

**PHÂN NHÓM MĂNG CẦU DAI (*ANNONA SQUAMOSA* L.)
VÙNG NÚI BÀ ĐEN, TỈNH TÂY NINH
DỰA TRÊN GENE *matK* VÀ HÌNH THÁI HOA**

*CLASSIFICATION OF CUSTARD APPLE (*ANNONA SQUAMOSA* L.)
IN BA DEN MOUNTAIN AREA, TAY NINH PROVINCE
BASED ON GENE *MATK* AND SHAPE FLOWER*

TRƯƠNG THẾ QUANG^(*)

TÓM TẮT: Giải trình tự gene *matK* của mười mẫu lá non măng cầu dai (*Annona squamosa* L.) ở vùng núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh. Ứng dụng kỹ thuật dấu phân tử *matK* thuộc hệ gene lục lạp để xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài măng cầu dai Bà Đen. Xây dựng cây phát sinh loài, phân loại các nhóm loài măng cầu dai Bà Đen dựa trên trình tự gene *matK* và đặc điểm hình thái hoa.

Từ khóa: măng cầu dai, *matK*, núi Bà Đen.

ABSTRACT: Gene *matK* of ten custard apple young leaves (*Annona squamosa* L.) in Ba Den mountain area, Tay Ninh province have been sequenced. Application molecular markers gene *matK* of chloroplast genome, genetic relationship between species of custard apple Ba Den have been defined. Based on gene *matK* and shape flower, phylogenetic tree and classification species of custard apple Ba Den have been developed.

Keywords: Custard apple, *matK*, Ba Den mountain.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây măng cầu có nguồn gốc từ Châu Mỹ. Măng cầu ta (*Annona squamosa* L.) có tên tiếng Anh: Custard apple, Sugar apple; tên tiếng Pháp: Pomme cannelle. Từ thế kỷ XVI, cây măng cầu đã được du nhập vào nhiều nước nhiệt đới do tính thích nghi ở các vùng nhiệt đới, á nhiệt đới và đã mang lại nhiều giá trị kinh tế. Măng cầu ta ở phía nam nước ta thường có hai loại là măng cầu dai và măng cầu bở. Tuy nhiên, măng cầu bở không có nhiều ưu điểm về phẩm chất và giá trị kinh tế nên phần lớn người dân trồng măng cầu dai, là loại quả giàu sinh tố

và khoáng chất. Ngoài ra, măng cầu còn có một hương vị đặc biệt khiến nhiều người ưa thích, có độ ngọt cao, vị chua không lạt, có hương thơm.

Trong công tác bảo tồn và sử dụng bền vững tài nguyên di truyền thực vật, việc đánh giá quỹ gene là công đoạn vô cùng quan trọng, không chỉ phục vụ cho việc xác định các giống, loài khác nhau mà còn nhằm tìm hiểu mối quan hệ về di truyền giữa các giống, loài để bảo tồn đa dạng nguồn gene. Sự phát triển mạnh mẽ của các phương pháp và kỹ thuật trong lĩnh vực sinh học phân tử đã tạo ra các công cụ hữu hiệu và nhanh chóng

^(*) TS. Trường Đại học Văn Lang, Email: truongthequang@vanlanguni.edu.vn

được ứng dụng trong nghiên cứu bảo tồn đa dạng sinh học. Ưu thế của các kỹ thuật phân tử là có khả năng xác định được sự đa dạng ở mức độ gene, tạo cơ sở để đánh giá về giá trị bảo tồn của loài và quần thể. Trong đó, mã vạch dựa trên trình tự DNA (DNA Barcode) ra đời đã hứa hẹn một tương lai mới, nơi mà con người có thể cập nhật nhanh chóng các thông tin như tên, thuộc tính sinh học,... của bất cứ loài sinh vật nào trên trái đất. Một công cụ hữu hiệu trong việc định danh thực vật khi các dữ liệu hình thái bị thiếu hoặc bất lực trong việc so sánh để phân biệt các loài trong cùng một giống. Chính vì vậy, việc tạo lập cơ sở dữ liệu DNA của các giống, loài để đăng ký ở ngân hàng gene thế giới về tài nguyên di truyền thực vật đặc hữu của Việt Nam nói chung và măng cầu nói riêng đang là vấn đề rất quan trọng, mang tính khoa học và thực tiễn cao. Trong những năm gần đây, người dân chuộng trồng các giống cây mới được lai tạo hoặc du nhập từ nước ngoài vào. Chính những vấn đề này đã và đang làm giảm sút một số giống quý, đặc hữu của địa phương, trong đó có cây măng cầu dai vùng núi Bà Đen thuộc tỉnh Tây Ninh. Do đó, việc xác định mối quan hệ di truyền và phân định các nhóm loài măng cầu dai đang trồng tại vùng núi Bà Đen thuộc tỉnh Tây Ninh dựa trên trình tự gene *matK* và đặc điểm hình thái hoa là cần thiết, đây là cơ sở khoa học ban đầu để xây dựng bản đồ gene cho giống măng cầu dai (*Annona squamosa* L.) đặc hữu tại địa phương này trong việc bảo tồn nguồn gene, xây dựng thương hiệu sản phẩm thông qua chỉ dẫn địa lý và bảo hộ thương hiệu của sản phẩm, cũng như ứng dụng trong nghiên cứu chọn giống, lai tạo giống mới kháng bệnh và có chất lượng cao.



