

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.119

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC GIỐNG SẦU RIÊNG (*Durio zibethinus*) DỰA TRÊN TRÌNH TỰ DNA MÃ VẠCH VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ ISSR

Đỗ Tấn Khang^{1*}, Phan Thanh Huynh², Trần Gia Huy³, Nguyễn Phạm Anh Thi¹, Trần Thanh Mến⁴ và Nguyễn Văn Ấy⁵

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Công nghệ sinh học Khóa 43, Trường Đại học Cần Thơ

³Học viên cao học ngành Công nghệ sinh học Khóa 26, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

⁵Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Tấn Khang (email: dtkhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 25/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 11/05/2021

Ngày duyệt đăng: 20/08/2021

Title:

Genetic diversity of durian (*Durio zibethinus*) varieties based on DNA barcode sequences and inter simple sequence repeat markers

Từ khóa:

DNA mã vạch, ISSR, ITS, *matK*, *rpoC1*, sầu riêng

Keywords:

DNA barcode, durian, ISSR, ITS, *matK*, *rpoC1*

ABSTRACT

Durian (*Durio zibethinus*) is one of the special fruits in Vietnam favored with high trade in the world. Currently, there are many varieties of durians grown in the Mekong Delta, and it is challenged to distinguish them through morphology. This study was aimed to examine genetic diversity based on DNA barcode and the ISSR molecular marker. The DNA sequences of three barcode DNA candidates, including ITS, *matK*, *rpoC1* of nine varieties (Ri-6, Monthong, Kho Qua Xanh, Chín Hoa, Sầu Hạt Lép, Chuông Bò, Bí, Musang King, and Sầu Hũu) collected from Can Tho, Tien Giang, Ben Tre and Vinh Long were sequenced and analyzed. Six SNPs were identified from the ITS sequence between individuals Ri-6-Ben Tre, Monthong-Tien Giang, Chuông Bò-Tien Giang, Sầu Hạt Lép-Can Tho, and Sầu Hũu-Tien Giang. For the *matK* gene, nine SNPs were found to distinguish Ri-6 individuals (Can Tho and Southern Fruit Research Institute), Chín Hoa-Ben Tre, Sầu Hạt Lép-Ben Tre and Sầu Hũu-Tien Giang. The *rpoC1* gene was highly conservative between varieties in this study. The ISSR molecular markers classified such durian varieties into five groups and showed clear differences between the exotic varieties of Musang King-Vinh Long and Monthong-Tien Giang.

TÓM TẮT

Sầu riêng (*Durio zibethinus*) là một trong những giống cây ăn quả đặc sản của Việt Nam được thị trường ưa chuộng. Hiện nay có nhiều giống sầu riêng được trồng tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) và khó phân biệt được qua hình thái. Đề tài được thực hiện nhằm bước đầu khảo sát về mặt di truyền dựa trên DNA mã vạch và chỉ thị phân tử ISSR. Trình tự DNA của ba locus DNA mã vạch gồm ITS, *matK*, *rpoC1* của chín giống (Ri-6, Monthong, Khổ Qua Xanh, Chín Hoa, Sầu Hạt Lép, Chuông Bò, Bí, Musang King và Sầu Hũu) được thu từ Cần Thơ, Tiền Giang, Bến Tre và Vĩnh Long đã được giải trình tự và phân tích. Nghiên cứu đã xác định 6 SNPs của vùng ITS giữa các cá thể Ri-6-Bến Tre, Monthong-Tiền Giang, Chuông Bò-Tiền Giang, Sầu Hạt Lép-Cần Thơ và Sầu Hũu-Tiền Giang. Đối với vùng trình tự *matK* tìm được 9 SNPs phân biệt được các cá thể Ri-6 (Cần Thơ và Viện Cây ăn quả miền Nam), Chín Hoa-Bến Tre, Sầu Hạt Lép-Bến Tre và Sầu Hũu-Tiền Giang. Vùng trình tự *rpoC1* có độ bảo tồn cao giữa các giống trong nghiên cứu. Cây phân loại dựa trên các dấu phân tử ISSR đã tách các giống sầu riêng thành 5 nhóm và cho thấy sự khác biệt rõ của giống sầu riêng nhập ngoại Musang King-Vĩnh Long và cá thể sầu riêng Monthong-Tiền Giang.

1. GIỚI THIỆU

Sầu riêng (*Durio zibethinus*) là một trong những loại cây ăn quả đặc sản và có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Xuất xứ từ vùng đất nhiệt đới ẩm ở Đông Nam Á, sầu riêng được trồng nhiều ở Indonesia, Malaysia, Philippines, Myanmar, Thái Lan, Lào, Campuchia, ... ngoài ra còn được trồng ở một số nước nhiệt đới khác ở Trung Nam Mỹ, một số nước châu Phi và châu Đại Dương như Úc. Sầu riêng được coi là một loại cây ăn trái quan trọng do có thời gian thu hoạch kéo dài và cho giá trị kinh tế cao (Nguyễn Danh Văn, 2008). Tại Việt Nam, sầu riêng được trồng nhiều ở các tỉnh như: Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương, Bình Phước, Bến Tre, Tiền Giang, Vĩnh Long, Cần Thơ,... với diện tích khoảng 13.000 ha, sản lượng 150.000 tấn (Bộ Công Thương, 2019). Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2013) đã định hướng phát triển sầu riêng là một trong 12 chủng loại cây ăn quả chủ lực trồng tập trung ở Nam Bộ với diện tích là 15.000 ha và được bố trí diện tích trồng rải vụ 5.250 ha đến năm 2020. Sầu riêng đông lạnh được thị trường nhiều nước ưa chuộng là mặt hàng xuất khẩu có giá trị rất cao. Trong tập đoàn cây ăn quả nhiệt đới của nước ta, sầu riêng có tiềm năng phát triển rất lớn góp phần tăng giá trị xuất khẩu.

Tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) hiện đang được trồng rất nhiều giống sầu riêng khác nhau như: sầu riêng Khô Qua Xanh, sầu riêng Ri 6, sầu riêng Chuông Bò, sầu riêng Chín Hóa, sầu riêng Monthong (nhập ngoại),... Tuy nhiên cho đến nay, có rất ít thông tin về mối quan hệ di truyền giữa các giống sầu riêng bao gồm các giống sầu riêng phổ biến có nguồn gốc từ các quốc gia Châu Á (Husin et al., 2018). Ở giai đoạn cây con, việc phân loại các giống cây trồng dựa vào hình thái có độ tin cậy thấp cho thiếu các tính trạng đặc trưng. Do đó, các chỉ thị phân tử đóng vai trò quan trọng trong công tác nhận diện giống. DNA mã vạch là một phương pháp định danh và giám định loài dựa trên các trình tự DNA ngắn ở những vùng chuẩn hóa của DNA hệ gene (Hebert et al., 2003). Hướng nghiên cứu này đang được nhiều quốc gia, nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm phát triển, đặc biệt trong những năm gần đây và sẽ là một xu thế nghiên cứu trong thời gian tới. DNA mã vạch được xem là một công cụ mới, hỗ trợ có hiệu quả trong nghiên cứu về phân loại, phát hiện loài mới, giám định loài và các mẫu có nguồn gốc từ sinh vật sống hoặc đã chết thậm chí đã qua chế biến.

Nghiên cứu đa dạng di truyền và bảo vệ nguồn gene của các giống sầu riêng tại ĐBSCL có ý nghĩa rất quan trọng trong việc bảo tồn tính đa dạng sinh học sử dụng có hiệu quả các nguồn gene và phục vụ cho công tác chọn tạo giống. Ngoài giá trị khoa học xác định giống loài, một hệ thống quản lý giống dựa vào các kỹ thuật sinh học phân tử sẽ giúp quản lý được tài nguyên di truyền để khai thác hiệu quả và có đủ cơ sở khoa học để chứng minh được quyền sở hữu quốc gia đối với nguồn tài nguyên sinh học, khi Việt Nam gia nhập AFTA và tổ chức thương mại quốc tế (Trần Nhân Dũng và Đỗ Tấn Khang, 2012). Chính vì thế việc thực hiện đề tài “Nhận diện giống sầu riêng Ri 6 bằng DNA mã vạch” nhằm phân loại và xác định giống sầu riêng Ri 6 và các giống sầu riêng được trồng phổ biến dựa trên vật liệu di truyền là rất cần thiết. Nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu phân tích được đặc điểm trình tự nucleotide, so sánh khả năng phân định và nhận diện giống sầu riêng Ri 6 với các giống sầu riêng khác dựa trên trình tự vùng trình tự ITS, *matK*, *rpoC1* và chỉ thị phân tử ISSR.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu mẫu

Các giống sầu riêng như: Ri 6, Monthong, Khô qua xanh, Chuông bò, Sữa hạt lép, Chín Hóa, Sầu Hửu, Musang King và sầu riêng Bí được thu tại các trại giống và các nhà vườn có diện tích trồng lớn ở các tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Vĩnh Long và Cần Thơ, mẫu được bảo quản trong túi nilon và ghi đầy đủ thông tin mẫu.

2.2. Ly trích DNA tổng số

Các mẫu lá được rửa bằng nước sạch sau đó khử trùng bề mặt bằng ethanol 70%. Mẫu được cắt nhỏ, ủ với nitrogen lỏng trong vòng 5 phút và nghiền thành bột mịn. Quy trình ly trích được hiệu chỉnh theo mô tả của Roger and Bendich (1988). DNA được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1%.

2.3. Khuếch đại và giải trình tự DNA mã vạch

Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 50 μ L gồm các thành phần: 25 μ L BiH₂O; 20 μ L Master Mix (Buffer, MgCl₂, dNTPs, *Taq* polymerase); 1 μ L mỗi xuôi và ngược (20 μ M); 3 μ L DNA khuôn. Thông tin môi và chu kỳ nhiệt được mô tả ở Bảng 1. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 50V trong 40 phút và kiểm tra bằng hệ thống Gel Doc XR (Bio-rad, Mỹ). Các sản phẩm PCR đạt chất lượng được giải trình tự tại Công ty Nextgen.

Bảng 1. Trình tự nucleotide và chu kỳ nhiệt của 3 cặp mồi khuếch đại vùng trình tự rpoC1, matK và ITS

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Chu kỳ nhiệt	Nguồn
rpoC1-F	GGCAAAGAGGGAAGATTTTCG	95°C-2 phút; 95°C-30 giây;	Kew (2007)
rpoC1-R	CCATAAGCATATCTTGAGTTGG	52°C- 30 giây; 72°C- 1 phút (30 chu kỳ; 72°C-5 phút	
matK-390F	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	95°C-2 phút; 95°C-30 giây;	White et al. (1990)
matK-1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	52°C- 30 giây; 72°C- 1 phút (30 chu kỳ; 72°C-5 phút	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	95°C-2 phút; 95°C-30 giây; 52°C- 30 giây; 72°C- 1 phút (30 chu kỳ; 72°C-5 phút	Kyndt et al. (2005)

2.4. Chỉ thị phân tử ISSR

Bảy mồi ISSR được sử dụng để khảo sát sự đa hình của các trình tự lặp trong bộ gene sấu riêng.

Mỗi phản ứng với thể tích 25 µL gồm 12 µL BiH₂O, 10 µL master mix, 1 µL mồi và 2 µL DNA khuôn. Trình tự các đoạn mồi và chu kỳ nhiệt được mô tả ở Bảng 2. Sản phẩm PCR được di trên gel agarose 3%.

