



DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.008

**KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ ĐẶC TÍNH DI TRUYỀN BẰNG
 DẤU CHỈ THỊ PHÂN TỬ ISSR CỦA CÁC GIỐNG THANH TRÀ
 ((*Bouea oppositifolia* (Roxb.)) MEISNE.) TẠI THỊ XÃ BÌNH MINH, TỈNH VĨNH LONG**

Lê Y Phụng^{1*}, Văn Quốc Giang¹, Nguyễn Lộc Hiền², Trần Văn Hậu² và Huỳnh Kỳ²

¹NCS ngành Di truyền và Chọn giống cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ

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

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Y Phụng (lyp.240493@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 26/06/2017

Ngày nhận bài sửa: 12/09/2017

Ngày duyệt đăng: 27/02/2018

Title:

Morphological and genetic characteristics of twelve marian plum (*Bouea oppositifolia* (Roxb.)) Meisne. varieties using ISSR markers in Binh Minh district, Vinh Long Province, Viet Nam

Từ khóa:

Bouea oppositifolia (Roxb.), ISSR, Thanh Trà, UPGMA

Keywords:

Bouea oppositifolia (Roxb.), ISSR, Marian Plum, UPGMA

ABSTRACT

In this study, fruit and leaf characteristics were used to examine the similarities and differences between 12 selected marian plum line/varieties selected from 44 surveyed gardens. Based on the results, ten random decamer primers out of the 15 tested were applied to assess the genetic diversity of 12 marian plum accessions. The leave phenotyping and genotyping results showed that 12 accessions were grouped into four major clusters. In total, 214 bands were amplified using 10 ISSR markers. Of 214 bands, 202 bands accounted for 95.29% were polymorphic. The PIC_{AV} values ranged from 0.26 to 0.37, and indicated an average level of polymorphism in the selected population. Based on the UPGMA analysis, 12 accessions were grouped into four main clusters with the ratio of coefficient similarity between 0.48 to 0.80 with the arithmetic mean of 0.65. Collectively, this report revealed that the 12 selected lines were valuable genetic resources for complementary conservation and breeding strategies of marian plum in the future.

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các đặc điểm hình thái trái, lá được dùng để khảo sát sự giống và khác nhau giữa 12 mẫu Thanh Trà được chọn từ 44 vườn điều tra. Qua kết quả khảo sát, 15 dấu chỉ thị phân tử ISSR có 10 dấu chỉ thị phân tử ISSR cho kết quả nên 10 dấu này được dùng để khảo sát mối tương quan di truyền của các mẫu Thanh Trà. Dựa vào phân tích đặc điểm hình thái lá và kiểu gen, có thể chia các mẫu Thanh Trà thành 4 nhóm chính. Kết quả khảo sát bằng 10 dấu chỉ thị phân tử ISSR đã khuếch đại tổng số 214 băng trong đó có 202 băng đa hình đạt tỉ lệ 95,29%. Chỉ số PIC dao động từ 0,26 – 0,37 cho thấy mức độ đa hình trung bình của quần thể được sử dụng trong bài nghiên cứu này. Kết quả phân tích sơ đồ nhánh dựa vào phương pháp UPGMA đã chứng minh các mẫu Thanh Trà có sự đa dạng về kiểu gen rất cao và có hệ số tương đồng dao động từ 0,48 – 0,80 và trung bình là 0,65. Nghiên cứu này chỉ ra rằng có sự biến đổi về mặt di truyền đáng kể trong số các mẫu, mà hình thái học khó có thể phân biệt được.

Trích dẫn: Lê Y Phụng, Văn Quốc Giang, Nguyễn Lộc Hiền, Trần Văn Hậu và Huỳnh Kỳ, 2018. Khảo sát đặc điểm hình thái và đặc tính di truyền bằng dấu chỉ thị phân tử ISSR của các giống Thanh Trà (*Bouea oppositifolia* (Roxb.)) Meisne. tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(1B): 50-60.

1 GIỚI THIỆU

Thanh Trà là một chi nổi tiếng trong Anacardiaceae thuộc họ xoài (Kochummen, 1996). Cây Thanh Trà (*Bouea oppositifolia* (Roxb.) Meisne) là cây ăn trái nhiệt đới, thuộc họ xoài và có nguồn gốc ở khu vực Đông Nam Á (Poolperm, 1993). Nó được trồng rộng rãi ở Sumatra, những vùng ẩm ướt ở Java, Borneo, Ambon và Thái Lan (Subhadrabandhu, 2001). Ở Việt Nam, cây Thanh Trà chỉ được tập trung canh tác ở vùng đất phù sa. Thị xã Bình Minh là vùng trồng Thanh Trà nhiều nhất (với hơn 150 ha) và tập trung duy nhất ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long vì thế có thể nói đây là đặc sản thứ hai sau bưởi Năm Roi. Bên cạnh đó, cây Thanh Trà còn được canh tác rải rác ở vùng đất Hà Tiên thuộc nhóm đất xám nghèo dinh dưỡng (Nguyễn Thị Huỳnh Mai, 1998). Ngoài ra, cây Thanh Trà ít tốn công chăm sóc, dễ trồng, ít nhiễm sâu bệnh hại, khả năng chịu hạn tốt, trái có mùi vị thơm ngon, màu sắc và mẫu mã đẹp hấp dẫn người tiêu dùng nên được thị trường ưa chuộng.

Tuy nhiên, diện tích Thanh Trà lại đang có xu hướng giảm. Nguyên nhân do một số yếu tố khách quan và chủ quan của nhà vườn như sâu bệnh, thời tiết thất thường, giá bán không ổn định. Ngoài ra, công tác giống chưa được chú trọng, nhà vườn thường mua giống thông qua người quen hoặc tự chiết cành nhân giống từ những cây không đủ tiêu chuẩn. Dẫn đến tình trạng cây dễ bị nhiễm bệnh, năng suất không cao, tuổi thọ cây ngắn và đặc biệt là khó xác định được sự khác nhau giữa các giống. Do đó, để nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng cũng như chọn ra những dòng thuần và những cây đầu dòng tốt phục vụ cho việc bảo tồn, phát triển nguồn gen, cần phải có cơ sở dữ liệu dựa trên sự kết hợp sử dụng các phương pháp chọn giống truyền thống (đánh giá kiểu hình, nhân giống vô tính) với các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại.