Hình 1. Cây măng cầu dai trồng tại vùng núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh [8]

Trong hệ thống học thực vật gần đây, gene *matK* nổi lên như là một gene vô giá bởi dấu hiệu phát sinh chủng loài của nó cao so với các gene khác được dùng trong lĩnh vực này. Gene *matK* (mã hóa cho maturase K) được phát hiện đầu tiên trên cây thuốc lá (*Nicotiana Tabacum*) khi giải trình tự gene *trnK* mã hóa cho tRNA^{Lys} (UUU) của lục lạp [2], [6].

Gene *matK* của *Annona squamosa* dài khoảng 802 bp, tương ứng với khoảng 267 amino acid trong protein [5]. Nằm giữa hai exon ở đầu 5' và 3' của *trnK*, tRNA^{Lys} trong vùng bản sao đơn lớn của bộ gene lục lạp ở hầu hết các loài thực vật đất (Hình 2).

Gene *matK* nổi bật lên trong số các gene lục lạp được dùng trong phân tích hệ thống học thực vật theo kiểu riêng và nhịp tiến hóa của nó. Sự biến đổi nucleotide tính trên mỗi vị trí trong *matK* cao gấp 3 lần trong *rbcL* (tiểu phần lớn của RUBISCO), và tốc độ thay thế amino acid cao gấp 6 lần của *rbcL*. Cùng với tốc độ thay thế amino

acid cao trong matK là tỉ lệ thay thế gần như bằng nhau giữa cả ba vị trí trong mỗi codon. Tốc độ thay thế cao làm gia tăng số điểm parsimony và tín hiệu phát sinh chủng loài mạnh, nên nó có thể được sử dụng để phân biệt lịch sử tiến hóa ở các mức phân loại khác nhau. Giá trị về thông tin phát sinh chủng loài tạo ra nhờ matK làm cho nó trở thành gene cực kỳ có giá trị trong các nghiên cứu hệ thống và tiến hóa nhanh chóng [1]. Tốc độ thay thế amino acid nhanh trong gene matK hầu như là do có tốc độ thay thế phân bố đồng đều cho cả ba vị trí trong codon trong khi phần lớn các gene mã hóa protein khác lại có xu hướng thay thế nucleotide ở vị trí thứ ba. Chẳng hạn, tốc độ thay thế ở 3 vị trí trong codon của matK lần lượt là 62%, 57% và 66% khi

so sánh các bộ thực vật hạt kín với nhau [3], và lần lượt là 32%, 28% và 39% trong họ Lan (Orchidaceae) [9]. Các đột biến chèn hay mất (gọi tắt là xóa chèn – Indel) thường xảy ra trong matK, mặc dù các xóa chèn chủ yếu xảy ra với bội số của ba, duy trì khung đọc mở. Tốc độ thay thế nhanh cùng với sự hiếm hiện diện các xóa chèn làm thay đổi khung đọc và một vài trường hợp codon kết thúc xuất hiện sớm.

Thông tin trình tự từ một mình gene matK đã có thể tạo ra kết quả phát sinh chủng loài mạnh như khi dựng bằng các bộ dữ liệu gồm từ 2 đến 11 gene khác nhau kết hợp. Hơn nữa, thông tin phân tử từ matK cũng được sử dụng để phân tích các quan hệ phát sinh chủng loài ở các nhóm phân loại từ thấp đến cao [3].



