

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN TẬP ĐOÀN CÂY CA CAO (*Theobroma cacao* L.) VIỆT NAM DỰA TRÊN MỘT SỐ ĐẶC TÍNH HÌNH THÁI VÀ ĐOẠN TRÌNH TỰ ADN-ITS GEN NHÂN

Lâm Thị Việt Hà¹, Trương Trọng Ngôn², Hà Thanh Toàn²

TÓM TẮT

Nghiên cứu khảo sát bộ sưu tập sáu mươi ba (63) giống cao cao Việt Nam (*Theobroma cacao* L.) đang trồng tại các địa phương khác nhau Đắk Lắk, Đồng Nai, Bến Tre và Cần Thơ. Đa dạng di truyền bộ sưu tập được khảo sát bằng ghi nhận các đặc tính hình thái thực vật và lập giản đồ phả hệ bằng cặp mồi ITS1-4. Khảo sát đặc tính hình thái thực vật dựa vào các đặc tính hình thái và màu sắc của cơ quan sinh dưỡng (lá) và cơ quan sinh sản (hoa, trái). Kết quả ghi nhận được 5 hình dạng lá dài khác nhau của bộ sưu tập (oval, broad, deltoid, elliptic và sub-lanceolate); 63 giống cao cao Việt Nam biểu hiện 3 dạng trái khác nhau Angoleta, Amelonado và Cundeamor, màu trái và lá non biểu hiện 02 màu nâu đỏ và vàng xanh; trái chín thể hiện hai màu khác nhau, đỏ và xanh. Giống TD11 có cấu trúc 3 cặp bầu noãn khác biệt so với 02 cặp của 62 giống còn lại. Phân tích di truyền ghi nhận sự khác biệt trong vùng ITS giữa các giống không lớn, phân chia thành 3 nhóm bao gồm nhóm Domestic Trinitario Cultivars (38 giống), Indigenous Cultivars (20 giống), Peru Cultivars (5 giống). Đây là nghiên cứu đầu tiên công bố về đặc tính hình thái thực vật và cây di truyền phả hệ của bộ sưu tập cây cao cao Việt Nam.

Từ khóa: *Ca cao, di truyền phả hệ, ITS1-4, hình thái thực vật.*

1. GIỚI THIỆU

Ca cao (*Theobroma cacao* L.) là loài cây công nghiệp có giá trị, thích hợp trồng tại miền Nam Việt Nam do khí hậu và điều kiện thổ nhưỡng (Wood và Lass, 2008; Efombagn *et al.*, 2009; Phước, 2009; Nguyễn và ctv., 2011). Hạt cao cao có giá trị kinh tế và dinh dưỡng (Wood và Lass, 2008; Efombagn *et al.*, 2009). Thực phẩm có nguồn gốc từ hạt cao cao (thực phẩm được sản xuất từ nguyên liệu hạt cao cao) đã được tiêu thụ từ hơn 2600 năm trước (Wood và Lass, 2008; Afoakwa *et al.*, 2016). Hạt cao cao Việt Nam được xếp vào loại hạt có kích cỡ to (Lâm và ctv., 2016), được xếp vào nhóm nước có chất lượng sản phẩm cao như Ghana, Ivory Coast, Brazil. Theo báo cáo của Cục Trồng trọt, tính đến năm 2013 diện tích ca cao cả nước là 22.110 ha. Trong đó diện tích vùng trồng lớn nhất là ĐBSCL và Tây Nguyên, sản lượng hạt cao cao khô khoảng 4.000 tấn/năm. Theo thống kê, nhu cầu tiêu dùng sô cô la của Việt Nam vào

khoảng 5.250 tấn/năm và hầu hết đều nhập khẩu từ nước ngoài.

Chất lượng hạt ca cao phụ thuộc vào giống (Hargy, 1960; Alex-Alan và Raúl, 2007; Motamayor, 2008). Tại Việt Nam, có rất nhiều giống cao cao du nhập từ Nam Mỹ, Đông Nam Á (Phước, 2009), cùng với sự ghép, tháp cây của nhà vườn, tạo nên bộ sưu tập các giống cao cao Việt Nam đa dạng. Chưa có tài liệu nào được công bố chứng minh nguồn gốc của các giống cao cao Việt Nam. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này tiến hành khảo sát phân loại dựa trên phân tích hình thái trái, kết hợp với giải phẫu mô nhằm xác định các giống cao cao thuộc nhóm nào, tạo tiền đề cho các nghiên cứu về cây giống cao cao năng suất và chất lượng tốt phục vụ cho việc xuất khẩu hạt ra thị trường thế giới.