Ngày nay, những dấu phân tử như SSR, RAPD, ISSR là các dấu phân tử được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật sinh học phân tử để nhận diện sự biến đổi di truyền ở thực vật. Cách tiếp cận phân tử để xác định kiểu gen thực vật có hiệu quả hơn so với các dấu hình thái học truyền thống vì nó cho phép truy cập trực tiếp tới hệ gen thực vật, chúng không bị ảnh hưởng bởi môi trường và có thể phát hiện được trong tất cả các giai đoạn phát triển. Dấu phân tử ISSR dựa trên kỹ thuật PCR dễ dàng, nhanh chóng, đơn giản và tiết kiệm (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Loại dấu phân tử này có khả năng lặp lại được do độ tin cậy hơn (nhiệt độ bắt mỗi cao), không yêu cầu thông tin về trình tự gen cũng như các nghiên cứu di truyền trước (Arohak *et al.*, 2003; Thimmappaiah *et al.*, 2009). Các dấu phân tử ISSR đã được sử dụng thành công cho đánh giá sự

đa dạng di truyền về dâu hoang dại (Cekic *et al.*, 2001), hạt điều Ấn Độ (Arohak *et al.*, 2003), hay nghiên cứu mối quan hệ phát sinh loài giữa 33 cây thuộc chi *Citrus* ở tỉnh Fars, Iran (Shahsavari *et al.*, 2007), các mẫu măng cụt ở Bình Dương (Trần Nhân Dũng và *ctv.*, 2012). Đối với họ Anacardiaceae, ISSR đã được sử dụng thành công để nghiên cứu về xoài (Gonzalez *et al.*, 2002; Damodaran *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2012). Ngoài ra, các dấu phân tử ISSR cũng được sử dụng cho nghiên cứu 24 mẫu cây nghệ (Nguyễn Lộc Hiền và *ctv.*, 2013) và nghiên cứu 40 mẫu cam (Vũ Văn Hiếu và *ctv.*, 2015). Mặc dù các nghiên cứu về sự đa dạng di truyền trong Anacardiaceae được ghi chép đầy đủ, nhưng lại khá giới hạn và thông tin về các loài Anacardiaceae nói chung và *Bouea* nói riêng thì khá ít. Chỉ có một số báo cáo về Thanh Trà như một số loại cây ăn trái nhiệt đới chưa được sử dụng của Thái Lan (Subhadrabandhu, 2001), cây Thanh Trà ở Đồng bằng sông Cửu Long (Nguyễn Thị Huỳnh Mai, 1998), sử dụng các dấu phân tử SSR trong đặc tính mầm bệnh của Thanh Trà (Damodaran *et al.*, 2013). Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về đặc điểm hình thái và đặc tính di truyền giữa các giống Thanh Trà. Vì vậy, đề tài “Khảo sát đặc điểm hình thái và đặc tính di truyền bằng dấu chỉ thị phân tử của các giống Thanh Trà (*Bouea oppositifolia* (Roxb.) Meisn) tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long” được thực hiện nhằm đánh giá đặc tính di truyền, từ đó làm cơ sở cho việc chọn tạo giống Thanh Trà cho năng suất cao, chất lượng tốt cho nguồn giống Thanh Trà tại Thị Xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đề tài được thực hiện tại 44 vườn điều tra của các hộ nông dân thuộc thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long từ tháng 8/2016 đến tháng 10/2016. Thí nghiệm thực hiện trên 12 mẫu Thanh Trà được thu có chọn lọc (dựa vào dạng trái và chất lượng trái) từ các vườn điều tra, các đặc trưng từ đặc tính hình thái và đặc tính nông học của Thanh Trà được khảo sát dựa trên tiêu chuẩn IPGRI (1999) (Bảng 1).

Cách thu mẫu lá: bắt đầu đánh dấu và theo dõi các cây nhú chồi đến ngày thứ 28; thu ngẫu nhiên 20 lá/cây (tuổi cây > 10 năm, và mỗi cây có độ tuổi khác nhau), 4 cây/giống đã chọn để mô tả hình dạng lá, mép lá, dạng cuống lá, dạng đỉnh lá và đo các chỉ tiêu nông học của lá như: chiều dài phiến lá, chiều rộng phiến lá, độ dài cuống lá.

– Chiều dài phiến lá: dùng thước kẻ để đo từ góc cuống lá đến đầu tận cùng của phiến lá.

– Chiều rộng phiến lá: dùng thước kẻ đo ở phần rộng nhất của phiến lá.

- Độ dài cuống lá: dùng thước kẻ đo từ phần đầu đến phần gốc cuống lá.
- Tính tỉ lệ chiều dài/chiều rộng phiến lá.

Cách thu mẫu trái: cũng như thu mẫu lá, bắt đầu đánh dấu và theo dõi các cây ra phát hoa đến ngày thứ 60; thu ngẫu nhiên 20 trái/cây, 4 cây/giống đã chọn để mô tả các đặc điểm của trái.

Bảng 1: Danh sách giống Thanh Trà được dùng ly trích DNA

Mẫu Nơi thu thập	
1	519, tổ 5 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
2	553, tổ 4 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
3	723, tổ 4 ấp Đông Hưng III, xã Đông Thành
4	1393, tổ 4 ấp Mỹ Thới I, xã Mỹ Hoà
5	1511, tổ 4 ấp Hoá Thành I, xã Đông Thành
6	549, tổ 5 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
7	580, tổ 4 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
8	636, tổ 4 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
9	522, tổ 5 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
10	634, tổ 4 ấp Đông Hưng II, xã Đông Thành
11	1393, tổ 4 ấp Mỹ Thới I, xã Mỹ Hoà
12	1375, tổ 4 ấp Mỹ Thới I, xã Mỹ Hoà

2.1 Ly trích DNA

Mẫu lá Thanh Trà được ly trích DNA theo phương pháp CTAB (Doyle and Doyle, 1990), được tinh chỉnh theo các bước sau: đầu tiên, cần

Bảng 2: Trình tự 10 con mồi ISSR được sử dụng ở nghiên cứu này

Tên đoạn mồi	Trình tự	Tm (°C)
ISSR BB1	5'-CCACCACCACCACCA-3'	55
ISSR BB11	5'-GTGGTGGTGGC-3'	55
ISSR BB3	5'-CACCACCACGC-3'	55
ISSR BB5	5'-CACACACACAAG-3'	55
ISSR BB7	5'-GGGCGAGAGAGAGAGA-3'	55
ISSR BB9	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	55
ISSR BB10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	55
ISSR BB13	5'-AGCAGCAGCAGCGT-3'	55
ISSR BB18	5'-GAGAGAGAGAGAGAT-3'	55
ISSR BB19	5'-GACAGACAGACAGACA-3'	55
ISSR Bn3	5'-AGGTCCAGCAGCAGCAG-3'	55
ISSR Bn4	5'-CACGTACTGTGTGTGTGTGTGT-3'	55
ISSR Bn6	5'-GAGAGAGAGAGAGG-3'	55
ISSR UBC20	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-3'	52,4
ISSR UBC22	5'-AGAGAGAGAGAGAGYT-3'	53,8

