



## ĐA DẠNG DI TRUYỀN MƯỜI BỐN DÒNG CACAO NỘI TRỘI CỦA VIỆT NAM BẰNG PLANT C/D SEQUENCES

Lâm Thị Việt Hà<sup>1,3</sup>, Nguyễn Thị Pha<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Liên<sup>2</sup>, Trần Văn Bé Năm<sup>2</sup>, Hà Thanh Toàn<sup>2</sup>, Koen Dewettinck<sup>3</sup> và Kathy Messens<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup> Đại học Ghent

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/04/2015

Ngày chấp nhận: 19/08/2015

### Title:

Assessment of genetic diversity among the main fourteen cocoa varieties in Vietnam using plant c/d sequences

### Từ khóa:

Đa dạng di truyền, *Theobroma cacao* L., trình tự plant c/d

### Keywords:

Genetic clustering, *Theobroma cacao* L., plant c/d sequences

### ABSTRACT

This work focused on clarifying the genetic diversity of fourteen cocoa clones in Vietnam. Primers plant c and plant d were used to analyse the genetic relationship. All detected band were encoded into binary matrix and the dendrogram was generated using the program NTSYS-PC 2.1 The similarity matrix was subjected to cluster analysis by unweighted pair group method for arithmetic mean (UPGMA). The genetic clustering of 14 Cocoa varieties showed genetic differences ranged from 0 to 41%. At around 59% similarity, fourteen TD clones could be divided into three groups: A, B, and C. Group A had ten clones (TD1, TD2, TD3, TD5, TD6, TD7, TD8, TD9, TD11, TD12), group B had 2 clones (TD10 and TD13), and group C included two clones (TD14 and TD15). Group B with 80% homologous had a relationship closer than groups A and C. Two clones in group A correlated approximately 76.4% similarity and group C showed 73% similarity rate.

### TÓM TẮT

Đề tài xác định mối quan hệ di truyền mười bốn dòng Cacao (*Theobroma cacao* L.) nội trội được tuyển chọn và đang trồng phổ biến tại Việt Nam. Phân tích di truyền dựa trên 2 đoạn mỗi chuyên biệt cho Cacao Plant c và Plant d. Các băng thu được mã hóa bằng hệ nhị phân để phân nhóm di truyền sử dụng phần mềm NTSYS2.1 phân nhóm theo phương pháp UPGMA. Kết quả nghiên cứu nêu rõ sự khác biệt di truyền của 14 dòng Cacao dao động trong khoảng 0- 41%. Các băng xuất hiện nhiều ở vị trí từ 500 bp – 600 bp. Ở khoảng tương đồng 59% 14 dòng Cacao được chia làm 3 nhóm chính: A, B, C. Nhóm A có 10 dòng (TD1, TD2, TD3, TD5, TD6, TD7, TD8, TD9, TD11, TD12), nhóm B có 2 dòng (TD10 và TD13), nhóm C có 2 dòng (TD14 và TD15). Trong đó, hai dòng nhóm B với khoảng tương đồng là 80% có mối quan hệ gần hơn so với nhóm A và C, các dòng trong nhóm A có quan hệ tương đồng ở mức 76.4%, các dòng trong nhóm C có quan hệ tương đồng khoảng 73%.

## 1 GIỚI THIỆU

Cacao là loài cây công nghiệp có giá trị kinh tế và dinh dưỡng rất cao. Hiện nay, Việt Nam đang đẩy mạnh sản lượng hạt Cacao xuất khẩu vì chất lượng và kích cỡ hạt không thua kém với các cường quốc xuất khẩu hạt Cacao như Ghana, Nigeria, Ivory Coast, Indonesia và Brazil (Lâm *et al.*, 2015). Tại Việt Nam, cây Cacao chỉ trồng ở miền Nam và diện tích trồng Cacao cho năng suất cao nhất nước là vùng Đồng bằng sông Cửu Long và Tây Nguyên. Hiện nay, việc lai tạo giống Cacao cho năng suất cao, trái không bị sâu bệnh, phù hợp với thổ nhưỡng của các vùng khác nhau là nhu cầu cấp bách của các nhà khoa học. Cho đến nay, các nghiên cứu về cây Cacao Việt Nam chủ yếu tập trung vào tuyển chọn cây Cacao cho năng suất tốt (Nguyễn *et al.*, 2010; Trần *et al.*, 2011) hay khảo sát về hình thái và giải phẫu mô học các dòng Cacao (Lâm *et al.*, 2015). Tuy nhiên các nghiên cứu về đa dạng di truyền trên quần thể Cacao Việt Nam chưa được nghiên cứu nhiều và chưa tìm thấy các công bố.