Các công bố khoa học cho thấy tầm quan trọng của khảo sát hình thái thực vật, quan sát ghi nhận các đặc tính hình thái cũng là một trong những phương pháp nghiên cứu di truyền (Nguyễn và ctv, 2011; Lâm và ctv., 2016). Ngày nay, cùng với sự phát triển vượt bậc của ngành sinh học phân tử hiện đại, di truyền của quần thể thực vật đã được nghiên cứu bằng việc giải trình tự bộ gen; kết quả thu thập được chính xác đến cấp bộ gen của loài. Đoạn mồi ITS (Internal transcribed Spacer) đã và đang được ứng

¹ Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu và Phát triển CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

dụng rộng rãi trong các nghiên cứu di truyền phả hệ thực vật.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Sáu mươi ba (63) giống ca cao thu thập từ các địa phương trồng ca cao khác nhau (Bảng 1) được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu. Mẫu thí nghiệm hình thái thực vật sau thu thập được trữ trong thùng lạnh đưa về Phòng thí nghiệm hình thái thực vật, Khoa Sinh học và phân tích ngay trong ngày hôm sau. Mẫu thí nghiệm (DNA) của 63 giống ca cao, bảo quản tủ -18°C dùng cho các phân tích di truyền.

Mẫu thu thập (63 giống) cho thí nghiệm hình thái thực vật bao gồm:

Cơ quan sinh dưỡng: lá ca cao (quan sát màu sắc lá non). Lá non và hoa được thu vào thời điểm 6-7 giờ sáng.

Cơ quan sinh sản: hoa ca cao (nhị, nhụy, bao phấn, lá đài); trái chín của mỗi giống. Nụ hoa (dài 5-6 cm, rộng 3-4 cm) được thu ngẫu nhiên vào sáng sớm.

Bảng 1. Ký hiệu giống và nơi thu thập

Mã giống	Số lượng	Nguồn gốc	Nơi thu thập
CT1-CT9	7	Colombia	Cần Thơ
Các giống TD lai ghép	11	Việt Nam	Trảng Bom
ICS/PA/NA/AMAZ/IM C/UIT	16	Peru	Đồng Nai
TD du nhập (TD1-TD14)	14	Malaysia	Bến Tre
EET/SIAL/MO/APA/P OUND/MAN	15	Trinidad/Ecuador	Đắk Lắk

2.2. Phương pháp quan sát đặc tính hình thái thực

Phương pháp giải phẫu và mô tả cấu trúc mô: phương pháp nhuộm hai màu son phenyl iod Carmin alune' 0.1N và Vert de Mirande 0.01N (Easu, 1964; Nguyễn Nghĩa Thìn, 2006). Tiêu bản được đặt trên lame và đập bằng lamén; quan sát bằng kính lúp Motic SMZ-168 Stereo zoom Microscope và kính hiển vi Olympus CX41- C5050 (Phòng thí nghiệm thực vật, Bộ môn Sinh học, Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ). Lá đài, bao phấn được chụp bằng kính lúp Binocular microscope trên nền đen (Engels, 1983; Lachenaud *et al.*, 1994). Hạt phấn được quan

sát bằng máy Tabletop Microscope TM-1000 (Hitachi High Technology) (PTN Microscope Electro- BM Môi Trường) (Efombagn *et al.*, 2009).

Phương pháp mô tả đặc tính hình thái của trái (pod) dựa vào phương pháp Toxopeus (personal communication) mô tả 4 trái khỏe mạnh, không sâu bệnh và trưởng thành (Hardy, 1960; Bekele, 2006).

Bảng 2. Phân loại nhóm cacao theo hình thái trái

Nhóm	Đặc điểm hình thái của trái (pod)
Forastero	- Amelonado: kích thước và khối lượng trung bình, da trơn láng, màu xanh. - Agoleta: trái sần sùi, quả xanh. - Quả xanh khi non, chín màu vàng. Lá non màu xanh nhạt
Criollo	- Cundeamor: trái dài và nhọn (elongate), quả màu đỏ, nâu sẫm. Lá non màu nâu đỏ.

(Theo: Cuatrecasae, 1964; Hamon P., 2003; Barley, 2005; Phạm Hồng Đức Phước, 2009; Nguyễn Bảo Vệ, 2011).

2.3. Phương pháp ly trích DNA

Hóa chất:

- CTAB extraction buffer (pH 8.0): 20 g/l CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M TRIS

0.02 M Na₂EDTA.

- CTAB precipitation buffer: 5 g/l CTAB, Proteinasease K (20 mg/ml), Chloroform, NaCl solution (1.2 M), Isopropanol, 70% ethanol, MQ water.



