

NHẬN DIỆN VÀ XÁC ĐỊNH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA HAI CÁ THỂ QUÝT ĐƯỜNG KHÔNG HỘT ĐƯỢC PHÁT HIỆN Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG BẰNG DẤU PHÂN TỬ DNA

Nguyễn Bá Phú¹, Nguyễn Bảo Vệ², Bùi Thị Cẩm Hương² và Trần Nhân Dũng³

ABSTRACT

To understand about genetic traits of the two seedless Duong tangerine trees discovered in Mekong Delta (Nguyen Bao Ve et al., 2007), this study was carried out: (i) to find a suitable markers to identify and (ii) to determine the genetic relationship between two seedless Duong tangerine trees and with seedy Duong tangerine trees. The sequence analysis results from ITS region and MatK gene showed that they were similar in seedless and seedy Duong tangerine trees. By RAPD using seven primers (A13, OPH13, SO15, SN20, A02, OPH18 and SN06), there were different bands presented in gel, these makers to identify seedless and seedy Duong tangerine trees, SO15 and A13 primers might use to determine between seedless and seedy Duong tangerine trees, SN06 and SN20 primers might use to distinguish two seedless Duong tangerine trees and seedy Duong tangerine tree; therefore, the genetic relationship between two seedless trees was tightly close (0,92) and closely with seedy tree (0,87).

Keywords: *Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), molecular markers, primer, seedless, Citrus, Duong tangerine, Citrus reticulata*

Title: *Application of molecular technology finding markers and determining genetic relationship of two seedless Duong tangerine trees discovered in Mekong Delta*

TÓM TẮT

Để có thông tin về đặc điểm di truyền của hai cây quýt Đường không hạt được phát hiện ở Đồng Bằng Sông Cửu Long (Nguyễn Bảo Vệ et al., 2007), đề tài được thực hiện nhằm: (i) tìm phương pháp đánh dấu phân tử để nhận diện và (ii) xác định mối quan hệ di truyền giữa hai cây quýt Đường không hạt với nhau và với cây quýt Đường có hạt. Kết quả giải trình tự các nucleotide vùng ITS và gen matK cho thấy giữa hai cây quýt Đường không hạt là giống nhau và không khác biệt với cây quýt Đường có hạt. Bằng kỹ thuật RAPD với 7 mồi (A13, OPH13, SO15, SN20, A02, OPH18 và SN06), đã ghi nhận có những sai khác về phổ băng DNA, đây là dấu phân tử để nhận diện hai dòng quýt Đường không hạt, mồi SO15 và A13 có thể phân biệt được hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt, mồi SN06 và SN20 có thể phân biệt được hai cây quýt Đường không hạt với nhau và với cây quýt Đường có hạt, kết quả phân tích quan hệ di truyền cho phép kết luận hai cây quýt Đường không hạt có mối quan hệ gần gũi với nhau (0,92) và gần với quýt Đường có hạt (0,87).

Từ khóa: *Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), marker phân tử, mồi, không hạt, cam quýt, quýt Đường, Citrus reticulata*

¹ Nghiên cứu sinh, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

1 MỞ ĐẦU

Sự kiện các nhà khoa học Trường Đại học Cần Thơ phát hiện được hai cây quýt Đường cho trái hoàn toàn không hạt ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) (Nguyễn Bảo Vệ *et al.*, 2007), là một tín hiệu vui cho sản xuất nông nghiệp nói chung và sự phát triển nghề trồng cam quýt ở nước ta nói riêng vì quýt Đường là loại trái ngon, loại cây có giá trị kinh tế cao, được trồng nhiều ở ĐBSCL, nhưng giống trồng phổ biến hiện nay còn khá nhiều hạt, gây khó khăn trong việc chế biến và làm giảm giá trị sản phẩm. Tình trạng không hạt thường do kiểu gen hoặc do điều kiện môi trường chi phối (vì cây cam quýt có khả năng trinh quả sinh), vì vậy để có cơ sở phát triển giống quýt Đường không hạt vừa được phát hiện vào sản xuất, đồng thời với nhiều nghiên cứu được tiến hành như khảo sát đặc tính hình thái thực vật, sự ổn định của tính trạng không hạt, ... Việc bước đầu tìm hiểu thông tin về đặc điểm di truyền của hai cây quýt Đường không hạt này cần được thực hiện nhằm: (i) tìm phương pháp đánh dấu phân tử để nhận diện và (ii) xác định mối quan hệ di truyền giữa hai cây quýt Đường không hạt với nhau và với cây quýt Đường có hạt dựa trên kết quả phân tích trình tự các nucleotide vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) trong nhân và gen *matK* (maturase *matK*) trong lục lạp kết hợp với kỹ thuật RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Mẫu lá cây quýt Đường không hạt mã số 1, cây quýt Đường không hạt mã số 80 và cây quýt Đường có hạt bình thường mã số 63 (Nguyễn Bảo Vệ *et al.*, 2007) có cùng tuổi trồng (được trồng năm 2001), cùng điều kiện canh tác, không sâu bệnh tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp được thu thập để điện di.