Bảng 2. Trình tự mồi ISSR và chu kỳ nhiệt sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự	Chu kỳ nhiệt
ISSR 03	5' -GAGAGAGAGAGAGAGAT- 3'	94°C-4 phút; 94°C-1 phút; 50°C- 45 giây; 72°C- 2 phút (35 chu kỳ); 72°C- 7 phút
ISSR 13	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCA-3'	
ISSR 22	5' -TGTGTGTGTGTGTGTGCC- 3'	
ISSR 31	5' -AGAGAGAGAGAGAGT- 3'	
ISSR K1	5' -GAGAGAGAGAGAGAGACTC- 3'	
ISSR K2	5' -GTGGTGGTGGTGAC-3'	
ISSR K3	5' -GAAGAAGAAGAAGAAGAA- 3'	

2.5. Phân tích dữ liệu

Các trình tự DNA được kiểm tra bằng chương trình Bioedit. Sau đó, các trình tự này được so sánh sự tương đồng với dữ liệu đã được công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Các trình tự được xác định độ chính xác bằng cách so sánh độ tương đồng trên cơ sở dữ liệu NCBI. Độ tương đồng càng cao, độ chính xác càng có ý nghĩa, được xác định qua các thông số sau: Organism (tên sinh vật), Querycover (mức độ trùng khớp của trình tự), E-value (độ tin cậy), Identity (mức độ tương đồng di truyền). Các trình tự DNA được dàn hàng (alignment) và xác định các SNPs bằng chương trình Bioedit.

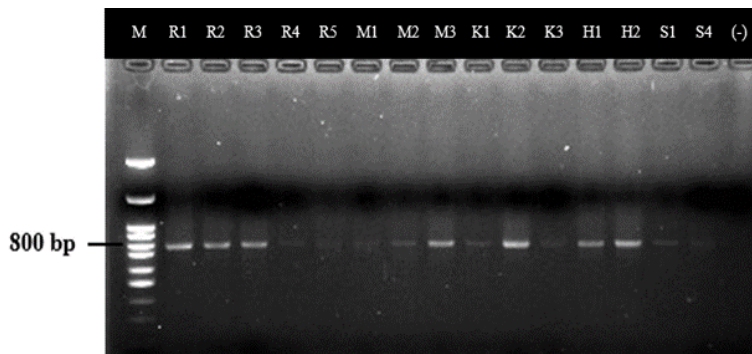
Sản phẩm khuếch đại của các dấu phân tử ISSR của các giống sấu riêng được phân tích đa dạng di truyền bằng phần mềm NTSYSpc2.1 (Numerical

Taxonomy System Personal Computer) (Sneath and Sokal, 1973). Các dãy băng gel thu được từ sản phẩm PCR mồi ISSR và được nhập vào phần mềm Excel. Sự hiện diện hoặc không hiện diện của một băng nào đó trên gel được ghi nhận tuần tự là 1 và 0. Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) để phân tích mối quan hệ di truyền.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Trình tự ITS

Kết quả PCR các mẫu với mồi ITS được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% (Hình 1) cho thấy các băng DNA xuất hiện rõ nét và không có băng phụ. So sánh với kích thước băng trên thang chuẩn 3 kb cho thấy đoạn gen ITS có kích thước khoảng 800 bp.



Hình 1. Phổ điện di với đoạn mồi ITS của 15 giống sầu riêng trên gel agarose 2%

M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri 6 (Vĩnh Long), R2. Ri 6 (Tiền Giang), R3. Ri 6 (Bến Tre), R4. Ri 6 (Cần Thơ), R5. Ri 6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ qua xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ qua xanh (Bến Tre), K3. Khổ qua xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre). H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa hạt lép (Bến Tre), S4. Sữa hạt lép (Cần Thơ) (-). Đối chứng âm.

Kết quả so sánh đã xác định được sự khác biệt ở giữa các trình tự gộp (consensus) và các giống thể hiện qua Bảng 3. Qua so sánh các trình tự, tìm được 6 SNPs giữa các trình tự và được kiểm tra peak lại trên chromatogram như sau: trong trình tự của các giống Ri 6, xuất hiện điểm sai khác tại vị trí 583 của trình tự sầu riêng Ri 6 Bến Tre, sau khi kiểm tra tín hiệu peak vị trí 603 nhận thấy tín hiệu chưa tốt ở vị trí này. Nucleotide A có tín hiệu peak cao hơn các tín hiệu của các nucleotide còn lại và nhiều nhiều. Ở vị trí này của trình tự sầu riêng Chuồng bò Tiền Giang cũng xuất hiện nucleotide A, sau khi kiểm tra peak vị trí 606 nhận thấy tín hiệu không phân biệt rõ giữa nucleotide A và G.

Trong trình tự của các giống Monthong, trình tự Mongthong_Tiền Giang xuất hiện nucleotide G tại vị trí 717, các trình tự còn lại là nucleotide C sau khi kiểm tra peak ở trình tự này tại vị trí 734 cho thấy có sự chồng đỉnh giữa nucleotide G và C, nhưng peak của nucleotide G cao hơn, có thể do bị nhiễm hoặc đột biến dị hợp vị trí này. Vị trí thứ 8 xuất hiện nucleotide G trên trình tự của giống sầu riêng Sáu Hữu_Tiền Giang, các trình tự còn lại là nucleotide C, sau khi kiểm tra lại peak trên chromatogram tại vị trí 21 cho thấy nucleotide G bị chèn thêm, nên khả năng tại vị trí này do đột biến mất điểm.