Trình tự DNA trong chloroplast (cpDNA) đã được ứng dụng khi xem xét các mối liên hệ interspecific ở thực vật, kết quả cho thấy mức độ tiến hóa rất thấp do bị giới hạn bởi những vùng intraspecific. Trong khi đó các vùng non-coding mô tả sự đột biến với mức độ lặp lại cao nhất (Clegg, 1991). Năm 1991, Taberlet đã thiết kế đoạn môi plant c và plant d cho việc khuếch đại vùng non-coding trong chloroplast trong gen thực vật và đã ứng dụng rất thành công trong việc khuếch đại gen ở hầu hết các loài thực vật (Taberlet *et al.*, 1991). Nhiều tác giả đã thành công khi sử dụng trình tự plant c/d trong phân tích cây di truyền ở

các loài thực vật (Petit *et al.*, 1998; Lannér 1998; Chen *et al.*, 2007; Geleta *et al.*, 2010). Hai đoạn môi này đã cho kết quả sản phẩm khuếch đại tốt nhất đối với DNA được trích ly từ lá Cacao và sản phẩm được tạo thành từ Cacao (Lam *et al.*, 2015).

Mười bốn dòng Cacao nổi trội của Việt Nam TD1, TD2, TD3, TD5, TD6, TD7, TD8, TD9, TD10, TD11, TD12, TD13, TD14, TD15 được tuyển chọn cho thí nghiệm khảo sát đa dạng di truyền, trong đó có 10 dòng được Bộ Nông nghiệp & Phát triển nông thôn công nhận là dòng Cacao quốc gia (Phạm, 2009). Mười bốn dòng Cacao được khảo sát đều thuộc nhóm thứ 3 Trinitario (Phạm, 2009; Nguyễn *et al.*, 2011; Lâm *et al.*, 2015), nhóm Trinitario là dòng lai giữa 2 nhóm Criollo và Forastero (Lachenaud, 2007; Wood, 2008; Shri, 2009). Kết quả phân tích đa dạng di truyền bằng cặp môi plant c và plant d sẽ bổ sung vào ngân hàng dữ liệu của các dòng Cacao chủ lực ở Việt Nam, kết quả này áp dụng trong công tác lai tạo giống, góp phần nâng cao những ưu điểm nổi trội của các dòng chủ lực này trong tương lai.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Giống Cacao (Bảng 1): 14 giống thu thập tại 2 địa điểm Đăk Lăk, Bến Tre.

- Địa điểm 1: vườn Cacao của hộ gia đình Trần Hùng Sơn (ấp Châu Phú-huyện Châu Thành-Tỉnh Bến Tre).

- Địa điểm 2: vườn Cacao thí nghiệm của Dr. Phạm Hồng Đức Phước-Trường ĐH Nông Lâm (Trảng Bom-Đồng Nai).

**Bảng 1: Nguồn gốc 14 dòng Cacao**

Giống	Kí hiệu giống	Nguồn gốc	Xuất xứ	Địa điểm thu mẫu
TD1	BAL 209	PA35 x NA32	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD2	BAL 244	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD3	BR 25	Con lai Trinitario	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD5	KKM 22	UAWA18 x T.S.15/43.352	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD6	PCB 123	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD7	PBC 154	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD8	PBC 157	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD9	PBC 159	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD10	PBC 230	NA31 x PA15	Malaysia	Châu Thành-Bến Tre
TD11	PBC 236	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Trảng Bom-Đồng Nai
TD12	QH 1213	(PA76 x SCA 20) x (UIT1 x SCA6)	Malaysia	Trảng Bom-Đồng Nai
TD13	QH 22	UIT1 x NA33	Malaysia	Trảng Bom-Đồng Nai
TD14	QH 441	PA173 x SCA9	Malaysia	Trảng Bom-Đồng Nai
TD15	UIT1	Không rõ nguồn gốc	Malaysia	Trảng Bom-Đồng Nai