Các môi ngẫu nhiên sử dụng trong thí nghiệm:

ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCT 3' và ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'.

matK-VF: 5' AACCTTCGTTACTGGATAAAAGA 3' và

matK-VR: 5' CCGCTGTAATAATGAGAAAGA 3'

A13: 5' CAGCACCCAC 3', SO15: 5' TGGCGTCCTT 3', SN20: 5' GGTGCTCCGT 3', SN06: 5' GAGACGCACA 3', OPH13: 5' GACGCCACAC 3', A02: 5' TGCCGAGCTG 3' và OPH18: 5' GAATCGGCCA 3'

Các môi ngẫu nhiên được cung cấp bởi Integrated DNA Technologies và các hoá chất chuyên dùng cho trích DNA và cho phản ứng PCR.

2.2 Phương pháp

Quy trình trích DNA trên cây cam quýt theo Rogers và Bendich (1988). Định lượng DNA bằng đo độ hấp thụ tử ngoại ở bước sóng 260 nm (A260). Khuếch đại các trình tự ITS và *matK* bằng các cặp môi ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) và *matK*-390F/*matK*-1326R (Kyndt *et al.*, 2005). Kỹ thuật RAPD: tiến hành khuếch đại lần lượt với 7 môi A13, OPH13, SO15, SN20, A02, OPH18 và SN06 bằng kỹ thuật PCR.

Các số liệu ITS và *matK* được phân tích bằng phần mềm BioEdit Sequence Alignment 7.0.5.3 theo phương pháp DNAPars (DNA Parsimony method). Số liệu

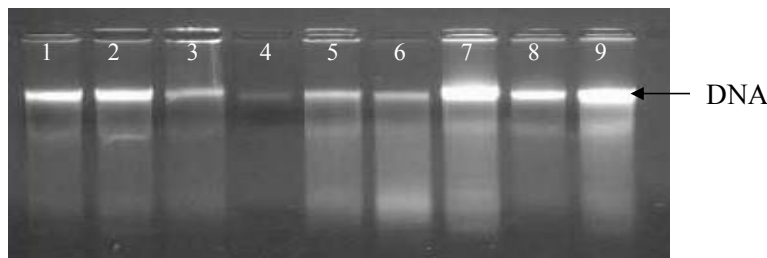
RAPD được ghi nhận dựa vào thang chuẩn 1 kb, sự có mặt hoặc không có mặt của một băng nào đó trên gel sẽ được ghi nhận là 1 và 0 cho mỗi cá thể và được phân tích bằng phần mềm BioDiversity Professional Beta (Pielou, 1984).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kiểm tra chất lượng DNA

3.1.1 Định tính DNA

Mẫu DNA sau khi ly trích được kiểm tra bằng phổ điện di trên gel agarose 0,8% có chứa ethidium bromide (10 mg/ml) với cường độ dòng điện 100 V. Sự di chuyển của phân tử DNA trên gel phụ thuộc vào khối lượng phân tử và nồng độ gel (Sambrook et al., 1989). Sau khi ly trích, khối lượng DNA nguyên mẫu rất lớn chứa hàng ngàn cặp nucleotide nên trên gel agarose các phân tử này chỉ di chuyển rất ít. Việc kiểm tra định tính DNA của mẫu trên gel agarose với sự hiện diện của ethidium bromide được thể hiện bằng những băng sáng và rõ nét dưới tia tử ngoại (Hình 1). Những mẫu DNA tinh sạch được chọn ra để thực hiện cho các bước tiếp theo.



Hình 1: Phổ điện di DNA của lá cây quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 1, 2 và 3), cây quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 4, 5 và 6) và cây quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 7, 8 và 9)

3.1.2 Định lượng DNA

Hàm lượng axit nucleic được đo ở hai bước sóng 260 nm và 280 nm (Bảng 1). Nồng độ trung bình các mẫu DNA quýt Đường không hạt và có hạt khoảng 245 ng/μl.