Nguồn: Mostafa et al. (2011)

Phản ứng PCR được tiến hành như sau: mỗi phản ứng bao gồm 20 µL, trong đó có 10 µL PCR Master Mix 2X; 8,5 µL H₂O PCR; 0,5 µL Primer và 1 µL DNA. Tất cả được trộn đều trước khi cho vào máy PCR GeneAmp PCR System 2700. Phản ứng này được thực hiện trong 40 chu kỳ gia nhiệt, bao gồm: 5 phút ở 94°C, 30 giây ở 94°C, 30 giây kể tiếp tùy thuộc vào nhiệt độ gắn mồi của mỗi

200 mg mẫu lá tươi cho vào cối và nghiền với 1 mL dung dịch CTAB (ở 65°C trong 60 phút) cho vào tube và mỗi tube cho vào 10µL β-mercaptoethanol rồi ủ 60 phút (10 phút lắc trộn mẫu 1 lần); sau khi ủ, mẫu được thêm vào 500 µL CI, trộn đều ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút; sau đó, rút 750 µL phần trên cho vào tube mới rồi thêm 500 µL CI, lắc đều, ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút; tiếp theo rút 550 µL phần trên vào tube mới rồi thêm vào 500 µL CI, lắc đều, ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút; rút 350 µL ở lớp trên cho vào tube mới, rồi cho thêm 5 µL RNase và ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ; thêm vào mỗi tube 300 µL CTAB và 500 µL CI, rồi trộn đều, ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút; lấy 400 µL phần trên cho vào tube mới, thêm 400 µL Isopropanol lạnh, trộn đều và ủ trong đá 30 phút, sau đó lấy mẫu ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút, rồi rạn lấy DNA và thêm 500 µL ethanol 70%, tiếp tục ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút (làm 2 lần); cuối cùng, rạn lấy DNA kết tủa đem phơi khô khoảng 30 phút, thêm vào 30 µL TE để hoà tan DNA và trữ mẫu ở -20°C.

2.2 ISSR – PCR

Mười chỉ thị phân tử ISSR được sử dụng cho nghiên cứu này (Mostafa et al., 2011). Trình tự của đầu chỉ thị được liệt kê ở Bảng 2.

primer ISSR mà điều chỉnh trên máy cho phù hợp (Bảng 2). Kéo dài chuỗi trong 30 giây ở 72°C, 5 phút ở 72°C và sản phẩm được trữ ở 100°C trong 20 phút.

Sau đó, sản phẩm PCR được tiến hành điện di bằng cách đổ gel polyacrylamide 8% gồm H₂O PCR, Bis-Acrylamide (29:1), TBE 5X, AP 10% và TEMED. Kế tiếp cho vào khuôn điện di gel

polyacrylamide và đợi khoảng 15 phút cho gel đặc lại, tiến hành lấy ra và rửa gel, sau đó lắp gel vào máy ATTA Compact PAGE-Twin. Dung dịch TBE 0,5X được đổ thêm vào cho ngập khuôn điện di trước khi chạy. Tiếp theo, 3 μ L ladder 1kb plus được bơm vào giếng đầu tiên của khuôn bên trái và giếng thứ 2 của khuôn bên phải để làm dấu, sau đó bơm mẫu PCR vào giếng lần lượt theo đúng thứ tự đã ghi trong danh sách. Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel polyacrylamide trong dung dịch TBE 0,5X bằng máy ATTA Compact PAGE-Twin với thời gian 60 phút ở hiệu điện thế 24V. Sau khi đã chạy điện di xong, tiến hành lấy gel ra và đem đi nhuộm trong ethidium bromide (10 mg/L) khoảng 15-20 phút ; kế tiếp đem rửa trong nước cất trong 5 phút và đem chụp ảnh gel với máy đọc gel bằng tia UV.

2.3 Phân tích số liệu

Phân tích phương sai (ANOVA) để phát hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức giống được khảo sát. Các giá trị trung bình được kiểm định bằng phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

Đặc tính hình thái của dạng lá, dạng trái được phân tích bằng hình ảnh thực tế được chụp ở vườn Thanh Trà tại Thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long và hình ảnh theo IPGRI (1999).

Các dãy băng trên gel thu được từ sản phẩm PCR được nhập vào phần mềm Excel. Sự hiện diện hoặc không hiện diện của một băng nào đó trên gel sẽ được ghi nhận tuân tự là 1 và 0. Sau khi ghi nhận tất cả các dãy băng trên mỗi dòng Thanh Trà, số liệu được lưu trữ trên phần mềm Excel. Phân tích cluster, vẽ giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan di truyền giữa các cá thể trong cùng một dòng bằng phần mềm NTSYSpc 2.11a (Numerical Taxonomy System Personal Computer) theo phương pháp UPGMA (Sneath and Sokal, 1973). Bảng đặc trưng thì được tính toán bởi phần mềm GelAnalyzer phiên bản 2010.

Chỉ số PIC (polymorphism information content) là chỉ số đa hình di truyền hay còn gọi là thước đo độ đa hình theo định nghĩa của Botstein *et al.* (1980). Theo đó, dấu chỉ thị phân tử ISSR là dạng marker trội (dominant marker) nên Roldan Ruiz *et al.* (2000) cho rằng chỉ số PIC của mỗi locus sẽ được tính theo công thức:

$$PIC_i = 2f_i(1-f_i)$$

Trong đó: i là thứ tự locus được tính, f_i là tần số alen xuất hiện, $(1-f_i)$ là tần số alen không xuất hiện. Kết quả chỉ số PIC sau cùng sẽ là chỉ số PIC trung bình cộng của tất cả các locus được tính theo công thức trên.

