

PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ MẪU GIỐNG GẮC (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) THU THẬP Ở VIỆT NAM TRÊN CƠ SỞ TRÌNH TỰ VÙNG ITS

Phạm Hồng Minh¹, Nguyễn Văn Khiêm¹, Phạm Xuân Hội²

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, mối quan hệ di truyền của 40 mẫu giống gác (*Momordica cochinchinensis*) thu thập từ 18 tỉnh/thành ở Việt Nam đã được đánh giá trên cơ sở trình tự vùng ITS. Vùng ITS dài 654 bp, có mức bao phủ 100% và tương đồng di truyền cao nhất từ 93,9 - 99,69% so với vùng ITS đã công bố trên GenBank với mã số AY606266. Kết quả phân tích cho thấy vùng biến đổi có 74/654 vị trí, chiếm 11,31% và vùng bảo tồn có 580/654, vị trí chiếm 88,69%. Gen 5.8S bảo tồn cao nhất với chỉ 5 vị trí sai khác, trong khi vùng ITS1 có 10 vị trí sai khác, vùng ITS2 có sự thay đổi nhiều nhất với 59 vị trí sai khác. Khoảng cách di truyền trong số 40 mẫu nghiên cứu dao động từ 0,0 - 0,076. Tổng cộng 40 mẫu giống gác được chia làm 3 nhóm chính trên sơ đồ cây quan hệ di truyền. Kết quả nghiên cứu góp phần bảo tồn, chọn tạo giống và phát triển gác ở Việt Nam.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, gác, *Momordica cochinchinensis*, ITS, PCR, quan hệ di truyền.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây gác (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) có nguồn gốc Đông Nam Á và Nam Á [1]. Hiện nay, gác được trồng ở một số nước như Bangladesh [2], Trung Quốc [3], Ấn Độ, Nepal, Thái Lan, Lào, Campuchia và Úc [4]. Bootprom và cs (2015) cho rằng gác trồng ở Việt Nam có năng suất và chất lượng cao nhất so với các nước khác. Gác là nguồn cung cấp được chất β -caroten, lycopene, tinh dầu để làm mỹ phẩm và thuốc [5].

Thông tin đa dạng di truyền nguồn gen có vai trò quan trọng trong công tác bảo tồn, chọn tạo giống mới. Cho đến nay, đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước về đa dạng di truyền nguồn gen gác. Bùi Văn Mỹ Tin (2014) đã phân tích đa dạng di truyền của một số giống gác ở đồng bằng sông Cửu Long dựa trên trình tự vùng ITS (vùng phiên mã trong) và gen *matK*, song chưa công bố trình tự các vùng gen này [6]. Nguyễn Thị Bạch Lan (2004) đã nghiên cứu đa dạng di truyền của một số giống gác (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) thu thập tại các tỉnh miền Trung bằng chỉ thị RAPD [7]. Phạm và cs (2017) đã phân tích đa dạng di truyền một số mẫu

giống gác thu thập từ một số tỉnh đồng bằng sông Mê Kông bằng chỉ thị RAPD [8]. Phạm và cs (2018) đã đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống gác thu thập ở một số tỉnh miền Nam bằng chỉ thị hình thái và SSR [9]. Vùng ITS có kích thước ngắn, trình tự bảo tồn khá cao, được sử dụng phổ biến cho các nghiên cứu phân tử ở thực vật nhằm xác định mối quan hệ trong loài và giữa các loài gần gũi về nguồn gốc tiến hóa [10]. Cho đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về giải trình tự vùng ITS và xác định đa dạng di truyền của các quần thể trong cùng loài, các loài trong chi, trong họ ở thực vật, động vật, vi sinh vật. Tuy nhiên, đến nay vẫn còn ít công bố về quan hệ di truyền trên cơ sở trình tự vùng ITS ở cây gác. Bài báo này, thông báo kết quả đánh giá quan hệ di truyền của 40 mẫu giống gác thu thập từ 18 tỉnh/thành ở Việt Nam trên cơ sở phân tích trình tự vùng ITS. Kết quả nghiên cứu sẽ làm cơ sở cho nghiên cứu tuyển chọn và phát triển giống gác có năng suất, chất lượng cao ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổng 40 mẫu giống (dòng) gác được thu thập từ các vùng khác nhau ở nước ta (Bảng 1). Các mẫu giống gác được nhận dạng thuộc loài *Momordica*

¹ Viện Dược liệu

² Viện Di truyền Nông nghiệp

cochinchinensis (Lour.) Spreng theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [11]. Mỗi mẫu giống được thu thập từ 1 cây chọn lọc, nhân giống vô tính bằng giâm hom để

tạo thành dòng gốc, sau đó trồng trên ruộng thí nghiệm tại Thanh Trì, Hà Nội.