Hình 2. Gene matK, vùng Reverse Transcriptase (RT) của matK ORF, miền domain X và hai vùng exon trnK

Ở nước ta hiện chưa có các nghiên cứu về quan hệ di truyền của các loài măng cầu (*Annona squamosa* L.) dựa trên các dấu phân tử thuộc hệ gene lục lạp hoặc hệ gene trong nhân. Ở nước ngoài đã có các công trình nghiên cứu về *Annona squamosa* như “Mã vạch DNA của một số loài thuộc họ na (*Annona*)” của Nerea Larranaga và José I. Hormaza (2015) [5]; “Đa dạng sinh học của một số loài thuộc họ Na (*Annona*) và hình thái quả dựa theo các kiểu gene đã chọn” của Hirdayesh Anuragi và cộng sự (2016) [4].

2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

Giải trình tự gene matK của mười mẫu lá non măng cầu dai đang trồng ở vùng núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh. Ứng dụng kỹ thuật dấu phân tử matK thuộc hệ gene lục lạp để xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài *Annona squamosa* L. Bà Đen. Xây dựng cây phát sinh loài, phân định các nhóm loài *Annona squamosa* L. Bà Đen dựa trên trình tự gene matK và đặc điểm hình thái hoa. Nghiên cứu được thực hiện vào năm 2017

tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Pháp y Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Lấy mẫu lá non măng cầu dai tại các xã Thạnh Tân, Tân Bình, Phước Bình, Phước Tân, Suối Đá thuộc khu vực chân núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh;

Tách chiết và thu nhận DNA tổng số bằng phương pháp CTAB có hiệu chỉnh;

Thiết kế và tổng hợp cặp mồi 2.1F và 5R dùng để khuếch đại vùng gene matK;

Khuếch đại vùng gene matK bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 2.1F và 5R;

Điện di trên gel agarose 1% để đánh giá sản phẩm PCR;

So sánh trình tự gene matK với cơ sở dữ liệu GenBank bằng phần mềm trực tuyến Blastn để định danh loài măng cầu dai vùng núi Bà đen là *Annona squamosa* L. Bà Đen;

Thiết lập ma trận tỷ lệ tương đồng và xây dựng cây phát sinh loài của 10 mẫu

Annona squamosa L. Bà Đen dựa trên trình tự gene matK và đặc điểm hình thái hoa;

Phân định các nhóm loài *Annona squamosa* L. Bà Đen dựa trên trình tự gene matK và đặc điểm hình thái hoa.

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Tách chiết DNA tổng số

Các mẫu lá non măng cầu thu thập sẽ được tách DNA tổng số bằng bộ kit CTAB (HiMedia Lab.). Sau đó, DNA tổng số sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di trên gel agarose 1%. Mẫu DNA đạt yêu cầu sẽ được bảo quản trong điều kiện lạnh sâu (- 20 °C) cho các nghiên cứu về sau.

3.2. Khuếch đại vùng matK

Cặp mồi dùng khuếch đại vùng gene matK được thiết kế bằng phần mềm DNAMAN phiên bản 9 (Lennon Corporation, 2017) và được tổng hợp tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Pháp y Thành phố Hồ Chí Minh (Bảng 1).

Bảng 1. Cặp mồi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại vùng matK [8]

Tên	Trình tự mồi theo chiều 5'- 3'	Tm (°C)	Chiều phản ứng	Chiều dài sản phẩm dự kiến (bp)
2.1F	CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	58,2	Xuôi	800
5R	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	56,7	Ngược	

Thành phần hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại vùng gene matK sử dụng cặp mồi 2.1F và 5R (Bảng 2, 3).

Bảng 2. Các thành phần có trong phản ứng khuếch đại vùng gene matK [8]

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Taq DNA pol 2x - preMix	12,5
2	Mồi 2.1F (5μM)	1,0
3	Mồi 5R (5μM)	1,0
4	H ₂ O	9,5
5	DNA khuôn	Điều chỉnh
Tổng thể tích		25,0

Bảng 3. Chu kỳ nhiệt khuếch đại vùng gene matK [8]

Giai đoạn	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
Tiền biến tính	94	3 phút	1
Biến tính	94	30 giây	30
Bắt cặp	53	40 giây	30
Kéo dài	72	40 giây	30
Kết thúc	72	5 phút	1

3.3. Điện di sản phẩm PCR

Mẫu sản phẩm PCR được bổ sung thuốc nhuộm ethidium bromide, dung dịch đệm loading buffer và cho chạy điện di trên gel agarose 1% với hiệu điện thế 120 V, thời gian từ 30 đến 60 phút. Quan sát các band DNA trên bàn đọc gel UV với bước sóng 365 nm.

