

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ CẤU TRÚC QUẦN THỂ CHANH LEO (*Passiflora edulis* Sims.) NHẬP NỘI BẰNG CHỈ THỊ SRAP VÀ ISSR

Trần Đức Trung^{1*}, Nguyễn Văn Việt², Bùi Quang Đăng¹

¹*Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

²*Viện Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Nafoods*

*Tác giả liên hệ: ductrung83@gmail.com

Ngày nhận bài: 14.10.2021

Ngày chấp nhận đăng: 01.03.2022

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, sự đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể của 31 mẫu giống chanh leo (*Passiflora edulis* Sims.) nhập nội (bao gồm loài chanh leo dại *P. incarnata*) đã được đánh giá thông qua sử dụng chỉ thị phân tử ISSR và SRAP. Qua sàng lọc đã xác định được 10/18 chỉ thị ISSR và 8/15 chỉ thị SRAP đáp ứng tính đặc hiệu và đa hình trên bộ mẫu giống chanh leo. Kết quả phân tích hệ số dị hợp tử H (0,43), hệ số thông tin đa hình PIC (0,35) và chỉ số năng lực phân biệt D (0,8) của các chỉ thị đạt mức cao, cho thấy sự đa dạng di truyền của bộ mẫu giống chanh leo. Cây phân nhóm di truyền Neighbor-Joining kết hợp với cấu trúc quần thể STRUCTURE đã phân chia các mẫu giống chanh leo thành 5 phân nhóm chính tương quan với màu sắc quả và nguồn gốc. Phân tích AMOVA đồng thời cho thấy nền di truyền của các mẫu giống có sự giao thoa lớn và là kết quả của sự lai tạo giữa các dạng chanh leo và có thể giữa các loài thuộc chi *Passiflora*. Kết quả này cung cấp cơ sở di truyền trong xác định nguồn gen tiềm năng, phục vụ công tác lưu giữ và khai thác các mẫu giống chanh leo nhập nội ở Việt Nam.

Từ khóa: *Passiflora*, đa dạng di truyền, cấu trúc quần thể, ISSR, SRAP.

Genetic Diversity and Population Structure of Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims.) Accessions Revealed by SRAP and ISSR Markers

ABSTRACT

Identification of potential germplasms is the crucial step for selection and breeding program of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). In this study, genetic diversity and population structure of 31 exotic passion fruit accessions (including wild relative *P. incarnata* accessions) were assessed using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. By primary screening for marker specificity and polymorphism, 8/15 SRAP markers and 10/18 ISSR were selected for passion fruit genotyping. The heterozygosity index H (0.43), polymorphic information content PIC (0.35), and discriminating power D (0.8) were recorded at a high level implying the significant genetic diversity of the analyzed passion fruit accessions. The Neighbor-Joining phylogenetic tree in combination with population structure model revealed by STRUCTURE discriminated and clustered the studied accessions into five groups which showed high accordance with the fruit color and the origin of the accessions. The analysis of molecular variance (AMOVA) also indicated the high rate of intraspecific and possibility interspecific hybridization among *Passiflora* species. These results provide essential genetic background facilitating efficient conservation and utilization of exotic passion fruit accessions in Vietnam.

Keywords: *Passiflora*, genetic diversity, population structure, ISSR, SRAP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Lạc tiên *Passiflora* thuộc họ Lạc tiên *Passifloraceae* có hơn 512 loài phân bố rộng ở

các vùng khí hậu nhiệt đới, chủ yếu ở châu Mỹ Latinh (là nơi khởi phát), châu Phi và châu Á. Trong khoảng 60 loài thuộc chi Lạc tiên có quả ăn được, chanh leo *P. edulis* Sims. là một trong

số ít loài có giá trị kinh tế và là cây trồng quan trọng ở nhiều quốc gia (Cerqueira-Silva & cs., 2018). Dựa vào màu sắc hình thái quả và hương vị, chanh leo được phân biệt thành hai dạng: (i) chanh leo tím (*P. edulis f. edulis*) có dịch quả hơi sệt (0,74% tinh bột), vị chua nhẹ (pH 4,2), hương thơm dịu và (ii) chanh leo vàng (*P. edulis f. flavicarpa* Deg.) có dịch quả trong (0,06% tinh bột), vị chua (pH 2,8) và rất thơm. Chanh leo tím có tính kháng sâu bệnh kém, sinh trưởng và phát triển tối ưu trong điều kiện khí hậu cận nhiệt đới hoặc tương ứng, trong khi đó chanh leo vàng có tính kháng sâu bệnh khá, thích hợp trồng tại các khu vực khí hậu nhiệt đới (Joy, 2010). Nhờ có hàm lượng cao các khoáng chất, vitamin cũng như các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học, quả tươi và nước quả chế biến từ chanh leo là sản phẩm có giá trị về dinh dưỡng và trong y học, được thị trường ưa chuộng.

Chanh leo đã được du nhập vào Việt Nam từ khoảng 30 năm trước và hiện đã chứng minh khả năng thích ứng với điều kiện khí hậu bản địa. Trong những năm gần đây, sản xuất chanh leo dần mở rộng ở Việt Nam và đã phát triển thành ngành hàng nông sản thế mạnh và có tiềm năng thị trường lớn, đặc biệt đối với các sản phẩm chế biến. Theo báo cáo của Cục Trồng trọt - Bộ NN&PTNT tại Hội nghị “Thúc đẩy phát triển sản xuất chanh leo bền vững” tháng 7/2020, chanh leo hiện được trồng tập trung thành các vùng nguyên liệu ở Tây Nguyên, Nghệ An, Hòa Bình, Sơn La với diện tích hơn 8.100ha và có xu hướng tiếp tục mở rộng. Giống chanh leo trồng phổ biến tại Việt Nam hiện nay thuộc dạng chanh leo tím có nguồn gốc nhập nội, tuy có năng suất và chất lượng tốt nhưng tính kháng sâu bệnh hại kém. Trên thực tế, những năm gần đây dịch hại trên chanh leo, đặc biệt các bệnh do virus, đã trở thành thách thức đối với sản xuất chanh leo bền vững. Chính vì vậy, việc chọn tạo và chủ động nguồn giống chanh leo mới đáp ứng yêu cầu của sản xuất là một nhu cầu cấp thiết.