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

TT	Tên mẫu	Nơi thu thập	TT	Tên mẫu	Nơi thu thập
1	LCA1	Thị trấn Bắc Hà, huyện Bắc Hà, tỉnh Lào Cai	21	HY2	Xã Đông Ninh, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên
2	LCA2	Phường Kim Tân, thành phố Lào Cai, tỉnh Lào Cai	22	HNA1	Thị trấn Bình Mỹ, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam
3	YB1	Thị trấn Mậu A, huyện Văn Yên, tỉnh Yên Bái	23	HNA2	Phường Quang Trung, thành phố Phủ Lý, tỉnh Hà Nam
4	BG1	Xã Quảng Minh, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang	24	HNA3	Xã Tân Sơn, huyện Kim Bảng, tỉnh Hà Nam
5	BG2	Thị trấn Chũ, huyện Lục Ngạn, tỉnh Bắc Giang	25	HNA4	Xã Thanh Phong, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam
6	VP1	Thị trấn Tam Đảo, huyện Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc	26	HNA5	Xã An Đổ, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam
7	VP2	Thị trấn Hợp Hoà, huyện Tam Dương, tỉnh Vĩnh Phúc	27	TB1	Xã Phú Lương, huyện Đông Hưng, tỉnh Thái Bình
8	VP3	Thị trấn Lập Thạch, huyện Lập Thạch, tỉnh Vĩnh Phúc	28	TB2	Xã Liên Giang, huyện Đông Hưng, tỉnh Thái Bình
9	BN1	Phường Đáp Cầu, thành phố Bắc Ninh, tỉnh Bắc Ninh	29	TB3	Thị trấn Hưng Hà, huyện Hưng Hà, tỉnh Thái Bình
10	BN2	Xã An Bình, huyện Thuận Thành, tỉnh Bắc Ninh	30	NB1	Vườn Quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình
11	HNO1	Xã Ngũ Hiệp, huyện Thanh Trì, Hà Nội	31	NB2	Xã Gia Trấn, huyện Gia Viễn, tỉnh Ninh Bình
12	HNO2	Xã Ngũ Hiệp, huyện Thanh Trì, Hà Nội	32	TH1	Xã Diên Trung, huyện Bá Thước, tỉnh Thanh Hóa
13	HNO3	Xã Vĩnh Quỳnh, huyện Thanh Trì, Hà Nội	33	TH2	Xã Hợp Thành, huyện Triệu Xuân, tỉnh Thanh Hóa
14	HNO4	Thị trấn Xuân Mai, huyện Chương Mỹ, Hà Nội	34	NA1	Xã Tào Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An
15	HNO5	Thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội	35	NA2	Xã Lăng Thành, huyện Yên Thành, tỉnh Nghệ An
16	HD1	Phường Minh Tứ, thành phố Hải Dương, tỉnh Hải Dương	36	KT1	Phường Duy Tân, thành phố Kon Tum, tỉnh Kon Tum
17	HD2	Xã Thanh Thủy, huyện Thanh Hà, tỉnh Hải Dương	37	ĐL1	Thị trấn Ea Kar, huyện Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk
18	HD3	Xã Thanh Sơn, huyện Thanh Hà, tỉnh Hải Dương	38	HCM1	Vinh Lộc A, huyện Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh
19	HD4	Xã Thanh Xá, huyện Thanh Hà, tỉnh Hải Dương	39	AG1	Xã An Hảo, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang
20	HY1	Xã Mễ Sở, huyện Văn Giang, tỉnh Hưng Yên	40	LA1	Xã Tân Tây, huyện Thạnh Hóa, tỉnh Long An

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số

Mẫu lá non được thu thập từ mỗi cây đại diện cho một mẫu gốc (hay dòng gốc) được sử dụng để tách chiết ADN tổng số bằng DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ ADN tổng số được đo bằng máy quang phổ NanoDrop, pha loãng đến nồng độ 50 ng/μl, lưu giữ ở -20°C đến khi sử dụng.