Bảng 3. Vị trí SNPs trong trình tự nucleotide dựa trên vùng ITS của các giống sầu riêng

Mẫu	Vị trí nucleotide					
	8	444	583	614	717	718
Ri 6_Consensus	C	G	G	G	C	A
Ri 6_VCAQMN
Ri 6_Tiền Giang
Ri 6_Cần Thơ
Ri 6_Bến Tre	.	.	A	.	.	.
Monthong_Consensus
Monthong_Vĩnh Long
Monthong_Tiền Giang	G	.
Monthong_Cần Thơ
Chín Hóa_Consensus
Chín Hóa_Bến Tre
Chín Hóa_Cần Thơ
Khổ qua xanh_Vĩnh Long
Chuồng bò_Tiền Giang	.	C	A	A	.	.
Sữa hạt lép_Cần Thơ	G
Bí_Bến Tre
Sáu Hữu_Tiền Giang

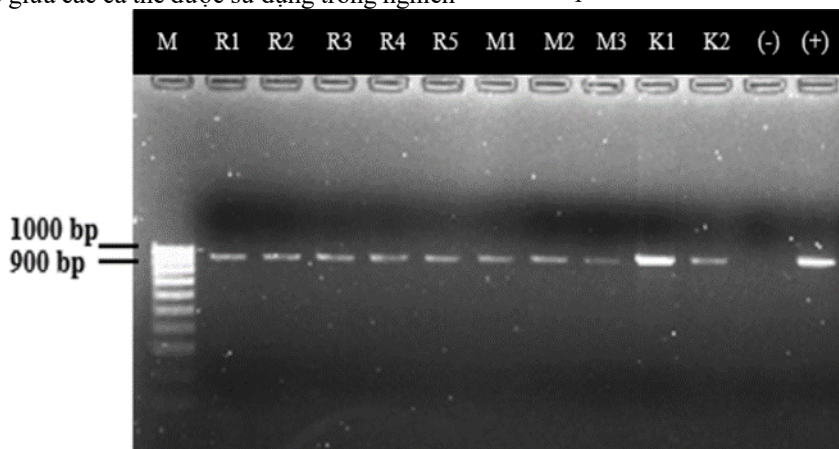
Ghi chú: C: nucleotide Cytosine; A: nucleotide Adenine; G: nucleotide Guanine; T: nucleotide Thymine

Qua kết quả phân tích và so sánh 14 trình tự dựa trên vùng ITS, trình tự có độ dài dao động từ 600 - 700 bp sau khi được hiệu chỉnh. Phát hiện 6 SNPs giữa các trình tự trong cùng một giống (Ri 6 và Monthong) và các trình tự ở các giống có một mẫu (Chuồng bò Tiền Giang, Sữa hạt lép_Cần Thơ và Sáu Hữu_Tiền Giang). Trong đó, các vị trí này không đặc trưng cho giống sầu riêng Ri 6 nên chưa thể nhận diện được giống sầu riêng Ri 6 với các giống sầu riêng được sử dụng trong nghiên cứu. Tuy nhiên, từ các SNPs có sự khác biệt từ các cá thể sầu riêng Chuồng Bò_Tiền Giang, Sữa Hạt Lép_Cần Thơ và Sáu Hữu_Tiền Giang. Khi so sánh trình tự vùng ITS giữa các cá thể được sử dụng trong nghiên

cứu thể hiện được sự đa dạng đối với các trình tự trong cùng giống và giữa các giống khác nhau.

3.2. Trình tự *matK*

Kết quả điện di sản phẩm PCR với mỗi khuếch đại một phần trình tự *matK* được kiểm tra trên gel agarose 2% với thang chuẩn 1 kb (Hình 2) cho thấy các băng DNA được khuếch đại cho kết quả rõ nét, kích thước đồng đều giữa các mẫu, không xuất hiện băng phụ chứng tỏ mỗi được thiết kế có tính đặc hiệu để DNA bắt được và nhân bản với các trình tự của sầu riêng. So sánh với kích thước băng trên thang chuẩn 1 kb cho thấy sản phẩm có kích thước khoảng 900 bp.



Hình 2. Phổ điện di với đoạn môi vùng trình tự *matK* của 10 giống sầu riêng trên gel agarose 2%

M. Thang chuẩn 1 kb, M. Thang chuẩn 3 kb, R1. Ri 6 (Vĩnh Long), R2. Ri 6 (Tiền Giang), R3. Ri 6 (Bến Tre), R4. Ri 6 (Cần Thơ), R5. Ri 6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ qua xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ qua xanh (Bến Tre), (-). Đối chứng âm, (+). Đối chứng dương

Trình tự của 17 mẫu được kiểm tra và hiệu chỉnh trên phần mềm BioEdit bằng cách đối chiếu các peak trên Chromatogram. Sau khi dàn hàng các trình tự trong cùng một giống bằng phần mềm BioEdit thì thu được trình tự chung của các giống sầu riêng Ri 6 (Ri 6_Consensus), Monthong (Monthong_Consensus), Khổ qua xanh (Khổ qua xanh_Consensus), Chín Hóa (Chín Hóa_Consensus), Sữa hạt lép (Sữa hạt lép_Consensus), Chuồng bò (Chuồng bò_Consensus).

Các trình tự Consensus của vùng trình tự *matK* được so sánh bằng công cụ BLAST trên NCBI để kiểm tra sự tương đồng với cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gene và kết quả thu được có độ tương đồng từ 99,75–99,88% với loài *Durio zibethinus*, độ bao phủ của trình tự Ri 6_Consensus so với các trình tự này dao động trong khoảng 91-100%.