Thu thập, đánh giá tiềm năng di truyền các nguồn gen chanh leo là bước khởi đầu quan trọng nhằm tìm kiếm và sử dụng hiệu quả nguồn vật liệu cho nghiên cứu chọn, tạo giống chanh leo mới. Đánh giá tiềm năng di truyền

qua kiểu hình với các chỉ tiêu chất lượng như màu sắc hoa, màu sắc quả, đặc tính sinh trưởng và chỉ tiêu số lượng như tiềm năng năng suất, kích thước, khối lượng quả, tính kháng các điều kiện bất thuận vô sinh (nhiệt, hạn...) và hữu sinh (sâu bệnh hại) là cách tiếp cận đơn giản và được sử dụng trong mô tả và đánh giá ban đầu nguồn gen chanh leo (Joy, 2010; Castro & cs., 2012; de Melo & cs., 2016). Tuy nhiên, dữ liệu kiểu hình không phản ánh hết bản chất di truyền và có rủi ro sai số do ảnh hưởng của điều kiện môi trường. Trong khi đó đánh giá kiểu gen bằng chỉ thị phân tử dựa trên phản ứng nhân gen PCR có độ tin cậy cao hiện là cách tiếp cận phổ biến hơn. Trong số này, các chỉ thị trội (dominant marker) với đặc điểm trung tính trong tiến hóa, có tính đa hình cao, thực hiện đơn giản nhanh chóng và đặc biệt là không cần biết trước thông tin hệ gen mục tiêu là lựa chọn hàng đầu trong phân tích kiểu gen của các đối tượng thực vật.

Chỉ thị ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) là chỉ thị trội phát hiện sự đa hình kích thước đoạn DNA giữa hai vùng chứa motif microsatellite giống nhau ở hai chiều đối nghịch (Zietkiewicz & cs., 1994). Các đoạn môi ISSR, chứa các motif lặp 2 (di-), 3 (tri-), 4 (tetra-) hoặc 5 (penta-nucleotide), có chiều dài 15-35 nucleotide, cho phép nâng cao nhiệt độ gắn môi để đảm bảo tính đặc hiệu của phản ứng nhân PCR. Chỉ thị SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) được phát triển để nhận bản đặc hiệu các vùng mã hóa trong hệ gen dựa trên các đoạn trình tự vùng exon giàu GC và các vùng intron và promoter giàu AT (Li & Quiros, 2001). Giống như ISSR, các đoạn môi của chỉ thị SRAP có chiều dài 17-25 nucleotide đảm bảo tính đặc hiệu của phản ứng nhân PCR. Các chỉ thị ISSR và SRAP được áp dụng phổ biến trong các nghiên cứu di truyền ở cấp độ dưới loài liên quan đến định danh giống, phân tích đa dạng di truyền và phân loại, lập bản đồ di truyền hay xác định cấu trúc quần thể ở nhiều loài thực vật khác nhau (Al Salameen & cs., 2018; Kumar & Agrawal, 2019; Yan & cs., 2019; Yan & cs., 2019) cũng như giữa các loài thuộc chi Lạc tiên và các nguồn gen chanh leo *P. edulis* (dos Santos & cs., 2011; Cerqueira-Silva & cs., 2015; Oluoch & cs., 2018).

Bảng 1. Danh sách mẫu giống chanh leo nghiên cứu

| TT | Ký hiệu | Tên mẫu giống | Màu quả | TT | Ký hiệu | Tên mẫu giống | Màu quả |
|----|----------------|----------------------|---------|----|-----------------|----------------------|---------|
| 1 | <i>P.ed_01</i> | Clone A | Tím | 17 | <i>P.ed_17</i> | Line H15.6 | Tím |
| 2 | <i>P.ed_02</i> | Line A10 | Tím | 18 | <i>P.ed_18</i> | Line H2.96 | Vàng |
| 3 | <i>P.ed_03</i> | Line A12 | Vàng | 19 | <i>P.ed_19</i> | Line H4.86 | Tím |
| 4 | <i>P.ed_04</i> | Line A13 | Vàng | 20 | <i>P.ed_20</i> | Line H4.93 | Tím |
| 5 | <i>P.ed_05</i> | Line A2 | Tím | 21 | <i>P.ed_21</i> | Line H5.27 | Tím |
| 6 | <i>P.ed_06</i> | Line A7 | Tím | 22 | <i>P.ed_22</i> | NCY_No1 | Vàng |
| 7 | <i>P.ed_07</i> | Clone B | Tím | 23 | <i>P.ed_23</i> | NCY_No2 | Đỏ hồng |
| 8 | <i>P.ed_08</i> | Colombia | Tím | 24 | <i>P.ed_24</i> | Anonymous | Vàng |
| 9 | <i>P.ed_09</i> | Đài Nông 1 | Tím | 25 | <i>P.ed_25</i> | Taiwan | Vàng |
| 10 | <i>P.ed_10</i> | Đài Nông 2 | Tím | 26 | <i>P.ed_26</i> | Puli 3 | Tím |
| 11 | <i>P.ed_11</i> | Ecuador | Vàng | 27 | <i>P.ed_27</i> | Sky star | Đỏ hồng |
| 12 | <i>P.ed_12</i> | <i>Edulis_slim</i> | Tím | 28 | <i>P.ed_28</i> | TN | Vàng |
| 13 | <i>P.ed_13</i> | Germany | Vàng | 29 | <i>P.ed_29</i> | Yellow passion fruit | Vàng |
| 14 | <i>P.ed_14</i> | Giant Yellow | Vàng | 30 | <i>P.in_01*</i> | <i>Incarnata_1</i> | Vàng |
| 15 | <i>P.ed_15</i> | Golden passion fruit | Vàng | 31 | <i>P.in_02*</i> | <i>Incarnata_2</i> | Vàng |
| 16 | <i>P.ed_16</i> | Line H14.6 | Tím | | | | |

Ghi chú: *: *P.in_01* và *P.in_02* là mẫu giống chanh leo dại thuộc loài *P. incarnata*.

Trong nghiên cứu này sự đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể các mẫu giống chanh leo nhập nội đã được đánh giá, phân tích nhằm tạo nền tảng thông tin di truyền nguồn gen hữu ích cho công tác chọn tạo giống chanh leo tại Việt Nam. Theo thông tin nhóm tác giả có được, đây là một trong những kết quả đầu tiên về ứng dụng chỉ thị phân tử ISSR và SRAP trong đánh giá đa dạng di truyền chanh leo tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá non được thu thập từ 29 mẫu giống chanh leo *P. edulis* và 2 mẫu giống chanh leo dại *P. incarnata* được lưu giữ tại vườn bảo tồn của Viện Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Nafoods. Ký hiệu, tên mẫu giống và thông tin màu sắc quả thể hiện ở bảng 1.

