

PHÂN TÍCH SỰ ĐA HÌNH CÂY XOÀI (*Mangifera indica* L.) BẰNG KỸ THUẬT SSR TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thị Lang¹, Nguyễn Thị Khánh Trân¹, Bùi Chí Công¹,

Bùi Chí Hiếu¹, Bùi Chí Bửu¹

TÓM TẮT

Chỉ thị phân tử SSR đã được sử dụng để nghiên cứu sự khác biệt di truyền với 30 giống xoài khác nhau. Trong số 66 mỗi SSR, 31 mỗi được sao chép với tổng số là 1.178 băng trong đó có 130 alen. Số lượng trung bình các mảnh gen được khuếch đại bằng marker SSR (kích thước 130 bp đến 400 bp). Primer SSR được sử dụng trong nghiên cứu, sản phẩm sản xuất PCR cho tỷ lệ biến động từ 90% tới 100%, hệ số PIC biến động từ 0,17 đến 0,85. Kết quả thu được chỉ số đa dạng Shannon I (5.312), sự đa dạng di truyền/locus - H (= 0,351) và hiệu quả allele/locus - A_{ep} (10,9 1-11,35. Kết quả nghiên cứu này làm cơ sở di truyền để nghiên cứu trên các giống xoài khác nhau tại ĐBSCL. Băng điện di được phân tích bằng phương pháp UPMGA chia thành 4 nhóm chính có mối liên quan di truyền, trong đó đặc biệt chú ý đến chương trình nhân giống hiệu quả với mục tiêu cải tiến giống. Dựa vào số lượng và tần số ghi điểm của các đoạn DNA, tỷ lệ đa hình và các thông số hiệu quả khác sau khi tổng hợp lại thì dường như MiIHR_i929, MiKVR_m056, LangXoai F4-R4 và Lang Xoài F2-R2 là những marker có hiệu quả và có thể được sử dụng để sàng lọc phân tử trong nguồn gene cây xoài cho đa hình và nhiều alen. Những phát hiện của nghiên cứu này tạo điều kiện cải thiện quản lý bảo tồn của nguồn gen và giúp cho các nghiên cứu chọn giống trong tương lai.

Từ khóa: Phân tích đa hình, chỉ thị SSR, giống xoài, mỗi (primer), thông số di truyền.

1. MỞ ĐẦU

Xoài (*Mangifera indica* L.), thành viên của họ *Anacardiaceae*, trên cơ sở các nghiên cứu về tế bào học một số loài *Mangifera* (*M. indica*, *M. caloneura*, *M. sylvatica*, *M. foetida*, *M. caesia*, *M. odorata* và *M. zeylanica*), số lượng nhiễm sắc thể cơ bản của xoài đã được tìm thấy là $2n = 40$ và $n = 20$ (Roy & Visweswariya, 1951; Mukherjee, 1957). Mukherjee (1950) đã báo cáo xoài là một allopolyploid. Sự lai tạo thường xuyên được quan sát thấy ở xoài (Mukherjee, 1953). Đây là một trong những loại trái cây được trồng phổ biến nhất và sớm nhất của vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, và được trồng ở hơn 100 quốc gia (Masroor và ctv, 2016). Xoài được xếp hạng là loại trái cây nhiệt đới được trồng nhiều thứ hai và là cây ăn quả lớn thứ sáu trên thế giới (UNCTAD, 2016) và loại quả này có tiềm năng cao theo các kịch bản biến đổi khí hậu (Munir và ctv, 2015). Do đó, trái xoài dường như là một trong những nguồn thực phẩm quan trọng đối với dân số thế giới ngày càng tăng (UNCTAD, 2016). Xoài là một trong những loại trái cây nhiệt đới quan trọng của Việt Nam. Để cải thiện giống trong xoài có rất nhiều ưu thế khác nhau nhưng cũng có một số hạn chế có liên quan như: độ

tuổi của cây rất dài, dị hợp tử, vô tính cao, một hạt trên mỗi quả, thoái hoá hạt giống, đa hình, hợp tử không tương thích tự động sớm rụng và yêu cầu diện tích lớn. Mặt khác, phạm vi đa dạng rộng rãi và dễ dàng nhân giống lai là những lợi thế cho các nhà lai tạo. Có rất ít nghiên cứu tạo ra các giống lai trên xoài, chủ yếu chỉ chú trọng về mặt thương mại. Sự phát triển của xoài chủ yếu dựa trên việc lựa chọn các dòng vô tính/cây giống có cơ hội cho quả chất lượng cao. Yêu cầu của một giống xoài tốt bao gồm: thấp cây, thời gian thu hoạch ngắn, ra hoa nhiều và thường xuyên, quả hấp dẫn, kích cỡ tốt và chất lượng ngon, không có rối loạn sinh lý, kháng sâu bệnh và cải thiện thời hạn sử dụng nhờ vỏ xoài dày, dễ vận chuyển vv.

Chỉ thị phân tử độc lập với môi trường đã được sử dụng thành công trên nhiều loài thực vật để sàng lọc kiểu gene trong thời gian ngắn. Trong số đó, kỹ thuật SSR (simple sequence repeat) đơn giản, dễ thực hiện, hiệu quả, ít tốn kém, ổn định và đáng tin cậy cho việc xác định nguồn gene và một phần cơ sở của bộ gene. Hơn nữa, kỹ thuật SSR là một công cụ mạnh mẽ để đánh giá đa dạng di truyền cũng như mối quan hệ giữa các loài/nguồn gene/loài lai bao gồm những loại khác. Với 33 chỉ thị (ISSR) đa dạng nguồn gen của 70 giống xoài đã được phân nhóm để giúp cho chọn giống xoài (Sagar S và ctv, 2014). Chỉ

¹ Viện Nghiên cứu Nông nghiệp Công nghệ cao ĐBSCL

thị phân tử SSR đã được sử dụng cho các đặc tính di truyền của các loại cây khác nhau bao gồm nguồn gen của cây xoài điều quan trọng là thiết kế các giống chiến lược để cải thiện di truyền (Lang, 2009). Do đó sử dụng phương pháp phân tử nhanh chóng và đáng tin cậy để xác định các loài có liên quan chặt chẽ của cây xoài sẽ là một tiến bộ quan trọng trong nghiên cứu. Trong bài viết này nghiên cứu phát triển chỉ thị SSR dựa vào hệ thống đánh giá di truyền nguồn gene cây xoài thông qua việc sử dụng các số liệu hiệu quả khác phục vụ công tác nghiên cứu chọn lọc giống xoài chất lượng tốt cho ĐBSCL.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu được sử dụng bao gồm 30 mẫu giống xoài được sưu tập tại ĐBSCL với tuổi xoài từ 7-10 tuổi.