2.2.2. Thiết kế môi và phản ứng PCR nhân vùng ITS

Cặp môi đặc hiệu nhân vùng ITS được thiết kế dựa vào trình tự GenBank AY606266 [12] và được tổng hợp tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc) với trình tự như sau:

ITSG-F: 5'-TCGATGCCTAAAACATCAAAAGAC-3'.

ITSG-R: 5'-GTCGAGAGCGCCGTCTTTTGG-3'.

Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 25 μl, gồm 50 ng ADN, cặp môi (1 μM), Master Mix (2X), gồm 100 mM mỗi loại dNTP, đệm PCR và enzym *Taq* polymerase. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR Master Cyclor (Eppendorf, Đức) với chu trình nhiệt: 94°C - 4 phút, 94°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 2 phút, lặp lại bước 2 đến bước 4 với 39 chu kỳ; 72°C - 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% ở hiệu điện thế 90V, trong 30 phút trong dung dịch đệm TAE và nhuộm trong dung dịch Ethidium Bromid 5 μl (10 mg/ml). Sau đó, sản phẩm PCR được kiểm tra dưới đèn UV, chụp ảnh bằng máy chụp và phân tích gel loại Gel DocIt² của Hãng UVP (Mỹ).

2.2.3. Tinh sạch, giải trình tự sản phẩm PCR và phân tích mối quan hệ di truyền

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Expin PCR SV Kit (GeneAll, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Sản phẩm PCR tinh sạch được kiểm tra chất lượng và hàm lượng trên máy NanoDrop và điện di, sau đó gửi đi giải trình tự tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Cả 2 môi đặc hiệu ITSG-F và ITSG-R được sử dụng để giải trình tự hai chiều. Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC và kiểm tra các sai lệch [13]. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự vùng ITS với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Cây quan hệ di truyền được xây dựng bằng

phần mềm MEGA X theo phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1.000 [14].

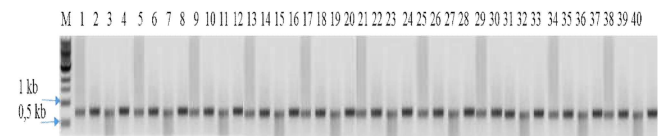
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN tổng số

Tổng số 40 mẫu giống (dòng) gốc đã được tách chiết ADN tổng số, kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8% trước khi tiến hành phản ứng PCR. Nồng độ ADN tổng số được xác định bằng phương pháp đo quang phổ dao động từ 350 ng/μl - 550 ng/μl. Chỉ số A_{260}/A_{280} ở các mẫu dao động từ 1,73 - 1,99 cho thấy, các mẫu ADN tổng số có chất lượng tốt, có thể được sử dụng cho phản ứng PCR.

3.2. Khuếch đại vùng gen và tinh sạch sản phẩm PCR

Vùng ITS của các mẫu giống gốc đã được khuếch đại thành công. Sản phẩm khuếch đại đều thu được bằng duy nhất có kích thước khoảng 0,7 kb. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 1) cho thấy, các băng ADN có kích thước khoảng 0,7 kb tương tự kích thước của sản phẩm PCR và vùng ITS.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sau khi tinh sạch của 40 mẫu gốc

Giếng 1 - 40: Mẫu 1 - 40; M: Thang chuẩn ADN (1 kb)