Kết quả các vị trí sai khác trong trình tự vùng trình tự *matK* được thể hiện qua Bảng 6. Kết quả cho thấy có 9 SNPs và được kiểm tra peak trên chromatogram: trong các trình tự của giống Ri 6, có 6 vị trí khác biệt ở giống này. Vị trí 662 của trình tự Ri 6_Viện Cây ăn quả miền Nam, sau khi kiểm tra peak cho thấy nucleotide G có tín hiệu thấp. Vị trí 739 và 740 của trình tự Ri 6_Cần Thơ, sau khi xem tín hiệu peak ở vị trí 760, 761 trên chromatogram cho thấy chỉ xuất hiện đỉnh cho một nucleotide A nên hai vị trí này có thể do đột biến. Vị trí 759 cũng ở trình tự Ri 6_Cần Thơ là nucleotide G các trình tự khác là nucleotide T, sau khi kiểm tra cho thấy tín hiệu nucleotide G chưa tốt và bị nhiễu. Vị trí 780 xuất hiện nucleotide C trên trình tự Ri 6_Cần Thơ các trình tự còn lại là nucleotide G, kiểm tra peak cho thấy tín hiệu nucleotide C thấp nhưng không có tín hiệu nhiễu bên dưới. Trong trình tự các giống Chín Hóa, hai điểm không xuất hiện nucleotide là

750 và 763, sau khi kiểm tra peak (đoạn trình tự 765 – 805) tín hiệu khá tốt các peak có đỉnh cao và phân biệt được các nucleotide, nên đây có thể là hai vị trí đột biến cho thấy được khác biệt của giống Chín Hóa với các giống còn lại. Trình tự các giống Sứa hạt lép cho thấy có 2 vị trí khác biệt. Vị trí 798 xuất hiện sai khác giữa nucleotide G và T, nên trình tự Consensus_SHL nên được thay thế bằng ký tự K. Trình tự Sáu Hữu_Tiền Giang xuất hiện sai khác tại vị trí 793 là nucleotide G các trình tự còn lại là nucleotide C, kiểm tra cho thấy tín hiệu nucleotide G thấp nhưng có tín hiệu của nucleotide A bên dưới mà không phải là nucleotide C. So sánh và kiểm tra

đổi chứng giữa 17 trình tự vùng trình tự *matK* có độ dài khoảng 800 bp đã tìm được một số vị trí sai khác giữa các trình tự trong cùng giống Ri 6, giống Sứa hạt lép_Bến Tre và cả hai thể của giống Chín Hóa_Bến Tre và giống Sáu Hữu_Tiền Giang. Trong các điểm sai khác chưa tìm được vị trí đặc trưng cho giống sấu riêng Ri 6 nên vẫn chưa thể nhận diện được giống sấu riêng Ri 6 với các giống sấu riêng được sử dụng trong nghiên cứu. Tuy nhiên, có thể nhận diện được hai cá thể Chín Hóa_Bến Tre và Sáu Hữu_Tiền Giang. Kết quả phân tích cho thấy sự đa dạng trong trình tự vùng trình tự *matK* giữa các cá thể sấu riêng với nhau.

Bảng 6. Vị trí SNPs trong trình tự nucleotide dựa trên trình tự *matK* của các giống sấu riêng

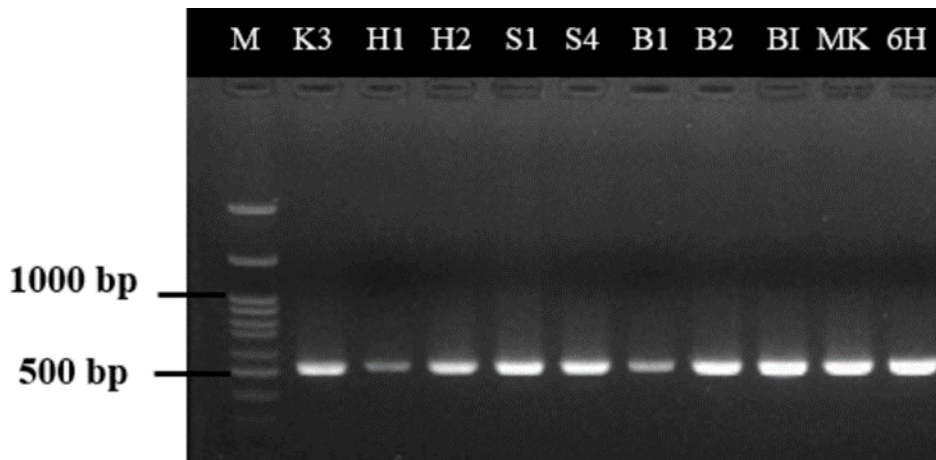
Mẫu	Vị trí nucleotide								
	662	739	740	750	759	763	780	793	798
Ri 6_Consensus	C	T	G	C	T	A	G	A	T
Ri 6_Vĩnh Long
Ri 6_Bến Tre
Ri 6_Cần Thơ	.	A	.	.	G	.	C	.	.
Ri 6_VCAQMN	G	.	–
Monthong_Consensus
Monthong_Tiền Giang
Monthong_Cần Thơ
Khô qua xanh_Consensus
Khô qua xanh_Vĩnh Long
Khô qua xanh_Bến Tre
Khô qua xanh_Cần Thơ
Chín Hữu_Consensus	.	.	.	–	.	–	.	.	.
Chín Hữu_Bến Tre	.	.	.	–	.	–	.	.	.
Chín Hữu_Cần Thơ
Sứa hạt lép_Consensus	K
Sứa hạt lép_Bến Tre	G
Sứa hạt lép_Cần Thơ
Chuồng bò_Consensus
Chuồng bò_Tiền Giang
Chuồng bò_Bến Tre
Bí_Bến Tre
Sáu Hữu_Tiền Giang	G	.

Ghi chú: C: nucleotide Cytosine; A: nucleotide Adenine; G: nucleotide Guanine; T: nucleotide Thymine

3.3. Trình tự *rpoC1*

Kết quả PCR các mẫu với mỗi khuếch đại vùng trình tự *rpoC1* được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2% (Hình 3) cho thấy các băng DNA xuất hiện rõ nét, không có băng phụ chứng tỏ mỗi được dùng để khuếch đại đặc hiệu. Mẫu đối

chứng dương cho băng rõ nét, có kích thước bằng với các băng được khuếch đại, đổi chứng âm không có băng xuất hiện chứng tỏ mẫu không bị ngoại nhiễm. So sánh với kích thước băng trên thang chuẩn cho thấy đoạn trình tự khuếch đại được có kích thước khoảng 500 bp.