Đánh giá các thông số theo đặc điểm định tính và 9 số lượng theo mô tả của xoài theo (IPGRI, 2006). Chiều cao cây, chiều dài lá, chiều rộng lá được đo bằng thước đo trên 20 lá cho mỗi cây với ba lần lặp lại.

Khối lượng trái (g): năm trái mỗi cây của 30 giống được chọn ngẫu nhiên để đánh giá khối lượng trái cây. Trái từng cây được cân bằng cân điện tử (Mettler 51 thường là hai chữ số thập phân). Khối lượng trung bình của năm loại trái cây đại diện cho khối lượng trái cây của sự đa dạng trong thí nghiệm.

Hàm lượng chất rắn hòa tan được đo bằng khúc xạ kế kỹ thuật số (Atago, PR-32, Nhật Bản) và thể hiện % của độ Brix.

Các kết quả thu được thử nghiệm tính toán thống kê. Ý nghĩa của sự khác biệt quan sát thấy trong số các giá trị bằng thử nghiệm của Duncan. Xác suất 5% được xem là có ý nghĩa.

Đánh giá kiểu gen theo phương pháp của Lang (2002).

Tách chiết DNA

Phân tử DNA phục vụ cho yêu cầu phân tích PCR được chuẩn bị theo qui trình ly trích DNA (Lang, 2002). 31 cặp mồi (primer) được sử dụng để đánh giá (Bảng 1).

Kỹ thuật PCR

Khuếch đại PCR được thực hiện trong 10 mM Tris-HCL (pH 8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂.1 đơn vị của Viện Lúa ĐBSCL *Taq*, 4 nmol dNTP, 10 pmol chỉ thị phân tử và 50 ng genomic DNA. Chu kỳ PCR: tách mạch đơn ở 94°C trong 5 phút, theo sau là 35 chu kỳ 94°C trong 60 giây, 36°C trong 60 giây và 72°C trong 120 giây. Quá trình kéo dài giây sau cùng là 72°C trong 5 phút. Cho thêm vào 13 µl dung dịch đệm (98% formamide, 10 mM EDTA, 0,025% bromophenol blue, 0,025% xylene cyanol) sau khi PCR. Đa hình trong sản phẩm PCR được phát hiện nhờ thuốc nhuộm ethidium bromide sau khi điện di trên 5% agarose gel.

Sản phẩm phản ứng PCR với chỉ thị phân tử SSR

Để phát hiện sự đa hình với 31 chỉ thị phân tử đã được sử dụng trong phản ứng PCR trên DNA genome thu được từ các mẫu lá của 30 giống xoài. Sản phẩm khuếch đại tạo ra từ những chỉ thị phân tử này được quan sát trên gel agarose 1,5%. Kết quả quan sát cho thấy 31 chỉ thị phân tử cho sản phẩm khuếch đại trên 100% số mẫu, có 15 chỉ thị phân tử không thể hiện khuếch đại bất cứ band hình nào. Số lượng đoạn DNA tạo ra trong một phản ứng được ghi nhận trên bảng 1. Dựa vào sự khác biệt giữa các allen thể hiện qua các băng trên gel ta có thể xác định được sự khác nhau giữa các giống về mặt di truyền. Sau khi phản ứng PCR hoàn tất, bổ sung 2,5 µl dung dịch nhuộm 6X (MB1 Ferment Inc., Maryland, USA) vào trong sản phẩm PCR và chạy điện di gel agarose 1,5% (m/v) với dung dịch đệm TAE 1X, sau đó nhuộm gel bằng ethidium bromide và ghi nhận kết quả bằng hệ thống (Syngene, Cambridge, UK).

Bảng 1. Các SSR đánh dấu sử dụng trong đề tài

TT	Tên chỉ thị phân tử	Kiểu lặp lại	Kích thước phân tử	Số alen	PIC	Dị hợp tử	Nguồn gốc
1	MiKVR_a394: F:AAACTTTAATGGATTTTATCGTGTAAT R: AAATACCCACCCATTTTGC	(TG)7	222-273	2	0,35	3,4	Kundapura V (2015)
2	MiKVR_b283 TCTTTTACGAGGATTTTCTTTTT R: CGAATAAGGGTCAATCCGAA	F: (TTC)4	190-210	3	0,18	5,8	Kundapura V (2015)