**Bảng 2: Đặc điểm trái (hình dạng và màu) của 20 dòng Cacao Việt Nam (Lâm et al., 2015)**

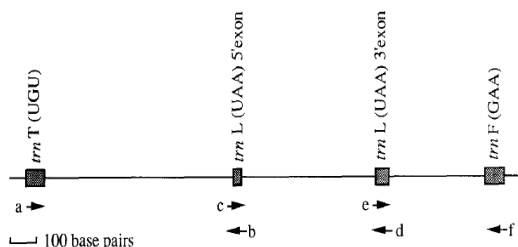
Giống	Dạng trái	Màu trái chín
TD 1	Angoleta	màu vàng
TD 2	Cundeamor	màu vàng
TD 3	Cundeamor	màu đỏ cam
TD 5	Amelonado	màu vàng
TD 6	Angoleta	màu đỏ cam
TD 7	Amelonado	màu vàng
TD 8	Cundeamor	màu vàng
TD 9	Amelonado	màu vàng
TD 10	Angoleta	màu đỏ vàng
TD 11	Amelonado	màu vàng
TD 12	Angoleta	màu vàng
TD 13	Amelonado	màu vàng
TD 14	Angoleta	màu vàng
CT 3	Amelonado	màu vàng
CT 5	Amelonado	màu vàng
CT 6	Amelonado	màu vàng
CT 7	Angoleta	màu vàng cam
CT 8	Angoleta	màu vàng
CT 9	Angoleta	màu vàng cam
CT 21	Amelonado	màu vàng

**3 PHƯƠNG PHÁP**

– **Phương pháp thu mẫu:** mẫu lá được giữ lạnh và chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ để ly trích DNA vì lá Cacao nếu lưu trữ lâu quá 24 giờ, sẽ xuất hiện nhiều đốm nâu trên bề mặt lá làm ảnh hưởng đến chất lượng DNA ly trích (Lam et al., 2015).

– **Ly trích DNA:** áp dụng phương pháp CTU-SDS (Lam et al., 2015; Trần, 2011). Đây là phương pháp được cải tiến từ phương pháp của Rogers và Bendich (1988).

– **Plant c/d:** 2 đoạn mỗi plant c (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3') và plant d (5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3') được dùng khuếch đại đoạn gen 500bp – 600bp (Hình 1) (Taberlet et al., 1991).



**Hình 1: Vị trí gắn của universal primers plant c/d, kích thước 577, 614, 389 bp (Taberlet et al., 1991)**

– **Phản ứng PCR :** hỗn hợp gồm có 10×PCR buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>), Taq polymerase (0.5U), dNTP (200 μM), mỗi (10 μM), genomic DNA trong tổng thể tích 50 μL. Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR bằng máy Gene Amp PCR System 9700, khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 95°C trong 3 phút, theo sau là 35 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: biến tính DNA ở 95°C trong 20 giây, gắn mỗi ở 54°C trong 40 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 3 giây và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 7 phút và lưu trữ ở 4°C.

– **Phân tích sản phẩm PCR:** sản phẩm PCR được điện di bằng bộ điện di Bio-RAD kèm PC, sử dụng gel polyacrylamide 30% ở hiệu điện thế 50V, 400 mA trong 990 phút ở nhiệt độ 25°C. Sản phẩm nhuộm với 1 ng/μL ethidium bromide, chụp hình gel dưới tia UV bằng máy Bio-RAD Gel Doc. Hình ảnh được phân tích bằng phần mềm Quantity One software. Thang chuẩn Lamda Hind III được dùng để ước lượng kích thước của đoạn DNA.

