

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC MẪU GIỐNG XOÀI TẠI TRUNG BỘ VÀ NAM BỘ VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ SCOT

Nguyễn Thị Nhấ^{1*}, Lê Thị Thanh Nga¹, Vũ Thị Huyền Trang¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với vật liệu nghiên cứu chính gồm 30 mẫu giống xoài thu thập tại các tỉnh/thành miền Trung và miền Nam Việt Nam và hệ thống chỉ thị SCoT gồm 52 môi. Kết quả khuếch đại cho thấy, trong tổng số 52 môi được khuếch đại, ghi nhận được 22 môi SCoT cho kết quả đa hình với tổng số 336 band đạt tỷ lệ 100% đa hình. Các band đa hình của các môi này dao động từ 10 đến 22 band, trong đó SCoT05 và SCoT06 là hai môi cho số band đa hình lớn nhất (22 band); SCoT17 là môi cho số band đa hình thấp nhất (10 band). Nghiên cứu sử dụng phương pháp phân nhóm UPGMA chia tổng số 30 mẫu giống xoài này thành hai nhóm chính, trong đó nhóm I bao gồm chủ yếu các giống xoài cát Hòa Lộc có giá trị kinh tế cao; nhóm II đa số các giống bản địa. Dù các mẫu giống đều thuộc cùng một loài, nhưng nếu nguồn gốc của chúng thuộc các cây đầu dòng khác nhau thì sẽ cho kết quả phân tích di truyền khác nhau, đây được xem là cơ sở để xây dựng một hệ thống nhằm quản lý tốt các cây ưu thế của loài.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, đa dạng di truyền, SCoT, Start Codon Target, giống xoài.

1. GIỚI THIỆU

Xoài là một trong 73 chi của họ Anacardiaceae, bộ Sapindales và chủ yếu trồng ở châu Á (Lockwood R, 2010). Xoài là loại trái cây nhiệt đới giàu dinh dưỡng cũng như có giá trị kinh tế cao. Trong năm 2016, trên toàn thế giới xoài được trồng phổ biến và rộng rãi trên 65 quốc gia khác nhau (Pariona A, 2018; Mitra SK, 2016). Việt Nam là quốc gia đứng thứ 14 về xuất khẩu xoài trên thế giới (Pariona A, 2018); trong đó Trung bộ và Nam bộ là nơi chiếm 82,5% về diện tích canh tác và 92,6% về năng suất của cả nước (Hòa NV, 2018). Công tác chọn tạo giống xoài ngày càng có nhiều thành tựu, tuy vậy, hệ thống dữ liệu phân tử của xoài vẫn còn nhiều hạn chế. Công tác chọn và tạo giống xoài ở Việt Nam hiện nay chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái và đặc điểm nông nghiệp, vì vậy có thể dẫn đến việc bỏ qua một số các alen quý hiếm tồn tại ở thể đồng hợp tử lặn, nhất là khi cây xoài là cây sinh sản vô tính.

Hiện nay, giữa các công nghệ khác nhau để đánh giá đa dạng di truyền, việc sử dụng kỹ thuật phân tử giúp có ưu thế hơn hẳn trong việc thực hiện thí nghiệm chính xác và nhanh chóng hơn rất nhiều. Thực tế, hiện nay kỹ thuật di truyền đã và đang được

ứng dụng rất nhiều trong các nghiên cứu trên thực vật. Kỹ thuật chỉ thị SCoT là một loại chỉ thị DNA được thiết kế bởi Collard và Mackill vào năm 2009 dựa trên phương pháp PCR nhân vùng trình tự có tính bảo toàn cao xung quanh bộ ba mở đầu ATG (Collard B, Mackill D, 2009; Luo C *et al.*, 2010). Với tính đa hình cao và giá thành rẻ, chỉ thị SCoT có khả năng thực hiện phản ứng PCR ngay cả khi không có thông tin trình tự gen của mẫu mục tiêu. Chỉ thị SCoT được cho là có ưu thế trong việc ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền, lập bản đồ QTL cũng như phân tích tính trạng số lượng (Collard B, Mackill D, 2009). Chỉ thị SCoT đã được ứng dụng thành công trên rất nhiều loại thực vật khác nhau như: lúa (Collard B, Mackill D, 2009), xoài (Luo C *et al.*, 2010; Gajera HP *et al.*, 2013), nho (Guo DL *et al.*, 2012), mía đường (Que Y *et al.*, 2014), cò (Al-Qurainy F *et al.*, 2015), lúa mì (Talebi R, Fayaz F, 2016), đậu (Chai X *et al.*, 2017), hoa hồng (Agarwal A *et al.*, 2018)...

Tại Việt Nam, Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang (2012) đã từng thực hiện nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trên nghiên cứu ở xoài, tuy nhiên, các nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật chỉ thị phân tử tương tự khác trên xoài vẫn chưa thật sự phổ biến và còn nhiều hạn chế.