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

3	MiKVR_d864 F: AAATTGGTGTGTTTTACCTTGGG R: TGGAATTGTTCCTCCTTCC	(ATC)4	250-300	4	0,45	0	Kundapura V (2015)
4	MiKVR_ao28 F: AAAACTATATGCACCAATTTTGAA R: ATTATGAGTTCTTATTTTGGATGGA	(TA)	170-230	5	0,32	10,2	Kundapura V (2015)
5	MiMRD_l744 F: AAATCCCGTACCTTCATCCC R: TGCCAGAACTGCTCTCTTCA ((AAAT)4	260-290	2	0,41	0,1	Kundapura V (2015)
6	MiMRD_l896 F: AATGCGGAGTATTCCAGGTG R: CCTTCTCTCGTTTGATTGCAT	(TTAA)4	200-280	5	0,32	21,4	Kundapura V (2015)
7	MiKVR_a152 F: TCGCATGTATACTCATAAATTTGTT R: CTAAAAGGGCTGTGCTCCAG	(ATTAT)4	220-250	3	0,21	0	Kundapura V (2015)
8	MiKVR_a965 F: GAAACCCCTAAGAGGGAAAA R: ACGCAACTTTGGTTTTGGAA				0,32	5,8	Kundapura V (2015)
9	KVR_u587 F: TTCTCCTGCTTTTCACCCTC R: AGGGGTGCAATTGTCATTTT	(TTTC)4	200-280	4	0,33	4,2	Kundapura V (2015)
10	MiMRD_b369 F: CCAGTTTATACCAGCCAAGC R: TAAGGTGCCAAACTGGACC	(GCTG)4	200-270	3	0,41	7,10	Kundapura V (2015)
11	MiMRD_o228 F: AAACCATGTGGATGTGGGT R: TCCCAGTCTGGA AAAAGAAAA	(TGCA)4	240-290	4	0,35	0	Kundapura V (2015)
12	MiMRD_z359 F: AGGACACGTGGAAGGATCAC R: AAGTTTGCATCTCTGCGAGC ((TCTCC)4	200-400	7	0,76	0	Kundapura V (2015)
13	MiBNG_e978 F: TCATGCACCAAATGTACGC R: CAACCTCGGAACGTTTGATT	(TTTAT)4	200-240	4	0,47	3,7	Kundapura V (2015)
14	MiMRD_r451 F: TGGTGTAATTTGGTGGTCCC R: GAGCGTCCTCATCACTGGAT	(CC)4	250-380	5	0,15	11,2	Kundapura V (2015)
15	MiKVR_l615 F: CCTGATGTTGAAATGTTCG R: TCCCTTCTCAAAGCATCTCA (ATCCAC)4	(ATCCAC)4	180-250	5	0,55	15,1	Kundapura V (2015)
16	MiKVR_t130 F: CACATGGGTGCATCTTAGGT R: GGTGGCTAGTGGGGTATGAA	(GAAAAA)4	230-270	5	0,41	0	Kundapura V (2015)
17	MiKVR_w661 F: AGACATACGCCATGTGTGA R: GGTCTTGTGCCATCTTCCAC	(AAGAAA)4	200-250	3	0,51	24,8	Kundapura V (2015)
18	MiIHR_j929 F: AGGTGAATTTGGTGAACGAG R: TCCTCGAAAACCAAGAGGAA	(GAAGGA)4	130-400	13	0,74	3,4	Kundapura V (2015)
19	MiKVR_m056 F: GTGTTCAGAATACCGGCCAT R: ACCCCTGCATGATTTTGA CT	(AT)11	240-300	4	0,72	22,7	Kundapura V (2015)
20	MiKVR_f689 F: TGGTTCACATGAGAATAACAATGA	(GT)15	190-350	6	0,56	0	Kundapura V (2015)

	R: TCCATTTTGAAGGCTTAACACA						
21	MiMRD_m660 F: CCAGCCTTGCCAATAAGAAC R: AGGGACCTCAGCGAGAGAGT	(CA)10	220-290	5	0,74	0	Kundapura V (2015)
22	MRD_z414 F: AAAATGGAGCCCACAAAGTG R: GTTTCGGATTTCTCATCGGA	(TGA)5	170-220	2	0,85	1,7	Kundapura V (2015)
23	MiMRD_z658 F: TGGATTCCCCTTGAGAGATG R: TCGGTGATTCTGTGAAGGAA	(ATAA)4	170-200	4	0,74	1,5	Kundapura V (2015)
24	MiKVR_q975 F: TGGGTGAGGGAATTTGTTT R: CTTTGAGATGATATGATGTGGTCA	(TTAT)4	200-240	3	0,32	25,4	Kundapura V (2015)
25	MiMRD_m126 F: TGCTCAGCAACTGAAAAGTCTC R: TGCAGTGTTAGGTTTTTGCG	(AAATT)4	190-210	2	0,73	7,8	Kundapura V (2015)
26	MiIHR_l595 F: GAAGCAGCCATGAAGCCTAC R: CCAACTCAACGTTTGTTC	(AAAAT)4	200-240	2	0,64	0	Kundapura V (2015)
27	MiMRD_m126 F: TGCTCAGCAACTGAAAAGTCTC R: TGCAGTGTTAGGTTTTTGCG	(AAACGA)4	190-200	4	0,25	22,1	Kundapura V (2015)
28	LangXoaiF1R1 F:Tgcaattttgattcccgttc R:tctgtgtgtgtgtgtgtgtgtg	(Tg)4	250-300	3	0,75	15,4	Nguyễn Thị Lang và ctv, 2009
29	LangXoaiF2R2 F:Ctggttcacccctttctt R:teccaaaacaccagctcaat	(Aat)3	200-250	5	0,57	21,0	Nguyễn Thị Lang và ctv, 2009
30	LangXoaiF3-R3 F:Tcattcactcatcggaacca R:tccgtgagtcagagcatttg	(att)4	190-230	4	0,47	4,5	Nguyễn Thị Lang và ctv, 2009
31	LangXoaiF4-R4 F:Tgatgcgattcgaaaacttg R:atggcacgtccgttgtgat	(at)10	200-250	9	0,62	0	Nguyễn Thị Lang và ctv, 2009
	Tổng hợp			130	0,44	7,490	

Phân tích thống kê

Bảng SSR sẽ được hiển thị dựa vào khối lượng phân tử và tính bằng đơn vị kilo base (kb) dựa vào thang đo như một marker. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel để tính các băng đa hình của từng primer riêng, trung bình đa hình và tỷ lệ đa hình. Phân tích thông tin tiềm năng của các chỉ thị phân tử và sự đa dạng di truyền trong các kiểu gene được đánh giá bao gồm số alen trên locus mong muốn -Aep theo Weir BS *et al.*, 1996, chỉ số đa dạng Shannon- (Martynov SP và ctv, 2003) đa dạng di truyền/chỉ số đa dạng- Hep, chỉ số marker (MI) và nội dung thông tin đa hình- PIC được tính toán cho từng primer trên cây trồng dựa vào tần số alen trên locus của mỗi cây.