Hình 3. Kết quả khuếch đại vùng gen *rpoC1* trên gel agarose 2%

M. Thang chuẩn 3 kb, K3. Khô qua xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre). H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sữa hạt lép (Bến Tre), S4. Sữa hạt lép (Cần Thơ) B1. Chuồng bò (Tiền Giang), B2. Chuồng bò (Bến Tre), BI. Bí (Bến Tre), MK. Musang King (Vĩnh Long), 6H. Sầu Hữu (Tiền Giang).

Trình tự *rpoC1* của 20 mẫu sầu riêng có kích thước 455 bp sau khi được kiểm tra và hiệu chỉnh trên phần mềm BioEdit bằng cách loại bỏ đoạn trình tự nhiễu ở hai đầu và kiểm tra peak trên chromatogram. Sau đó, các trình tự đã được dàn hàng và kết quả cho thấy không có biến đổi nucleotide trong trình tự đoạn gen *rpoC1* và hoàn toàn giống nhau giữa các giống được sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả này cho thấy vùng gen *rpoC1* có tính bảo tồn cao đối với các giống sầu riêng trong nghiên cứu này. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Tassanee et al. (2018) trên 40 giống sầu riêng của Thái Lan, kết quả không thể phân biệt được các giống sầu riêng và trình tự nucleotide của gen *rpoC1* có tính bảo toàn cao chưa phải là mã vạch tiềm năng để nhận dạng tốt các giống sầu riêng. Ngược lại, đối với nghiên cứu các loài Trám đen (*Canarium nigrum*) ở một số tỉnh phía Bắc nước ta, vùng trình tự *rpoC1* lại cho kết quả nhận dạng tốt với các trình tự trong cùng chi *Canarium* (Đinh Thị Phòng và ctv., 2018). Như vậy, có thể nhận định rằng ở vùng trình tự *rpoC1* có những đặc trưng riêng và hiệu quả phân biệt ở các loài khác nhau là không giống nhau.

Qua phân tích trình tự nucleotide của 3 trình tự ITS, *matK* và *rpoC1*, mối quan hệ di truyền gần gũi giữa các giống sầu riêng trong nghiên cứu thể hiện qua số SNPs đặc trưng cho từng giống còn khá khiêm tốn. Shearman et al. (2020) chỉ xác định được 9 SNPs khi phân tích trình tự bộ gene lục lạp hoàn chỉnh ở 24 cá thể sầu riêng thuộc giống Thái và Musang King.

3.4. Chỉ thị phân tử ISSR

ISSR trong phản ứng PCR trên DNA của bộ gen thu được từ các mẫu lá sầu riêng. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,5%. Kết quả, sản phẩm của 2 môi (ISSR31 và ISSR1) không khuếch đại được trong tất cả các mẫu hoặc không hoàn toàn, hoặc do sản phẩm quá ít không thể ghi nhận được kết quả. Còn lại phổ điện di của 5 môi (ISSR03, ISSR13, ISSR22, ISSR1 và ISSR2) được tiếp tục sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của 20 mẫu sầu riêng.

Theo Bảng 4, có tổng số 57 phân đoạn được nhân lên với trung bình 11,4 băng/đoạn môi. Trong đó, có 40 phân đoạn đa hình chiếm tỉ lệ 72%. Số lượng băng đa hình dao động từ 6 (ISSR22) đến 20 (ISSR13) với trung bình đạt 8, kích thước các băng đa hình trong khoảng 200 - 2500 bp. Trong số 5 chỉ thị của nghiên cứu này, ISSR13 cho nhiều phân đoạn nhất với 20 phân đoạn, trong đó có 11 phân đoạn đa hình chiếm 65%, kể đến là ISSR2 cho 15 phân đoạn với 11 phân đoạn đa hình chiếm 73,3%. Còn lại ISSR22, ISSR3 và ISSR03 cho số phân đoạn thấp hơn lần lượt là 6,7 và 9. Kết quả này cao hơn trong một nghiên cứu tương tự trên sầu riêng của Vanijajiva (2012), với 5 chỉ thị ISSR đã khuếch đại được 50 phân đoạn, có kích thước từ 50-2.000 bp và có 19 phân đoạn đa hình chiếm 38%. So sánh với quần thể 55 giống sầu riêng được nghiên cứu ở Indonesia của Angelieta et al. (2019), 11 đoạn môi ISSR được sử dụng cho 83 allele đa hình (93,25%).

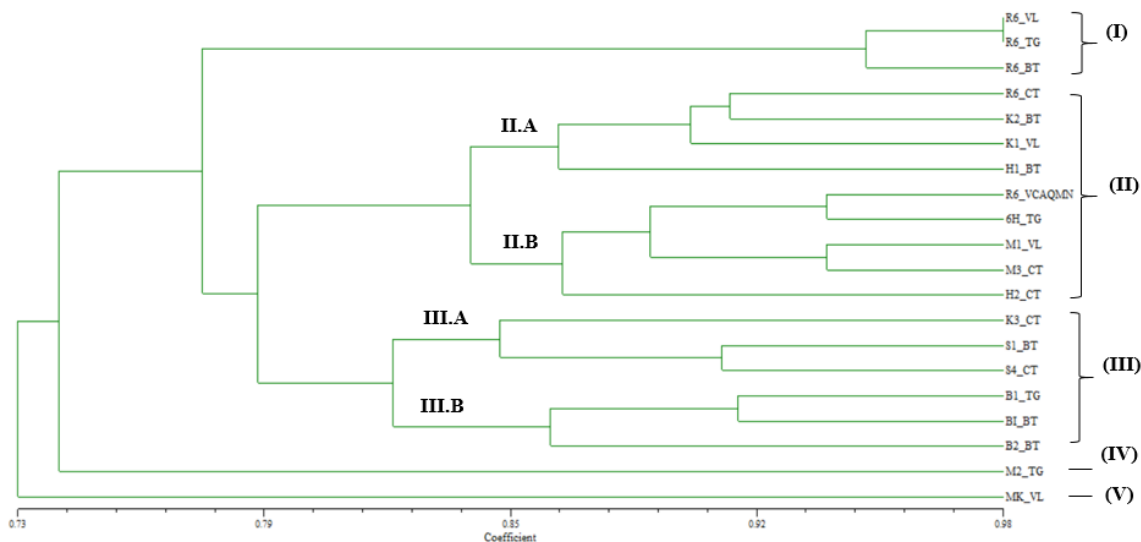
Bảng 4. Kết quả 5 môi được phân tích sự đa dạng giữa 20 giống sầu riêng