Nghiên cứu này là kết quả ứng dụng chỉ thị Start Codon Target (SCoT) để đánh giá đa dạng di truyền

¹ Khoa Công nghệ Sinh học,
Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
*Email: ntnha@ntt.edu.vn

nhằm đóng góp xây dựng dữ liệu cho hệ thống dữ liệu phân tử của các giống xoài tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu mẫu

Ba mươi mẫu lá xoài được thu từ các vùng ở miền Trung và miền Nam Việt Nam, trong đó có 3 mẫu xoài từ Bến Tre, 4 mẫu xoài từ thành phố Hồ Chí Minh, 10 mẫu xoài từ Tiền Giang, 2 mẫu xoài từ Long An, 4 mẫu xoài từ Khánh Hòa và 5 mẫu xoài ở Ninh Thuận. Các giống xoài được sử dụng trong

nghiên cứu gồm có: xoài Tứ Quý, xoài Cát Chu, xoài Đài Loan, xoài Cát Hòa Lộc, xoài Thái, xoài Cóc, xoài Tượng, xoài Bưởi, xoài Úc E2R2, xoài Canh Nông, xoài Thanh Ca và xoài Tím.

Xử lý mẫu bằng rửa sạch mẫu dưới vòi nước máy để loại bỏ bụi bẩn có trên lá, làm khô trong điều kiện phòng. Dùng bông thấm cồn 70⁰ lau sạch hai bề mặt lá nhằm loại bỏ khuẩn sau đó tiếp tục làm khô trong điều kiện phòng. Lưu giữ mẫu trong túi zip và trữ đông ở -21⁰C nếu chưa sử dụng.

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

STT	Tên mẫu	Kí hiệu	Nguồn gốc	Nơi thu mẫu
1	Xoài Tứ Quý	XTQ1	Việt Nam	Trung tâm Giống cây trồng Bến Tre, tỉnh Bến Tre
2	Xoài Cát Chu – 1	XCC1	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
3	Xoài Cát Chu – 2	XCC2	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
4	Xoài Đài Loan – 1	XDL1	Đài Loan	Trung tâm Công nghệ Sinh học, thành phố Hồ Chí Minh
5	Xoài Đài Loan – 2	XDL2	Đài Loan	Trại giống cây trồng Tân Hiệp Chánh, thành phố Hồ Chí Minh
6	Xoài Cát Hòa Lộc – 9	XHL9	Việt Nam	Trại cây giống Đức Hòa, tỉnh Long An
7	Xoài Cát Hòa Lộc – 10	XHL10	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
8	Xoài Cát Hòa Lộc – 11	XHL11	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
9	Xoài Cát Hòa Lộc – 12	XHL12	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
10	Xoài Cát Hòa Lộc – 13	XHL13	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
11	Xoài Cát Hòa Lộc – 14	XHL14	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
12	Xoài Cát Hòa Lộc – 15	XHL15	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
13	Xoài Thái	XT2	Thái Lan	Trại giống cây trồng Tân Hiệp Chánh, thành phố Hồ Chí Minh
14	Xoài Cát Hòa Lộc – 16	XHL16	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
15	Xoài Cát Hòa Lộc – 17	XHL17	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
16	Xoài Cóc – 1	XC1	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
17	Xoài Cóc – 2	XC2	Việt Nam	Trung tâm Giống cây trồng Bến Tre, tỉnh Bến Tre
18	Xoài Bưởi – 2	XB1	Việt Nam	Nhà vườn Khánh Võ, thành phố Hồ Chí Minh
19	Xoài Bưởi – 1	XB2	Việt Nam	Trung tâm Giống cây trồng Bến Tre, tỉnh Bến Tre
20	Xoài Tượng – 2	XTG1	Việt Nam	Siêu thị cây giống, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

21	Xoài Tượng – 1	XTG2	Việt Nam	Trại giống Tiến Đạt, Đắk Lắk
22	Xoài Úc R2E2	XUC	Úc	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
23	Xoài Thanh Ca – 1	XTC1	Việt Nam	Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
24	Xoài Thanh Ca – 2	XTC2	Việt Nam	Viện Nghiên cứu cây ăn quả miền Nam, tỉnh Tiền Giang
25	Xoài Canh Nông	XCN	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
26	Xoài Tím – 1	XTI1	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
27	Xoài Tím – 2	XTI2	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
28	Xoài Tím – 3	XTI3	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
29	Xoài Tím – 4	XTI4	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
30	Xoài Tím – 5	XTI5	Việt Nam	Trung tâm Nông nghiệp Công nghệ cao Khánh Hòa, tỉnh Khánh Hòa