Bộ chỉ thị được sử dụng cho nghiên cứu này bao gồm 18 chỉ thị ISSR (dos Santos & cs., 2011) và 15 chỉ thị SRAP (Li & Quiros, 2001). Sau khi sàng lọc tính đặc hiệu và đa hình, các chỉ thị đạt yêu cầu sẽ được lựa chọn để đánh giá kiểu gen bộ mẫu giống chanh leo (Bảng 2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA và nhân gen PCR: Các mẫu lá được làm sạch và nghiền trong niro lỏng bằng máy nghiền lác TissueLyser II (Qiagen) trước khi sử dụng để tách chiết DNA bằng DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) theo quy trình khuyến cáo của nhà cung cấp. Chất lượng và nồng độ DNA tổng số được đánh giá thông qua điện di trên gel Agarose 0,5%/1X TAE và đo độ hấp thụ quang bằng máy NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Phản ứng nhân gen PCR sử dụng kit 1× GoTaq Green Master Mix (Promega) được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà cung cấp với 10µm primer mỗi loại, 30ng DNA tổng số trong tổng thể tích 10µl. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy chu trình nhiệt GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Chu trình nhiệt cho các chỉ thị ISSR bao gồm 1 chu kỳ biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ gồm các bước biến tính ở 94°C trong 1 phút - bắt cặp primer ở nhiệt độ thích hợp (Bảng 2) trong 1 phút - tổng hợp chuỗi ở 72°C trong 1,5 phút, và 1 chu kỳ tổng hợp kết thúc ở 72°C trong 5 phút. Đối với các chỉ thị SRAP, chu trình nhiệt bao gồm 1 chu kỳ biến tính ban đầu

ở 94°C trong 5 phút, 5 chu kỳ tiền tổng hợp gồm các bước biến tính ở 94°C trong 1 phút - bắt cặp primer ở 35°C trong 1 phút - tổng hợp chuỗi ở 72°C trong 1 phút, 30 chu kỳ tổng hợp gồm các bước biến tính ở 94°C trong 1 phút - bắt cặp primer ở 50°C trong 1 phút - tổng hợp chuỗi ở 72°C trong 1 phút, và 1 chu kỳ kết thúc ở 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm của phản ứng nhân gen PCR được phân giải trên gel Agarose 3%/1X TAE và kết quả điện di được ghi nhận bằng máy soi gel EASY Doc plus (Herolab). Các alen tương ứng với băng điện di được ghi nhận tự động bằng phần mềm Totallab TL120, trong đó tại một locus nhất định, mẫu giống có alen xuất hiện được ghi nhận là “1” và không có alen xuất hiện được ghi nhận là “0”.

Phân tích số liệu: Số liệu kiểu gen ISSR và SRAP được kết hợp và sử dụng để phân tích các chỉ số di truyền bằng phần mềm PowerMarker (Liu & Muse, 2005): dị hợp tử (*H*), hàm lượng thông tin đa hình (*PIC*) và năng lực phân biệt (*D*). Ma trận khoảng cách di truyền giữa các cặp mẫu giống chanh leo được tính theo công thức Jaccard và sử dụng cho phân tích thành phần chính (PCA) và phân nhóm di truyền Neighbor-Joining bằng phần mềm DARwin6 (Perrier & Jacquemoud-Coller, 2006).

Phân tích xác định cấu trúc quần thể của bộ mẫu giống chanh leo được thực hiện trên phần mềm STRUCTURE Version 2.3.4 (Pritchard & cs., 2000) với các thông số: số lượng quần thể dự đoán trước dựa trên các dạng chanh leo (dạng quả tím, quả vàng và dạng lai giữa quả tím và quả vàng) là 3, số lượng quần thể tối ưu *K* được kiểm nghiệm từ 1-9 bằng mô hình hỗn hợp với 100.000 lần lặp burn-in và 50.000 lần lặp MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Giá trị *K* tối ưu theo phương pháp của Evano và mô hình cấu trúc quần thể được xác định bằng công cụ StructureSelector (Li & Liu, 2018). Phân tích AMOVA dựa trên giá trị PhiPT (hoán vị 999 lần) được thực hiện bằng công cụ GenAlEx 6.51b2 (Peakall & Smouse, 2012) nhằm xác định phương sai di truyền ở hai cấp độ (i) giữa các quần thể và (ii) trong các quần thể được phân nhóm dựa trên giá trị *K* tối ưu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá kiểu gen ISSR và SRAP của bộ mẫu giống chanh leo nhập nội

Tính đặc hiệu và tính đa hình của tổng số 18 chỉ thị ISSR và 15 chỉ thị SRAP đã được sàng lọc thông qua đánh giá kiểu gen của các mẫu giống chanh leo *P.ed_12* (dạng quả tím) và *P.ed_14* (dạng quả vàng). Qua đó đã lựa chọn được 10/18 chỉ thị ISSR và 8/15 chỉ thị SRAP đáp ứng yêu cầu để đánh giá kiểu gen toàn bộ 31 mẫu giống chanh leo. Đối với các chỉ thị ISSR, số lượng alen thu nhận được từ 9 alen (TriAAC_3RC) đến 21 alen (TriAGC_3RC) với kích thước alen dao động từ 163bp đến 1.950bp. Trong số các chỉ thị SRAP, số lượng alen thu nhận được từ 7 alen (ME5-EM10) đến 20 alen (ME1-EM7) với kích thước alen dao động từ 101bp đến 1.369bp. Số alen trung bình của 18 chỉ thị ISSR và SRAP là 14,778 alen/chỉ thị (Hình 1 và Bảng 2).

Các chỉ số di truyền của 18 chỉ thị trên bộ 31 mẫu giống chanh leo được trình bày ở Bảng 2. Chỉ số dị hợp tử *H* trung bình đạt 0,43 tương ứng với 44,0% mẫu giống chanh leo dị hợp tử tại các locus được đánh giá. Hệ số thông tin đa hình *PIC* và chỉ số năng lực phân biệt *D* đặc trưng cho các chỉ thị cũng được xác định. Theo đó giá trị *PIC* cao nhất ghi nhận của chỉ thị ME5-EM9 (0,38), thấp nhất của chỉ thị TriAAC_3RC (0,32) và giá trị trung bình của 18 chỉ thị là 0,35. Tương tự, các chỉ thị TriCAA_3RC và DiGA_3C có khả năng phân biệt các mẫu giống cao nhất với giá trị *D* đạt 0,93, trong khi đó chỉ thị DiCA_3YG có khả năng phân biệt thấp nhất với giá trị *D* đạt 0,28. Giá trị *D* trung bình của 18 chỉ thị đạt 0,8 (Bảng 2).