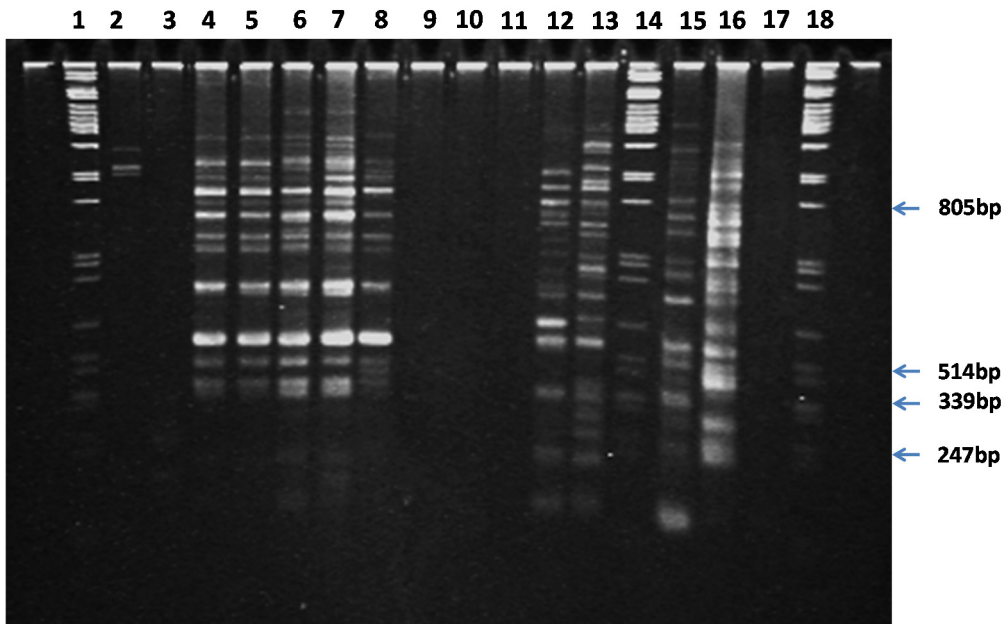
– **Phương pháp phân tích di truyền:** các băng DNA thu được sau khi điện di được mã hóa bằng hệ nhị phân để phân nhóm di truyền sử dụng phần mềm NTSYS2.1 theo phương pháp UPGMA (Rohlf, 2000).

**4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

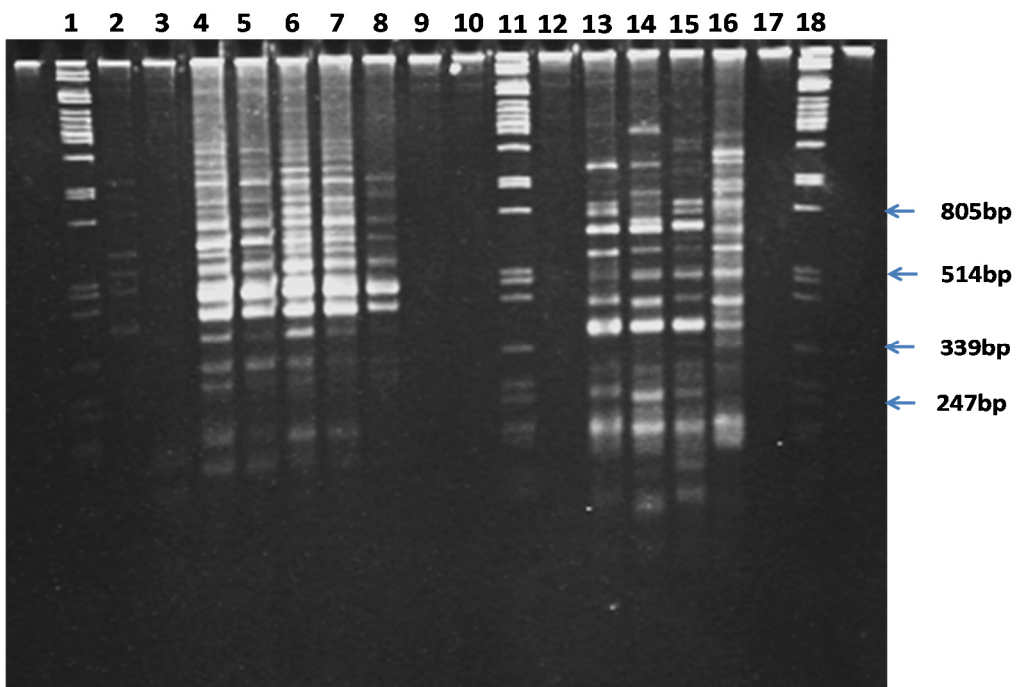
Phân nhóm di truyền dựa trên sự hiện diện của các băng DNA được khuếch đại thể hiện trên gel polyacrylamide. Gel polyacrylamide có thể phân biệt các băng có kích thước nhỏ vì vậy kết quả ghi nhận được tác cả các băng khuếch đại. Kết quả cho thấy primer plant c với 53 băng khuếch của thang chuẩn, tổng cộng có 209 băng của sản phẩm PCR (hình 2). Plant d với 40 băng khuếch của thang chuẩn, tổng cộng có 209 băng sản phẩm khuếch đại sản phẩm PCR (hình 3). Kết quả này khẳng định một lần nữa tính đa hình chuyên biệt của mỗi plant c/d (Lam et al., 2015). Kết quả phân tích đa dạng di truyền bằng cho thấy mười bốn dòng Cacao khảo sát có sự đa dạng, khác biệt di truyền dao động trong khoảng 0- 41% (hình 4). Xét ở khoảng tương đồng 59% có thể chia làm 3 nhóm chính : A, B,C. Nhóm A có 10 dòng, nhóm B có 2 dòng, nhóm C có 2 dòng. Nhóm B có 2 dòng các loài có mối quan hệ gần hơn so với nhóm A và B với khoảng tương đồng là 80%, còn 2 dòng trong nhóm C có quan hệ tương đồng xa hơn (khoảng 73%).