Phân tích Cluster

Các bảng SSR sẽ được mã hóa theo hệ nhị phân 0 và 1. Trên gel điện di theo hàng ngang, mẫu nào có băng thì ghi là 1, mẫu nào không có băng thì ghi là 0. Dựa vào kết quả bảng, ma trận thể hiện tương quan di truyền cho tất cả các cặp từ Euclidean Distance và được sử dụng để xây dựng giản đồ cây phả hệ theo phương pháp phân nhóm Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Dữ liệu sẽ được phân tích bằng phần mềm phân tích số liệu bằng cách sử dụng NTSYS-PC phiên bản 2,1 (Rohlf, 2000). Các dữ liệu từ SSR marker sẽ được xử lý với nhau.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thu thập xoài tại ĐBSCL

Dựa vào vị trí và thông tin thu thập các giống đánh giá hình thái và chỉ thị phân tử DNA. xoài được sử dụng và nguồn gốc được thu thập để

Bảng 2. Danh sách các dòng/giống xoài sử dụng trong nghiên cứu

Số thứ tự	Tên	Nguồn gốc	Vị trí thu thập	Ghi chú mã số
1	Hòa Lộc1	Việt Nam	Chợ Lách, Bến Tre	1
2	Hòa Lộc2	Việt Nam	Cần Thơ: Nông trường Sông Hậu	2
3	Hòa Lộc3	Việt Nam	Chợ Mới, An Giang	3
4	Hòa Lộc4	Việt Nam	Bình Tân (Vĩnh Long)	4
5	Hòa Lộc5	Việt Nam	Long Định, Tiền Giang	5
6	Cát Chu1	Việt Nam	Chợ Lách, Bến Tre	6
7	Cát Chu2	Việt Nam	Cần Thơ: Nông trường Sông Hậu	7
8	Cát Chu3	Việt Nam	Chợ Mới, An Giang	8
9	Cát Chu4	Việt Nam	Bình Tân (Vĩnh Long)	9
10	Cát Chu5	Việt Nam	Long Định, Tiền Giang	10
11	Đài Loan	Đài Loan	Đồng Tháp	11
12	Đài Loan2	Đài Loan	Cái Răng, Cần Thơ	12
13	Đài Loan3	Đài Loan		13
14	Đài Loan4	Đài Loan	Phú Tân, An Giang	14
15	Đài Loan5	Đài Loan	Bình Tân (Vĩnh Long)	15
16	Xoài Tượng	Việt Nam	Bình Tân Vĩnh Long	16
17	Thanh Ca	Việt Nam	Tịnh Biên, An Giang	17
18	Xoài Mũ	Việt Nam	Ô Môn (Cần Thơ)	18
19	Xoài Voi	Việt Nam	Bến Tre	19
20	Xoài Hòn	Việt Nam	Bến Tre	20
21	Xoài Úc1	Úc	Ô Môn (Cần Thơ)	21
22	Xoài Úc2	Úc	Chợ Mới (An Giang)	22
23	Xoài Thái Lan xanh	Thái Lan	Ô Môn (Cần Thơ)	23
24	Xoài Thái Lan	Du nhập Thái lan	Cái Môn (Bến Tre)	24
25	Xoài keo xanh	Campuchia	Tiền Giang	25
26	Xoài keo xanh2	Campuchia	An Giang	26
27	Ấn Độ	Ấn Độ	Du nhập từ Ấn Độ	27
28	Philippine	Philippine	Du nhập từ Philippine	28
29	Nha Trang	TP. Cam Ranh	Cam Ranh	29
30	Keo B Núi	Campuchia	Phú Tân (An Giang)	30

3.2. Kết quả phân tích một số kiểu hình của các dòng/giống xoài nghiên cứu

Đặc tính hình thái là bước đầu tiên cần được thực hiện trước khi các nghiên cứu phân tử sâu sắc hơn. Việc áp dụng các dấu hiệu hình thái học là đơn giản của các phương pháp tiêu chuẩn và lặp lại. Các mẫu có sai khác trong hình thái, sinh lý và các đặc điểm nông học. Các kết quả 8 tính trạng dựa vào hình thái các giống xoài biến động có ý nghĩa trên bảng 3. Năng suất giữa các giống cũng cho thấy biến động rõ giữa cát Hòa Lộc và Cát Chu. Giống có năng suất cao là Xoài Tượng do trái to. Xoài có năng suất

thấp nhất là Xoài keo xanh. Đây là cơ sở ban đầu để chọn lọc và nhân giống cây ăn trái trong thời gian tới.

Kết quả phân tích đa hình sản phẩm PCR-SSR của các dòng/giống xoài nghiên cứu đã phát hiện một loạt các đa dạng trong trồng xoài ở cấp độ phân tử trong số các mẫu thử nghiệm, bằng cách sử dụng các mối SSR.

Một mức độ đa hình cao được quan sát, với trung bình đa hình của chỉ thị phân tử. Dùng 31 chỉ thị phân tử SSR để tạo sự khuếch đại cho 30 cây xoài trong đó. Ghi nhận kết quả tất cả sản phẩm của SSR đều cho sự đa hình trên 30 giống xoài (P= -93-100%).

Đối với primer Lang Xoài F4-R4 sự khuếch đại DNA cho sản phẩm đạt 100% và 9 allele với kích thước phân tử từ 140, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250 bp, 300 và 350 bp. Trong chỉ thị này có sự khác biệt giữa 4 giống xoài cát Hòa Lộc trồng các nơi khác với

giống xoài Cát Hòa Lộc trồng tại Long Định, Tiền Giang (Hình 1.A). Cát Chu 4 và 5 khác với xoài Cát Chu 1, 2, và 3. Điều này ghi nhận nhóm xoài cát này có sự phân ly do thụ phấn chéo. Trong nhóm xoài Đài Loan cũng ghi nhận có sự tách biệt khác nhau.