Chỉ số Marker Index (MI) là chỉ số đa dạng trung bình của các locus đa hình và được tính theo công thức:

$$MI = PIC \times EMR$$

Trong đó, EMR (Effective multiplex ratio) theo Varshney *et al.* (2007) được tính bằng công thức:

$$EMR = n \times \beta$$

với n là số băng được khuếch đại ở từng locus của mỗi được sử dụng và β là tần số được tính giữa locus đa hình (PB) và locus không đa hình (MB) có công thức:

$$\beta = PB / (PB + MB)$$

Chỉ số Rp (Resolving power) là chỉ số sai khác của mỗi cặp mỗi theo Prevost và Wilkinson (1999) chỉ số này được tính theo công thức:

$$Rp = \sum Ib$$

Trong đó, Ib (Band informativeness) có công thức:

$$Ib = 1 - [2 \times |0.5 - p|]$$

với p là tần số xuất hiện băng.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm hình thái

Dựa vào kết quả đặc điểm hình thái trái như đường kính trái, chiều dài trái, đường kính hột và chiều dài hột (Bảng 3) đều cho thấy các mẫu Thanh Trà khác biệt có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Các chỉ tiêu này đều phân các mẫu Thanh Trà làm 3 nhóm. Đường kính trái lớn nhất là các mẫu (1)-(4) (4,03 cm), nhỏ nhất là các mẫu (9)-(12) (3,30 cm), theo mô tả của Verheij, (1992) thì trái Thanh Trà có đường kính chỉ khoảng 1,5 cm, nên kết quả này cho thấy các mẫu Thanh Trà ở Thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long đều có đường kính trái to hơn. Có nhiều nguyên nhân ảnh hưởng đến kích thước trái như dinh dưỡng, thời tiết, ... Chiều dài trái lớn nhất là các mẫu (5)-(8) (4,59 cm), các mẫu còn lại khác biệt không có ý nghĩa qua phân tích thống kê. Kết quả này phù hợp với mô tả của Andrew (2011), Trái Thanh Trà chín dài khoảng 4-7 cm, vỏ mỏng, mịn và giòn. Đường kính hột nhỏ nhất là ở các mẫu (1)-(4) (1,52 cm), các mẫu còn lại khác biệt không có ý nghĩa qua phân tích thống kê. Còn về chiều dài hột, lớn nhất là các mẫu (5)-(8) (3,19 cm), nhỏ nhất là các mẫu (1)-(4) (2,60 cm). Từ kết quả trên cho thấy các mẫu Thanh Trà (1) – (4) có kích thước hột nhỏ nhất, nhưng kích thước trái to hơn các mẫu còn lại. Từ đó cho thấy nó có tỷ lệ thịt nhiều và điều này là một trong những nguyên nhân mà các mẫu này được nhà vườn và người tiêu dùng ưa chuộng hơn.

Bảng 3: Kích thước trái và hạt của các mẫu Thanh Trà khảo sát tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long

Mẫu	Đường kính trái (cm)	Chiều dài trái (cm)	Đường kính hạt (cm)	Chiều dài hạt (cm)
(1) - (4)	4,03 ^a	4,30 ^b	1,52 ^b	2,60 ^c
(5) - (8)	3,42 ^b	4,59 ^a	1,66 ^a	3,19 ^a
(9) - (12)	3,30 ^c	4,29 ^b	1,67 ^a	2,92 ^b
F (mẫu)	**	**	**	**
CV (%)	5,40	4,90	16,24	6,58

Ghi chú: Trong cùng một cột những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Duncan; **: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1%

Phạm Hoàng Hộ (1991) đã mô tả trái Thanh Trà là dạng quả hạch tròn, dài có màu nâu vàng, thịt quả màu vàng, có vị chua, khi chín hơi ngọt. Tuy nhiên, theo Andrew (2011), trái Thanh Trà như một loại xoài nhỏ có hình elip. Trong khi đó, dạng trái Thanh Trà ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long có 3 dạng như Hình 1 cho thấy dạng trái của đa số các mẫu Thanh Trà (5) – (12) là hình elip

nhưng các mẫu Thanh Trà (5) – (8) ở kiểu hình (b) có kích thước to hơn các mẫu Thanh Trà (9) – (12) kiểu hình (c), còn các mẫu Thanh Trà (1) – (4) ở kiểu hình (a) thì có dạng trái hình cầu. Điều này chứng tỏ hình dạng trái của Thanh Trà ở Bình Minh rất đa dạng và khác biệt so với mô tả của Phạm Hoàng Hộ và Andrew.



Hình 1: Hình dạng trái các giống Thanh Trà được điều tra tại Thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long, 2016

Ghi chú: (a) các mẫu Thanh Trà (1) – (4); (b) các mẫu Thanh Trà (5) – (8); (c) các mẫu Thanh Trà (9) – (12)

Dựa vào đặc điểm hình thái lá thì khó có thể phân biệt được sự khác nhau của các mẫu Thanh Trà, vì đa số các mẫu Thanh Trà ở Hình (a), (b) và (c) (Hình 2) đều có dạng lá hình bầu dục, nhưng chỉ có mẫu Thanh Trà (12) Hình (c) lại có dạng lá hình ngọn giáo. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phạm Hoàng Hộ (2003), lá Thanh Trà là

dạng lá đơn nguyên, dài mọc đối, phiến lá bầu dục thon. Về đỉnh lá thì 12 mẫu Thanh Trà (Hình 2) đều có đỉnh lá dạng mũi nhọn. Cuống lá của 12 mẫu Thanh Trà cũng giống nhau là dạng cuống nhọn. Mép lá của 12 mẫu Thanh Trà cũng không khác biệt nhau, đều là mép lá dạng nguyên (không gợn sóng).



Hình 2: Bốn dạng lá (ở 4 tuần tuổi) chính theo đặc điểm hình thái và di truyền của 12 mẫu Thanh Trà

Ghi chú: (a), (b) (c): hình bầu dục, (d): hình ngọn giáo

Dựa vào kết quả đặc điểm hình thái lá như dài cuống, dài lá, rộng lá và tỉ lệ dài/rộng lá (Bảng 4) đều cho thấy các mẫu Thanh Trà khác biệt có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Nhưng chỉ có tỉ lệ dài/rộng lá có thể chia các mẫu Thanh Trà thành các nhóm khác nhau. Nhóm I là 3 mẫu Thanh Trà (1), (2) và (3) có tỉ lệ dài/rộng lá khác biệt không có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Tỷ lệ dài/rộng lá của nhóm này

là nhóm có tỉ lệ dài/rộng lá nhỏ nhất trong tất cả các nhóm và nằm trong khoảng 2,59 – 2,65 mm. Nhóm II là 6 mẫu Thanh Trà (4) – (9) có tỉ lệ dài/rộng lá khác biệt không có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Tỷ lệ dài/rộng lá của nhóm này nằm trong khoảng 2,7 – 2,77 mm. Nhóm III chỉ có duy nhất mẫu Thanh Trà (12) với tỉ lệ dài/rộng lá là 3,7 mm và cũng là nhóm có tỷ lệ dài/rộng lá lớn nhất trong tất cả các mẫu. Nhóm IV