3.2. Quan hệ di truyền của các mẫu giống chanh leo

Dựa trên kiểu gen ISSR và SRAP của bộ 31 mẫu giống chanh leo, mức độ khác biệt di truyền của các mẫu giống đã được tính toán dựa trên công thức Jaccard bằng phần mềm DARwin 6. Kết quả cho thấy, giá trị mức độ khác biệt di truyền trung bình của 465 cặp

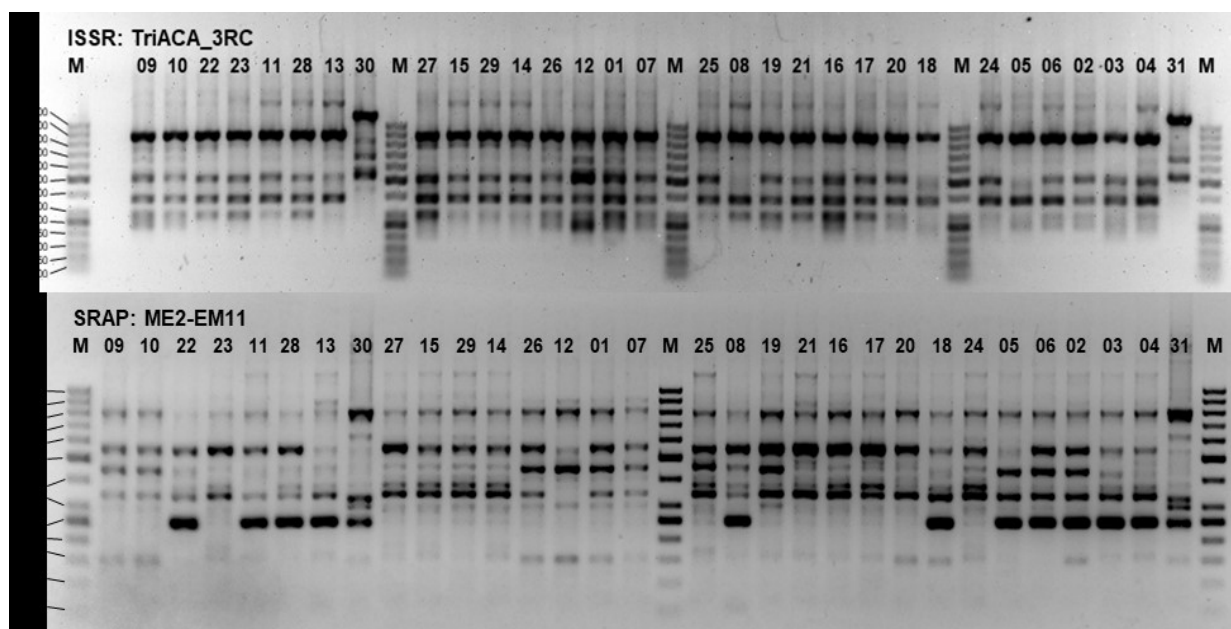
mẫu giống là 0,523, dao động từ 0,163 (*P.ed_14* và *P.ed_15*) đến 0,921 (*P.ed_17* và *P.in_02*). Phần lớn các cặp mẫu giống có mức độ khác biệt di truyền trong khoảng 0,5~0,7 (Hình 2A). Phân tích thành phần chính (PCA) dựa trên kết quả kiểu gen ISSR và SRAP cho thấy, 5 thành phần chính đầu tiên giải thích 67,68% phương sai kiểu gen giữa các mẫu giống chanh leo. Biểu đồ tham chiếu hai nhân tố dựa trên hai thành phần chính PC2 và PC4 kết hợp với đặc điểm màu sắc quả phân chia các 31 mẫu giống chanh leo thành 5 nhóm (Hình 2B). Trong đó nhóm I bao gồm 2 mẫu giống thuộc loài chanh leo dại *P. incarnata* và nhóm II gồm 6 mẫu giống chanh leo tím được phân tách hoàn toàn. Các mẫu giống chanh leo còn lại (nhóm III, IV và V) bao gồm cả các mẫu giống chanh leo quả tím, đỏ hồng và vàng nhóm cùng nhau trên biểu đồ, cho thấy mức độ tương quan di truyền lớn hơn so với các mẫu giống thuộc nhóm I và II.

Cây phân nhóm Neighbor-Joining dựa trên ma trận khác biệt di truyền Jaccard phân chia 31 mẫu giống chanh leo thành 5 phân nhóm (Hình 3A). Tương đồng với kết quả phân tích

thành phần chính PCA, phân nhóm I bao gồm 2 giống thuộc loài *P. incarnata* tách biệt hoàn toàn so với các mẫu giống còn lại của chanh leo *P. edulis*. Phân nhóm II bao gồm 6 mẫu giống chanh leo quả tím, phân nhóm III bao gồm hỗn hợp 15 mẫu giống chanh leo quả tím và vàng là các dòng tuyển chọn từ các chương trình lai tạo. Phân nhóm IV (4 mẫu giống) và phân nhóm V (4 mẫu giống) là các mẫu giống chanh leo quả vàng và đỏ hồng.

3.3. Cấu trúc quần thể của bộ mẫu giống chanh leo

Để làm rõ cấu trúc quần thể trong tập đoàn mẫu giống chanh leo nhập nội, phân tích phân nhóm dựa trên mô hình Bayesian đã được tiến hành dựa trên kết quả đánh giá kiểu gen ISSR và SRAP. Thông qua kiểm định số quần thể thông qua chỉ số delta K (ΔK) bằng công thức của Evanno (Li & Liu, 2018), giá trị K ứng với số quần thể tối ưu trong bộ mẫu giống chanh leo nghiên cứu được xác định là 5 (Hình 4). Số lượng quần thể dựa trên mô hình phù hợp với kết quả phân nhóm di truyền Neighbor-Joining (Hình 2).



Ghi chú: M: 1kb DNA ladder.

Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm nhân gen 31 mẫu giống chanh leo bằng chỉ thị ISSR TriACA_3RC và chỉ thị SRAP ME2-EM11

Bảng 2. Thông tin về các chỉ thị ISSR và SRAP được lựa chọn và kết quả đánh giá kiểu gen của 31 mẫu giống chanh leo

| TT | Tên chỉ thị | Trình tự (5'-3') | T _m (°C) | Số alen | Kích thước alen (bp) | | H | PIC | D |
|------------|-------------|-----------------------|---------------------|---------|----------------------|---------|------|------|------|
| | | | | | Min | Max | | | |
| ISSR1 | TriAAG_3RC | (AAG) ₅ RC | 48 | 16 | 163 | 1309 | 0,44 | 0,33 | 0,86 |
| ISSR2 | TriACA_3RC | (ACA) ₅ RC | 51 | 10 | 254 | 1268 | 0,46 | 0,33 | 0,87 |
| ISSR3 | TriCAA_3RC | (CAA) ₅ RC | 53 | 17 | 275 | 1597 | 0,46 | 0,36 | 0,93 |
| ISSR4 | TriAAC_3RC | (AAC) ₅ RC | 45 | 9 | 579 | 1742 | 0,38 | 0,32 | 0,84 |
| ISSR5 | TriAGC_3RC | (AGC) ₅ RC | 55 | 21 | 213 | 1950 | 0,48 | 0,33 | 0,86 |
| ISSR6 | DiCA_3YG | (CA) ₈ YG | 53 | 17 | 478 | 1322 | 0,44 | 0,37 | 0,28 |
| ISSR7 | DiGT_3YG | (GT) ₈ YG | 56 | 17 | 565 | 1581 | 0,48 | 0,36 | 0,92 |
| ISSR8 | DiGA_3C | (GA) ₈ C | 51 | 19 | 213 | 1501 | 0,39 | 0,36 | 0,93 |
| ISSR9 | DiGA_3T | (GA) ₈ T | 46 | 15 | 250 | 1344 | 0,32 | 0,36 | 0,91 |
| ISSR10 | DiCA_3RG | (CA) ₈ RG | 50 | 15 | 390 | 1594 | 0,40 | 0,34 | 0,89 |
| SRAP1 | ME1 | TGAGTCCAAACCGGATA | * | 20 | 159 | 1369 | 0,43 | 0,36 | 0,90 |
| | EM7 | GACTGCGTACGAATTCAA | | | | | | | |
| SRAP2 | ME1 | TGAGTCCAAACCGGATA | * | 14 | 137 | 1172 | 0,43 | 0,36 | 0,90 |
| | EM12 | GACTGCGTACGAATTATG | | | | | | | |
| SRAP3 | ME2 | TGAGTCCAAACCGGAGA | * | 11 | 139 | 865 | 0,49 | 0,33 | 0,79 |
| | EM10 | GACTGCGTACGAATTCAG | | | | | | | |
| SRAP4 | ME2 | TGAGTCCAAACCGGAGA | * | 16 | 150 | 1166 | 0,41 | 0,37 | 0,91 |
| | EM11 | GACTGCGTACGAATTCCA | | | | | | | |
| SRAP5 | ME2 | TGAGTCCAAACCGGAGA | * | 13 | 117 | 1012 | 0,49 | 0,36 | 0,29 |
| | EM12 | GACTGCGTACGAATTATG | | | | | | | |
| SRAP6 | ME5 | TGAGTCCAAACCGGAAG | * | 14 | 101 | 1331 | 0,40 | 0,38 | 0,92 |
| | EM9 | GACTGCGTACGAATTCGA | | | | | | | |
| SRAP7 | ME5 | TGAGTCCAAACCGGAAG | * | 7 | 168 | 794 | 0,44 | 0,36 | 0,54 |
| | EM10 | GACTGCGTACGAATTCAG | | | | | | | |
| SRAP8 | ME5 | TGAGTCCAAACCGGAAG | * | 15 | 234 | 1330 | 0,47 | 0,34 | 0,84 |
| | EM11 | GACTGCGTACGAATTCCA | | | | | | | |
| Trung bình | | | | 14,77 | 254,72 | 1347,05 | 0,43 | 0,35 | 0,80 |

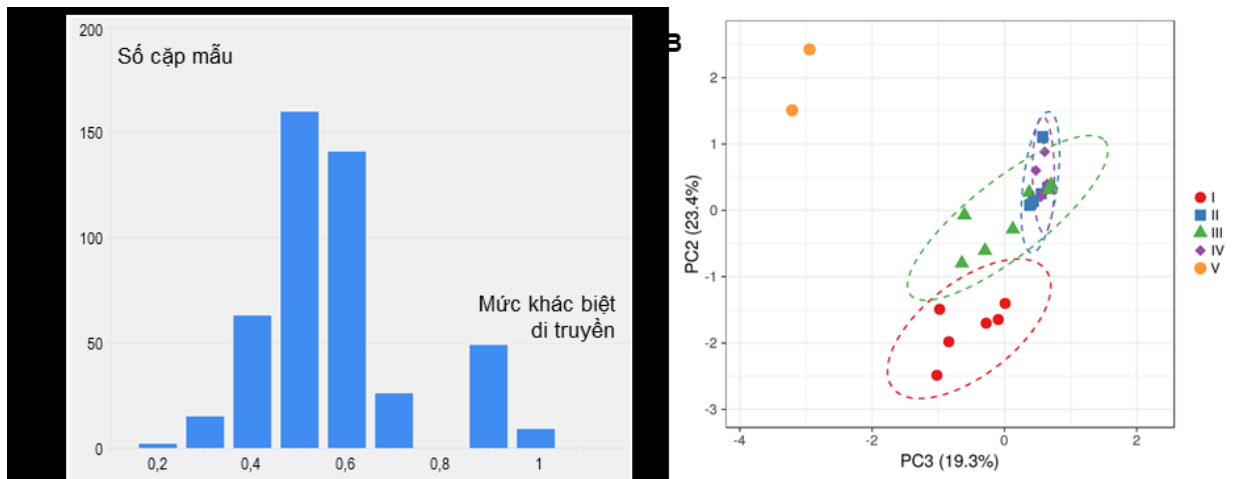
Ghi chú: H (Heterozygosity index): Hệ số dị hợp tử; PIC (Polymorphic Information Content): Hệ số thông tin đa hình; D (Discriminating power): Năng lực phân biệt hai mẫu giống của chỉ thị; *: Nhiệt độ gắn môi theo chu trình nhiệt chung cho chỉ thị SRAP (chi tiết phần Phương pháp nghiên cứu).