Bảng 3. Kết quả đánh giá các tính trạng hình thái của 30 mẫu xoài thu tại ĐBSCL

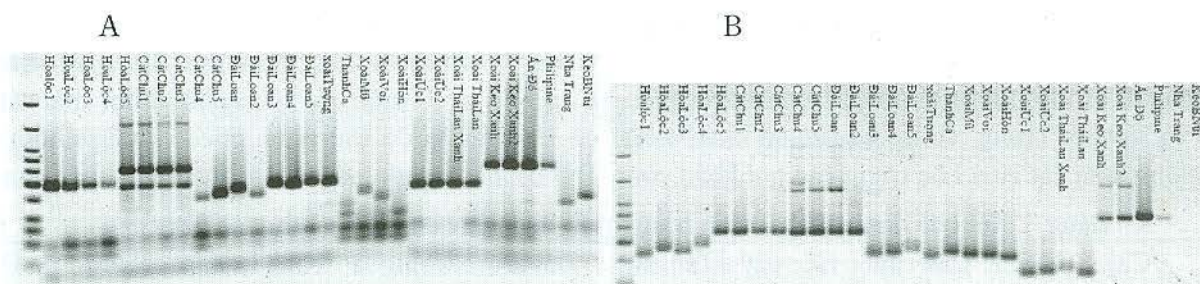
Cây	Cao cây (m)	Gốc cây (m)	Tán cây (m)	Dài lá (cm)	Rộng lá (cm)	Khối lượng trái (gram)	Năng suất (kg/cây)	Độ °Brix
Hòa Lộc1	7,00 nop	1,00 ijk	4,00 i	32,00 b	0,40 o	450 b	300 p	13,2 h
Hòa Lộc2	8,90 ab	0,70 o	3,40 jk	25,00 r	0,50 g-j	400 e	345 kl	13,8 h
Hòa Lộc3	8,90 ab	0,70 o	5,00 ef	26,00 p	0,56 cde	320 i-l	356 j	14,5 g
Hòa Lộc4	5,40 st	1,20 f	5,00 ef	27,00 o	0,57 bcd	321 ijk	356 j	17,1 d
Hòa Lộc5	8,50 cd	1,20 f	5,20 e	28,00 l	0,60 b	312 k-n	356 j	16,5 e
Cát Chu1	9,00 a	0,90 m	5,20 e	28,90 h	0,50 g-j	211 r	374 i	16,8 e
Cát Chu2	7,80 ghi	0,92 lm	5,30 de	28,60 h-k	0,68 a	324 hi	458 f	12,73l a
Cát Chu3	7,00 nop	0,98 jkl	5,30 de	32,00 b	0,59 bc	231 q	500 e	17,5 d
Cát Chu4	6,80 pq	0,97 jkl	4,20 hi	32,10 b	0,60 b	312 k-n	523 c	16,6 e
Cát Chu5	8,20 def	0,95 klm	4 i	34,20 a	0,50 g-j	452 b	542 b	16,8 e
Đài Loan	7,60 g-k	0,97 jkl	4,10 i	28,90 h	0,54 def	451 b	421 g	12,4 l
Đài Loan2	9,00 a	1,10 g	4,20 hi	29,60 efg	0,52 fgh	421 c	411 h	14,1g
Đài Loan3	7,30 j-n	1,20 f	4,60 g	29,50 efg	0,56 cde	421 c	423 g	12,5 l
Đài Loan4	7,60 g-k	1,30 e	4,50 gh	27,00 o	0,52 fgh	412 d	415 gh	15,6 f
Đài Loan5	6,60 q	1,40 d	4,50 gh	27,40 n	0,51 fi	412 d	523 c	14,4 g
Xoài Tượng	7,90 fgh	1,60 b	4,10 i	25,60 q	0,53 efg	590 a	624 a	11,4l
Thanh Ca	8 efg	1,20 f	3,00 l	27,80 lm	0,52 fgh	530 a	521 c	20,7b
Xoài Mũ	8 efg	1,10 g	4,00i	29,60 efg	0,51 fi	320 i-l	415 gh	12,4l
Xoài Voi	8,50 cd	1,02 hij	4,20 hi	28,90 h	0,60 b	300 p	251 q	11,5l
Xoài Hòn	8,30 cde	1,03 hij	4,00 i	24,80 r	0,45 lmn	310 mno	210 t	13,9 h
Xoài Úc1	8,40 cd	1,05 ghi	4,20 hi	29,50 efg	0,42 no	301 p	241 r	11,4 l
Xoài Úc2	6,90 opq	1,07 gh	4,20 hi	25,80 pq	0,65 a	305 nop	253 q	12,4 l
Xoài Thái Lan xanh	7,40 i-m	0,90 m	3,00 l	28,70 hij	0,52 fgh	304 nop	200 u	18,6 c
Xoài Thái Lan	8,60 bc	0,99 ijk	3,00 l	27,80 lm	0,51 fi	342 g	145 v	17,5 d
Xoài keo xanh	7,50 i-l	0,95 klm	3,20 jkl	25,60 q	0,52 fgh	341 g	124 w	21,1 a
Xoài keo xanh2	4,60 u	0,92 lm	3,50 j	29,80 cde	0,54 def	342 g	120 w	20,4 b
Ấn Độ	8,50 cd	0,80 n	3,10 kl	28,50 ijk	0,52 fgh	324 hi	236 rs	13,2 h
Philippine	7,60 g-k	0,98 jkl	4,00 i	28,80 hi	0,57 bcd	331 h	356 j	17,4d
Nha Trang	7,50 i-l	0,79 n	6,00 a	29,50 efg	0,54 def	324 hi	562 a	12,9 l
Keo B Núi	7,40 i-m	1,20 f	5,20 e	27,80 lm	0,45 lmn	324 hi	510 d	18,5 c

Ghi chú: a, b, c ... là phân thống kê có ý nghĩa theo phân tích Duncan

Đối với primer MiIHR_i929: sự khuếch đại DNA cho sản phẩm đạt 93,3%. Sản phẩm khuếch đại 13 allele với kích thước phân tử từ 130, 150, 160, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 300, 350, 360, 400 bp. Khi ghi nhận cho thấy các xoài cát Hòa Lộc đã bị đột biến do