Hình 1. Hình dạng và màu trái ca cao của 63 giống khảo sát

Phương pháp CTAB-Proteinase K (Gryson et al., 2007; Lâm và ctv., 2019)

CTAB buffer (pH 8.0) bao gồm CTAB (20 g/L), NaCl (1,4 M), Tris (0,1 M) và Na₂EDTA (0,02 M). CTAB precipitation buffer chứa CTAB (5 g/L) và NaCl (0,04 M). Thêm 1,5 mL CTAB extraction buffer (làm nóng 65°C) vào 300 mg mẫu và trộn đều. Hỗn hợp ủ 30 min 65.

Bổ sung Proteinase K (10 µL, 20 U/mg) và tiếp tục ủ 30 min 65°C. Sau ly tâm 10 p 12.000 (Microcentrifuge-Eppendorf 5415D), hút lớp dịch nổi trên vào tube mới, bổ sung một lượng tương đương chloroform.

Huyền phù được ly tâm 12.000 xg trong 15 p. Chuyển lớp dịch nổi trên vào ống ly tâm mới, thêm 2 lần thể tích CTAB precipitation buffer và ủ ở nhiệt độ khí quyển 60 p, tiếp tục ly tâm 15 p at 12.000 xg.

Dịch nổi được hút bỏ và DNA tủa được hòa tan bằng 350 µL NaCl (1.2 M). Bổ sung 350 µL chloroform, huyền phù ly tâm 10 p ở 12.000 xg và pha nước được chuyển vào tube mới. 0,6 thể tích isopropanol được thêm vào và trộn đảo ngược tube, giữ huyền phù ổn định 20 p.

Sau khi ly tâm 15 p 12.000 xg, dịch nổi được loại bỏ. CTAB được hoàn toàn loại bỏ bằng thêm 500 µL ethanol 70% v/v.

Chất nổi được hút bỏ, vệt DNA được hòa tan trong 100 µL của Milli-Q.

2.4. Phương pháp PCR

Đoạn mồi Oligonucleotide

Mồi forward ITS1 (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A), T_m=68.4 (Gardes và Bruns, 1993).

Mồi reverse ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), T_m = 61.5 (White et al., 1990).

Hỗn hợp 20 µL chứa 2 µL DNA sản phẩm và 18 µL thể tích master mix chứa 10,2 µL nước cất 2 lần, 4 µL thể tích 5xGoTaq PCR buffer (Promega), 0,8 µL mỗi mồi (10 µM), 2 µL dNTPs (5 mM) và 0,2 µL GoTaq DNA polymerase (5 U).

Phản ứng PCR

Cặp mồi ITS1-4: khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, theo sau là 30 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: biến tính DNA ở 95°C trong 1 phút 30 giây, gắn mồi ở 54°C trong 60 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút 30 giây và

kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 7 phút 72°C; lưu trữ ở 40°C.

Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR bằng máy Gene Amp PCR System 9700.

Phân tích sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được điện di bằng bộ điện di Bio-RAD kèm PC, sử dụng gel agarose 1,5% 1xTAE buffer. Sản phẩm nhuộm với 1 ng/µL ethidium bromide, chụp hình gel dưới tia UV bằng máy Bio-RAD Gel Doc. Hình ảnh băng được phân tích bằng phần mềm Quantity One software. Thang chuẩn Lamda Hind III và GeneRuler™100 bp DNA ladder Plus được dùng để ước lượng kích thước của đoạn DNA.

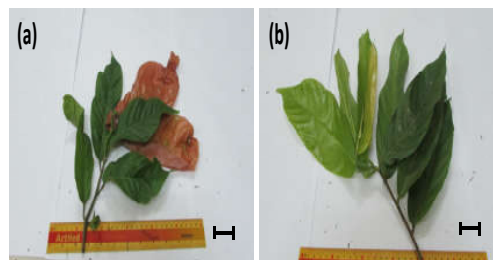
Phân tích di truyền phả hệ

Mẫu DNA được ly trích, tiếp tục nhân bản vùng trình tự đích bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4 (kích thước 250bp-300bp). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp sợi đôi, sử dụng bộ kit giải trình tự và máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer. Phân tích di truyền bằng chương trình Clustal W (Bioedit 7.0) và phần mềm Mega 6.0. Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm PAUP* 4.0 b10 theo hai phương pháp: Maximum Likelihood (ML). Các vùng 18S, 28S ở hai đầu và 5.8S ở giữa đã bị loại bỏ trong phân tích, các khoảng trống được xử lý như dữ liệu vắng mặt. Giá trị bootstrap xác định với số lần nhắc lại mẫu là 1000.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng di truyền dựa trên đặc điểm hình thái thực vật