Căn cứ mô hình cấu trúc quần thể ứng với giá trị $K = 5$ (Hình 3B), quần thể tương ứng phân nhóm I là hai mẫu giống thuộc loài *P. incarnata*. Quần thể tương ứng với phân nhóm II là các mẫu giống quả tím có nền di truyền nguyên vẹn của dạng chanh leo tím *P. edulis f. edulis*. Tương tự, các quần thể tương ứng với hai phân nhóm IV và V là các

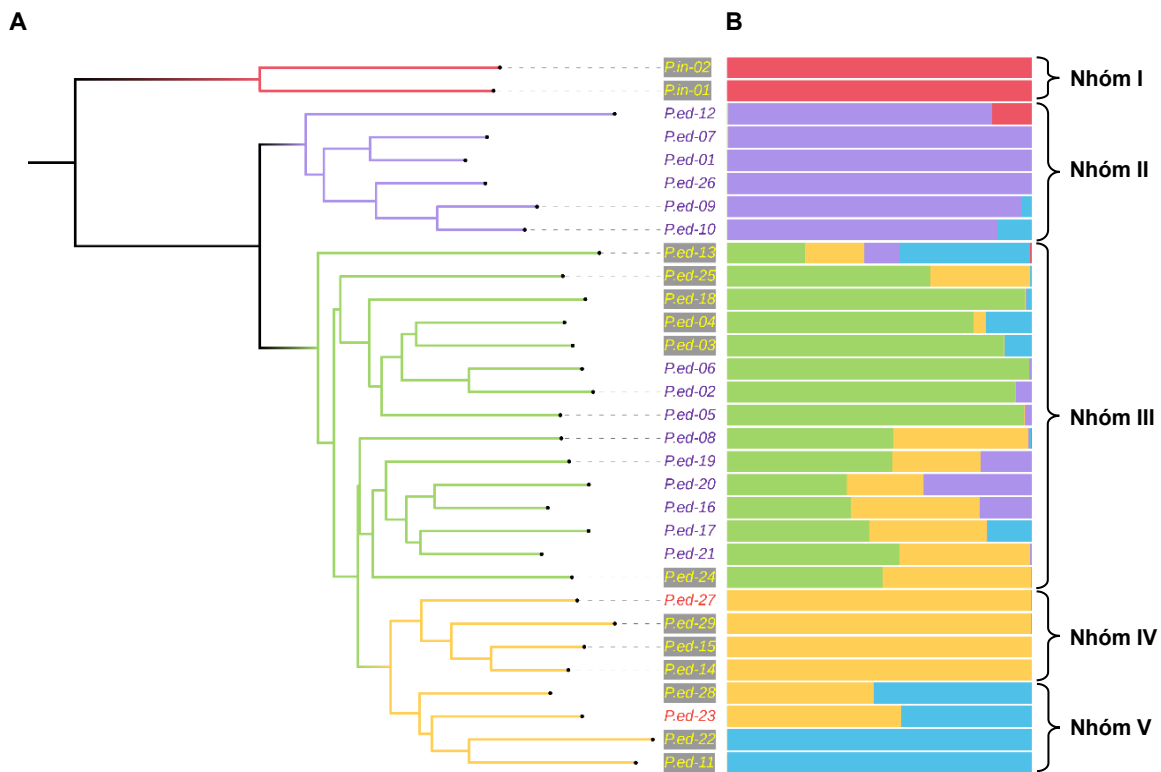
mẫu giống quả vàng hoặc đỏ hồng. Mặc dù được xác định thuộc dạng chanh leo vàng *P. edulis f. flavicarpa* Deg, hai quần thể này sở hữu nền di truyền hoàn toàn khác nhau, ít nhất trong phạm vi bộ mẫu giống chanh leo nghiên cứu. Trong khi đó, quần thể tương ứng với phân nhóm III bao gồm các mẫu giống quả tím và vàng với nền di truyền hỗn hợp và được

xác định là các dạng lai giữa hai dạng chanh leo quả tím (phân nhóm II) và quả vàng (phân nhóm IV và V). Phân tích phương sai di truyền AMOVA dựa trên kết quả phân nhóm và xác định quần thể cho thấy 26% biến dị di truyền xảy ra giữa các quần thể, trong khi đó 74% biến dị trong các quần thể (Bảng 3). Giá trị

PhiPT giữa phân nhóm I và phân nhóm II là nhỏ nhất, giữa phân nhóm II và phân nhóm V là lớn nhất ($P < 0,001$). Phân nhóm V có sự khác biệt lớn nhất so với các phân nhóm còn lại. Giá trị tương đồng di truyền Nei giữa các quần thể cũng phản ánh quan hệ di truyền tương tự giữa các cặp phân nhóm (Bảng 4).

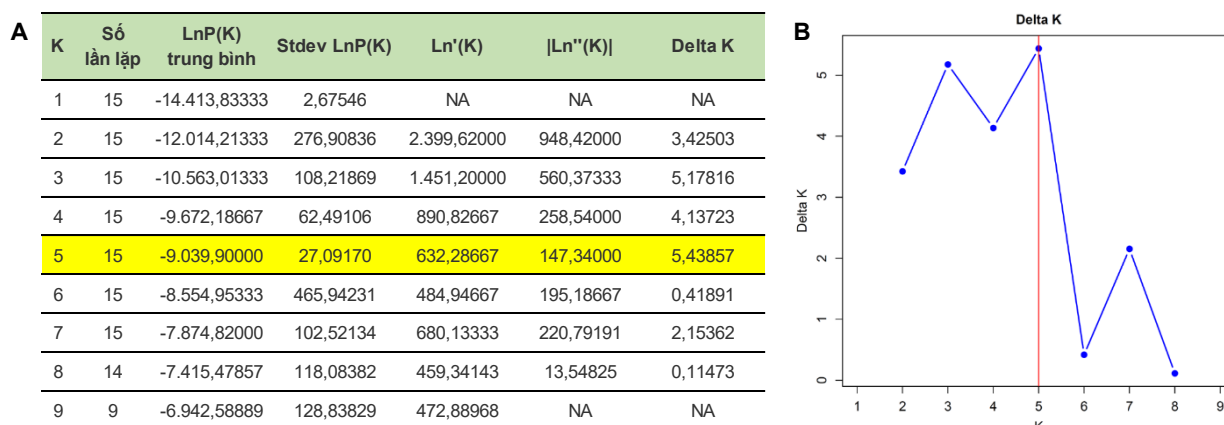


Hình 2. Tần suất các mức độ khác biệt di truyền giữa các cặp mẫu giống chanh leo (A) và kết quả phân nhóm thành phần chính PCA của 31 mẫu giống (B)



Hình 3. Phân nhóm di truyền (A) và cấu trúc quần thể (B) xác định dựa trên kiểu gen ISSR-SRAP của bộ mẫu giống chanh leo

Đánh giá đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể chanh leo (*Passiflora edulis* Sim.) nhập nội bằng chỉ thị SRAP và ISSR



Ghi chú: Giá trị ΔK lớn nhất tương ứng với số quần thể tối ưu (A) được thể hiện trên biểu đồ (B).