3.3. Phân tích trình tự vùng ITS

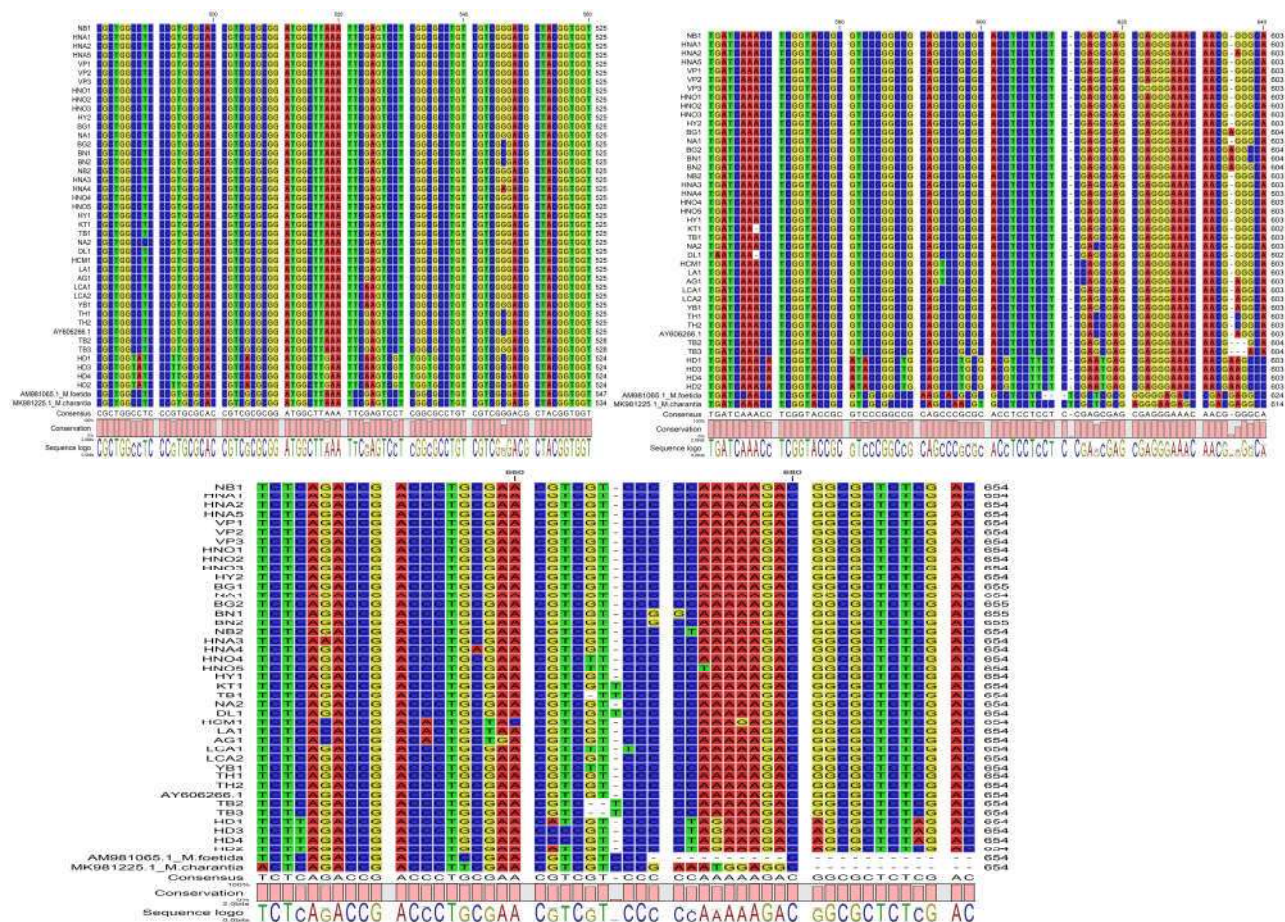
Vùng ITS sau giải trình tự ở các mẫu nghiên cứu có kích thước 654 bp. Kết quả BLAST được thể hiện trong bảng 2 cho thấy, trình tự vùng ITS của tất cả 40 mẫu có mức độ bao phủ 100% trên toàn bộ vùng ITS và có mức độ tương đồng từ 93,90 - 99,69% so với vùng ITS của cây gốc (*M. cochinchinensis*) đã công bố trên GenBank AY606266. Vùng ITS bao gồm đoạn ITS1 dài từ 1 bp - 214 bp, gen 5.8S dài từ 215 - 378 bp và đoạn ITS2 dài từ 379 - 654 bp. Các trình tự ADN sau khi hiệu chỉnh, được phân tích bằng phần mềm MEGA X với giá trị bootstrap 1.000. Kết quả phân tích cho thấy, vùng biến đổi có 74/654 vị trí, chiếm 11,31% và vùng bảo tồn có 580/654 vị trí, chiếm 88,69%. Gen 5.8S có trình tự bảo thủ rất cao chỉ với 5 sự sai khác trong gen. Vùng ITS1 có sự thay đổi lớn hơn với 10 vị trí sai khác. Vùng ITS2 có sự thay đổi

lớn nhất với 59 vị trí sai khác. Như vậy, tổng cộng có 74 vị trí sai khác trong vùng ITS. Các mẫu HD1, HD2, HD3 và HD4 thu thập tại Hải Dương có nhiều sự sai khác nhất trong trình tự vùng ITS so với các mẫu khác. So sánh trình tự vùng ITS trong số 40 mẫu nghiên cứu được thể hiện trong hình 2. Khoảng cách di truyền trong số 40 mẫu nghiên cứu trên cơ sở trình tự vùng ITS được thể hiện trong bảng 3. Khoảng cách di truyền giữa chúng dao động từ 0,0 - 0,076 (HD4 và HCM1), tương ứng với hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,924 - 1,00. Sau khi xác định được trình tự nucleotide vùng ITS, cây quan hệ