Nhóm A chia thành 3 phân nhóm AI, AII và AIII ở khoảng tương đồng 73%. Phân nhóm AI có 2 nhóm phụ AI<sub>1</sub> và AI<sub>2</sub>; nhóm AI<sub>1</sub> bao gồm TD1, TD9, TD6 và TD2, chúng có khoảng tương đồng từ 86%-90%. Nhóm phụ AI<sub>2</sub> gồm TD5 và TD7,

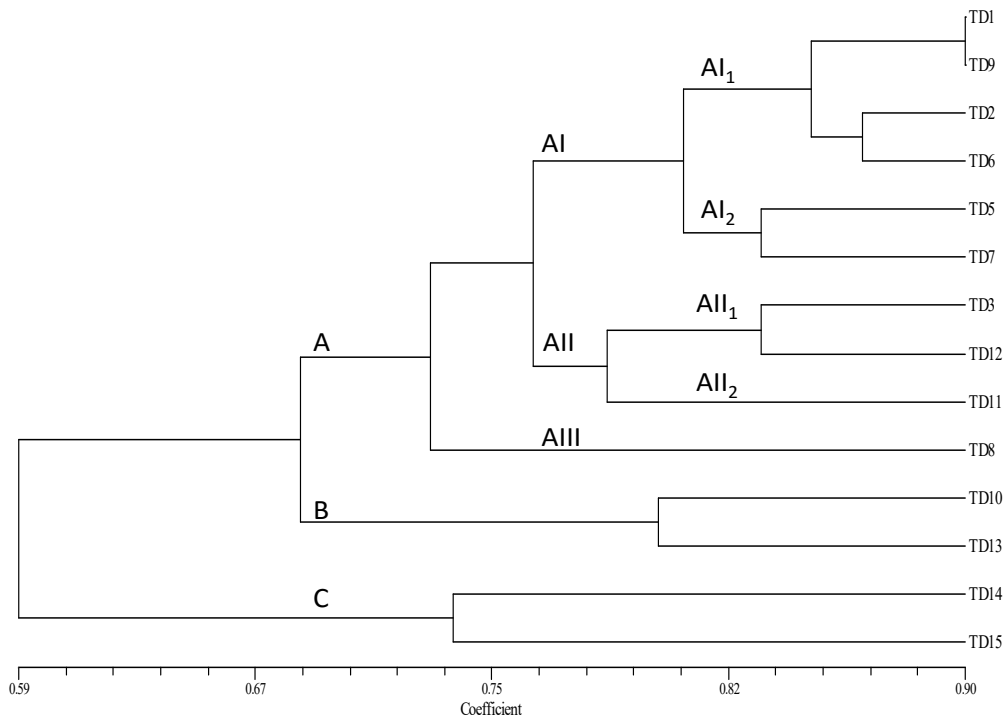
chúng có khoảng tương đồng tương tự 2 dòng TD3 và TD12 với 84% tương đồng. Phân nhóm AII có 3 dòng TD3, TD12 và TD1 với khoảng tương đồng 78.5%. Phân nhóm AIII còn lại với 1 dòng TD8.