Bảng 1: Nồng độ các mẫu DNA của quýt Đường không hạt và có hạt

Cây quýt Đường	abs	abs	$\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$	$\frac{280 \text{ nm}}{260 \text{ nm}}$	Axit nucleic (ng/μl)
	260 nm	280 nm			
Không hạt mã số 1	0,58	0,34	1,68	0,60	290
Không hạt mã số 80	0,37	0,20	1,87	0,54	185
Có hạt mã số 63	0,53	0,31	1,73	0,58	265

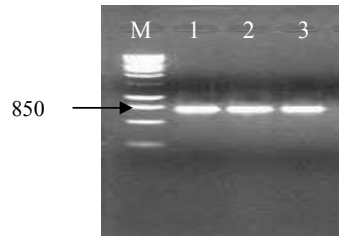
3.2 Phân tích các sản phẩm khuếch đại

3.2.1 Vùng ITS và matK

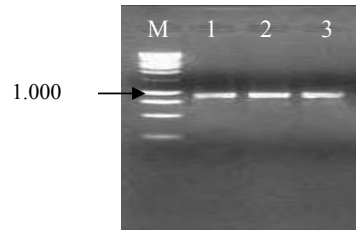
* Khuếch đại vùng ITS và matK

Sau khi thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại với cặp mồi ITS1/ITS4 và matK-390F/ matK-1326R được điện di trên gel agarose 1,5% cho băng đơn hình

với kích thước lần lượt khoảng 800 bp và 950 bp. Kết quả phân tích mẫu lá của hai cây quýt Đường không hạt và cây quýt Đường có hạt được trình bày ở hình 2 và hình 3.



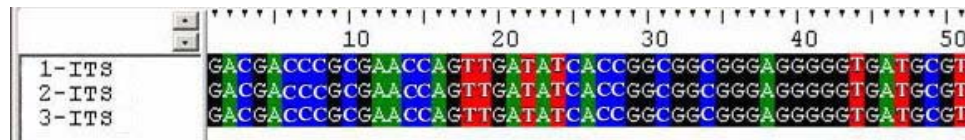
Hình 2: Phổ điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS4 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 1), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 2) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 3) so với thang chuẩn 1 kb (giếng M)



Hình 3: Phổ điện di sản phẩm PCR với cặp mồi *matK*-390F/*matK*-1326R trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 1), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 2) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 3) so với thang chuẩn 1 kb (giếng M)

Sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS4 và mồi *matK*-390F/*matK*-1326R sau khi tinh sạch được phân tích trực tiếp trên máy giải trình tự ABI 3130 và phần mềm BioEdit 7.0.5.3, kết quả cho ra giản đồ có các đỉnh (peak) với bốn màu sắc khác nhau tương ứng với bốn loại nucleotide và biểu thị dãy trình tự các nucleotide.

Kết quả phân tích vùng ITS cho thấy trình tự các nucleotide giữa hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt đều không có sự khác biệt nhau (Hình 4) và đều có tỷ lệ Guanin (G = 31,6%) và Cytosine (C = 33,3%) cao hơn tỷ lệ Adenine (A = 20,2%) và Thyminine (T = 14,8%) hay nói một cách khác là đều có thành phần GC (65%) cao hơn thành phần AT (35%).



Hình 4: Một đoạn so sánh trình tự nucleotide của vùng ITS trên quýt Đường không hạt và có hạt

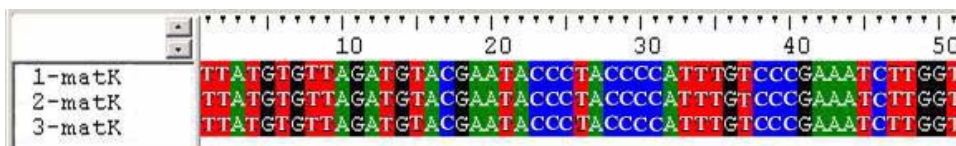
1: quýt Đường không hạt mã số 1; 2: quýt Đường không hạt mã số 80; và 3: quýt Đường có hạt mã số 63.

Theo kết quả Blast (Basic Local Alignment Search Tool) trong NCBI (National Center for Biotechnology Information), sự tương đồng của trình tự các nucleotid vùng ITS ở hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt này với các nghiên cứu khác trên *Citrus spp.* vào khoảng 96-99% (Bảng 2).