là 2 mẫu Thanh Trà (10), (11) có tỉ lệ dài/rộng lá lần lượt là 2,83 mm và 2,87 mm và tỷ lệ của 2 mẫu này cũng khác biệt không có ý nghĩa qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Theo Verheij (1992), lá Thanh Trà ngọt thường lớn hơn lá của Thanh Trà chua. Đặc biệt, các lá già có chiều dài từ 100 – 170 mm, ngang 25 – 45 mm. Sự khác nhau về dinh

dưỡng và lượng nước sẵn có, tiếp xúc với ánh mặt trời, độ ẩm và các yếu tố môi trường khác có thể khác nhau giữa cây và trong cây có thể có ảnh hưởng đến lá, mô tĩnh mạch và đường viền lá (Tsukaya, 1995; Roth *et al.*, 2001; Chickarmane *et al.*, 2010).

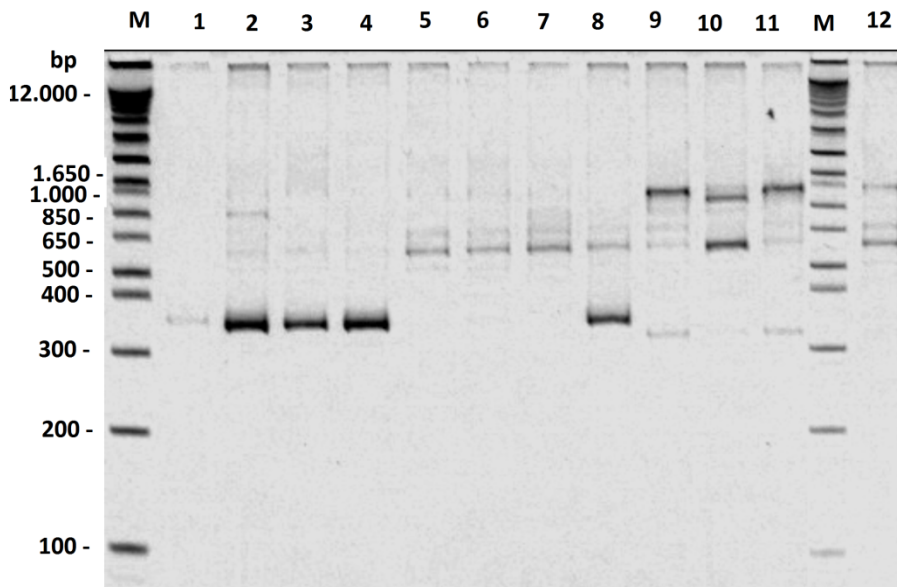
Bảng 4: Đặc điểm hình thái lá của các mẫu Thanh Trà khảo sát tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long

Mẫu	Dài cuống (mm)	Dài lá (mm)	Rộng lá (mm)	Tỷ lệ D/R lá (mm)
1	11,35 ^{bcd}	82,35 ^d	31,40 ^d	2,62 ^{ef}
2	12,35 ^{bcd}	100,50 ^c	38,10 ^{bc}	2,65 ^{ef}
3	12,70 ^b	100,40 ^c	38,80 ^{bc}	2,59 ^f
4	12,70 ^b	105,50 ^b	38,65 ^{bc}	2,73 ^{de}
5	12,20 ^{bcd}	108,35 ^b	39,30 ^b	2,75 ^{cd}
6	11 ^{cd}	107,00 ^b	38,65 ^{bc}	2,77 ^{cd}
7	12,60 ^{bc}	104,55 ^{bc}	38,70 ^{bc}	2,71 ^{de}
8	11,15 ^{bcd}	100,15 ^c	37,30 ^c	2,70 ^{de}
9	10,75 ^d	105,85 ^b	38,95 ^{bc}	2,71 ^{de}
10	10,90 ^d	75,35 ^c	26,65 ^c	2,82 ^{bc}
11	7,85 ^c	70,95 ^f	24,80 ^f	2,87 ^b
12	14,50 ^a	151,60 ^a	41,00 ^a	3,70 ^a
F (mẫu)	**	**	**	**
CV (%)	19,67	6,76	7,20	5,36

3.2 Phân tích đa dạng di truyền của 12 mẫu Thanh Trà bằng dấu chỉ thị phân tử ISSR

Kết quả khuếch đại của 10 primer ISSR đã được sử dụng trong phản ứng PCR cho 12 mẫu Thanh Trà được thể hiện ở Bảng 5 cho thấy có tổng số 214 băng được khuếch đại, trong đó có 202 băng đa hình chiếm tỉ lệ 95,29%. Mỗi ISSR BB9

cho kết quả cao nhất với 34 phân đoạn đa hình đạt tỷ lệ 100%, ngược lại mỗi ISSR Bn3 cho kết quả thấp nhất với 20 phân đoạn đa hình đạt tỷ lệ 76,92%. Các môi cho kết quả phân đoạn đa hình đạt 100% là mỗi ISSR BB11, ISSR BB3, ISSR BB5, ISSR BB9, ISSR BB10, ISSR BB13, ISSR Bn4.