Hình 2: Sản phẩm PCR sử dụng primer plant c. Thang chuẩn LamdaHind III (land 1, 14, 18); các dòng TD1-TD12 (land 2-13); các dòng TD12-TD15 (land 15-16); nước (land 17)



Hình 3: Sản phẩm PCR sử dụng primer plant d. Thang chuẩn LamdaHind III (land 1, 11, 18); các dòng TD1-TD10 (land 2-10); các dòng TD11-TD15 (land 12-16); nước (land 17)



**Hình 4: Phân nhóm di truyền 14 giống Cacao TD với đa dạng di truyền 0-41%**

Nhóm B với 2 dòng TD10 và TD13, là con lai của giống NA31 và NA33 (Bảng 1) thể hiện kết quả tương đồng 80%. Kết quả so sánh hình thái cho thấy dòng TD10 có lá non và quả trưởng thành màu tím đỏ, trong khi dòng TD13 cho lá non và quả trưởng thành đều màu xanh; quả TD10 không thối cổ chai trong khi quả TD13 hơi thối cổ chai (Hà, 2015). Điều này chứng minh nếu chỉ dựa vào đặc điểm kiểu hình để đánh giá sự đa dạng di truyền có thể gây ra sự sai lệch kết quả. Vì vậy, kết quả này cần có thêm thí nghiệm nghiên cứu chuyên sâu hơn để làm rõ quan hệ di truyền của 2 dòng này.

Nhóm C gồm 2 dòng TD14 và TD15, 2 cá thể này có quan hệ tương đồng di truyền trong khoảng 73%. Dòng TD15 (UIT) không rõ nguồn gốc xuất xứ được du nhập từ Châu Mỹ; chúng tôi chỉ quan sát được màu của lá non (màu xanh) và trái trưởng thành của cả 2 dòng đều có màu xanh (Lâm *et al.*, 2015). Như vậy có thể kết luận chúng có mối quan hệ di truyền gần ở mức tương đồng 73%.

Nhóm A có 10 dòng TD (TD1, TD2, TD3, TD5, TD6, TD7, TD8, TD9, TD11, TD12). Phân nhóm AI và AII với khoảng tương đồng 76%, trong đó có 2 dòng TD3 và TD6 biểu hiện kiểu hình lá và quả tương tự nhau (màu đỏ tím), 8 dòng

còn lại đều cho kiểu hình thể hiện màu lá non và quả giống nhau.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lâm *et al.* (2015), dòng TD3 và TD6 thuộc nhóm lai mang kiểu hình Criollo. So sánh với kết quả cây di truyền, chúng thuộc phân nhóm AI (với khoảng tương đồng 76%). Các dòng TD5, TD7, TD9 và TD11 thuộc nhóm lai mang tính trạng Forastero, chúng thuộc phân nhóm A với khoảng tương đồng 76%.

## 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 5.1 Kết luận

Mười bốn dòng Cacao được khảo sát cho thấy có sự đa dạng, khác biệt di truyền dao động trong khoảng 0- 41%. Xét ở khoảng tương đồng 59% có thể chia làm 3 nhóm chính: A, B, C. Nhóm A có 10 dòng, nhóm B có 2 dòng, nhóm C có 2 dòng.

- Nhóm B có 2 dòng TD10 và TD13 với khoảng tương đồng là 80%,

- Nhóm C với 2 dòng TD14 và TD15 có quan hệ tương đồng khoảng 73%.

- Nhóm A chia thành 3 phân nhóm AI, AII và AIII ở khoảng tương đồng 73%. Phân nhóm AI có 2 nhóm phụ AI<sub>1</sub> và AI<sub>2</sub>: nhóm AI<sub>1</sub> bao gồm TD1, TD9, TD6 và TD2, chúng có khoảng tương đồng



từ 86%-90%. Nhóm phụ AI<sub>2</sub> gồm TD5 và TD7, chúng có khoảng tương đồng tương tự 2 dòng TD3 và TD12 với khoảng tương đồng là 84%. Phân nhóm AII có 3 dòng TD3, TD12 và TD1 với khoảng tương đồng 78.5%. Phân nhóm AIII còn lại với 1 dòng TD8.