2.2. Tách chiết DNA

Cân 0,1 g lá vào tube 2.0 ml sau đó bổ sung nitor lỏng và nghiền mẫu lá thành bột mịn nhằm phá vỡ các cấu trúc thành tế bào. Bổ sung 400 µl PLS, vortex đều, thêm 10 µl Rnase và vortex đều, sau cùng ủ hỗn hợp này trong 30 phút ở nhiệt độ 65°C. Bổ sung 130 µl PLS2 vào hỗn hợp sau đó vortex và ủ trên đá 5 phút. Tiến hành ly tâm hỗn hợp này 15.000 vòng trong 5 phút và lọc lấy dịch nổi. Chuyển dịch nổi sang một tube khác, bổ sung dung dịch PBB vào dịch nổi với thể tích gấp 1,5 lần dịch nổi, sau đó vortex đều từ 1 đến 2 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục chuyển hỗn hợp này vào cột silica và ly tâm vs tốc độ 11.000 vòng trong 1 phút. Loại bỏ dịch lỏng và giữ lại cột silica. Bổ sung thêm 500 µl PWB vào tube và ly tâm liên tiếp hai lần với tốc độ 11.000 vòng trong 1 phút, sau đó tiến hành làm khô cột silica bằng cách ly tâm cột silica đã loại bỏ hết dịch lỏng với tốc độ 11.000 vòng trong 2 phút. Sau cùng, bổ sung thêm 100 µl EB đã ủ ở 70°C vào cột silica và ly tâm với tốc độ 12.000 vòng trong 2 phút. Giữ lại tube chứa DNA và lưu trữ trong tủ âm -4°C.

2.3. Sàng lọc các mẫu SCoT đa hình

Đã tham khảo và chọn ra 46 mẫu SCoT được sử dụng trong nghiên cứu của Luo (Agarwal A *et al.*, 2018), Atika Agarwal (Agarwal A *et al.*, 2018) và Guo (Guo Y *et al.*, 2018) làm vật liệu mẫu trong nghiên cứu. Tất cả các mẫu đều được cung cấp bởi công ty

PHUSA Biochem Co., Ltd. Tiến hành sàng lọc 46 mẫu với 3 mẫu giống xoài được chọn ngẫu nhiên. Mỗi phản ứng khuếch đại bao gồm 2 µl DNA khuôn, 1 µl mỗi, 12.5 µl 2X GoTaq® G2 Green Master Mix (Taq DNA Polymerase, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP và 3 mM MgCl₂); thêm H₂O cho đủ thể tích 25 µl/ phản ứng. Chu trình nhiệt gồm các giai đoạn tiền biến tính 94°C: 3 phút (1 chu kỳ); biến tính 94°C: 45 giây, bắt cặp 52°C: 60 giây, kéo dài 72°C: 60 giây (40 chu kỳ); kết thúc 72°C: 5 phút (1 chu kỳ) (Luo C *et al.*, 2010). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% trong dung dịch đệm TBE 1X và nhuộm bằng gel red 6X để xác định sự hiện diện/vắng mặt của các băng DNA.

2.4. Phân tích kết quả

Phân tích đa dạng di truyền được thực hiện bằng phần mềm NTSYSpc 2.02e (Sinibaldi. R. M, 2011). Sự có mặt hay vắng mặt của các allele của từng chỉ thị SCoT được ghi nhận cho tất cả các giống xoài trong nghiên cứu, trong đó 0 là không có băng DNA và 1 là có băng DNA ở cùng một vị trí. Số liệu được nhập vào chương trình NTSYSpc 2.02e để xây dựng ma trận tương đồng di truyền sử dụng hệ số SM. Tiếp theo, sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa các giống xoài trong nghiên cứu được xây dựng bằng phương pháp phân nhóm UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical averages).