3.1.1. Đặc điểm cơ quan sinh dưỡng



Hình 2. Màu lá non đỏ nâu (a) và xanh (b). Khoảng đo = 3 cm

Lá cao cao:

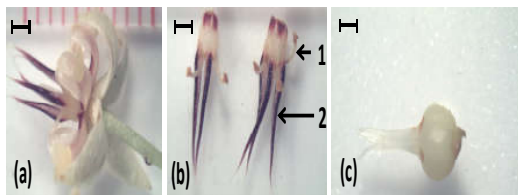
Có 02 giống cao cao: giống trái màu cam đỏ khi xanh và cam đỏ đậm khi chín, điều này cũng thể hiện trên màu sắc lá - lá non có màu nâu đỏ. Ngược lại,

giống còn lại trái có màu xanh khi non và chín màu vàng, lá non cũng thể hiện màu vàng xanh nhạt (Hardy, 1960; Garcia et al., 2014). Trong mẫu lá non của 63 giống, có 7 giống lá non có màu nâu đỏ TD3, TD6, TD10, TD15, ICS1, TD31, TD17; 56 giống còn lại màu lá non có màu xanh (Hình 2).

3.1.2. Đặc điểm cơ quan sinh sản

Cấu trúc hoa ca cao:

Hoa ca cao được quan sát.

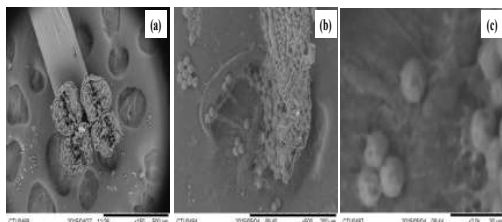


Hình 3. Cấu trúc của hoa ca cao (a); nhị đực (b); bầu noãn (c); khoảng đo = 0,05 cm (a, b) ; = 0,5 mm (c)

Hạt phấn

Hình thái phấn hoa được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu hình thái học, đặc biệt là phân loại thực vật và nghiên cứu về đa dạng của hệ thực vật. Hạt phấn được phân loại dựa trên đặc điểm về hình dạng, kích thước, tính đối xứng và kiến trúc bề mặt vỏ (Trịnh Thị Lâm, 2009).

Đã tiến hành nghiên cứu đặc điểm hình thái hạt phấn của 63 giống ca cao, đều có hạt phấn 3 rãnh, nhiều lỗ gai, là đặc tính thuộc cây hai lá mầm, bộ Malvales, họ Sterculiaceae. Kết quả tương đồng với công bố trước (Santos et al., 2012).

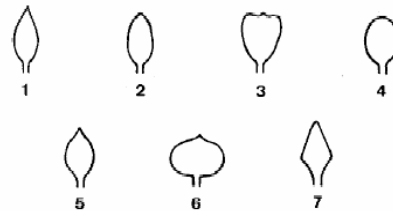


Hình 4. Hạt phấn hình cầu chụp bằng SEM (a) khoảng đo = 500 µm; hạt phấn x 500 (b) khoảng đo = 200 µm; hạt phấn x 2,000 (c) khoảng đo = 30 µm

Lá đài

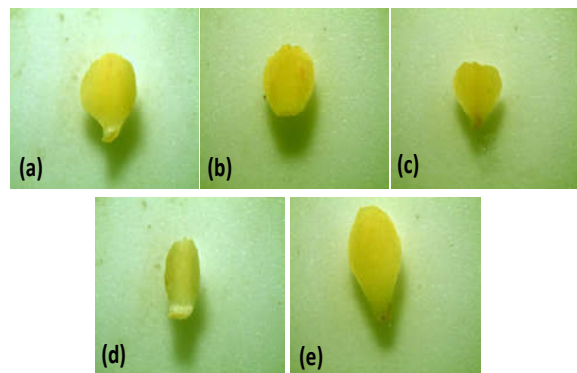
Các nghiên cứu đã công bố lá đài hoa ca cao có màu vàng và đa dạng về hình dạng (Soria và Enríquez, 1981; Lachenaud et al., 1999; Lachenaud và Oliver, 2005; Swanson, 2008). Lachenaud đã ghi nhận được bảy (7) hình dạng lá đài của hoa ca cao trong bộ sưu tập ca cao ở French Guiana (Lachenaud

và Oliver, 2005). Các hình dạng khác nhau thể hiện sự đa dạng về cấu trúc của hoa, cơ quan sinh sản của nhóm Theobroma.