di truyền được xây dựng bằng phần mềm Mega X, kết quả thể hiện ở hình 3. Theo Felsenstein (1985) bootstrap là một công cụ hỗ trợ cho việc xây dựng cây quan hệ di truyền. Hệ số bootstrap nói lên độ tin cậy của sự gán gũ các thành viên của nhóm của cây phả hệ. Tỷ lệ càng lớn thì kết quả có mức độ tin cậy càng cao. Thông thường hệ số bootstrap trên 50 thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê [15]. Cây quan hệ di truyền trong số 40 mẫu nghiên cứu được chia làm 3 nhóm chính trên cơ sở hệ số bootstrap có ý nghĩa thống kê (63 - 95).

Bảng 2. Mức độ bao phủ, tương đồng và kích thước vùng ITS của các mẫu giống gốc

STT	Tên mẫu	Loài xác định	Mức độ bao phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Kích thước (bp)
1	LCA1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,93	654
2	LCA2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	99,24	654
3	YB1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	99,24	654
4	BG1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
5	BG2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,78	654
6	VP1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
7	VP2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	96,62	654
8	VP3	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,47	654
9	BN1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,32	654
10	BN2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,47	654
11	HNO1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
12	HNO2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
13	HNO3	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
14	HNO4	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,47	654
15	HNO5	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,32	654
16	HD1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	94,21	654
17	HD2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	94,51	654
18	HD3	<i>M. cochinchinensis</i>	100	94,05	654
19	HD4	<i>M. cochinchinensis</i>	100	93,90	654
20	HY1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,32	654
21	HY2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
22	HNA1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
23	HNA2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,78	654
24	HNA3	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,47	654
25	HNA4	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,47	654
26	HNA5	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
27	TB1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,17	654
28	TB2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	97,57	654
29	TB3	<i>M. cochinchinensis</i>	100	95,57	654
30	NB1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,62	654
31	NB2	<i>M. cochinchinensis</i>	100	98,32	654
32	TH1	<i>M. cochinchinensis</i>	100	99,69	654



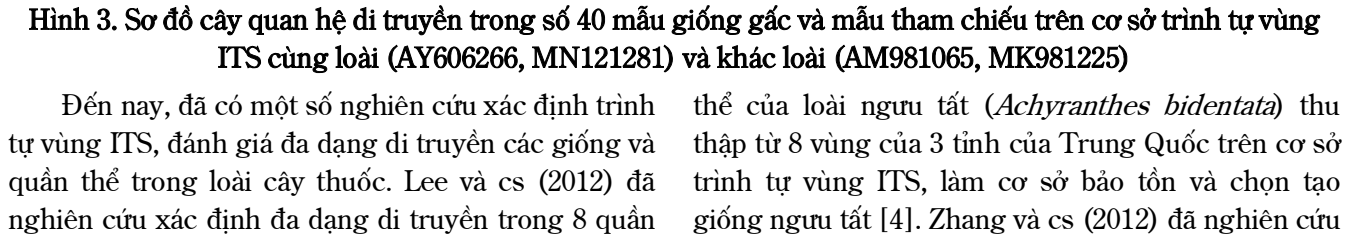
Hình 2. So sánh trình tự vùng ITS trong số 40 mẫu giống gốc