Bảng 2. Danh sách các môi SCoT được sử dụng trong nghiên cứu

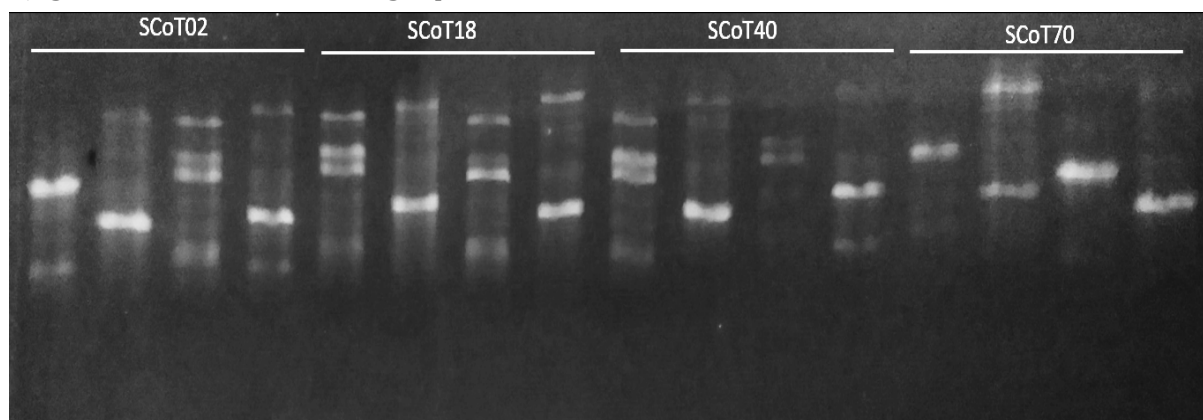
Tên primer	Trình tự (5' to 3')	Tham khảo	Tên primer	Trình tự (5' to 3')	Tham khảo
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	Luo	SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC	Gajera
SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC	Gajera	SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG	Yong
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	Luo	SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA	Yong
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	Yan	SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG	Yan
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	Gajera	SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT	Yong
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	Gajera	SCoT32	CCATGGCTACCACCGCAC	New
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	Yan	SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	Gajera
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	Yong	SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA	Luo
SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA	Luo	SCoT35	CATGGCTACCACCGGCCC	Yong
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	Yan	SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC	New
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	Yong	SCoT40	CAATGGCTACCACTACAG	Gajera
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	Yong	SCoT44	CAATGGCTACCAATTAGCC	New
SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	Yan	SCoT45	ACAATGGCTACCACTGAC	Gajera
SCoT14	ACGACATGGCGACCAACGC	Gajera	SCoT51	ACAATGGCTACCACTGTC	Gajera
SCoT15	ACGACATGGCGACCGCGA	Yong	SCoT60	ACAATGGCTACCACCACA	New
SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC	Gajera	SCoT61	CAACAATGGCTACCACCG	Luo
SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG	Yong	SCoT63	ACCATGGCTACCACGGGC	Gajera
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	Yan	SCoT65	ACCATGGCTACCACGGCA	Gajera
SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC	Gajera	SCoT66	ACCATGGCTACCAGCGAG	Gajera
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	Luo	SCoT70	ACCATGGCTACCAGCGCG	Gajera
SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC	Yong	SCoT73	CCATGGCTACCACCGGCT	Gajera
SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG	Yong	SCoT77	CCATGGCTACCACTACCC	Gajera
SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG	Luo	SCoT78	CCATGGCTACCACTAGCA	Gajera

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc tính đa hình của các môi SCoT

Tiến hành sàng lọc các môi có khả năng khuếch đại đa hình trong tổng số 46 môi được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu, nhận thấy có tổng cộng 22 môi có tính đa hình cung cấp hình ảnh rõ

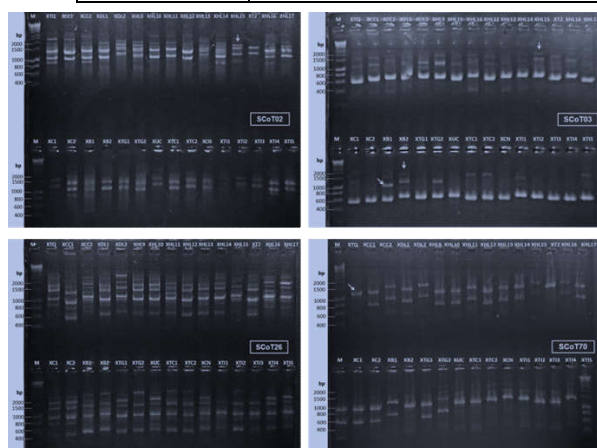
ràng, các band có khả năng lặp tốt, 5 môi đơn hình và 25 môi không xác định được kết quả do số band bị mờ không rõ vì ảnh hưởng của thao tác trong quá trình thí nghiệm. Do đó đã quyết định dùng 22 môi trên làm vật liệu môi để khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu.



Hình 1. Kết quả sàng lọc các môi SCoT đa hình

Bảng 3. Danh sách các môi SCoT đa hình được xác định

Tên primer	Trình tự	Tổng số band	Tổng số band đa hình	Tỷ lệ (%)
SCoT02	CAACAATGGCTACCACCC	14	14	100
SCoT03	CAACAATGGCTACCACCG	13	13	100
SCoT05	CAACAATGGCTACCACGA	22	22	100
SCoT06	CAACAATGGCTACCACGC	22	22	100
SCoT07	CAACAATGGCTACCACGG	13	13	100
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	14	14	100
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	15	15	100
SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	16	16	100
SCoT15	ACGACATGGCGACCGCGA	18	18	100
SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG	10	10	100
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	13	13	100
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	13	13	100
SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC	19	19	100
SCoT30	CCATGGCTACCACCGCG	13	13	100
SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	15	15	100
SCoT35	CATGGCTACCACCGGCC	19	19	100
SCoT40	CAATGGCTACCACTACAG	14	14	100
SCoT45	ACAATGGCTACCACTGAC	13	13	100
SCoT51	ACAATGGCTACCACTGTC	13	13	100
SCoT65	ACCATGGCTACCACGGCA	17	17	100
SCoT70	ACCATGGCTACCAGCGCG	13	13	100
SCoT77	CCATGGCTACCACTACCC	17	17	100
Tổng	-	336	336	-
Nhỏ nhất	-	10	10	-
Lớn nhất	-	22	22	-
Trung bình	-	15.2727273	15.2727273	-