Hình 5. Các hình dạng lá đài của hoa ca cao (1) lanceolate, (2) elliptic, (3) deltoid, (4) ovate, (5) sub lanceolate, (6) broad, (7) rhombic (Lachenaud và Oliver, 2005)

Đã ghi nhận được năm (5) dạng lá đài của bộ sưu tập 63 giống ca cao (Hình 6, bảng 3).



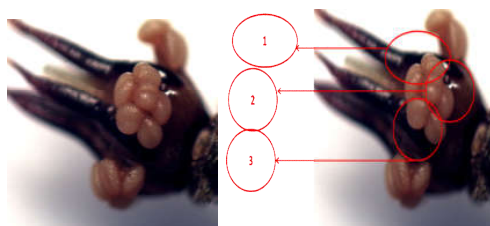
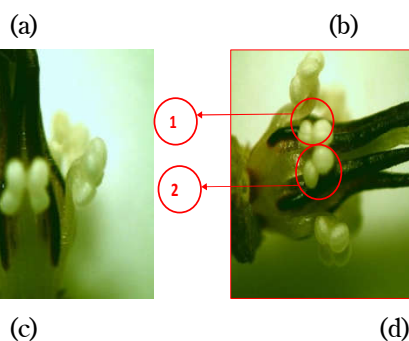
Hình 6. Các hình dạng lá đài của bộ sưu tập ca cao Việt Nam: (a) oval, (b) broad, (c) deltoid, (d) elliptic, (e) sub-lanceolate (N Goran, 1994; Santos et al., 2012)

Bảng 3. Số lượng hình dạng lá đài của bộ sưu tập ca cao Việt Nam: (a) oval, (b) broad, (c) deltoid, (d) elliptic, (e) sub-lanceolate

Giống	Hình dạng					Số lượng
	Ovate	Broad	Deltoid	Elliptic	Sub-lanceolate	
CT	0	0	2	4	1	7
TD	9	4	3	4	5	25
Khác	13	5	12	1	1	31
Tổng	21	9	17	9	7	63

Bao phấn

Thí nghiệm ghi nhận được có sáu mươi hai (62) giống có cấu trúc 2 cặp đôi bao phấn; tuy nhiên giống TD11 trồng tại Trảng Bom có cấu trúc đặc biệt gồm 3 cặp bao phấn (Hình 7).



Hình 7. Bao phấn gồm 3 cặp (a, b) của giống TD11 và 2 cặp (c, d) của 62 giống khác

3.1.3. Hình dạng và màu sắc của trái ca cao

Hình dạng trái của 63 mẫu được ghi nhận thuộc 3 kiểu Amelonado, Anjoleta và Cundeamor. (Bảng 4). Dạng còn lại Calabacillo không thể hiện trong 63 mẫu ca cao quan sát.

- Hình dạng trái

Bảng 4. Hình dạng trái của 63 giống ca cao

Giống	Hình dạng			Số lượng
	Cundeamor	Amelonado	Anjoleta	
CT	3	1	3	7
TD	8	4	13	25
Others	19	8	14	31
Total	20	13	30	63

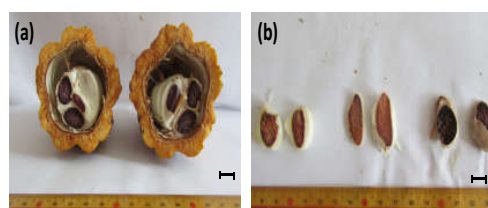
- Màu trái

Bảng 5. Màu sắc trái chín của 63 giống ca cao

Giống	Màu (trái chín)		Số lượng
	Đỏ/tím	Vàng	
CT	0	7	7
TD	6	18	25
Khác	1	31	31
Tổng cộng	7	56	63