Trên sơ đồ cây quan hệ di truyền (Hình 3), tổng cộng 40 mẫu giống gốc được chia làm 3 nhóm chính: *Nhóm I*, gồm các mẫu TH1, TH2 thu thập từ Thanh Hóa. *Nhóm II* gồm các mẫu LCA1, LCA2, YB1 thu thập từ Lào Cai và Yên Bái. *Nhóm III* gồm 35 mẫu còn lại. Nhóm III được chia làm hai dưới nhóm: *dưới nhóm III-1* gồm các mẫu HD1, HD2, HD3, HD4 thu thập từ tỉnh Hải Dương; *dưới nhóm III-2* gồm 31 mẫu là HCM1, LA1, AG1, KT1, DL1, NB1, NB2, HNA1, HNA2, HNA3, HNA4, HNA5, VP1, VP2, VP3, HNO1, HNO2, HNO3, HNO4, HNO5, HY1, HY2, BG1, BG2, BN1, BN2, TB1, TB2, TB3, NA1, NA2 thu thập từ các tỉnh/thành như: Hồ Chí Minh, Long An, An Giang, Kon Tum, Đắk Lắk, Ninh Bình, Hà Nam, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Hưng Yên, Bắc Giang, Bắc Ninh, Thái Bình, Nghệ An. Các mẫu có cùng nguồn gốc địa lý gần nhau có xu hướng nằm trong cùng nhóm nhỏ như LCA1, LCA2 (Lào Cai), TH1, TH2 (Thanh Hóa); BN1, BN2 (Bắc Ninh), BG2 (Bắc Giang); TB1, TB2, TB3 (Thái Bình), HNO4, HNO5 (Hà Nội); AG1 (An Giang), HCM1 (Hồ Chí Minh), LA1 (Long An); KT1 (Kon Tum), DL1 (Đắk Lắk); NA1, NA2 (Nghệ An);

HNO1, HNO2, HNO3 (Hà Nội), HNA1, HNA5 (Hà Nam), HY1, HY2 (Hưng Yên), VP1, VP2, VP3 (Vĩnh Phúc). Mặc dù đa dạng di truyền cao giữa các mẫu có nguồn gốc từ các vùng địa lý khác nhau nhưng một số mẫu thu thập tại vùng địa lý khác nhau (khác tỉnh) nằm trong cùng dưới nhóm. Chẳng hạn, mẫu HNA3 (Hà Nam) cùng nhóm KT1 (Kon Tum), DL1 (Đắk Lắk), AG1 (An Giang), HCM1 (Hồ Chí Minh), LA1 (Long An) và BG1 (Bắc Giang). Một số mẫu có cùng địa lý gần nhưng không nằm trong cùng dưới nhóm như NB1 và NB2 (Ninh Bình), BG1 và BG2 (Bắc Giang), HNA1, HNA2, HNA3, HNA4, HNA5 (Hà Nam).

Tổng cộng 40 mẫu giống gốc có quan hệ gần hơn với tham chiếu cùng loài *M. cochinchinensis* theo GenBank AY606266 và GenBank MN121281. Trong khi 2 loài khác cùng chi là *Momordica foetida* (GenBank AM981065) và *Momordica charantia* (GenBank MK981225) nằm trong nhóm hoàn toàn khác biệt với 40 mẫu giống gốc nghiên cứu và loài *M. cochinchinensis* (GenBank AY606266, GenBank MN121281).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1CA1																																							
1CA2	0.003																																						
1B1	0.003	0.003																																					
1B2	0.003	0.012	0.002																																				
1B3	0.009	0.005	0.005	0.003																																			
1Y1	0.003	0.012	0.002	0	0.005																																		
1Y2	0.003	0.012	0.002	0	0.005	0																																	
1Y3	0.017	0.014	0.004	0.002	0.005	0.002	0.002																																
2N1	0.023	0.02	0.02	0.02	0.008	0.005	0.008	0.008	0.009																														
2N2	0.02	0.017	0.017	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.009																														
2N31	0.003	0.012	0.002	0	0.005	0	0	0.002	0.008	0.005																													
2N32	0.003	0.012	0.002	0	0.005	0	0	0.002	0.008	0.005	0	0																											
2N33	0.003	0.012	0.002	0	0.005	0	0	0.002	0.008	0.005	0	0																											
2N34	0.004	0.014	0.011	0.002	0.005	0.002	0.002	0.003	0.009	0.006	0.002	0.002	0.002																										
2N35	0.003	0.015	0.002	0.003	0.006	0.003	0.003	0.005	0.011	0.008	0.003	0.003	0.003	0.002																									
HD1	0.004	0.001	0.001	0.009	0.006	0.009	0.009	0.001	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.001	0.003																								
HD2	0.004	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.009	0.001	0.001	0.001	0.009	0.009	0.009	0.001	0.003	0.003																							
HD3	0.006	0.003	0.003	0.003	0.009	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.003	0.004	0.003	0.006																						
HD4	0.008	0.004	0.004																																				