Hình 2. Kết quả PCR của mỗi SCoT02, SCoT03, SCoT26 và SCoT70 với 30 mẫu DNA xoài

Khi tiến hành phản ứng khuếch đại giữa 22 môi SCoT đa hình với 30 mẫu giống xoài, kết quả thu nhận được tổng cộng 336 band với tỷ lệ đa hình đạt 100%. Số band cho mỗi môi dao động từ 10 đến 22 band; trong đó cặp môi SCoT05 và SCoT06 tạo ra nhiều band đa hình nhất (22 band) trong khi SCoT17 là môi có số band đa hình thấp nhất (10 band), số band trung bình cho từng môi được ghi nhận là 15,17 band/môi.

Khi so sánh kết quả này với các nghiên cứu tương tự trước đó, nhận thấy rằng có sự tương đồng khi hai môi SCoT03 và SCoT61 trong nghiên cứu của Luo cũng cho kết quả đa hình 100%, tuy nhiên cũng trong nghiên cứu đó, môi SCoT70 ghi nhận được nhiều band đa hình nhất (14/15 band đa hình) (Luo

C *et al.*, 2010). Trong khi đó mỗi SCoT70 trong nghiên cứu này lại chỉ khuếch đại được 13 band đa hình, ít hơn mỗi SCoT05 và SCoT06 tạo ra 22 band đa hình. Ba mỗi SCoT33, SCoT40 và SCoT51 trong nghiên cứu của Gajera và cộng sự cho tỷ lệ đa hình tuyệt đối là 100% (Gajera HP *et al.*, 2013), điều này một lần nữa giống với kết quả được ghi nhận trong nghiên cứu này. Từ những kết quả trên, nghiên cứu này tái khẳng định rằng chỉ thị SCoT là chỉ thị phân tử có tính đặc trưng cho giống loài ở mức độ từng cá thể.

3.2. Quan hệ di truyền của 30 mẫu giống xoài

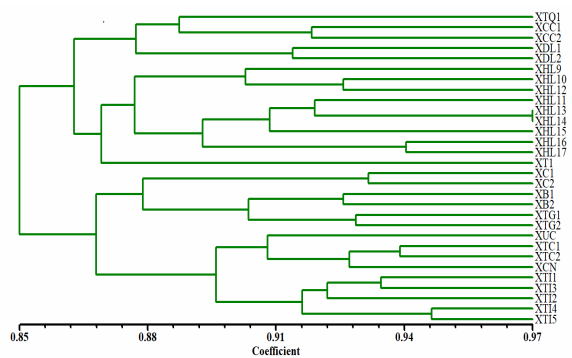
Kết quả phân tích ma trận tương đồng cho thấy độ tương đồng di truyền của các mẫu khá cao, dao động từ 0,83 đến 0,97. Trong đó, hai mẫu có độ tương đồng cao nhất là XHL13 (xoài Cát Hòa Lộc – 13) và XHL14 (xoài Cát Hòa Lộc – 14) với hệ số tương đồng là 0,97, điều này cho thấy quan hệ di truyền giữa hai mẫu là vô cùng lớn, có khả năng hai giống này đều xuất phát từ một cây mẹ do mẫu từ hai giống đều thu ở các địa điểm khá gần nhau. Hai mẫu độ tương đồng thấp nhất là XUC (xoài Úc E2R2) và XCC1 (xoài Cát Chu – 1) với hệ số di truyền là 0,83, xoài Úc R2E2 là một giống ngoại nhập, do đó kiểu gen của nó có thể khác biệt so với các giống nội, và khác biệt nhất là khi so sánh với mẫu xoài Cát Chu – 1.