3.4. Giải trình tự sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR sau khi thu nhận sẽ được gửi đi giải trình tự theo chiều xuôi và chiều ngược bằng hệ thống tự động 3130. Thử tích sản phẩm PCR dùng để giải trình tự là 10 µl. Cặp mồi 2.1F và 5R được sử dụng để giải trình tự. Mồi phải được pha trong nước cất hai lần khử ion, không có muối, EDTA hay bất kỳ nhiễm tạp khác. Nồng độ của mỗi mồi là 10 µM với thể tích tối thiểu là 5 µl cho mỗi mẫu giải trình tự.

3.5. Hiệu chỉnh trình tự

Trình tự sau khi được xác định bằng hệ thống tự động 3130 chưa thể sử dụng ngay cho việc phân tích. Việc đọc base tự động do hệ thống thực hiện có một tỷ lệ sai sót nhất định tùy theo phương pháp và loại máy sử dụng. Sự sai sót này xảy ra bởi cường độ tín hiệu huỳnh quang thu được không phải lúc nào cũng rõ ràng. Khoảng cách không đồng đều giữa các mũi tín hiệu cũng như sự chồng lấp các tín hiệu dẫn đến việc máy tính nhận và hiển thị sai kết quả. Hiệu chỉnh trình tự bằng cách loại bỏ

những tín hiệu không chính xác ở hai đầu trình tự và kiểm tra các sai lệch giữa hai kết quả giải trình tự.

3.6. So sánh với cơ sở dữ liệu GenBank

Sau khi hiệu chỉnh các sai lệch, trình tự liên ứng (Consensus Sequence) được rút ra từ hai kết quả giải trình tự và kiểm tra các sai lệch. Trình tự liên ứng là trình tự chính xác cho đoạn DNA khảo sát. Tuy nhiên, kết quả này cần được kiểm tra một lần nữa trên cơ sở dữ liệu nucleotide như GenBank bằng công cụ BLAST. Nếu có các sai lệch giữa trình tự trên cơ sở dữ liệu và trình tự truy vấn thì cần được xem xét và kiểm tra lần nữa để xác nhận kết quả giải trình tự. Ngoài ra, việc thực hiện BLAST còn giúp kiểm tra sự nhiễm mẫu và đánh giá quá trình thu nhận và bảo quản mẫu.

3.7. Xây dựng cây phát sinh loài

Xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm DNAMAN phiên bản 9. Sắp hàng nhiều trình tự bằng thuật toán ClustalW (Feng - Doolittle and Thompson). Thiết lập ma trận tương đồng và ma trận khoảng cách theo mô hình Kimura (Kimura, 1980, J. Mol. Evol 16: 111-120). Phân tích bootstrap 10.000 lần cho giá trị độ tin cậy của cây phát sinh loài.

Cây Phylogenetic được thiết lập từ ma trận khoảng cách theo thuật toán Neighbor - Joining (Saitou và Nei, 1987, Mol. Biol. Ecol.4: 406-425) [7].

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

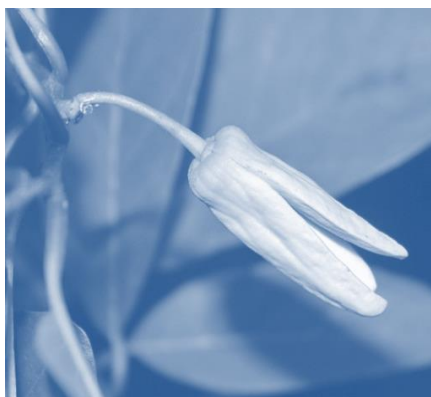
4.1. Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu lá non măng cầu được thu thập ở các xã thuộc khu vực chân núi Bà Đen.

Được định danh và phân loại sơ bộ theo hình thái hoa (Bảng 4). Mẫu được xử lý và bảo quản ở - 20 °C cho việc tách chiết DNA tổng số.