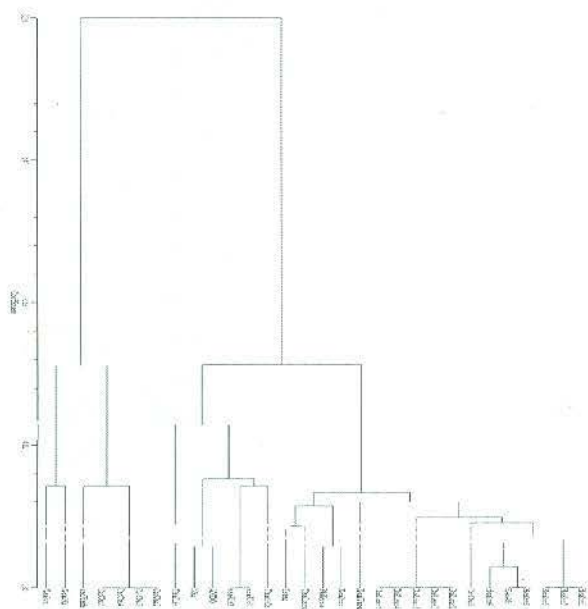
biến động khác nhau từ các vị trí kích thước phân tử khác nhau 180,190, 200 và 210 bp (Hình 1 B).

Tương tự các chỉ thị phân tử SSR cho sản phẩm đa hình biến động từ 2-13 alen và dựa vào các tần số alen này các giống phân biệt khác nhau.



Hình 1. A. Sản phẩm PCR của Lang Xoài F4-R4 trên 30 giống xoài khác nhau được tách trên gel polyacrylamide nhuộm với nitrat bạc; B. Sản phẩm PCR của MiIHR_i929 trên 30 giống xoài khác nhau được tách trên gel polyacrylamide nhuộm với nitrat bạc

4. PHÂN NHÓM DI TRUYỀN KIỂU GEN



Hình 2. Giản đồ phả hệ mối tương quan di truyền giữa 30 giống xoài dựa vào chỉ số tương đồng Jaccard bằng cách sử dụng marker SSR (UPGMA). (A, B, C và D cho thấy có 4 nhóm chính, khi xét hệ số tương đồng 0,47-1)

Kết quả phân nhóm di truyền dựa trên kiểu gen cho thấy: ở khoảng cách di truyền khoảng 0,70 các giống được chia thành 4 nhóm rất rõ rệt: Nhóm A, B, C và D.

Như vậy, với 31 chỉ thị phân tử 30 giống được phân thành 4 nhóm chính trong đó mức độ tương quan giữa các giống dao động từ 0,47 – 1,0 cho thấy các giống có sự đa dạng về mặt di truyền cao. Có mức độ tương đồng giữa các giống là thấp nhất 0,60% và một số giống trong nhóm A có mức độ tương đồng cao nhất gần 100%. Sự khác biệt về di truyền giữa các giống trong nhóm A cao hơn ở các giống trong nhóm C, hệ số tương đồng giữa nhóm A và nhóm B so với nhóm C là 0,49 và các giống trong

nhóm B có thể được xem là giống trung gian giữa nhóm A và nhóm C. Điều này có nghĩa là nếu như đem các giống ở nhóm A và C lai tạo với nhóm B thì có thể tạo ra nhiều cá thể có nhiều đặc tính mong muốn bởi khoảng cách di truyền càng xa thì khả năng cho ưu thế lai càng cao (Bùi Chí Bửu và ctv, 2003).

Phân nhóm di truyền dựa vào khả năng kết hợp với các môi, ở khoảng tương đồng 0,47 đến 1 các giống được chia thành 4 nhóm chính A, B, C và B:

Nhóm A có mức tương đồng nằm trong khoảng 0,00-0,75, bao gồm 17 giống: 1: Hòa Lộc, 2: Hòa Lộc Sông Hậu; 3: Hòa Lộc Chợ Mới; 5 Hòa Lộc Tiền Giang; 4: Hòa Lộc Vĩnh Long; về mặt di truyền, các giống trong nhóm này tương đối giống nhau về di truyền. Trong nhóm A chia ra 4 nhóm phụ.

Nhóm A1: có mức tương đồng nằm trong khoảng 0,00-0,75, bao gồm 9 giống: 1: Hòa Lộc, 2: Hòa Lộc Sông Hậu; 3: Hòa Lộc Chợ Mới; 5 Hòa Lộc Tiền Giang; 4: Hòa Lộc Vĩnh Long. Về mặt di truyền, các giống trong nhóm này tương đối giống nhau về di truyền. Đây là nhóm giống xoài cát Hòa Lộc. Các giống trong nhóm này có các alen thể hiện liên kết với môi MiIHR_I595; MiMRD_z359; Lang xoài F4-R4 thể hiện sản phẩm khuếch đại ở kích thước 130-400 bp.

Nhóm A2: Bao gồm 5 giống xoài Đài Loan.

Nhóm A3: Chỉ có 1 giống xoài Tượng thu tại Vĩnh Long trên chỉ thị MiIHR_i929.

Nhóm A4: bao gồm xoài Philippine, xoài Thái xanh và xoài Nha Trang.

Nhóm B được chia thành hai nhóm B1 và B2 ở hệ số tương đồng 0,80.

Nhóm B1 có 4 giống Thanh Ca, Úc 1 (Cần Thơ) và Úc 2 (thu tại An Giang), Ấn Độ, đối với MiMRD_z658) thể hiện sản phẩm khuếch đại ở kích

thước 170-200 bp), MRD_z414 (thể hiện sản phẩm khuếch đại ở kích thước 170- 220 bp).

Nhóm B2 bao gồm các giống: gồm 1 giống xoài Thái Lan thể hiện sản phẩm khuếch đại ở kích thước MiIHR_i929: Sản phẩm khuếch đại 13 allele với kích thước phân tử từ 130- 400 bp. Vị trí phân biệt được alen của B2 nằm vị trí 130 bp.

Nhóm C: Chia ra hai nhóm:

Nhóm C1: Có 4 giống Cát Chu. Nhóm này hầu hết đa hình trên chỉ thị MiIHR_i929 (với 13 alen với kích thước phân tử từ 130, 150, 160, 180,190, 200, 210, 220, 230, 300, 350, 360, 400 bp). Tuy nhiên với nhóm xoài Cát Chu nằm vị trí alen với kích thước phân tử là 220, 230, 300, 350, 360, 400bp; MiMRD_z359 với chỉ thị phân tử 200-400 bp theo thứ tự.