	XTQ1	NCC1	NCC2	NCC3	NCC4	NCC5	NCC6	NCC7	NCC8	NCC9	NCC10	NCC11	NCC12	NCC13	NCC14	NCC15	NCC16	NCC17	NCC18	NCC19	NCC20	NCC21	NCC22	NCC23	NCC24	NCC25	NCC26	NCC27	NCC28	NCC29	NCC30
XTQ1	1,00																														
NCC1	0,89	1,00																													
NCC2	0,89	0,92	1,00																												
NCC3	0,88	0,88	0,90	1,00																											
NCC4	0,87	0,86	0,88	0,91	1,00																										
NCC5	0,87	0,86	0,86	0,87	0,88	1,00																									
NCC6	0,87	0,86	0,87	0,88	0,88	0,90	1,00																								
NCC7	0,86	0,85	0,88	0,87	0,87	0,87	0,89	1,00																							
NCC8	0,88	0,87	0,87	0,88	0,87	0,89	0,91	0,90	1,00																						
NCC9	0,87	0,86	0,86	0,88	0,88	0,89	0,91	0,91	0,90	1,00																					
NCC10	0,87	0,86	0,87	0,88	0,88	0,89	0,91	0,91	0,90	0,90	1,00																				
NCC11	0,86	0,85	0,88	0,87	0,87	0,87	0,89	0,90	0,90	0,90	0,92	1,00																			
NCC12	0,88	0,87	0,87	0,88	0,87	0,89	0,91	0,90	0,90	0,90	0,91	0,91	1,00																		
NCC13	0,87	0,86	0,86	0,88	0,88	0,89	0,91	0,91	0,90	0,90	0,91	0,91	0,91	1,00																	
NCC14	0,88	0,86	0,86	0,88	0,88	0,89	0,91	0,91	0,90	0,90	0,91	0,91	0,91	0,91	1,00																
NCC15	0,88	0,85	0,87	0,86	0,87	0,87	0,88	0,90	0,89	0,89	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	1,00															
NCC16	0,87	0,84	0,86	0,86	0,85	0,86	0,86	0,88	0,88	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00														
NCC17	0,84	0,83	0,85	0,86	0,85	0,85	0,87	0,86	0,86	0,86	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00													
NCC18	0,87	0,85	0,86	0,86	0,85	0,84	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,86	0,85	0,86	0,85	0,86	0,84	1,00												
NCC19	0,87	0,85	0,86	0,87	0,86	0,85	0,86	0,85	0,86	0,87	0,87	0,87	0,87	0,85	0,86	0,85	0,86	0,85	0,91	1,00											
NCC20	0,85	0,84	0,86	0,85	0,86	0,85	0,87	0,86	0,87	0,87	0,89	0,85	0,86	0,86	0,87	0,89	0,85	0,86	0,87	0,90	1,00										
NCC21	0,86	0,85	0,86	0,86	0,87	0,85	0,86	0,86	0,86	0,88	0,86	0,85	0,86	0,85	0,86	0,85	0,86	0,85	0,89	0,91	0,90	1,00									
NCC22	0,86	0,84	0,86	0,86	0,87	0,85	0,86	0,87	0,86	0,86	0,88	0,86	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,91	0,90	0,90	0,90	0,90	1,00								
NCC23	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00							
NCC24	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00						
NCC25	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00					
NCC26	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00				
NCC27	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00			
NCC28	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00		
NCC29	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00	
NCC30	0,85	0,84	0,85	0,85	0,86	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,88	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	1,00	

Hình 3. Ma trận tương đồng của 22 môi SCoT và 30 mẫu xoài phân tích bằng hệ số SM

Dựa vào hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống xoài đã thu nhận được, tiến hành xây dựng cây phát sinh và phân nhóm các mẫu giống. Với các mẫu có hệ số tương đồng cao sẽ sắp xếp nằm chung một nhóm với ý nghĩa các mẫu này có quan hệ di truyền gần nhau, các mẫu có hệ số tương đồng di truyền thấp sẽ nằm khác nhóm và cách xa nhau trong cây phát sinh.

Phương pháp UPGMA đã chia 30 mẫu xoài thành 2 nhóm lớn ở hệ số tương đồng 0,85. Nhóm I gồm các giống từ giống số 1 đến 15, nhóm II là 15 mẫu còn lại. Ở nhóm I, ở hệ số từ 0,88 đến 0,91, lại được chia thành 2 nhóm phụ và IA và IB. Nhóm phụ IA gồm có 5 mẫu trong đó, hai mẫu XDL1 (xoài Đài Loan – 1) và XDL2 (xoài Đài Loan – 2) có độ tương đồng di truyền 91,33%, XCC1 (xoài Cát Chu – 1) và XCC2 (xoài Cát Chu – 2) có độ tương đồng di truyền khoảng 91,17%, điều đó cho thấy các cá thể xuất phát từ cùng một giống thường có độ tương đồng lớn. Mẫu XTQ1 (xoài Tứ Quý) còn lại trong nhánh có quan hệ di truyền gần với hai mẫu xoài Cát Chu hơn hai mẫu xoài Đài Loan. Giải thích cho điều này, xoài Đài Loan được biết đến là một giống xoài du nhập vào Việt Nam trong những năm gần đây trong khi đó 2 giống Cát Chu và Tứ quý đều là giống bản địa của Việt Nam từ rất lâu.