Bảng 2: Kết quả Blast trình tự các nucleotid vùng ITS của hai cây quýt Đường không hạt và cây quýt Đường có hạt trong NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CK940090.1	CGF1004741_F01 Developing fruit flavedo at 165 DAFB Citrus sinensis cDNA clone F1650003_IF_F01 5', mRNA sequence	<u>785</u>	785	62%	0.0	99%
CX293750.1	C04035B09SK FlavFr1 Citrus clementina cDNA clone C04035B09, mRNA sequence	<u>767</u>	767	60%	0.0	99%
EY832063.1	PT11-C2-300-083-B08-CT.F Poncirus trifoliata bark, greenhouse plant Citrus trifoliata cDNA, mRNA sequence	<u>745</u>	745	62%	0.0	97%
EY833590.1	PT11-C2-300-092-C03-CT.F Poncirus trifoliata bark, greenhouse plant Citrus trifoliata cDNA, mRNA sequence	<u>630</u>	630	53%	3e-177	96%
DC886463.1	DC886463 BFC Citrus unshiu cDNA clone BFC5C83 3', mRNA sequence	<u>610</u>	610	50%	3e-171	97%
CX292708.1	C04018F08SK FlavFr1 Citrus clementina cDNA clone C04018F08, mRNA sequence	<u>457</u>	457	39%	5e-125	96%
CX292699.1	C04018E11SK FlavFr1 Citrus clementina cDNA clone C04018E11, mRNA sequence	<u>455</u>	455	39%	2e-124	96%
CX291678.1	C04002B01SK FlavFr1 Citrus clementina cDNA clone C04002B01, mRNA sequence	<u>385</u>	385	33%	2e-103	96%
CX292062.1	C04010A11SK FlavFr1 Citrus clementina cDNA clone C04010A11, mRNA sequence	<u>364</u>	364	28%	3e-97	99%
FC931986.1	C34203D04EF PostHarveN Citrus clementina cDNA clone C34203D04, mRNA sequence	<u>311</u>	311	24%	4e-81	98%

Kết quả phân tích gen *matK* cho thấy trình tự các nucleotide giữa hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt đều không có sự khác biệt (Hình 5) và đều có tỷ lệ Adenine (A = 27,2%) và Thymin (T = 35,4%) cao hơn tỷ lệ Guanin (G = 17,5%) và Cytosine (C = 19,8%) hay nói một cách khác là đều có thành phần AT (62,7%) cao hơn thành phần GC (37,3%).



Hình 5: Một đoạn so sánh trình tự nucleotide của gen *matK* trên quýt Đường không hạt và có hạt

1: quýt Đường không hạt mã số 1; 2: quýt Đường không hạt mã số 80; và 3: quýt Đường có hạt mã số 63.

Theo kết quả Blast trong NCBI, sự tương đồng của trình tự các nucleotid gen *matK* ở hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt này với các nghiên cứu khác trên *Citrus spp.* vào khoảng 98-100% (Bảng 3).

Bảng 3: Kết quả Blast trình tự các nucleotid gen *matK* của hai cây quýt Đường không hạt và cây quýt Đường có hạt trong NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<u>CK940124.1</u>	CGF1004741_C01 Developing fruit flavedo at 165 DAFB Citrus sinensis cDNA clone F1650003_IF_C01 5', mRNA sequence	<u>1046</u>	1046	69%	0.0	98%
<u>EB686202.1</u>	CP29_H10_080.f1 Citrus paradisi young grapefruit leaf cDNA library Citrus x paradisi cDNA clone CP29_H10_080 3', mRNA sequence	<u>1044</u>	1044	67%	0.0	99%
<u>EY758865.1</u>	CR05-C1-100-008-H10-CT.F Mandarin leaf, greenhouse plant Citrus reticulata cDNA, mRNA sequence	<u>937</u>	937	59%	0.0	100%
<u>DR909327.1</u>	USDA-FP_17455 Citrus sinensis phloem Citrus sinensis cDNA clone VPE-20_F06 5', mRNA sequence	<u>902</u>	902	60%	0.0	98%
<u>EB686536.1</u>	CP34_D12_095.f1 Citrus paradisi young grapefruit leaf cDNA library Citrus x paradisi cDNA clone CP34_D12_095 3', mRNA sequence	<u>856</u>	856	54%	0.0	99%
<u>DR909810.1</u>	USDA-FP_17938 Citrus sinensis phloem Citrus sinensis cDNA clone VPE-34_F12 5', mRNA sequence	<u>832</u>	832	52%	0.0	100%
<u>DC893863.1</u>	DC893863 OVA Citrus unshiu cDNA clone MOAE922 3', mRNA sequence	<u>798</u>	798	53%	0.0	98%