Bảng 4. Số lượng mẫu lá và hình thái hoa măng cầu [8]

STT	Xã, thành phố (huyện)	Số lượng mẫu	Ký hiệu mẫu	Hình thái hoa
1	Xã Thạnh Tân, thành phố Tây Ninh	01	X1	Xoắn
		01	T1	Thẳng
2	Xã Tân Bình, thành phố Tây Ninh	01	X2	Xoắn
		01	T2	Thẳng
3	Xã Phước Tân, huyện Dương Minh Châu	01	X3	Xoắn
		01	T5	Thẳng
4	Xã Suối Đá, huyện Dương Minh Châu	01	X4	Xoắn
		01	T6	Thẳng
5	Xã Phước Bình, huyện Dương Minh Châu	01	T3	Thẳng
		01	T4	Thẳng
Tổng cộng:		10		



a) Hoa xoắn



b) Hoa thẳng

Hình 3. Hình thái hoa măng cầu [8]

4.2. Tách DNA tổng số

Trong nghiên cứu này, DNA tổng số của các mẫu được tách bằng phương pháp CTAB theo Doyle (1987) có hiệu chỉnh chỉnh phù hợp với tình trạng thực tế của mẫu. Kết quả được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy các band DNA thu được của các mẫu măng cầu có vệt sáng kéo dài, điều đó chứng

tỏ vẫn còn nhiều RNA chưa được loại bỏ khỏi dịch chiết DNA.

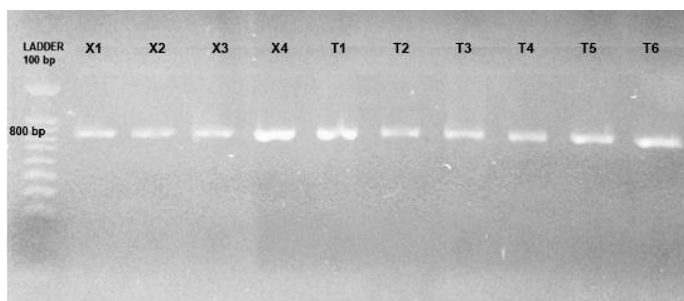
4.3. Khuếch đại gene *matK* bằng kỹ thuật PCR

Tiến hành khuếch đại gene *matK* với chu trình nhiệt như đã trình bày ở Bảng 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy ở mẫu T3, T4 và T6 không cho sản phẩm PCR như mong muốn. Mẫu X1, T2 và T5 có nồng độ sản phẩm PCR thấp. Do đó,

cần hiệu chỉnh bằng cách tăng nồng độ DNA khuôn.

Để khắc phục, thực hiện phản ứng PCR lần hai cho các mẫu chưa đạt yêu cầu với DNA khuôn thay đổi là 1,2 µl với các mẫu X1, T2 và T5 và 1,5 µl đối với các

mẫu T3, T4 và T6. Kết quả chạy PCR lần 2 đã khuếch đại thành công gene matK, cho sản phẩm đúng như mong đợi. Các band sản phẩm rõ, đúng kích thước nên có thể sử dụng giải trình tự (Hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR gene matK lần 2[8]

4.4. Kết quả giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự

Kết quả giải trình tự gene matK, tất cả 10 mẫu măng cầu đều cho kết quả giải trình tự tốt cho cả hai mạch xuôi và mỗi ngược. Chứng tỏ cặp môi 2.1F và 5R rất hiệu quả trong việc khuếch đại và giải trình tự gene matK. Trình tự gene matK của 10 mẫu măng cầu có kích thước từ 756 bp đến 844 bp [8].

4.5. So sánh trình tự của mẫu với cơ sở dữ liệu GenBank

Kiểm tra sơ bộ bằng công cụ BLAST trên ngân hàng GenBank cho thấy, tất cả 10 trình tự nói trên đều thuộc các loài măng cầu *Annona squamosa* L. có trong GenBank với mức độ bao phủ 99% và mức độ tương đồng 100% (Bảng 5). Điều này cho thấy, mẫu vật thu thập ngoài thực địa không bị lẫn tạp các mẫu khác, quá trình bảo quản mẫu tốt đạt độ tin cậy cao.

Bảng 5. Các loài *Annona squamosa* L. trên GenBank có độ tương đồng cao với mẫu

STT	Tên loài	Quốc gia	Accession Number
1	<i>A. squamosa</i> L.	Trung Quốc	EU715064.1
2	<i>A. squamosa</i> L.	Trung Quốc	KT452823.1
3	<i>A. squamosa</i> L.	Ấn Độ	JN114737.1
4	<i>A. squamosa</i> L.	Tây Ban Nha	KM68854.1

Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank nhằm mục đích cho một kết quả tham khảo với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ 100% và độ tương đồng 99% có thể suy được tên loài.