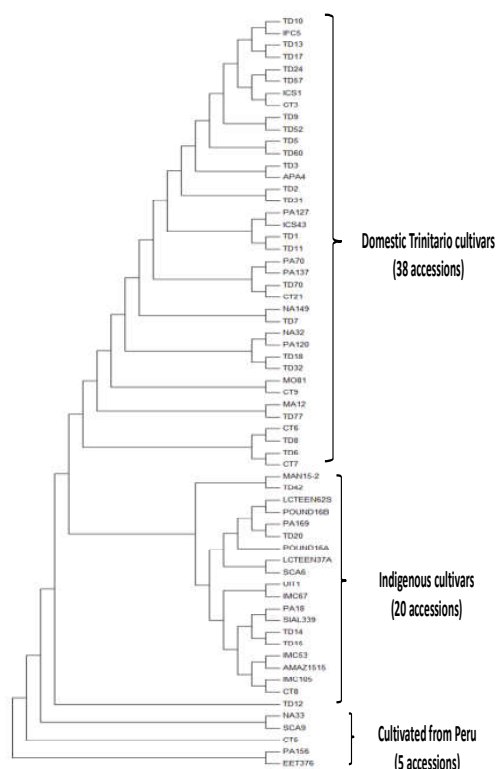
- Hạt (màu và hình dạng)

Thí nghiệm ghi nhận hình oval của hạt và màu nâu tím khi chín của cả 63 mẫu quan sát (Hình 8).

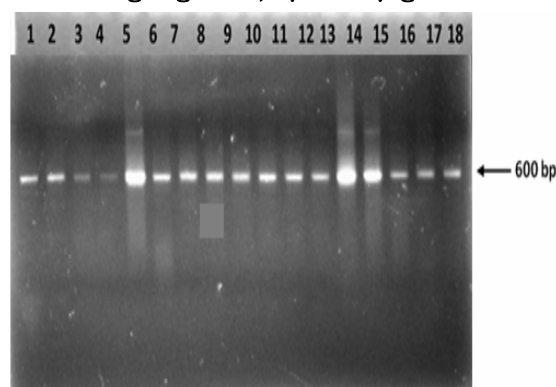


Hình 8. Mẫu cắt ngang (a) trái và (b) hạt

3.2. Phân tích di truyền phả hệ



Hình 9. Biểu đồ Dendrogram phân tích chuỗi ITS của 63 giống cacao; độ biến động 2%



Hình 10. Mẫu DNA điện di, thang chuẩn lamda hind III

>CT8

TTGATTAATGAATATTCTATTTCGATTTTCTTCAACTTGAATCGATTCAACAATTTCT
TTTTATTTTTCATATAAATGGATTTTGCATTTGCATATAATATAAAATAAAAAATATGGG

>IMC105

TTTTCTCTTACTATAAATTT-CATT-GTTGTC-GGTGACATGTATAACGGGACTCTATC
TTTATTCTCGTCCGATTAATCCGTTTTCAAAAGATTTATCAGACTATGGAGTGAATGAT

Sơ đồ phả hệ được vẽ sau khi phân tích các trình tự; kết quả có thể phân chia thành 3 nhóm chính (Hình 9):

- Nhóm Domestic Trinitario: gồm có 38 giống ca cao thu tại 5 vùng trồng khác nhau. Trong đó có nhóm giống CT được ghép tại Cần Thơ. Kết quả cho thấy nhóm CT và TD có mối quan hệ di truyền gần, kết quả này tương đồng với công bố của Dung (2005) kết luận giống CT6, TD7 và TD14 quan hệ di truyền gần; cũng như 3 giống TD6, TD8, TD11 có mối quan hệ di truyền gần. Giống CT3 có năng suất cao, có thể ghép với TD9 có mùi vị thơm ngon, tạo cây lai mang đặc tính tốt. Nhóm SIAL339, LCTEEN62/S, POUND16A, IMC105, PA8, PA70, AMAZ1515, SCA9, NA33 và PA137 có mối quan hệ di truyền gần với nhóm TD, có thể lai ghép tạo cây lai mang đặc tính tốt (trái Amelonado và trái Angoleta, mang đặc tính nhóm Forastero lai với Trinitario).

- Nhóm Indigenous: gồm 20 giống, chỉ số bootstrap của nhóm là 100%. Giống NA, SCA và IMC có mối quan hệ di truyền gần, điều này tương tự với công bố của Ji (Ji et al., 2012), chứng minh bằng Snips về cha mẹ các giống này xuất phát từ vùng ca cao Upper Amazon Forastero. Hơn nữa, Aikpokpodion et al. (2010) chứng minh rằng giống PA và IMC có mối quan hệ di truyền gần và thuộc nhóm Indigenous cultivation. Kết quả tương thích với Sounigo và Motamayor (Sounigo et al., 2005; Sereno et al., 2006; Motamayor et al., 2008) chứng minh các giống này có nguồn gốc từ Amazon (Costa Rica và các nước Nam Mỹ). Trong nhóm này CT5, TD14 và TD15 có mối quan hệ di truyền gần với nhóm PA, hệ số 62%, nhóm này được gọi tên "scavina. PA", kết quả tương đồng với công bố của Barley (2005). Các giống thuộc nhóm này thuộc đặc tính nhóm Forastero, kết quả tương tự với công bố của Smulders (Smulders et al. 2010), chứng minh SCA6 và IMC67 thuộc giống Forastero.