3.2.2 Kỹ thuật RAPD

* Sản phẩm khuếch đại

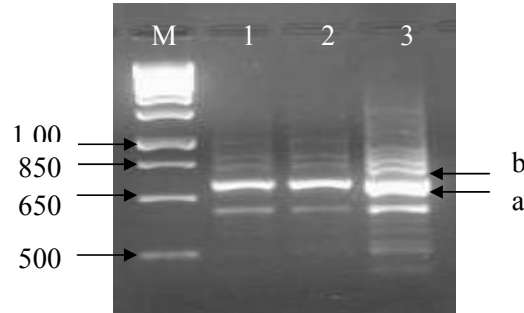
Qua kết quả phân tích chúng tôi nhận thấy cả bảy đoạn môi được sử dụng đều cho sản phẩm khuếch đại tốt. Tổng cộng có 46 băng được ghi nhận với kích thước các đoạn phân tử biến động trong khoảng 500 – 1.500 bp (Bảng 4).

Bảng 4: Bảy đoạn môi và kết quả khuếch đại của chúng.

STT	Môi	Số băng	Trọng lượng phân tử (bp)
1	A13	06	620 – 900
2	S015	10	500 – 1.440
3	SN20	07	560 – 1.220
4	SN06	07	500 – 1.000
5	OPH13	07	620 – 1.440
6	A02	05	750 – 1.500
7	OPH18	04	600 – 850

Đoạn môi A13 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu sáu đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 620 bp đến 900 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 6 – giếng 1, 2

và 3). Các mẫu phân tích đều thể hiện sự đa hình. Trong đó, dễ dàng nhận ra sự khác nhau giữa hai cây quýt Đường không hạt (giếng 1 và 2) với cây quýt Đường có hạt (giếng 3). Cây quýt Đường có hạt cho sản phẩm khuếch đại đoạn DNA ở hai vị trí 650 bp và 750 bp (ký hiệu a và b) trong khi hai cây quýt Đường không hạt không cho sản phẩm khuếch đại ở những vị trí này. Qua đó, có thể sử dụng đoạn mồi này để phân biệt các cá thể quýt Đường không hạt với cá thể quýt Đường có hạt.

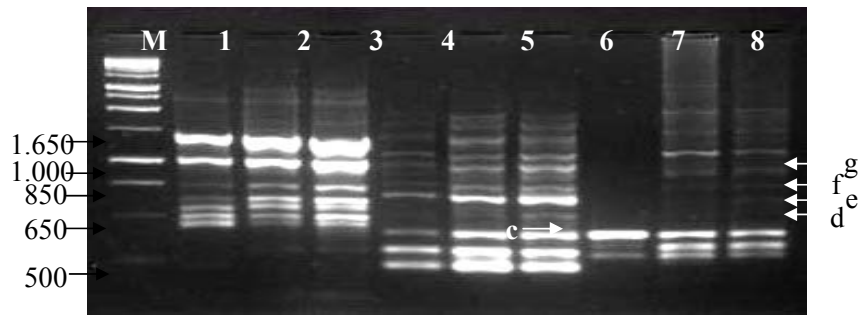


Hình 6: Phổ điện di sản phẩm PCR với mồi A13 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 1), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 2) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 3) so với thang chuẩn 1 kb (giếng M)

Đoạn mồi OPH13 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu bảy đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 620 bp đến 1.440 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 7 - giếng 1, 2 và 3). Các mẫu phân tích đều cho sản phẩm khuếch đại giống nhau. Do đó, đoạn mồi này không thể nhận biết được các cá thể quýt Đường không hạt với cá thể quýt Đường có hạt.

Đoạn mồi SO15 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu mười đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 500 bp đến 1.440 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 7 - giếng 4, 5 và 6). Các mẫu phân tích đều thể hiện sự đa hình và dễ dàng nhận ra sự khác nhau giữa hai cây quýt Đường không hạt (giếng 4 và 5) với cây quýt Đường có hạt (giếng 6). Cây quýt Đường có hạt cho sản phẩm khuếch đại đoạn DNA ở vị trí có kích thước phân tử 650 bp (ký hiệu c), trong khi hai cây quýt Đường không hạt không cho sản phẩm khuếch đại đoạn DNA ở vị trí này. Qua đó, có thể sử dụng đoạn mồi này để phân biệt các cá thể quýt Đường không hạt với cá thể quýt Đường có hạt.

