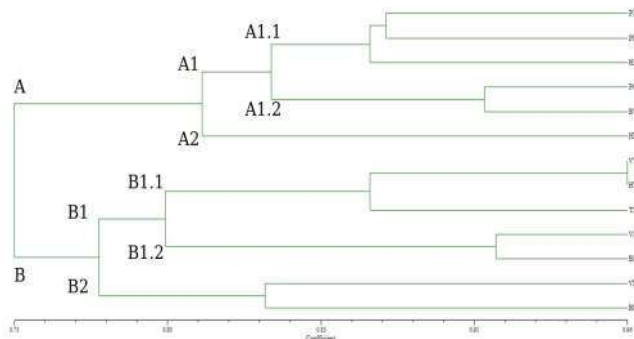


Hình 3. Kết quả điện di với mỗi ISSR 31

M: thang chuẩn 100 bp, PT: cc. Thái Phong Điền, PJ: cc. Java Phong Điền, PN: cc. Nhân Phong Điền, Pt: cc. ta Phong Điền, VT: cc. Thái Vĩnh Long, VJ: cc. Java Vĩnh Long, VN: cc. Nhân Vĩnh Long, HT: cc. Thái Hậu Giang, HJ: cc. Java Hậu Giang, HN: cc. Nhân Hậu Giang, BT: cc. Thái Bến Tre, BJ: cc. Java Bến Tre, BN: cc. Nhân Bến Tre, TN: cc. Nhân Tiền Giang, Tt: cc. ta Tiền Giang

3.2. Kết quả phân tích mối tương quan di truyền giữa 13 mẫu giống chôm chôm

Dữ liệu phân tích kết quả điện di với ba môi ISSR 03, ISSR 22, ISSR 31 được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc2.1 để xây dựng giản đồ phân nhánh thể hiện mối tương quan di truyền giữa 13 mẫu giống chôm chôm. Hai mẫu giống không sử dụng trong phân tích này là PT và Tt do không đủ kết quả phân tích chỉ thị ISSR.



Hình 4. Giản đồ phân nhánh của 13 giống chôm chôm bằng phương pháp UPGMA

PT: cc. Thái Phong Điền, PJ: cc. Java Phong Điền, PN: cc. Nhân Phong Điền, HJ: cc. Java Hậu Giang, Pt: cc. ta Phong Điền, BT: cc. Thái Bến Tre, HN: cc. Nhân Hậu Giang, VT: cc. Thái Vĩnh Long, HT: cc. Thái Hậu Giang, TN: cc. Nhân Tiền Giang, VJ: cc. Java Vĩnh Long, BJ: cc. Java Bến Tre, VN: cc. Nhân Vĩnh Long, BN: cc. Nhân Bến Tre

Kết quả xây dựng giản đồ phân nhánh UPGMA với 3 chỉ thị ISSR cho thấy, mức độ tương đồng của các mẫu dao động từ 0,75 - 0,96. Ở mức tương đồng 0,75 giản đồ được chia thành 2 nhóm A và B.

Nhóm A phân thành 2 nhóm phụ A1 và A2 (mẫu HN) có độ tương đồng 0,81 - 0,82. Trong nhóm A1 còn 2 phân nhánh nhỏ là A1.1 (PJ, PN và HJ) và nhánh A1.2 (mẫu Pt và BT).

Nhánh B cũng chia ra B1 và B2, ở nhánh B1.1 có mẫu chôm chôm Nhân Tiền Giang (TN) và hai mẫu giống chôm chôm Thái (VT, HT), trong đó hai mẫu giống Thái Vĩnh Long (VT) và Thái Hậu Giang (HT) có độ tương đồng di truyền cao nhất, lên đến 96%. Nhánh B1.2 có hai mẫu giống chôm chôm Java (VJ, BJ), có độ tương đồng di truyền ~92%. Nhánh B2 có hai mẫu giống chôm chôm Nhân với độ tương đồng ~83% (VN, BN). Giản đồ đã cho thấy sự đa dạng di truyền giữa các mẫu giống chôm chôm nghiên cứu, trong đó có thể nhận định được các mẫu thuộc giống

chôm chôm Nhân có sự đa dạng hơn cả về mặt di truyền so với các giống còn lại.

Manggabarani và cs (2018) đã phân tích tương đồng di truyền giữa 30 giống chôm chôm với chỉ thị phân tử ISSR và nhận định mức độ tương đồng di truyền giữa các mẫu giống dao động từ 0,48 - 0,93 [7]. Trong nghiên cứu này, độ tương đồng di truyền của 13 mẫu giống được phân tích dao động từ 0,75-0,96, cao hơn nghiên cứu của Manggabarani và cs (2018).

4. KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát đa hình ADN của 15 mẫu giống chôm chôm với ba chỉ thị ISSR 03, ISSR 22 và ISSR 31 đã thu được 16 băng ADN đa hình, chiếm 66,6% tổng số băng được khuếch đại. Một số mẫu giống cho băng ADN đặc trưng là mẫu giống ta Tiền Giang (Tt) và Thái Hậu Giang (HT), có thể dễ dàng phân biệt với các mẫu giống còn lại khi sử dụng kết hợp cả 3 chỉ thị ISSR.

Kết quả phân tích giản đồ phân nhánh di truyền dựa vào chỉ thị phân tử ISSR cho thấy 13 mẫu giống chôm chôm có độ tương đồng di truyền khá cao, dao động từ 0,75 - 0,96, trong đó các mẫu giống chôm chôm Thái có độ tương đồng di truyền cao nhất và các mẫu thuộc giống chôm chôm Nhân có sự đa dạng hơn cả về mặt di truyền so với các giống còn lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andi, M. M., Tatik, C., Alex, H. (2018). Characterization of Rambutan Cultivars (*Nephelium lappaceum*) based on Leaf Morphological and Genetic. *Biosaintifika*, 10 (2), 252-259.
2. El-Amin, H. K., & Hamza, N. B. (2016). Comparative analysis of genetic structure and diversity of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) local farmer's varieties from Sudan. *J. Adv. Biol. Biot*, 5: 1-10.
3. Gautam, Ajay Kumar, et al. (2018). Characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lectin for biological activity. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24 (3): 389 - 397.
4. Hernández, C. H., Aguilar, C. N., Herrera, R. R., Gallegos, A. C. F., Chávez, J. M., Salas, M. G., & Valdés, J.A. A. (2019). Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.): Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 201 - 210.

5. Mahdi, H., Kazemitabar, S. K., Yaghini, H., & Dayani, S. (2020). Genetic diversity and species differentiation of medicinal plant Persian Poppy (*Papaver bracteatum* L.) using AFLP and ISSR markers. *Ecological Genetics and Genomics*, 16: 100058.
6. Nguyễn Đức Thành (2014). Các kỹ thuật chỉ thị ADN trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. *Tạp chí Sinh học*, 36 (3), 265 - 294.
7. Manggabarani, A. M., Chikmawati, T., & Hartana, A. (2018). Characterization of rambutan cultivars (*Nephelium lappaceum*) based on leaf morphological and genetic markers. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10 (2), 252 - 259.
8. Roger, S. O. and A. J. B. Bendich. (1988). Extraction of ADN from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, printed in Belgium, 6, 1 - 10.

STUDY ON USING THE ISSR (INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT) MARKERS TO EVALUATE THE GENETIC DIVERSITY OF RAMBUTAN VARIETIES (*Nephelium lappaceum* L.)

Phan Thi Thu Hien¹

¹*Faculty of Biology and Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2*

Summary

Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) is a tropical fruit tree with a delicious taste, rich in vitamins and minerals. In this study, 3 primers ISSR 03, ISSR 22 and ISSR 31 were used to evaluate the genetic diversity of 15 samples of 4 rambutan varieties. The electrophoresis results showed that primer ISSR 03 had 7 polymorphic bands (accounting for 77.7%) out of 9 amplified bands; primer ISSR 22 has 4 polymorphic bands, accounting for 50% of the total amplified bands and ISSR 31 has 5 polymorphic bands (71.42%) out of 7 amplified bands. In total, the polymorphism analysis showed 16 polymorphic bands, accounting for 66.6% of amplified bands. The results of UPGMA analysis with 3 ISSR markers showed high genetic similarity among rambutan samples, ranging from 0.75 to 0.96. The combined analysis of all 3 markers ISSR 03, ISSR 22 and ISSR 31 can help distinguish samples of different rambutan varieties in the study. The results of this study contribute to confirming the potential of the ISSR markers in investigating genetic relatedness, genetic diversity of plant populations, and rambutan cultivars in Vietnam.

Keywords: *Nephelium lappaceum* L., ISSR, genetic diversity.

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Minh Nguyệt

Ngày nhận bài: 12/4/2022

Ngày thông qua phản biện: 10/5/2022

Ngày duyệt đăng: 14/5/2022