Kết quả này có ý nghĩa tích cực cho chương trình lai tạo giống Cacao, bảo tồn và thu thập giống tương lai.

## 5.2 Đề xuất

Sử dụng microsatellite markers để kiểm tra quan hệ di truyền của các dòng Cacao ở cấp độ phân tử từng Nucleotide.

## LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn PGS. TS Trần Nhân Dũng và TS. Phạm Hồng Đức Phước đã đóng góp ý kiến rất quan trọng cho sự thành công của nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Clegg, M. T., Learn, G. H., & Golenberg, E. M. 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. Evolution at the molecular level/edited by Robert K. Selander, Andrew G. Clark, and Thomas S. Whittman.
2. Chen, T., Ng, C., Wang, C., & Shyu, Y. 2007. Molecular identification and analysis of *Psidium guajava* L. from indigenous tribes of Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(1), 82.
3. Geleta, M., Bekele, E., Dagne, K., & Bryngelsson, T. 2010. Phylogenetics and taxonomic delimitation of the genus *Guizotia* (Asteraceae) based on sequences derived from various chloroplast DNA regions. *Plant systematics and evolution*, 289(1-2), 77-89.
4. Lachenaud, P., Paulin, D., Ducamp, M., & Thevenin, J. M. (2007). Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia horticulturae*, 113(4), 313-321.
5. Lannér, C. (1998). Relationships of wild Brassica species with chromosome number 2n= 18, based on comparison of the DNA sequence of the chloroplast intergenic region between trnL (UAA) and trnF (GAA). *Canadian journal of botany*, 76(2), 228-237.

6. Lam Thi Viet Ha, Lore Vanlerberghe, Ha Thanh Toan, Koen Dewettinck and Kathy Messens. 2015. Comparative Evaluation of Six Extraction Methods for DNA Quantification and PCR Detection in Cocoa and Cocoa-Derived Products. *Food Biotechnology*, 29,1-19.
7. Lâm Thị Việt Hà, Phùng Thị Hằng, Trần Nhân Dũng, Hà Thanh Toàn, Koen Dewettinck và Kathy Messens. 2015. Đặc điểm hình thái giải phẫu mô các giống Cacao chủ lực miền Nam Việt Nam. *Tạp chí Khoa học ĐHTC*, 36(A), 47-56.
8. Nguyễn Bảo Vệ, Trần Văn Hâu và Lê Thanh Phong, 2011. *Giáo trình cây công nghiệp dài ngày*, NXB Đại học Cần Thơ. 9.
9. Petit, R. J., Demesure, B., & Dumolin, S. 1998. cpDNA and mtDNA primers in plants. In *Molecular tools for screening biodiversity*. Springer Netherlands, pp. 256-261.
10. Phạm Hồng Đức Phước. 2009. *Kỹ Thuật Trồng Cacao ở Việt Nam*. NXB Nông Nghiệp. 1-46.
11. Shri. Mohan Jain and P.M. Priyadarshan. 2009. *Breeding Plantation Tree Crops*. Springer, New York, USA. 589-591.
12. Smulders, M. J. M., Esselink, D., Amores, F., Ramos, G., Sukha, D. A., Butler, D. R., & van Loo, E. N. 2008. Identification of cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans. *IGENIC Newsletters*, 12, 1-13.
13. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
14. Trần Nhân Dũng. 2011. *Thực tập Kỹ thuật Sinh học phân tử*. NXB ĐH Cần Thơ. pp. 4-9.
15. Trần Văn Hâu và Hồ Thị Ngân. 2011. Kết quả bước đầu về bình tuyển cây cao (*Theobroma cacao* L.) đầu dòng tại Cần Thơ. *Tạp chí NN&PTNT chuyên đề giống cây trồng, vật nuôi*, tập 1, tháng 6/2011: 120-127.
16. Wood, G. A. R., & Lass, R. A. 2008. *Cocoa*. John Wiley & Sons, London, UK.