Nhóm C2: Có 1 giống Keo xanh thể hiện trên phân tử MiIHR_i929, với alen từ 130 - 220 bp.

Nhóm D: Có hai giống: Xoài Voi và xoài mũ. Nhóm này hầu hết đa hình trên chỉ thị MiMRD_m660 với chỉ thị phân tử RM 250- 290 bp và LangXoai2 F3-R3 với kích thước phân tử 190-230 bp.

5. THẢO LUẬN

Việc xác định thay đổi chỉ dựa trên kiểu hình đặc điểm là không chính xác do ảnh hưởng của môi trường và số giới hạn của các đặc điểm của các giống. Điều này phù hợp với Hameedunnisa và ctv, 2014. Các kiểu gen được sử dụng trong nghiên cứu này cho thấy mức độ cao của dị hợp tử quan sát khác nhau, từ 0,07 đến 0,56. Đặc biệt phân biệt được dị hợp tử trên xoài cát Hòa Lộc trên 5 vùng khác nhau. Trong số 31 chỉ thị phân tử SSR, với 30 giống xoài (Hình 3) hiển thị các vạch băng của các cây một cách đồng nhất. Các chỉ thị phân tử SSR có tổng số 130 alen thể hiện tính đa hình. Trung bình số đoạn DNA được khuếch đại bằng marker SSR trong nghiên cứu này là dao động từ 2 đến 13 alen (kích thước từ 130-400 bp). Với 31 chỉ thị có một sự biến đổi cao của các đoạn DNA được tạo ra từ marker SSR có thể là do sự khác biệt trong vị trí gắn trên toàn bộ các alen của các giống xoài khác nhau. Tính hiệu quả của các chỉ thị phân tử sử dụng trong SSR là xác định được số lượng bằng cách ước đoán dựa vào sự khác biệt của các thông số di truyền (Bảng 1). Số lượng alen trên mỗi locus dao động từ 2 tại 3 của locus (MiKVR_a394, MiKVR_b283) đến 7 tại 1 của locus (MiMRD_z359), 9 alen (Lang Xoai F-R) và 13 locus (MiIHR_i929) với giá trị trung bình là 4,1

alen (Bảng 1). Với 130 vị trí có thể được phân biệt và phân loại thành 30 kiểu gen đã tìm ra đa dạng di truyền phân tử dựa vào chỉ số Shannon trên từng chỉ thị phân tử trung bình là 5,789 với giá trị dao động từ 10,91-11,35 cho thấy đa dạng di truyền rộng. Khi so sánh các giá trị PIC, đa dạng di truyền (Hep) là dạng đa dạng có thể xác định của bốn nhóm giống, (0,504 và 0,337). Các giá trị này tương tự phân tích của Sagar S. và ctv, 2007) biểu hiện tính hiệu quả của thông tin loci SSR trong nghiên cứu này cũng ghi nhận sự đa hình cao trên chỉ thị phân tử như MiMRD_z359. Trong nghiên cứu này, Hep (chỉ số đa dạng di truyền) cho thấy sự đồng nhất đáng chú ý trên từng chỉ thị phân tử và dao động từ 0,72% (MiIHR_i929). Hơn nữa, Hep cho thấy mối liên hệ tích cực và có ý nghĩa ($r = 0,997$, $P < 0,001$) với ảnh hưởng alen/locus (10,91-11,35). Thông số của chỉ thị phân tử đã được tính toán để phát hiện các đặc tính của từng cá thể bằng chỉ thị phân tử riêng biệt để xác định các locus đa hình trên các loại giống xoài khác nhau. Bằng hình điện di được phân tích bằng phương pháp UPGMA (Hình 2) cho thấy quá trình phân nhóm kiểu gene thành 4 nhóm chính. Có một mối liên hệ chặt chẽ giữa các kiểu gene đã được ghi nhận. Mối tương quan di truyền như thế là rất có ý nghĩa, nó cung cấp cho các vật liệu tốt cho nghiên cứu cho chương trình lai giống xoài sau này. Bên cạnh đó, sự hiểu biết về sự đa dạng của nguồn gen của các giống để khai thác dị hợp tử bằng phân tích đa dạng. Ngoài ra việc phát hiện trong các nguồn gen cũng có thể ngăn chặn các giống lai có sự trùng lặp các alen, tránh nhầm lẫn trong di truyền mà có thể được gây ra cận giao khi lai.

6. KẾT LUẬN

Phân tích kiểu hình của 30 cây xoài dựa vào năng suất và hình thái đã phân biệt được các giống xoài khác nhau. Tuy nhiên sự biến động của các giống rất lớn. Điều này còn tùy thuộc vào giống, môi trường, tuổi của cây trồng.

Phân tích trên chỉ thị phân tử của SSR: trong tổng số 66 primers tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền thì chỉ có 31 chỉ thị phân tử cho sản phẩm khuếch đại trên 30 giống xoài. Trung bình số đoạn DNA được khuếch đại bằng marker SSR trong nghiên cứu này là dao động từ 2 đến 13 alen (kích thước phân tử biến động từ 130-400 bp).

Thông qua các dữ liệu chỉ thị phân tử SSR với 31 chỉ thị phân tử được sử dụng, 30 giống được phân thành 4 nhóm chính.

Bản đồ phân nhóm dựa phương pháp chỉ thị phân tử cũng được thiết lập với bốn nhóm khác nhau. Trong đó đáng chú ý có bốn chỉ thị MiIHR_{i929}; MiKVR_{m056}, Lang Xoai F4-R4 và LangXoaiF2-R2. Có thể phân biệt độ thuần của các giống xoài khác nhau.

Chỉ số đa dạng của cây xoài phân tích theo phương pháp SSR cao ($H = 0,315$). Các kết quả được trình bày ở đây là những bước đầu tiên hướng tới một hiểu biết tốt hơn về các giống cây xoài tại ĐBSCL và có thể phục vụ cho các nghiên cứu lai tạo loại cây này trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Cần Thơ đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Chí Bửu, Phạm Thị Thu Hà, Đồn Văn Hòn, Bùi Phước Tâm, Châu Thanh Nhã, Nguyễn Thị Lang, 2013. Nghiên cứu biến động di truyền tính chịu nóng trên quần thể hồi giao cây lúa (*Oryza sativa* L.). Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, số 2/2013 trang 10-15.