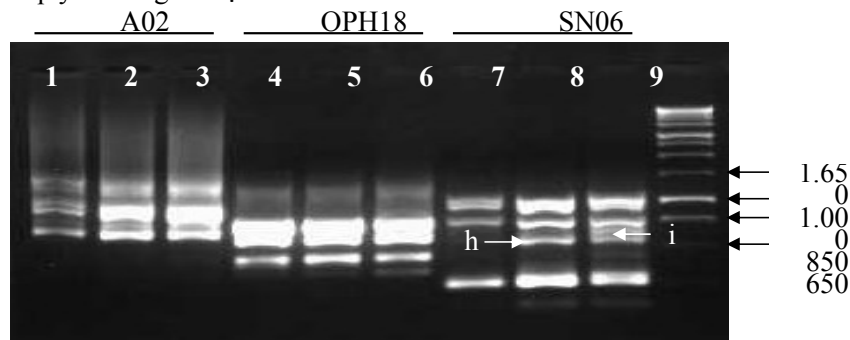
Đoạn mồi SN20 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu bảy đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 520 bp đến 2000 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 7 - giếng 7, 8 và 9). Các mẫu phân tích đều thể hiện sự đa hình và dễ dàng nhận ra sự khác nhau ở cả ba cây quýt Đường phân tích. Cây quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 7) chỉ khuếch đại đoạn DNA ở ba vị trí có kích thước phân tử lần lượt là 560 bp, 590 bp và 620 bp; trong khi cây quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 8) có thêm hai vị trí có kích thước phân tử là 1.000 bp và 1.220 bp (ký hiệu f và g). Cây quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 9) ngoài hai vị trí trên còn có thêm hai vị trí khác có kích thước phân tử là 750 bp và 850 bp (ký hiệu d và e). Trên cơ sở đó, có thể sử dụng đoạn mồi SN20 để nhận diện hai cá thể quýt Đường không hạt với nhau và với cá thể quýt Đường có hạt.



Hình 7: Phổ điện di sản phẩm PCR với môi OPH13 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 1), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 2) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 3); môi SO15 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 4), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 5) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 6); môi SN20 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 7), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 8) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 9) so với thang chuẩn 1 kb (giếng M)

Đoạn môi A02 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu năm đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 750 bp đến 1.500 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 8 - giếng 1, 2 và 3). Các mẫu phân tích đều cho sản phẩm khuếch đại giống nhau. Do đó, đoạn môi này không thể nhận biết được các cá thể quýt Đường không hạt với cá thể quýt Đường có hạt.

Tương tự, đoạn môi OPH18 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu bốn đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 600 bp đến 850 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 8 - giếng 4, 5 và 6). Các mẫu phân tích đều cho sản phẩm khuếch đại giống nhau. Do đó, đoạn môi này không thể nhận biết được các cá thể quýt Đường không hạt với cá thể quýt Đường có hạt.



Hình 8: Phổ điện di sản phẩm PCR với môi A02 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 1), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 2) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 3); môi OPH18 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 4), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 5) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 6); môi SN06 trên quýt Đường không hạt mã số 1 (giếng 7), quýt Đường không hạt mã số 80 (giếng 8) và quýt Đường có hạt mã số 63 (giếng 9) so với thang chuẩn 1 kb (giếng M)

Đoạn môi SN06 cho sản phẩm khuếch đại tối thiểu bảy đoạn DNA có kích thước phân tử trong khoảng 500 bp đến 1.000 bp với thang chuẩn 1 kb (Hình 8 - giếng 7, 8 và 9). Các mẫu phân tích đều thể hiện sự đa hình và dễ dàng nhận ra sự khác nhau ở cả ba cây quýt Đường phân tích. Cây quýt Đường không hạt 1 (giếng 7) chỉ khuếch đại đoạn DNA ở bốn vị trí có kích thước phân tử lần lượt là 500 bp, 530 bp, 850 bp, 950 bp và 1.000 bp, trong khi cây quýt Đường không hạt 2 (giếng 8)

khuếch đại đoạn DNA thêm ở vị trí có kích thước phân tử 700 bp (ký hiệu h). Cây quýt Đường có hạt 3 (giếng 9) ngoài vị trí trên còn có thêm một vị trí khuếch đại khác có kích thước phân tử là 750 bp (ký hiệu i). Trên cơ sở đó, có thể sử dụng đoạn mồi SN06 để nhận diện hai cá thể quýt Đường không hạt với nhau và với cá thể quýt Đường có hạt.