- Nhóm Peru cultivars (NA33, SCA9, CT5, PA156 và EET376): cả 5 loài này có nguồn gốc đa dạng.

Theo Phước (2009), chúng có nguồn gốc từ Peru và Costa Rica; các tác giả công bố NA, PA và SCA có nguồn gốc từ Amazon và thuộc nhóm Indigenous (Sounigo et al., 2005; Bartley, 2005); vì vậy vùng ITS1-4 cho thấy mối quan hệ di truyền gần giữa 5 giống. Đặc biệt giống NA33 được giới thiệu là giống ca cao chất lượng cho chương trình lai ghép ca cao từ 10 năm qua.

Biểu đồ Dendrogram trên cho thấy sự khác biệt trên toàn vùng ITS (bao gồm vùng ITS1 và ITS4) của 63 giống ca cao đang trồng tại Việt Nam là không lớn, tuy nhiên có thể thấy các giống được chia thành ba nhóm chính theo nguồn gốc xuất xứ và du nhập.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đặc tính hình thái thực vật của bộ sưu tập giống ca cao Việt Nam được ghi nhận:

- Màu lá non khác nhau: 7 giống màu đỏ khi non, các giống còn lại màu xanh.

- Giống TD11 có cấu tạo gồm 3 bao phấn; khác với 62 giống còn lại có cấu tạo 02 cặp bao phấn.

- Hình thái trái thuộc 3 nhóm: Amelonado (13 giống), Angoleta (30 giống) và Cuademore (20 giống).

Phân tích di truyền phả hệ được kết quả:

- Một vùng trình tự đầy đủ ITS thuộc hệ gen ca cao Việt Nam đã được xác định và bổ sung cho Ngân hàng trình tự ADN gen ca cao quốc tế (KR864819-KR864772).

- Phân tích quan hệ di truyền sử dụng trình tự ITS cho thấy bộ sưu tập 63 giống ca cao đang trồng tại Việt Nam chia thành 3 nhóm di truyền: Nhóm Domestic Trinitario (38 giống), nhóm Indigenous (20 giống), nhóm Peru (5 giống).

4.2. Đề nghị

Phân tích di truyền phả hệ bằng các chỉ thị phân tử khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Afoakwa, E.O., Kongor JE, Budu AS, Mensah-Brown H, JF Takrama, 2015. Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. J. Nutr. Heal. Food Sci. 2: 9651-9670.
2. Aikpokpodion, P. O., 2010. Variation in agromorphological characteristics of cacao, *Theobroma cacao* L., in farmers' fields in Nigeria. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 38(2): 157-170.
3. Alex-Alan F. de and VALLE, Raúl R., 2007. Ecophysiology of the cacao tree. Braz. J. Plant Physiol. 19 (4): 425-448.
4. Bartley B. G., 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Cabi, pp 25-98.
5. Bekele F. L., Bekele .I, Butler D. R., Bidaisee G. G., 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 933-948.
6. Efombagn M. I. B., Sounigo O., Nyasse S., Manzanares-Dauleux M., Eskes A. B., 2009. Phenotypic variation of cacao (*Theobroma cacao* L.) on farms and in the gene bank in Cameroon. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 1: 258-264.
7. Easu, K., 1964. Plant anatomy. New York, NY: John Wiley.
8. Garcia T. B., Potiguara R. C. D. V., Kikuchi T. Y. S., Demarco D., Aguiar-Dias A. C. A. D., 2014. Leaf anatomical features of three *Theobroma* species (Malvaceae s.l.) native to the Brazilian Amazon. Acta Amazonica, 44: 291-300.
9. Gardes, M., and T. D. Bruns., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2:113-118.
10. Hamon P., Marc S., Xavier P., Jean C. G., 2003. Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants. Editions Quae. Science Publishers, Inc., USA, 125-129.
11. Hardy F., 1960. Cacao manual. Agricutul Sciences Turrialba, Costa Rica, 12.
12. Jahan S., Sarwar A. G., Fakir M. S. A., 2014. Phenology, floral morphology and seed yield in *Indigofera tinctoria* L. and *I. suffruticosa* Mill. Bangladesh Journal of Botany, 42: 231-237.
13. Ji, K., Zhang, D., Motilal, L. A., Boccara, M., Lachenaud, P., Meinhardt, L. W., 2013. Genetic diversity and parentage in farmer varieties of cacao (*Theobroma cacao* L.) from Honduras and Nicaragua as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. Genetic resources and crop evolution 60(2): 441-453.
14. Lachenaud P., Bonnot F., Oliver G., 1999. Use of floral descriptors to study variability in wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in French Guiana. Genetic Resources and Crop Evolution, 46: 491-500.
15. Lachenaud P., Paulin D., Ducamp M., Thevenin J. M., 2007. Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. Scientia horticulturae, 113: 313-321.
16. Lâm Thị Việt Hà, Phan Huỳnh Anh, Hà Thanh Toàn, Koen Dewetincx, Kathy Messens, 2016. Đặc tính lý hóa hạt ca cao Việt Nam so với hạt ca cao của các nước. Tạp chí NN&PTNT, 24: 74-79.
17. Motamayor J. C., Lachenaud P., da Silva e Mota J. W., Loo de R., Kuhn D. N., Brown J. S., & Schnell R. J., 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). PLoS One, 3(10): e3311.
18. N'Goran J., 1994. Contribution à l'étude génétique du cacaoyer par les marqueurs moléculaires: diversité et recherche de QTIs. Doctoral thesis, University of Montpellier II, Montpellier, France p. 105.
19. Nguyễn Nghĩa Thìn, 2006. Methodology of Botany research. Vietnam Agriculture Publisher, pp. 3-17.
20. Nguyễn Bảo Vệ, Trần Văn Hâu và Lê Thanh Phong, 2011. Giáo trình cây công nghiệp dài ngày. NXB Đại học Cần Thơ. 9.
21. Phạm Hồng Đức Phước, 2009. Kỹ thuật trồng ca cao ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp. 1-46.
22. Santos R. C., Pires J. L., Correa R. X., 2012. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. Genetic Resources and Crop Evolution, 59: 327-345.