2. Bui Chi Buu, Nguyen Thi Lang, 2003. Application of molecular marker to rice breeding in mekong delta Vietnam. Agriculture rural development.

3. Hameedunnisa Begum, Medagam Thirupathi Reddy, Surapaneni Malathi, Boreddy Purushotham Reddy, Gonela, Narshimulu, Javaregowda Nagaraju and Ebrahimali Abubaker Siddiq, 2014. Morphological and Microsatellite Analysis of Intravarietal Variability in 'Cherukuram' Cultivar of Mango (*Mangifera indica* L.). 2014. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. Volume 10, No.3 2014.

4. Kundapura V Ravishankar; M R DINESH, P. Nischita, B. S. Sandya, 2015. Development and characterization of microsatellite markers in mango (*Mangifera indica*) using next-generation sequencing technology and their transferability across species. *Molecular Breeding* 35(3).DOI: 10.1007/s11032-015-0289-2.

5. Masroor HM, Anjum MA, Hussain S., Ejaz S., Ahmad S., Ercisli S., Zia-Ul-Haq M. Zinc improves yields and the quality of the mango is cultivated in

the limestone soil. *Erwerbs-Obstbau*, 2016; 58:49 Bóng55. DOI: 10.1007/s10341-015-0258-2. [CrossRef] [Google scholar].

6. Munir T., Perkins M., Kaing E., Strack M., 2015. Carbon dioxide and the main production of a bog treed boreal: Reaction to warming and simulation lowering the water level of climate change. *Biochemistry*. 2015; 12:1091 from 1111. DOI: 10.5194/BG-12-1091-2015. [CrossRef] [Google scholar].

7. Mukherjee, S. K., 1950. Mango: its allopolyploid nature. *Nature*, 166: 196–7.

8. Mukherjee, S. K., 1951. Origin of Mango. *Indian J. Genet. Pl. Breed.*, 11:49–56.

9. Mukherjee, S. K., 1957. Cytology of some Malayan Species of *Mangifera*. *Cytologia*, 22: 239–41.

10. Martynov SP, Dobrotvorskaya TV, Dotlacil L, Stehno Z, Faberova I, Bares I., 2003. Genealogical approach to the formation of the winter wheat core collection. *Russian J Genet* 2003; 39: 917-923. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025382807351>

11. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Những phương pháp cơ bản trong công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

12. Nguyen Thi Lang, Bui Phuoc Tam, Nguyen Van Hieu, Chau Thanh Nha, Abdelbagi Ismail-Russell Reinke and Bui Chi Buu, 2014. Evaluation of rice landraces in Vietnam using SSR markers and morphological characters. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 46(1) p1-20.

13. Nguyễn Thị Lang, 2009. Ứng dụng chỉ thị phân tử PCR trong chọn dòng thuần cây xoài cát sông Hậu. Báo cáo tổng kết đề tài cấp TP. Cần Thơ.

14. IPGRI, 2006. Descriptors for mango (*Mangifera indica* L). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

15. Roy, B. and S. S. Visweswariya, 1951. *Cytogenetics of Mango and Banana*.

16. Rohlf, F. J., 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 Exeter Software, Setauket, New York, USA.

17. Sagar S. Pandit, Sirsha Mitra, Ashok P. Giri, Keshav H. Pujari, Bhimarao P. Patil, Narayan D. Jambhale and Vidya S. Gupta., 2007. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter

simple sequence repeat markers. CURRENT SCIENCE, VOL. 93, NO. 8, 25 OCTOBER 2007. Sagar S. Pandit, Sirsha Mitra, Ashok P. Giri, Keshav H. Pujari, Bhimarao P. Patil, Narayan D. Jambhale and Vidya S. Gupta. 2014. Genetic diversity analysis of mango cultivars using inter simple sequence repeat markers. <https://www.researchgate.net/publication/228694822>.

18. UNCTAD. Mango, 2016. An Infocomm commodity record. United Nations; New York, NY, United States: Geneva, Switzerland. 2016. Ward 21. [Google scholar]. Weir BS. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Publishers, Sunderland, MA, USA; 1996. Nguồn <https://www.ibm.com/support/pages/downloading-ibm-spss-statistics-20>.

GENETIC DIVERSITY STUDIES MANGO (*Mangifera indica* L.) BY SIMPLE SEQUENCE REPEAT MARKERS (SSR)

Nguyen Thi Lang¹, Nguyen Thi Khanh Tran¹,
Bui Chi Cong¹, Bui Chi Hieu¹, Bui Chi Buu¹

¹ High Agricultural Technology Research Institute for Mekong delta

Summary

SSR markers research for have been used to genetic distinctiveness among 30 mango varieties. Out of the 66 primers for SSR 31 primers reproduce a total 1,178 bands of which 130 were polymorphic. The average number of fragment amplified by SSR marker across the mango have been 130-400 bp. SSR markers across that from 90-100% polymorphism. Information contents: PIC (0.17 to 0.85), genetic diversity H (= 0.351) and allele/locus - A_{FP} (10.91-11.35 Shannon I (5,312). Band analysed by UPMGA (Unweighted pair group method with arithmetic Mean) showed four major clusters and close relatedness among 30 varieties. This is maybe significant for designing breeding program towards. Some markers good for efficient breeding such as MiIHR_j929; MiKVR_m056, Lang Xoai F4-R4 and LangXoaiF2-R2. The analysis of the population structure of the individuals also showed four subpopulations, which supported the generated dendrogram. The findings of this study facilitate improved conservation management of the germplasm and help to find strategies for future breeding activities.

Keywords: Multi-image analysis, SSR markers, mango varieties, primer, genetic parameters.

Người phản biện: GS.TS. Ngô Xuân Bình

Ngày nhận bài: 31/7/2020

Ngày thông qua phản biện: 31/8/2020

Ngày duyệt đăng: 7/9/2020