đa dạng di truyền trong số loài đan sâm (*Salvia miltiorrhiza*) với các loài có quan hệ di truyền gần gũi bằng phân tích trình tự vùng ITS [16]. Ở gác, một số nghiên cứu phân lập và giải trình tự vùng ITS đã được thực hiện. Bùi Văn Mỹ Tin (2014) đã phân lập và giải trình tự vùng gen *matK* và vùng ITS của 4 mẫu giống gác ở đồng bằng sông Cửu Long [6]. Pham và cs (2017) đã phân tích 20 mẫu gác từ Cần Thơ, Đồng Tháp, Kiên Giang và An Giang bằng 10 chỉ thị RAPD. Phân tích cụm chỉ ra các mẫu giống có tương quan với nguồn gốc địa lý. Các mẫu từ vùng địa lý giống nhau có quan hệ di truyền gần. Tuy nhiên, một số mẫu giống gác thu thập trong cùng tỉnh không nằm trong cùng nhóm. Một số mẫu thu thập từ các tỉnh khác nhau nằm trong cùng nhóm lớn [8]. Pham và cs (2018) đã phân tích đa dạng di truyền 16 mẫu giống gác thu thập từ 16 tỉnh ở miền Nam và Tây Nguyên Việt Nam bằng 7 chỉ thị hình thái quả và 10 chỉ thị SSR. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy, các mẫu giống gác đa dạng về hình thái quả và di truyền bằng chỉ thị SSR. Phân tích cụm chỉ ra hầu hết các mẫu giống có tương quan với nguồn gốc địa lý. Các mẫu từ vùng địa lý giống nhau có quan hệ di truyền gần, như từ miền Nam, Tây Nguyên. Một số mẫu thu thập tại vùng địa lý khác nhau nằm trong cùng nhóm. Một số mẫu thu thập ở khác vùng địa lý nhưng nằm cùng nhóm [9]. Các nghiên cứu cho thấy, các mẫu không nằm cùng nhóm theo nguồn gốc địa lý có thể do trao đổi các nguồn gen giữa người trồng nằm ngoài giới hạn các tỉnh. Mối quan hệ gần của các mẫu trong các vùng khác nhau có thể do người dân từ vùng khác mang nguồn giống gác để trồng trong các nơi sinh sống mới. Như vậy, kết quả nghiên cứu về đa dạng di truyền của 40 mẫu giống gác thu thập ở Việt Nam trên cơ sở trình tự vùng gen ITS phù hợp với những nghiên cứu đã công bố về đa dạng nguồn gen gác ở Việt Nam bằng các chỉ thị RAPD [8], hình thái và SSR [9]. Stankiewicz và cs (2001) cũng cho rằng nhân tố con người trước đây đã được chứng minh là nguyên nhân gây ra sự thiếu tương quan giữa di truyền và khoảng cách địa lý trong một số trường hợp [17].

4. KẾT LUẬN

Vùng ITS của 40 mẫu gác thu thập từ 18 tỉnh/thành trong cả nước đã được khuếch đại thành công, dài 654 bp, trong đó đoạn ITS1 dài từ 1 - 214 bp, gen 5.8S dài từ 215 - 378 bp và đoạn ITS2 dài từ 379 - 654 bp. Trình tự vùng ITS phân lập từ 40 mẫu gác có mức

độ bao phủ 100% và mức độ tương đồng từ 93,9 - 99,69% so với trình tự vùng ITS trên GenBank AY606266.

Kết quả phân tích cho thấy có sự khác biệt 74/654 vị trí, chiếm 11,31% và bảo tồn 580/654 vị trí, chiếm 88,69%. Gen 5.8S có trình tự bảo thủ rất cao chỉ với 5 sự sai khác trong gen. Vùng ITS1 có sự thay đổi lớn hơn với 10 vị trí sai khác. Vùng ITS2 có sự thay đổi lớn nhất với 59 vị trí khác biệt. Khoảng cách di truyền dao động từ 0,0 - 0,076, tương ứng với hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,924 - 1,00. Như vậy, vùng ITS có thể được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền và nguồn gốc tiến hóa các mẫu giống gác phục vụ bảo tồn và chọn giống. Tuy nhiên, cần kết hợp với các chỉ thị hình thái và chỉ thị phân tử ADN khác để bảo đảm thông tin di truyền về nguồn gen gác chính xác hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kubola J, Siriamornpun S (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry* 127: 1138 - 1145.
2. Hasan C M, Rabba RJ, Waterman P (1987). Chondrillasterol from the tubers of *Momordica cochinchinensis*. *Plant Medicine* 53 (6): 578 - 579.
3. Iwamoto M, Okabe H, Yamauchi T (1985). Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33: 1 - 7.
4. Lee Y, Liu P, Li Y (2012). Intraspecific variation of *Achyranthes bidentata* (Amaranthaceae) in the geo-authentic product area based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. *Australian Journal of Crop Science* 6 (12): 1655 - 1660.
5. Bootprom N, Songsri P, Suriharn B, Lomthaisong K, Lertrat K (2015). Genetics diversity based on agricultural traits and phytochemical contents in spiny bitter gourd (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 47 (3): 278 - 290.
6. Bùi Văn Mỹ Tin (2014). Phân tích đa dạng di truyền của một số giống gác ở đồng bằng sông Cửu Long dựa trên trình tự vùng gen ITS và gen *matK*. *Tạp chí Khoa học, Đại học An Giang* 3 (2): 25 - 29.