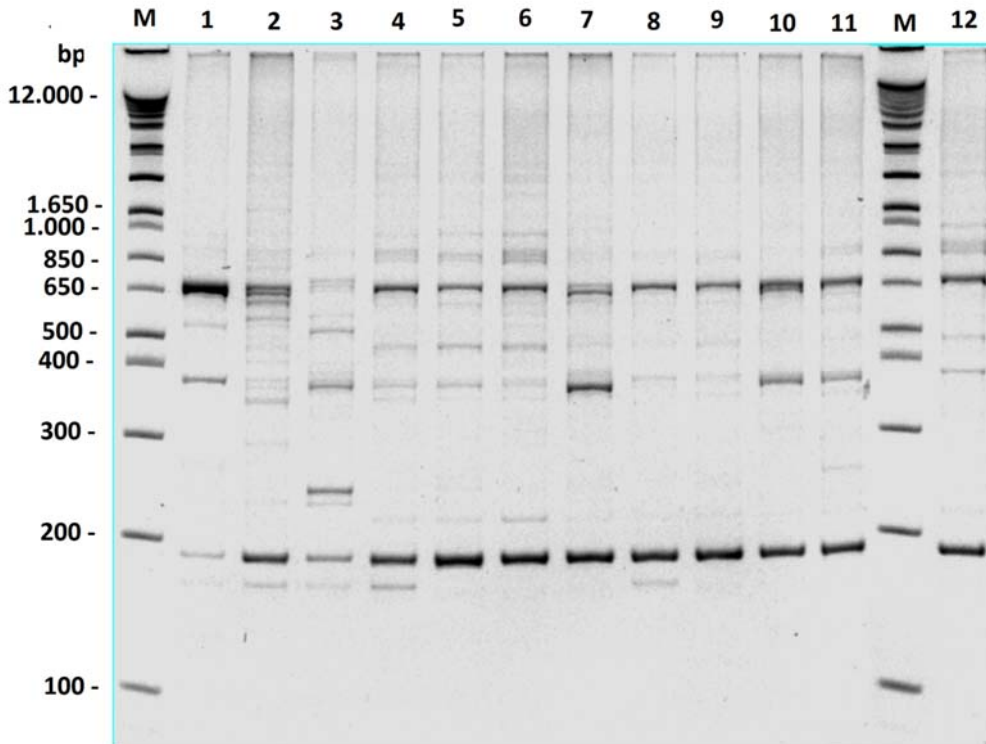
Hình 3: Phổ điện di sản phẩm PCR bằng mỗi ISSR BB11 cho 12 mẫu Thanh Trà trên gel polyacrylamide 8%. M: thang chuẩn 1 kb plus ladder (Invitrogen, USA), 1 – 12: tương ứng với các mẫu Thanh Trà (1) – (12)

Theo Botstein *et al.* (1980), nếu chỉ số PIC > 0,5 thì môi được sử dụng cho kết quả đa hình cao, ngược lại chỉ số PIC nằm trong khoảng $0,25 \leq PIC \leq 0,5$ cho kết quả đa hình trung bình và với chỉ số PIC < 0,25 thì kết quả đa hình thấp. Theo Bảng 5 cho thấy chỉ số PIC thấp nhất là 0,26 (ISSR BB11) và chỉ số PIC cao nhất là 0,37 (ISSR BB5). Nhìn chung, tất cả các chỉ số PIC của 10 môi ISSR đều thấp hơn 0,5 và điều này cho thấy 10 dấu chỉ thị phân tử được dùng trong nghiên cứu quần thể 12 mẫu Thanh Trà đạt mức đa hình trung bình.

Chỉ số MI (Bảng 5) cao nhất là 2,08 được ghi nhận bởi môi ISSR Bn4, thấp nhất là môi ISSR BB11 với 0,49 và chỉ số MI trung bình 1,44. Powell *et al.* (1996) mô tả rằng chỉ số MI càng cao sẽ phản ánh được hiệu quả của việc ứng dụng một kỹ thuật nào đó khi đánh giá một lượng lớn các băng hơn là chỉ dựa vào các băng đa hình được

khuếch đại. Việc sử dụng chúng để đánh giá khả năng hay tính hữu hiệu của môi thì hiện tại vẫn chưa được nghiên cứu chỉ có thể dựa vào chỉ số MI để so sánh hiệu quả giữa các kỹ thuật với nhau và điều này đã được Milbourne *et al.* (1997) nhận định.

Kết quả Bảng 5 cho thấy chỉ số Rp cao nhất là 15,67 thuộc về môi ISSR BB9, thấp nhất là 3,17 của môi ISSR BB11 và chỉ số Rp trung bình là 10,30. Theo Prevost and Wilkinson (1999), chỉ số Rp đã chỉ ra được sự tương quan giữa các kiểu gen với dấu phân tử DNA, chỉ số Rp càng cao chứng tỏ dấu phân tử đó hữu hiệu trong việc phân nhóm kiểu gen. Từ kết quả trên cho thấy dấu phân tử ISSR BB9 rất hữu hiệu trong việc sử dụng môi ISSR BB9 để phân chia các kiểu gen của mẫu Thanh Trà (3) (Hình 4).



Hình 4: Phổ điện di sản phẩm PCR bằng môi ISSR BB9 cho 12 mẫu Thanh Trà trên gel polyacrylamide 8%. M: thang chuẩn 1 kb plus ladder (Invitrogen, USA), 1 – 12: tương ứng với các mẫu Thanh Trà (1) – (12)

Bảng 5: Các chỉ số đánh giá tính đa hình của quần thể 12 mẫu Thanh Trà được khuếch đại bởi 10 môi ISSR

Tên môi	Trọng lượng phân tử (bp)	TB	PB	PPB	PIC	MI	Rp
ISSR BB11	300 – 1.650	10	10	100	0,26	0,49	3,17
ISSR BB3	250 – 5.000	26	26	100	0,32	1,29	11,83
ISSR BB5	200 – 12.000	13	13	100	0,37	1,88	7,67
ISSR BB7	400 – 5.000	14	13	93,8	0,33	1,67	7,33
ISSR BB9	150 – 5.000	34	34	100	0,33	1,20	15,67
ISSR BB10	150 – 5.000	29	29	100	0,33	1,37	14,67
ISSR BB13	200 – 12.000	20	20	100	0,34	1,33	10,67
ISSR Bn3	300 – 12.000	26	20	76,92	0,29	1,54	11,83
ISSR Bn4	400 – 12.000	14	14	100	0,35	2,08	7,50
ISSR Bn6	250 – 5.000	28	23	82,14	0,31	1,58	12,67
Tổng cộng		214	202				
Trung bình		21,14	20,20	95,29	0,32	1,44	10,30
Độ lệch chuẩn		±8,26	±7,86	±8,61	±0,03	±0,43	±8,34

Ghi chú: TB là tổng locus; PB là locus đa hình; PPB là tỷ lệ phần trăm locus đa hình; PIC là chỉ số đa hình di truyền; MI là chỉ số đa dạng trung bình của các locus đa hình; Rp là chỉ số sai khác của mỗi cặp môi

3.3 Phân tích mối quan hệ giữa các giống Thanh Trà

Sự giống nhau về mặt di truyền của 12 mẫu Thanh Trà được ghi nhận dựa trên sự đa hình về kiểu gen trong quần thể Thanh Trà được khuếch đại bởi 10 môi và có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,48 – 0,8 (Bảng 6). Từ Bảng 6 cho thấy biến động của 12 mẫu Thanh Trà này tương

đối cao và có khoảng dao động khá xa. Nguyên nhân là do đa số Thanh Trà được canh tác ở Bình Minh hiện nay đều được nhà vườn mua từ những người quen khác nhau, trong đó có một số cây được trồng từ hạt (mẫu 12), cho nên hầu như đều không rõ nguồn gốc. Kết quả này tương tự với kết quả của Mohd *et al.*, (2015) có hệ số dao động của các giống Thanh Trà từ 0,591 – 0,977.