Kết quả tổng hợp ở Bảng 5 cho thấy, bằng kỹ thuật RAPD với bảy đoạn mồi được sử dụng, tổng cộng có 46 băng được ghi nhận. Trong đó có 9 băng xuất hiện sự đa hình ở các đoạn mồi SO15 (1 băng), SN20 (4 băng), SN06 (2 băng) và A13 (2 băng). Mồi SO15 và A13 có thể phân biệt được hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt. Trong khi đó, mồi SN06 và SN20 có thể phân biệt được hai cây quýt Đường không hạt với nhau và với cây quýt Đường có hạt (phân biệt được cả ba cây với nhau).

Bảng 5: Vị trí băng DNA của sản phẩm PCR-RAPD với các mồi OPH13, SO15, SN20, A02, OPH18, SN06 và A13 của quýt Đường không hạt và có hạt

Trọng lượng phân tử (bp)	Mồi																				
	OPH13			SO15			SN20			A02			OPH18			SN06			A13		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1.500										X	X	X									
1.440	X	X	X	X	X	X															
1.220				X	X	X	0	X	X	X	X	X									
1.000	X	X	X	X	X	X	0	X	X							X	X	X			
950				X	X	X				X	X	X				X	X	X			
900																			X	X	X
850	X	X	X	X	X	X	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
750	X	X	X	X	X	X	0	0	X	X	X	X				0	0	X	0	0	X
700	X	X	X										X	X	X	0	X	X	X	X	X
650	X	X	X	0	0	X													0	0	X
620	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X				X	X	X
590							X	X	X												
560				X	X	X	X	X	X				X	X	X						
530																X	X	X			
500				X	X	X										X	X	X			
Số băng	7			10			7			5			4			7			6		

1: quýt Đường không hạt mã số 1; 2: quýt Đường không hạt mã số 80; và 3: quýt Đường có hạt mã số 63.

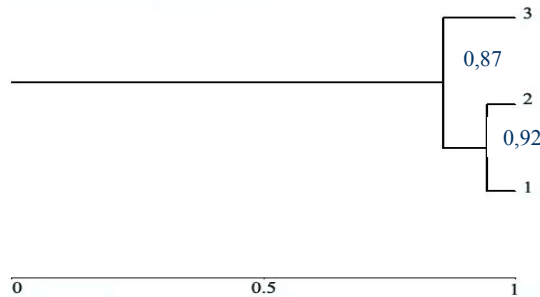
X: có hiện diện băng; 0: không hiện diện băng

Kỹ thuật RAPD đã được sử dụng khá phổ biến trong nghiên cứu tính đa hình di truyền trên nhóm cây cam quýt (Coletta Filho *et al.*, 1998, Coletta-Filho *et al.*, 2000, Nhan *et al.*, 2003, Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2004, Trần Thị Oanh Yên *et al.*, 2005). Bằng việc sử dụng kỹ thuật này, chúng tôi đã phát hiện có những sai khác về phổ băng DNA giữa hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt. Các số liệu thu được về phổ băng DNA của 2 cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt trên đây là những dẫn liệu bổ sung

về những sai khác trong hệ gen của chúng. Tuy vậy, liệu những sai khác này có liên quan và liên quan như thế nào đến đặc tính tạo hạt của trái hay không là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu. Xác định trình tự của những đoạn DNA sai khác là cơ sở tốt nhất để trả lời câu hỏi vừa nêu.

*** Mối quan hệ di truyền**

Mối quan hệ di truyền giữa hai cây quýt Đường không hạt và cây quýt đường có hạt được phân tích theo giản đồ nhánh (Hình 9).



Hình 9: Giản đồ nhánh của hai cây quýt Đường không hạt và cây quýt Đường có hạt

1: quýt Đường không hạt mã số 1; 2: quýt Đường không hạt mã số 80; và 3: quýt Đường có hạt mã số 63.

Qua giản đồ cho thấy cả ba cây quýt Đường nghiên cứu hợp thành một nhánh chính. Nhánh chính bao gồm cây quýt Đường có hạt mã số 63 với hai cây quýt Đường không hạt mã số 1 và cây quýt Đường không hạt mã số 80 với hệ số giống nhau khá cao (0,87). Điều này có thể kết luận rằng giữa hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt có quan hệ di truyền gần nhau.