Hình 4. Sơ đồ thể hiện quan hệ di truyền của 30 mẫu xoài

Ở nhóm phụ IB gồm 9 mẫu xoài Cát Hòa Lộc và một mẫu xoài Thái. Sơ đồ phân nhánh hợp lý theo hệ thống tên gọi của chúng, xoài Thái được tách riêng một nhánh và có quan hệ di truyền 87,16% với các mẫu xoài Hòa Lộc còn lại. Các mẫu Hòa Lộc còn lại tiếp tục được nhóm thành 2 nhánh nhỏ, trong khi XHL9 (xoài Hòa Lộc – 9), XHL10 (xoài Hòa Lộc – 10) và XHL12 (xoài Hòa Lộc – 12) nằm cùng một nhánh nhỏ, hai mẫu Cát Hòa Lộc được thu ở Cam Ranh lại được tách thành một nhánh riêng với độ tương đồng di truyền 93,81%, khác hẳn với các giống Hòa Lộc còn lại thu từ Tiền Giang; 2 mẫu XHL13 (xoài Hòa Lộc – 5) và XHL14 (xoài Hòa Lộc – 6) có độ tương đồng di truyền cao nhất là 96,56%; các mẫu còn lại có độ tương đồng di truyền trung bình là khoảng 91%.

Nghiên cứu đa dạng di truyền của Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang (2012) đã kết luận độ tương

đồng di truyền của các giống Thanh Ca, Cát Chu và Tượng là khoảng 88% cũng như cho rằng Thanh Ca có thể là tổ tiên của xoài Tượng và Cát Chu. Nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với kết luận đó sau khi so sánh và nhận thấy độ tương đồng của chúng trong nghiên cứu này dao động từ 84% đến 87%.

3.3. Đa hình hiếm nhận diện một số cá thể xoài

SCoT là một chỉ thị DNA có tính đa hình cao ở mức độ cá thể, bằng chứng là với những cá thể khác nhau của cùng một giống loài, SCoT vẫn có thể khuếch đại nên các band khác nhau đặc trưng cho từng cá thể riêng biệt.

Kết quả cho thấy 9 mẫu Cát Hòa Lộc có thể được phân biệt hoàn toàn bởi hai chỉ thị SCoT02 và SCoT33 trong khi 5 mẫu xoài Tim được phân biệt một cách hiệu quả bằng hai dấu SCoT17 và SCoT35. Bên cạnh đó, SCoT02 và SCoT03 có thể được sử dụng nhằm nhận diện các mẫu XHL15 (xoài Hòa Lộc – 7) ở vị trí 2000 bp. Hai mẫu giống xoài Đài Loan (XDL1 và XDL2) có thể được phân biệt bằng SCoT05 tại vị trí 700 bp và SCoT18 tại hai vị trí lần lượt 1500 bp và 2000 bp. Mẫu xoài Thái (XT1) có thể được xác định được bằng SCoT13 ở vị trí 400 bp và SCoT70 ở vị trí 1500 bp.

Bảng 4. Danh sách các mẫu chỉ thị có các band đa hình hiếm

Primer ID	Cultivar	Band
SCoT02	Cat Hoa Loc no.7	2000 bp
SCoT03	Cat Hoa Loc no.7	2000 bp
	Buoi no.2	1900 bp
	Buoi no.1	1100 bp
SCoT05	Dai Loan no.2	700 bp
SCoT13	Thai	400 bp
SCoT17	Cat Hoa Loc no.8	1500 bp
	Tim no.2	1700 bp; 1000 bp
SCoT18	Dai Loan no.2	1500 bp; 2000 bp
SCoT35	Cat Hoa Loc no.8	1000 bp
SCoT70	Tu Quy	1300 bp
	Thai	1500 bp

Từ kết quả trên có thể kết luận rằng chỉ thị SCoT là một chỉ thị có mức độ đa hình cao ở cấp độ cá thể trong nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền. Trong nghiên cứu này, dù cho thuộc cùng một giống nhưng khi so sánh sự đa hình của các giống xoài Cát Hòa Lộc vẫn có thể nhận ra có từ 3% đến 6% khác biệt

trong việc khuếch đại các band đa hình giữa các mẫu. Tương tự, có từ 6% đến 9% khác biệt trong việc khuếch đại các band đa hình giữa các cá thể xoài Tim.

Hai mẫu XHL13 (xoài Hòa Lộc – 13) và XHL14 (xoài Hòa Lộc – 14) có độ tương đồng cao nhất 97% và 3% khác biệt này được tạo nên do sự khác nhau từ 1 đến 4 band của các mẫu SCoT02, SCoT03, SCoT05, SCoT06, SCoT07, SCoT13, SCoT15, SCoT33, SCoT40 và SCoT70. Từ kết quả này có thể suy đoán rằng mẫu XHL13 và XHL14 có thể có nguồn gốc từ hai cây đầu dòng riêng biệt, tuy nhiên hai cây đầu dòng này có khả năng cao có quan hệ di truyền gần gũi hoặc cùng xuất phát từ một cây đầu dòng mẹ.