7. Nguyễn Thị Bạch Lan (2004). Nghiên cứu sự đa dạng di truyền của một số giống gấc (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) thu thập tại các tỉnh miền Trung bằng kỹ thuật sinh học phân tử RAPD. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 9: 18 - 22.
8. Phạm DT, Vo TTH, Huỳnh VB, Bui MT, Bui CT (2017). Genetic diversity of gac [*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng] accessions collected from Mekong delta of Vietnam revealed by RAPD markers. *Australian Journal of Crop Science* 11 (2): 206 - 211.
9. Phạm DT, Huỳnh VB, Vo TTH, Huỳnh DS, Bui MT, Bui CT (2018). Analysis of genetic diversity of gac [*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng] in Southern Vietnam using fruit - morphological and microsatellite markers. *Australian Journal of Crop Science* 12(12):1890-1898.
10. Schibler U, Wyler T, Hagenbuchle O (1975). Changes in size and secondary structure of the ribosomal transcription unit during vertebrate evolution. *Journal of Molecular Biology* 94 (3): 503 - 17.
11. Phạm Hoàng Hộ (1999). *Cây cỏ Việt Nam*, quyển I. Nxb Trẻ. Trang 568.
12. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY606266.1?report=genbank&log\\$=nuclopt&blast_rank=1&RID=4B15A7RB016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY606266.1?report=genbank&log$=nuclopt&blast_rank=1&RID=4B15A7RB016).
13. <http://vi.software.org/download-software-for-atgc-labs-developer>.
14. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolution* 35 (6): 1547 - 1549.
15. Felsenstein J (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125 (1): 1 - 15.
16. Zhang L, Zhao HX, Fan X, Wang M, Ding CB, Yang RW, Yin ZQ, Xie XL, Zhou YH, Wan DG (2012). Genetic diversity among *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related species inferred from nrDNA ITS sequences. *Turkish Journal of Biology* 36: 319 - 326.
17. Stankiewicz M, Gadamski G, Gawronski S (2001). Genetic variation and phylogenetic relationships of triazine resistant and triazine susceptible biotypes of *Solanum nigrum* analysis using RAPD markers. *Weed Research* 41 (4): 287 - 300.

ANALYSIS OF GENETIC RELATIONSHIPS OF SOME ACCESSIONS OF *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng COLLECTED IN VIETNAM BASED ON ITS SEQUENCES

Phạm Hồng Minh, Nguyễn Văn Khiêm, Phạm Xuân Hoi

Summary

In the present study, the genetic relationships of the 40 accessions of *Momordica cochinchinensis* collected from 18 provinces in Vietnam were assessed based on ITS sequences. The ITS region was 645 bp in length, having 100% coverage and genetic similarity from 93.9 to 99.69% compared with the ITS region on GenBank AY606266. There was a difference of 74/654 positions (11.31%), and 580/654 positions (88.69%) of conserved sequences in the ITS region. The 5.8S gene had a highly conserved sequence with only 5 variations in the gene. The ITS1 had a greater change with 10 different positions. ITS2 was the most variable with 59 different positions. The genetic distance ranges from 0.0 to 0.076, corresponding to the genetic similarity coefficient ranging from 0.924 to 1.00. A total of 40 accessions were divided into 3 main groups on the genetic relationship tree. Research results are useful for the conservation, breeding, and development of *M. cochinchinensis* in Vietnam.

Keywords: Molecular marker, *Momordica cochinchinensis*, genetic relationships, ITS, PCR.

Người phản biện: PGS.TS. Lê Thị Thu Hiền

Ngày nhận bài: 25/2/2022

Ngày thông qua phản biện: 25/3/2022

Ngày duyệt đăng: 25/7/2022