Cũng qua giản đồ nhánh cho thấy hai cây quýt Đường không hạt hợp thành một nhánh phụ và chúng có hệ số giống nhau cao (0,92). Điều này có thể kết luận giữa hai cây quýt Đường không hạt có quan hệ di truyền gần gũi với nhau.

4 KẾT LUẬN

Kết quả giải trình tự các nucleotide vùng ITS và gen matK cho thấy giữa 2 cá thể quýt Đường không hạt là giống nhau và không khác biệt với cây quýt Đường có hạt.

Bằng kỹ thuật RAPD, đã ghi nhận có những sai khác về phổ băng DNA giữa 2 cây quýt Đường không hạt với nhau và với cây quýt Đường có hạt. Đây là dấu phân tử để nhận diện 2 dòng quýt Đường không hạt được phát hiện ở ĐBSCL. Mỗi SO15 và A13 có thể phân biệt được hai cây quýt Đường không hạt với cây quýt Đường có hạt. Trong khi đó, mỗi SN06 và SN20 có thể phân biệt được hai cây quýt Đường không hạt với nhau và với cây quýt Đường có hạt (phân biệt được cả ba cây với nhau). Kết quả phân tích quan hệ di truyền cũng cho phép kết luận hai cá thể quýt Đường không hạt có mối quan hệ gần gũi với nhau và gần với quýt Đường có hạt thương phẩm trong vùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andrade-Rodríguez, M., A. Villegas-Monter, G. Carrillo-Castaneda, A. García-Velásquez (2004), *Polyembryony and identification of volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD*, Pesq. Agropec. Bra, 39, 551- 559.
- Coletta-Filho, H.D., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C.P.Q.D.G. Moreira and J. Pompeu Jr. (1998), *Analysis of the genetic diversity among mandarins (Citrus spp.) using RAPD markers*. Euphytica, 102(1), 133-139.
- Coletta-Filho, H.D., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon and J. Pompeu Jr. (2000), *The use of random amplified polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin (Citrus reticulata Blanco) accessions*. Genetic and Molecular Biology, 23(1), 169-172.
- Kyndt, T., B.V. Droogenbroeck, E. Rromeijn-Peeters, J.P. Romero-Motochi. X. Scheldeman, P. Goetghebeur, P. Van Damme and G. Gheysen (2005), *Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA Internal Transcribed space (ITS) and chloroplast sequence data*, Mol. Phy. Evol., 37, 442-459.
- Nguyễn Bảo Vệ, Lê Vĩnh Thúc, Nguyễn Bá Phú, Nguyễn Việt Khởi, Nguyễn Thị Thu Đông, Phùng Thị Thanh Tâm, Lâm Ngọc Phương, Nguyễn Ngọc Tuyết, Bùi Thị Cẩm Hương, Lưu Thái Danh, Phạm Thị Phương Thảo và Phạm Đức Trí. 2007. *Ứng dụng công nghệ cao trong chọn, tạo giống cam Sành (Citrus nobilis Lour) và quýt Đường (Citrus reticulata Blanco) không hạt có năng suất và phẩm chất cao*. Báo cáo khoa học đề tài Nghiên cứu Khoa học cấp Tỉnh. Sở Khoa học và Công nghệ Vĩnh Long. 77p.
- Nhan, N.T., T. Shimizu, N. Hirohisa, M. Omura and N.M. Chau (2003), *RAPD Markers: Application to Varietal Identification and Analysis of Genetic Relationships among Citrus Varieties/Species in Vietnam*, Jircas Newletters.
- Oliveira, R.P., C.I. Aguilar-Vildoso, M. Cristofani and M.A. Machado (2004), *Skewed RAPD markers in linkage maps of Citrus*, Genet. Mol. Biol, 27(3), 437-441.
- Rogers, S.O. and A.J.B. Bendich (1988), *Extraction of DNA from plant tissues*, Plant molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, printed in Belgium.
- Trần Thị Oanh Yến, Nguyễn Ngọc Thi, Nguyễn Nhật Trường và Phạm Ngọc Liễu (2005), *Kết quả tuyển chọn giống cam mật (Citrus sinensis) không hạt ổn định trong tự nhiên*, Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ rau quả năm 2003-2004, Viện nghiên cứu cây ăn quả Miền Nam, Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Trang 65-76.
- Pielou, E.C. (1984), *The interpretation of Ecological Data*, Wiley, New York
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3.