4. KẾT LUẬN

Dựa trên việc khuếch đại 30 mẫu giống xoài với tỷ lệ đa hình cao đạt 100%, chỉ thị SCoT cho thấy tính hiệu quả trong việc trở thành vật liệu thực hiện phản ứng khuếch đại PCR mà không cần biết thông tin di truyền cũng như trình tự gen của đoạn DNA mục tiêu. Điều này giúp ích rất nhiều trong việc ứng dụng chỉ thị phân tử đặc biệt là chỉ thị DNA nhằm xây dựng hệ thống dữ liệu phân tử của các loài thực vật mà việc giải mã toàn bộ hệ gen vẫn chưa hoàn thiện.

Nghiên cứu này có thể trở thành cơ sở để đánh giá tính đa dạng di truyền cũng như xác định các cá thể khác nhau trong cùng một giống. Đồng thời nghiên cứu này cho thấy tiềm năng vô cùng lớn trong việc ứng dụng chỉ thị SCoT để truy xuất nguồn gốc của các sản phẩm xoài đang bán trên thị trường cũng như trong công tác quản lý chất lượng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu nhận được tài trợ từ đề tài số ĐTN 14/17 ngày 6/12/2017 của Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Tiền Giang và tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2019.01.41.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lockwood R (2010). The Mango. Botany, Production and Uses. Cambridge University Press.
2. Pariona A (2018). "The Top Mango Producing Countries In The World.". worldatlas.
3. Mitra SK (2016). Mango production in the world present situation and future prospect. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

4. Nguyễn Văn Hòa (2018). Sản xuất xoài ở một số nước Đông Nam Á và Việt Nam. <https://apmangonet.org/wp-content/uploads/2018/10/Sep-18SOFRIRegMangoProduction-VNCopy.pdf>.
5. Collard B, Mackill D (2009). Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. 27:86-93.
6. Luo C, He X-H, Chen H, Ou S-J, Gao M-P (2010). Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. 38:1176-1184.
7. Gajera HP, Bambharolia RP, Domadiya RK, Patel SV, Golakiya BA (2013). Molecular characterization and genetic variability studies associated with fruit quality of indigenous mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Plant Systematics and Evolution* 300(5):1011-1020.
8. Guo DL, Zhang JY, Liu CH (2012). Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses. *Mol Biol Rep* 39(5):5307-5313.
9. Que Y, Pan Y-B, Lu Y, Yang C, Yang Y, Huang N, Xu L (2014). Genetic Analysis of Diversity within a Chinese Local Sugarcane Germplasm Based on Start Codon Targeted Polymorphism. 2014:468375.
10. Al-Qurainy F, Khan S, Mohammad N, Tarroum M (2015). SCoT marker for the assessment of genetic diversity in Saudi Arabian date palm cultivars. 47:637-643.
11. Talebi R, Fayaz F (2016). Geographical diversity pattern in Iranian landrace durum wheat (*Triticum turgidum*) accessions using start codon targeted polymorphism and conserved DNA-derived polymorphism markers. 14.
12. Chai X, Dong R, Wenxian L, Wang Y, Liu Z (2017). Optimizing Sample Size to Assess the Genetic Diversity in Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Populations Using Start Codon Targeted (SCoT) Markers. 22.
13. Agarwal A, Gupta V, Ul Haq S, Jatav PK, Kothari SL, Kachhwaha S (2018). Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasms using SCoT marker. *Journal of King Saud University - Science*.
14. Trần Nhân Dũng, Đỗ Tấn Khang (2012). Đa dạng di truyền các giống xoài (*Mangifera* sp.) bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ 2012:22a, 175-185.
15. Guo Y, Zhai L, Long H, Chen N, Gao C, Ding Z, Bo J (2018). Genetic diversity of *Bletilla striata* assessed by SCoT and IRAP markers. 155.
16. Sinibaldi. R. M (2011). Update on the use of random 10mers in mapping and fingerprinting genomes.

GENETIC DIVERSITY OF MANGO CULTIVARS IN CENTRAL AND SOUTHERN VIETNAM USING START CODON TARGET (SCoT) MARKER

Nguyen Thi Nha¹, Le Thi Thanh Nga¹, Vu Thi Huyen Trang¹

¹Biotechnology Faculty, Nguyen Tat Thanh University

Summary

Thirty mango cultivars collected in Central and Southern Vietnam were evaluated genetic diversity using the Start Codon Target (SCoT) marker. Twenty-two out of 46 primers were chosen as high polymorphism markers. The analysis of 22 markers SCoTored 336 DNA bands which were all polymorphism with average bands varied from 10 to 22 bands. The UPGMA clustering method divided 30 mango cultivars into 2 main groups, group I included taxa which had export value while group II mostly consisted of local mango cultivars. Even in the same varieties, original ortets were not completely similar in heritability. These results provided useful method for management of orginal elite trees.

Keywords: Genetic diversity, mango, molecular markers, SCoT, start codon target.

Người phản biện: GS.TS. Ngô Xuân Bình

Ngày nhận bài: 26/01/2021

Ngày thông qua phản biện: 26/02/2021

Ngày duyệt đăng: 5/3/2021