Bảng 6: Hệ số tương đồng giữa 12 mẫu Thanh Trà dựa vào ma trận tương đồng

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1,00											
2	0,70	1,00										
3	0,66	0,80	1,00									
4	0,63	0,73	0,77	1,00								
5	0,65	0,64	0,67	0,80	1,00							
6	0,55	0,62	0,66	0,82	0,80	1,00						
7	0,59	0,63	0,64	0,77	0,86	0,77	1,00					
8	0,64	0,65	0,66	0,76	0,73	0,71	0,78	1,00				
9	0,57	0,57	0,54	0,63	0,70	0,65	0,72	0,78	1,00			
10	0,57	0,54	0,54	0,60	0,62	0,57	0,65	0,71	0,77	1,00		
11	0,53	0,50	0,52	0,49	0,55	0,48	0,56	0,60	0,69	0,77	1,00	
12	0,54	0,56	0,59	0,63	0,60	0,65	0,64	0,70	0,60	0,64	0,56	1,00

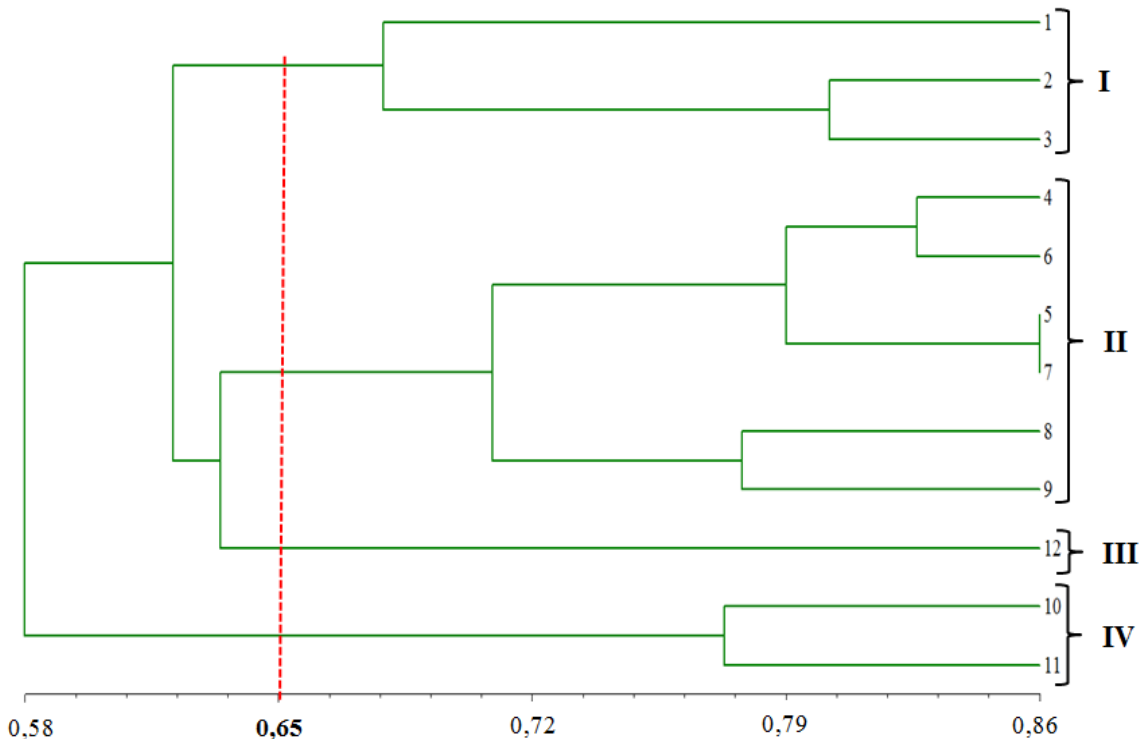
Ghi chú: 1 – 12: tương ứng với các mẫu Thanh Trà (1) – (12)

Trong phân loại và các lĩnh vực khác, di truyền học và hình thái học có thể tương tác hiệu quả như công cụ bổ sung để hiểu được nguồn gốc của sự khác biệt kiểu hình (Klingenberg, 2010). Kết quả (Bảng 6) được dùng phương pháp UPGMA thông qua phần mềm NTSYSpc 2.11a (Numerical Taxonomy System Personal Computer) (Sneath and Sokal, 1973) tạo nên biểu đồ mối quan hệ di truyền của 12 mẫu Thanh Trà (Hình 5) cũng cho kết quả tương tự đặc điểm hình thái lá (Bảng 4). Theo kết quả ở Hình 5 có thể chia thành 4 nhóm

chính dựa vào hệ số tương đồng trung bình là 0,65. Nhóm I là 3 mẫu Thanh Trà số (1), (2) và (3), trong đó hệ số tương đồng gần nhất là 0,80 giữa 2 mẫu Thanh Trà số (2) và số (3), xa nhất là 0,66 ở mẫu Thanh Trà số (1) với mẫu số (3). Nhóm II gồm 6 giống là mẫu số (4), (5), (6), (7), (8) và (9). Trong đó, hệ số tương đồng gần nhất là 0,86 giữa mẫu số (5) và số (7) và xa nhất là 0,7 ở mẫu Thanh Trà số (5) với mẫu số (9). Nhóm III có duy nhất 1 mẫu số (12) và điều này cho thấy mẫu này có quan hệ xa với các mẫu còn lại. Nhóm IV gồm 2 mẫu Thanh Trà số (10) và (11) hai mẫu này có quan hệ gần gũi

với nhau ở hệ số tương đồng là 0,77. Sự giống nhau giữa các cây khi quan sát theo thời gian, không gian hoặc các yếu tố khác có thể xảy ra do sự phân bố không gian và di truyền học, những cây

sống gần nhau có nhiều khả năng giống nhau hơn cây ở xa, và các cây cùng loài thường có nhiều đặc điểm chung giữa chúng hơn các cây khác loài (Fortin, 2005).