TT	Primers	Tổng số băng	Băng đa hình	Tỉ lệ đa hình (%)
1	ISSR03	9	6	66,7
2	ISSR13	20	13	65,0
3	ISSR22	6	5	83,3
4	ISSRK2	15	11	73,3
5	ISSRK3	7	5	71,4
	Tổng cộng	57	40	
	Trung bình	11,4	8	72,0

Sự khác biệt của 20 giống sầu riêng được ghi nhận dựa trên sự đa hình về kiểu gene được khuếch đại bởi 5 môi ISSR có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,61-0,97 (Hình 4). Qua kết quả phân nhóm trên, các môi ISSR đã dùng trong nghiên cứu có thể nhận diện được hai cá thể của từng giống đơn lẻ như Musang King ở Vĩnh Long và Monthong ở Cần Thơ. Các mẫu của giống sầu riêng Ri 6 nằm ở 3 nhánh khác nhau, trong đó có 3 cá thể nằm cùng nhánh là Ri 6 (Vĩnh Long, Tiền Giang và Bến Tre) thuộc nhóm I, còn 2 cá thể của giống này nằm ở nhóm II.A (Ri 6 Cần Thơ) và II.B (Ri 6 Viện CAQMN). Các mẫu của hai giống sầu riêng Sầu hạt lép (Bến Tre và Cần Thơ) và Chín Hóa (Bến Tre và Cần Thơ) không đi cùng một nhóm, qua đó ta có thể nhận định hai giống này không có cùng nguồn gốc. Hai mẫu sầu riêng Chuông Bò (Tiền Giang và Bến Tre) và sầu riêng Bí (Bến Tre) nằm cùng nhánh III.B cho thấy rằng hai giống này có mối quan hệ họ hàng gần gũi. Đặc biệt qua phổ điện di có thể phân biệt được mẫu Musang King, giống này nằm riêng một nhánh trong cây phân loại và đây là giống sầu riêng nhập ngoại từ Malaysia. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Giang et al. (2016) trên các giống được thu từ Malaysia, Thái Lan và Việt Nam, trong đó giống D197 (Musang King) của Malaysia cũng nằm riêng một nhánh.

Kết quả phân tích dựa vào dấu phân tử ISSR đã phân chia 20 giống sầu riêng thu được ở bốn tỉnh của vùng ĐBSCL chia thành các 5 nhóm có hệ số tương đồng dao động khá xa trong khoảng 0,61 –

0,97. Nguyên nhân do các mẫu thu tại các nhà vườn được trồng bằng các phương pháp khác nhau như ghép cành, trồng từ hạt và nguồn gốc giống đến từ nhiều nơi khác nhau nên có sự đa dạng trong vật liệu di truyền trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Cũng giống như một nghiên cứu về mối quan hệ di truyền của 14 giống sầu riêng ở Thái Lan có hệ số tương đồng dao động trong khoảng 0,632 - 1,00 (Vanijajiva, 2012). Một số nghiên cứu trên các giống cây ăn quả khác dựa vào dấu phân tử ISSR cũng cho kết quả tương tự. Nghiên cứu của Trần Nhân Dũng và Trần Thị Lệ Quyên (2012) trên các giống măng cụt cho thấy mức độ tương đồng của 32 dòng măng cụt trong nghiên cứu nằm trong khoảng 0,75-1,00. Trong nghiên cứu trên 12 mẫu thanh trà, Lê Y Phụng và ctv. (2018) đã chỉ ra mức độ đa hình của quần thể có sự đa dạng cao và mức độ tương đồng dao động từ 0,58- 0.86. Hồ Viết Thế và ctv. (2019) phân tích đa dạng di truyền ở Chanh dây đã kết luận chỉ thị ISSR và RAPD tạo ra đều cho mức độ đa hình cao và kết quả phân tích cây phá hệ có sự biến động lớn trong thông tin di truyền giữa các mẫu phân tích và không tuân theo quy luật về vị trí thu mẫu. Khi nghiên cứu về mối liên hệ di truyền của các giống cây trồng trong canh tác nông nghiệp cho thấy con người là yếu tố quan trọng trong việc di chuyển giống cây trồng giữa các vùng địa lý (Stankiewicz et al., 2001). Kết quả cho thấy có nhiều yếu tố tạo nên sự khác biệt trong quần thể như khả năng phát tán, ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến quá trình sinh trưởng và phát triển (Kerdelhué et al., 2002).