23. Sereno, M. L., Albuquerque, P. S., Vencovsky, R., Figueira, A., 2006. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conservation Genetics* 7(1): 13-24.
24. Soria J. and Enríquez G. A. (Eds.), 1981. International cacao cultivar catalogue (No. 6). Bib. Orton IICA/CATIE, pp 11-19.
25. Sounigo O., Umaharan R., Christopher Y., Sankar A., Ramdahin S., 2005. Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG, T) using isozyme electrophoresis and RAPD. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52:1111-1120.
26. Swanson J. D., Carlson J. E., Guiltinan M.J., 2008. Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. *International Journal of Plant Sciences*, 169: 1187-1199.
27. White, T. J., T. Burns, S. Lee, and T. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fugal ribosomal RNA genes for phylogenetic, pp 315-322.
28. Wood G. A. R. and Lass R. A., 2008. *Cocoa*. Fourth edition. John Wiley & Sons, London, UK, pp 11-38.

**GENETIC RELATIONSHIPS AMONG VIETNAMESE COCOA VARIETIES COLLECTION
(*Theobroma cacao* L.) BASED ON MORPHOLOGY CHARACTERIZATION AND
PHYLOGENETIC TREE**

Lam Thi Viet Ha, Truong Trong Ngon, Ha Thanh Toan

Summary

This study examined the morphological traits of 63 cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.) that have been cultivated in cocoa regions in Vietnam Dak Lak, Dong Nai, Ben Tre and Can Tho. Their morphological features were individually evaluated and analysed. This included leaf characteristics, pods and flower features. The Vietnamese cocoa flower showed a diversity of morphological characteristics including five shapes of ligule (oval, broad, deltoid, elliptic and sub-lanceolate) and each stamen also had a bilobed anther with the exception of trilobed anther for TD11. Three kinds of fruit shapes were identified, namely Angoleta, Amelonado and Cundeamor, and these were of varied colours yellow and red in ripe. Additionally, an anatomical analysis on the midrib structure of the leaves from the 63 varieties showed high similarities. The colour of young leaves was observed as being green and red. Their phylogenetic relationships were identified using ITS primers (internal transcribed spacer): Domestic Trinitario Cultivars (38 accessions), Indigenous Cultivars (20 accessions), and Cultivars from Peru (5 accessions). The present study is the first report of phylogenetic relationships of Vietnamese cocoa collections.

Keywords: *Cocoa, genetic relationships, ITS1-4, morphology characteristic.*

Người phản biện: PGS.TS. Khuất Hữu Trung

Ngày nhận bài: 12/3/2021

Ngày thông qua phản biện: 12/4/2021

Ngày duyệt đăng: 19/4/2021