Hình 4. Kết quả xác định số quần thể tối ưu K trong bộ mẫu giống chanh leo nghiên cứu bằng công cụ StructureSelector

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai di truyền AMOVA của bộ mẫu giống chanh leo trong 5 quần thể

| Nguồn | df | Tổng bình phương | Mean square | Phương sai | Tỉ lệ phương sai (%) | P |
|--------------------|----|------------------|-------------|------------|----------------------|--------|
| Giữa các quần thể | 4 | 283,338 | 70,835 | 8,689 | 26% | <0,001 |
| Trong các quần thể | 26 | 632,017 | 24,308 | 24,308 | 74% | <0,001 |
| Tổng | 30 | 915,355 | | 32,997 | 100% | |

Bảng 4. Giá trị PhiPT (bên dưới đường chéo) và tương đồng di truyền Nei (phía trên đường chéo) giữa 5 quần thể

| | Nhóm I | Nhóm II | Nhóm III | Nhóm IV | Nhóm V |
|----------|--------|---------|----------|---------|--------|
| Nhóm I | | 0,904 | 0,872 | 0,818 | 0,838 |
| Nhóm II | 0,000 | | 0,917 | 0,894 | 0,916 |
| Nhóm III | 0,066 | 0,063 | | 0,927 | 0,935 |
| Nhóm IV | 0,079 | 0,040 | 0,000 | | 0,945 |
| Nhóm V | 0,117 | 0,219 | 0,216 | 0,126 | |

4. THẢO LUẬN

Sự đa dạng di truyền của một loài thực vật là chỉ dấu phản ánh mức độ phân bố, khả năng thích ứng với điều kiện môi trường và tiềm năng tiến hóa của loài đó trong tự nhiên. Chính vì vậy, đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen thực vật, nhất là dựa trên số liệu kiểu gen có vai trò ý nghĩa trong hỗ trợ hiệu quả công tác bảo tồn nguồn gen. Bên cạnh đó, khi tiềm năng di truyền của nguồn gen được xác định chính xác và khai

thác hợp lý, đây còn là bước chuẩn bị quan trọng tạo tiền đề thành công cho nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng mới. Trong thời gian gần đây, chanh leo đã trở thành mặt hàng nông sản tiềm năng và là đối tượng cây trồng nhận được sự quan tâm của giới khoa học, nhất là về nghiên cứu cải tạo giống, trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể của bộ 31 mẫu giống chanh leo nhập nội tại Việt Nam lần đầu tiên đã được đánh giá bằng chỉ thị phân tử ISSR và SRAP.

Với đặc điểm không cần biết trước thông tin trình tự của đối tượng nghiên cứu, tầm soát cùng lúc nhiều locus trải khắp hệ gen và yêu cầu điều kiện thí nghiệm đơn giản, các chỉ thị trội như RADP, AFLP, ISSR, RAMP, SRAP... đến nay vẫn là lựa chọn phổ biến cho các nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền thực vật, đặc biệt ở cấp độ dưới loài. Tuy nhiên, mức độ tin cậy liên quan đến tính đặc hiệu và khả năng tái lập do đặc điểm “ngẫu nhiên” là điểm cần phải lưu ý đối khi ứng dụng sử dụng loại chỉ thị này trong các nghiên cứu (Poczai & cs., 2013). Để đảm bảo độ tin cậy của kết quả đánh giá kiểu gen các mẫu giống chanh leo, nghiên cứu đã tham khảo và lựa chọn bộ chỉ thị ISSR và SRAP đã được áp dụng trong một số đánh giá đa dạng di truyền chanh leo dạng vàng (dos Santos & cs., 2011; Li & Quiros, 2001). Nhờ vậy, số lượng chỉ thị đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu, tính đa hình và được lựa chọn để đánh giá kiểu gen cho bộ mẫu giống chanh leo chiếm tỷ lệ cao, 66,67% số chỉ thị ISSR và 53,33% số chỉ thị SRAP ban đầu. Dựa trên số liệu kiểu gen của các chỉ thị này, giá trị trung bình của hệ số dị hợp tử H (0,43) trên bộ 31 mẫu giống chanh leo cao hơn so với kết quả nghiên cứu tương tự ở 22 mẫu giống chanh leo ở Kenya ($H = 0,23$) (Oluoch & cs., 2018) và 45 mẫu giống chanh leo (phần lớn là chanh leo vàng) ở Brazil ($H = 0,32$) (dos Santos & cs., 2011). Kết quả này phù hợp với bản chất giao phấn của chanh leo, không chỉ cho thấy tính đa dạng di truyền cao trong bộ mẫu giống chanh leo nhập nội ở Việt Nam mà còn là nguyên nhân dẫn đến sự chênh lệch so với các nghiên cứu trước, tương tự như kết quả đánh giá đa dạng di truyền quần thể cà phê ở Trung Quốc (Yan & cs., 2019). Tương tự, giá trị trung bình của hệ số thông tin đa hình PIC (0,35) và chỉ số năng lực phân biệt D (0,80) của các chỉ thị ISSR và SRAP sử dụng trong nghiên cứu này cũng cao hơn so với các nghiên cứu ở chanh leo trước đây và đồng thời minh chứng cho hiệu lực của các chỉ thị này trong việc phát hiện tính đa hình của bộ mẫu giống nghiên cứu.

Phân tích phân nhóm di truyền dựa trên số liệu kiểu gen là cách tiếp cận phổ biến trong nghiên cứu quan hệ di truyền các nguồn gen