Hình 4. Mối quan hệ di truyền của 20 mẫu giống sầu riêng dựa trên 5 đoạn mỗi ISSR

R1. Ri 6 (Vĩnh Long), R2. Ri 6 (Tiền Giang), R3. Ri 6 (Bến Tre), R4. Ri 6 (Cần Thơ), R5. Ri-6 (Viện Cây ăn quả miền Nam), M1. Monthong (Vĩnh Long), M2. Monthong (Tiền Giang), M3. Monthong (Cần Thơ), K1. Khổ qua xanh (Vĩnh Long), K2. Khổ qua xanh (Bến Tre), K3. Khổ qua xanh (Cần Thơ), H1. Chín Hóa (Bến Tre), H2. Chín Hóa (Cần Thơ), S1. Sầu hạt lép (Bến Tre), S4. Sầu hạt lép (Cần Thơ), S4. Sầu hạt lép (Cần Thơ), B1. Chuông bò (Tiền Giang), B2. Chuông bò (Bến Tre), B1. Bí (Bến Tre), MK. Musang King (Vĩnh Long), 6H. Sáu Hữu (Tiền Giang).

4. KẾT LUẬN

Vùng trình tự ITS phát hiện 6 SNPs giữa các cá thể Ri 6_Bến Tre, Monthong_Tiền Giang, Chuông bò_Tiền Giang, Sầu hạt lép_Cần Thơ và Sáu Hữu_Tiền Giang. Đối với vùng trình tự *matK* tìm được 9 SNPs phân biệt được các cá thể Ri 6 (Cần Thơ và Viện Cây ăn quả miền Nam), Chín Hóa_Bến Tre, Sầu hạt lép_Bến Tre và Sáu Hữu_Tiền Giang, nhưng chưa thể nhận diện được giống sầu riêng Ri 6 với các giống sầu riêng được sử dụng trong nghiên cứu. Nghiên cứu đã góp phần xây dựng bộ dữ liệu DNA mã vạch làm nền tảng định hướng cho các bước nghiên cứu tiếp theo trên sầu riêng ở ĐBSCL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Angeliena, A., Ma'rif, A., Sidiq, H. A., Anggraito, Y. U., Habibah, N. A., Huyop, F. Z., & Retnoningsih, A. (2019, September). The diversity of superior Indonesian durians based on molecular markers. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2155, No. 1, p. 020043). AIP Publishing LLC.

Bộ Công Thương. (2019). *Báo cáo xuất nhập khẩu Việt Nam 2018*. Nhà xuất bản Công Thương.

Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. (2013). Quyết định về việc phê duyệt quy định vùng cây ăn quả chủ lực trồng tập trung và định hướng rải vụ một số cây ăn quả ở Nam bộ đến năm 2020 (1648/QĐ-BNN-TT).

<https://www.mard.gov.vn/VanBan/Pages/he-thong-van-ban.aspx>.

Đinh Thị Phòng, Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền & Hoàng Thanh Lộc. (2018). Đa dạng nucleotide vùng ITS gen nhân và các gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *rpoC1*) loài Trám đen (*Canarium nigrum*) ở một số tỉnh phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(3), 439-450.

Husin, N. A., Rahman, S., Karunakaran, R. & Bhore, S. J. (2018). A review on the nutritional, medicinal, molecular and genome attributes of Durian (*Durio zibethinus* L.), the King of fruits in Malaysia. *Bioinformation*, 14(6), 265-270. 0.6026/97320630014265

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270(1512), 313-321.

Hồ Viết Thế, Ngô Thị Kim Anh, Phan Thị Huyền Trang & Tạ Thị Thanh Thủy. (2019, January 11). *So sánh chỉ thị RAPD và ISSR trong phân tích đa dạng di truyền của một số giống chanh dây*. Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm. Thành phố Hồ Chí Minh. <https://dost.hochiminhcity.gov.vn/documents/1014/Kyyeu2019.pdf>

Kerdelhué, C., Roux, G., Forichon, J., Chambon, J., Robert, A., & Lieutier, F. (2002). Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae: Scolytinae) on different pine

- species and validation of *T. destruens* (Woll.). *Molecular Ecology*, 11(3), 483-494.
- Kyndt, T., Van-Droogenbroeck, B., Romeijn-Peeters, E., Romero-Motochi, J. P., Scheldeman, X., Goetghebeur, P., & Gheysen, G. (2005). Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2), 442-459.
- Lê Y Phụng, Văn Quốc Giang, Nguyễn Lộc Hiền, Trần Văn Hậu & 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.) Meisn) tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(1B), 50-60.
- Nguyễn Danh Vân. (2008). *Kỹ thuật canh tác cây ăn trái - Cây sầu riêng*. Nhà xuất bản Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh.
- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. B. (1988). *Extraction of DNA from plant tissues. Plant molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers.
- Shearman, J. R., Sonthirod, C., Naktang, C., Sangsakru, D., Yoocha, T., Chatbanyong, R., & Pootakham, W. (2020). Assembly of the durian chloroplast genome using long PacBio reads. *Scientific reports*, 10(1), 1-8.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *Systematic Zoology*, 24(2), 263-268.
- Stankiewicz, M., Gadamski, G., & Gawronski, S. W. (2001). Genetic variation and phylogenetic relationships of triazine resistant and triazine susceptible biotypes of *Solanum nigrum* analysis using RAPD markers. *Weed Research*, 41(4), 287-300.
- Tassanee, S., Theerachai, T., & Narumol, T. (2018). Assessment of genetic relationship and identification of durian (*Durio zibethinus* Murr.) using nucleotide sequences of rbcL gene. *Thai Journal of Science and Technology*, 7(2), 191-201.
- 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 Trường Đại học Cần Thơ*, 22, 175-185.
- Trần Nhân Dũng & Trần Thị Lê Quyên. (2012). Đa dạng di truyền các giống/dòng Mãng cụt (*Garcinia mangostana* L.) dựa trên dấu phân tử ISSR ở Bình Dương. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2(23a), 253-261.
- Vanijajiva, O. (2012). The application of ISSR markers in genetic variance detection among Durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand. *Procedia Engineering*, 32(2012), 155-159. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1250>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press.