Hình 5: Sơ đồ di truyền nhánh dựa trên dấu phân tử ISSR ở các mẫu Thanh Trà qua phân tích hệ số tương đồng bằng phương pháp UPGMA

Ghi chú: 1 – 12: tương ứng với các mẫu Thanh Trà (1) – (12)

Dựa vào dấu chỉ thị phân tử ISSR và đặc điểm hình thái lá có thể chia 12 mẫu Thanh Trà thành 4 nhóm chính. Nhìn chung, đa số các mẫu có kiểu hình tương đối giống nhau được thu ngẫu nhiên từ các địa điểm sẽ xếp cùng 1 nhóm, riêng mẫu Thanh Trà (12) lại có sự khác biệt so với các mẫu Thanh Trà khác. Các nhóm trên có tỷ lệ kết quả phân tích tương quan với tỉ lệ D/R của lá. Theo kết quả tương tự của Mohd (2015), các mẫu Thanh Trà được thu thập từ các nguồn gốc địa lý khác nhau không cho thấy mối tương quan với nhau. Có nhiều yếu tố tạo nên sự khác biệt di truyền trong quần thể như khả năng phát tán và ảnh hưởng từ môi trường sống (Kerdelhué *et al.*, 2002).

4 KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, ISSR đã phát hiện thành công sự biến đổi giữa các mẫu Thanh Trà, mà đặc điểm hình thái trái khó có thể phân biệt được. Cần tiếp tục đánh giá đa dạng di truyền Thanh Trà bằng các dấu phân tử ISSR với các môi khác nhau và từ đó ứng dụng vào chọn giống cây Thanh Trà trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andrew, P., 2011. Maprang (*Bouea macrophylla*). www.rarefruitaustralia.org/site/wp-content/uploads/2011/09/Andrews-Maprang.pdf, access 14/10/2014.

Arohak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E., Swamy, M., Karihaloo, J.L., 2003. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. *Euphytica*, 130(3): 397-404.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32(3): 314-331.

Cekic, C., Battey, N.H. Wilkinson, M.J., 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet*, 103(2): 540-546.

Chickarmane, V., Roeder, A.H.K., Tarr, P.T., Cunha, A., Tobin, C., 2010. Computational Morphodynamics: A Modeling Framework to Understand Plant Growth, 61: 65-87.

- Damodaran, T., Ahmad, I., Nagarajan, B., 2013. *Bouea oppositifolia* - A fast disappearing native mango genetic resource from Andamans. Morphological and molecular evidences. *Indian J. Hortic*, 70: 161-164.
- Damodaran, T., Kannan, R., Ahmed, I., Srivastava, R.C., Rai, R.B., Umamaheshwari, S., 2012. Assessing genetic relationships among mango (*Mangifera indica* L.) accessions of Andaman islands using inter simple sequence repeat markers. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci*, 40: 229-240.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Fortin, M.J., Dale, T., 2005. *Spatial Analysis: A Guide for Ecologists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp 392.
- Gonzalez, A., Coulson, M., Brettell, R., 2002. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. *Acta Hortic*, 575: 139-143.
- IPGRI., 1999. *Descriptors for Mango*. International plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.
- Kerdelhué, C., Roux, G., Forichon, J., Chambon, J., Robert, A., Lieutier, F., 2002. (Curculionidae: Scolytinae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). *Molecular Ecology*, 11: 483-494.
- Klingenberg, C.P., 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nat Rev Genet*, 11: 623-635.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Provan, J., Powell, W., Waugh, R., 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3: 127-136.
- Mohd, M.H., Lee, B.J., Cui, Y., Paik, J.K., 2015. Residual strength of corroded subsea pipelines subject to combined internal pressure and bending moment. *Ships and offshore Structures*, 10 (5): 554-564.
- Mostafa, N., Ormal, H., Tan, S.G., Napis, S., 2011. Studies on the Genetic Variation of the Green Unicellular Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Obtained from Different Geographical Location Using ISSR and RADP Molecular Marker. *Molecules*, 16: 2598-2608.
- Nguyễn Lộc Hiền, Tô Thị Nhứt, Huỳnh Kỳ và Huỳnh Thanh Tùng, 2013. Sự đa dạng di truyền của quần thể cây nghệ ở tỉnh Bình Dương, Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ. 29: 44-51.
- Nguyễn Thị Huỳnh Mai, 1998. Cây Thanh Trà (*Bouea oppositifolia* – Anacardiaceae) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn Thạc sĩ khoa học chuyên ngành Sinh vật học và Môi trường. Trường đại học Cần Thơ. 78 trang.
- Phạm Hoàng Hộ, 1991. Cây cỏ miền Nam. Tập 1, 2, 3, 4, 5, 6. NXB MêKong Ấn Quán. CA.
- Phạm Hoàng Hộ, 2003. Cây cỏ Việt Nam, Q. II. In lần 2. Nxb. Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh. 368 trang.
- Poolperm, N., 1993. *Maprang Cultivation*. Jareanrut Publ. Bangkok, 117 pp.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S.V., Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.
- Rocha, A., Salomao, L.C.C., Salomao, T.M.F., Cruz, C.D., Siqueira, D.L., 2012. Genetic Diversity of ‘Uba’ Mango Tree Using ISSR Markers. *Mol. Biotechnol*, 50:108-113.
- Roth, A., Mosbrugger, D., Kerp, H., 2001. Evolution and Function of Leaf Venation Architecture, 87: 553-566.
- Shahsavari, A.R., Izadpanah, K., Tafazoli, E., Sayed, B.E., 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 112: 310-314.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco, pp. 573.
- Subhadrabandhu, S., 2001. Ma-Prang (*Bouea macrophylla*). In *Under-utilized tropical fruits of Thailand*. Regional Office for Asia and the Pacific (RAP) Publication: 2001/26. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome. pp 6-8.
- Thimmappaiah, S., Shobha, W.G., Melwyn, G.S., 2009. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sci. Hortic*, 120: 411-417.
- Trần Nhân Dũng và Trần Thị Lệ Quyên, 2012. Đa dạng di truyền các giống/dòng măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) dựa trên dấu phân tử ISSR ở Bình Dương. Tạp chí Khoa học Đại Học Cần Thơ, 23: 253-261.
- Tsukaya, H., 1995. Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledonous plants. *J Plant Res*, 108: 407-416.
- Verheij, E.W.M., coronel, R.E., 1992. *Plant resources South East Asia No.2 Edible fruits and nuts*. Prosea Foundation. Bogor. Indonesia, pp. 186-190.
- Vũ Văn Hiếu, Nông Thị Huệ, 2015. Phân tích đa dạng di truyền của các mẫu giống cam sành tại Hà Giang bằng chỉ thị RAPD và ISSR, Tạp chí Khoa học và Phát triển Hà Giang 2015. 6: 867-875.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.