thực vật. Dựa trên số liệu kiểu gen ISSR và SRAP, khoảng cách di truyền giữa các mẫu giống chanh leo được xác định là khá gần với trên 50% cặp mẫu giống có khoảng cách di truyền trong khoảng 0,4-0,6 (Hình 2A). Điều này cho thấy tiềm năng lai chéo ở cấp độ dưới loài (intraspecific) giữa các mẫu giống và quần thể chanh leo. Cũng dựa trên số liệu kiểu gen, cây phân nhóm di truyền Neighbor-Joining đã phân biệt rõ 31 mẫu giống chanh leo và chia thành 5 phân nhóm chính phù hợp với hình thái màu sắc quả của hai dạng chanh leo quả tím, vàng và dạng lai tạo giữa chúng (Hình 3A). Ngoài ra cây phân nhóm cũng phản ánh đúng quan hệ di truyền gần của một số mẫu giống chanh leo dạng tím (các cặp mẫu giống *P.ed_01*, *P.ed_07* và *P.ed_09*, *P.ed_10* thuộc nhóm II), dạng vàng (các phân nhóm IV, V) và dạng lai (nhóm mẫu giống *P.ed_02*, *P.ed_03*, *P.ed_04*, *P.ed_05*, *P.ed_06* và nhóm mẫu giống *P.ed_16*, *P.ed_17*, *P.ed_19*, *P.ed_20*, *P.ed_21* thuộc phân nhóm III). Kết quả này đã bổ sung thêm minh chứng cho hiệu quả của các chỉ thị trội ISSR và SRAP trong đánh giá đa dạng di truyền chanh leo (dos Santos & cs., 2011; Oluoch & cs., 2018). Cấu trúc quần thể là phương thức mô hình hóa nền di truyền của các mẫu giống trong sự tương quan với số lượng quần thể tối ưu được xác định trong bộ mẫu giống nghiên cứu. Kết hợp với phân nhóm di truyền, phân tích cấu trúc quần thể có thể xác định lịch sử tiến hóa, lai tạo và chọn lọc tự nhiên của các quần thể nghiên cứu. Chính vì vậy, cùng với phân tích đa dạng di truyền, xác định cấu trúc quần thể là bước nghiên cứu tiền đề cho việc lưu giữ và khai thác hiệu quả nguồn gen thực vật cho công tác chọn, tạo giống (Laidò & cs., 2013). Cấu trúc quần thể tối ưu dựa trên kiểu gen ISSR-SRAP cho thấy hai mô hình nền di truyền khác nhau của bộ 31 mẫu giống chanh leo. Nền di truyền nguyên vẹn có tính bảo toàn của các mẫu giống chanh leo tím (nhóm II), chanh leo vàng (nhóm IV, V) và chanh leo dại (nhóm I) và nền di truyền hỗn tạp của nhóm chanh leo lai (nhóm III). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu cấu trúc quần thể chanh leo dại *P. contracta* của Turchetto & cs. (2018). Đặc biệt, một tỉ lệ lớn nền di truyền của

nhóm chanh leo lai không được đóng góp bởi bất kỳ mẫu giống chanh leo tím hoặc vàng nào trong bộ mẫu giống nghiên cứu (Hình 3B). Điều này cho thấy các mẫu giống chanh leo lai còn mang đặc điểm di truyền của một nhóm chanh leo hoàn toàn khác biệt, hoặc không có quan hệ di truyền với các mẫu giống chanh leo tím và vàng trong quần thể nghiên cứu, hoặc thuộc các loài chanh leo dại. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với đặc tính thụ phấn chéo và khả năng lai khác loài (interspecific) đã được mô tả ở chi *Passiflora* (Cerqueira-Silva & cs., 2018).

5. KẾT LUẬN

Ứng dụng chỉ thị phân tử ISSR và SRAP, nghiên cứu này đã đánh giá đa dạng di truyền của bộ 31 mẫu giống chanh leo nhập nội và phân thành 5 nhóm chính, với cấu trúc quần thể tương quan với nguồn gốc của các nhóm chanh leo quả tím, quả vàng và chanh leo lai. Ngoại trừ nhóm III bao gồm các mẫu giống chanh leo lai với nền di truyền hỗn hợp, các nhóm chanh leo còn lại có nền di truyền đồng nhất. Kết quả này cung cấp cơ sở di truyền cho các nghiên cứu lưu giữ và khai thác nguồn gen chanh leo phục vụ công tác chọn tạo giống mới ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài khoa học công nghệ “Nghiên cứu chọn tạo giống chanh leo phục vụ các vùng nguyên liệu trọng điểm đáp ứng nhu cầu nội tiêu và xuất khẩu” do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al Salameen F., Habibi N., Kumar V., Al Amad S., Dashti J., Talebi L. & Al Doaij B. (2018). Genetic diversity and population structure of *Haloxylon salicornicum* moq. in Kuwait by ISSR markers. Plos One. 13(11): e0207369.

Castro J.A., Neves C.G., de Jesus O.N. & de Oliveira E.J. (2012). Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. Scientia Horticulturae. 145: 17-22.

Cerqueira-Silva C.B.M., Faleiro F.G., de Jesus O.N., dos Santos E.S.L. & de Souza A.P. (2018). Passion

fruit (*Passiflora* spp.) breeding. In: Al-Khayri J. M., Jain S. M. & Johnson D. V. (Eds). Advances in plant breeding strategies: Fruits: Volume 3. Springer International Publishing. pp. 929-951.

Cerqueira-Silva C.B.M., Jesus O.N., Oliveira E.J., Santos E.S.L. & Souza A.P. (2015). Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. Euphytica. 202(3): 345-359.

de Melo C.A.F., Souza M.M., Viana A.P., Santos E.A., de Oliveira Souza V. & Corrêa R.X. (2016). Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. Scientia Horticulturae. 212: 91-103.

dos Santos L.F., de Oliveira E.J., dos Santos Silva A., de Carvalho F.M., Costa J.L. & Pádua J.G. (2011). ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. Biochemical Genetics. 49(7): 540-554.

Joy P.P. (2010). Status and prospects of passion fruit cultivation in Kerala. Kerala Agricultural University. 12.

Kumar J. & Agrawal V. (2019). Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, *Trichosanthes dioica* employing ISSR, SCoT and SRAP markers. Heliyon. 5(3): e01346.

Laidò G., Mangini G., Taranto F., Gadaleta A., Blanco A., Cattivelli L., Marone D., Mastrangelo A.M., Papa R. & De Vita P. (2013). Genetic diversity and population structure of tetraploid wheats (*Triticum turgidum* L.) estimated by SSR, DArT and pedigree data. Plos One. 8(6): e67280.

Li G. & Quiros C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theoretical and Applied Genetics. 103(2): 455-461.

Li Y.L. & Liu J.X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. Mol Ecol Resour. 18(1): 176-177.

Liu K. & Muse S.V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. 21(9): 2128-2129.

Oluoch P., Nyaboga E.N. & Bargul J.L. (2018). Analysis of genetic diversity of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes grown in Kenya by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. Annals of Agrarian Science. 16(4): 367-375.

- Peakall R. & Smouse P.E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Perrier X. & Jacquemoud-Coller J.P. (2006). DARwin software v.6.0.021. Retrieved from <http://darwin.cirad.fr/> on Sep 15, 2021.
- Poczai P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N., Valkonen J.P.T. & Hyvönen J. (2013). Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*. 9(1): 6.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155(2): 945-959.
- Turchetto C., Mäder G., Cazé A.L.R. & Freitas L.B. (2018). Genetic variability and population structure of *Passiflora contracta*, a bat-pollinated species from a fragmented rainforest. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 186(2): 247-258.
- Yan L., Ogutu C., Huang L., Wang X., Zhou H., Ly Y., Long Y., Dong Y. & Han Y. (2019). Genetic diversity and population structure of coffee germplasm collections in China revealed by ISSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*. 37(3): 204-213.
- Yan W., Li J., Zheng D., Friedman C. & Wang H. (2019). Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers. *PeerJ*. 7: e7173-e7173.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. & Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20(2): 176-183.