Bởi kết quả BLAST hiển thị trình tự tương đồng nhất mà trên GenBank hiện có và với những trình tự ở mức độ dưới loài, nên dựa trên vùng trình tự gene matK có thể kết luận 10 mẫu măng cầu núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh là loài *Annona*

squamosa L. Bà Đen, Việt Nam, chưa được công bố và cập nhật vào cơ sở dữ liệu GenBank trên thế giới.

4.6. Xây dựng cây phát sinh loài

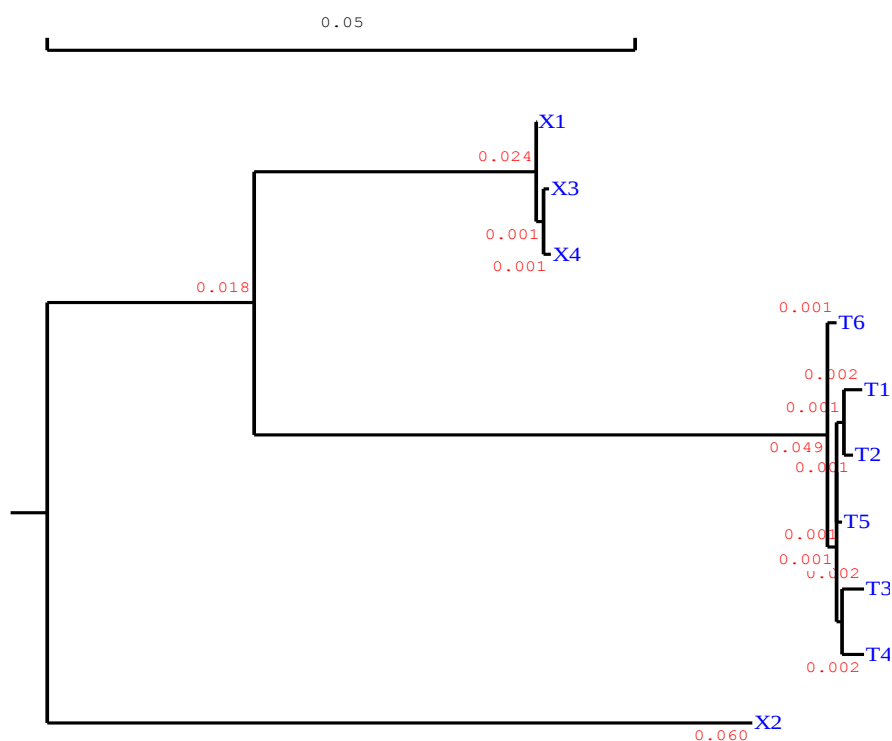
Ứng dụng phần mềm DNAMAN phiên bản 9. Sắp hàng 10 trình tự gene matK của *Annona squamosa* L. Bà Đen bằng thuật toán ClustalW. Kết quả, thiết lập được ma trận khoảng cách (Bảng 6) theo mô hình Kimura.

Bảng 6. Ma trận khoảng cách của 10 trình tự gene matK *A. squamosa* L. Bà Đen [8]

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	X1	X2	X3	X4
T1	0									
T2	0.003	0								
T3	0.006	0.004	0							
T4	0.004	0.004	0.004	0						
T5	0.003	0.003	0.003	0.004	0					
T6	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0				
X1	0.077	0.076	0.077	0.075	0.073	0.074	0			
X2	0.129	0.129	0.129	0.130	0.128	0.127	0.092	0		
X3	0.077	0.076	0.077	0.075	0.073	0.074	0.000	0.110	0	
X4	0.077	0.076	0.077	0.075	0.073	0.074	0.000	0.112	0.001	0

Cây Phylogenetic (Hình 5) được thiết lập từ ma trận khoảng cách theo thuật toán Neighbor - Joining. Phân tích bootstrap

10.000 lần cho giá trị độ tin cậy của cây phát sinh loài.



Hình 5. Cây Phylogenetic của *A. squamosa* L. Bà Đen theo trình tự gene matK [8]

4.7. Phân nhóm mẫu cây dai vùng núi Bà Đen theo gene matK

Phân tích cây Phylogenetic theo gene matK có thể chia *Annona squamosa* L. Bà Đen thành ba nhóm dưới loài: Nhóm 1: *Annona squamosa* L. Bà Đen hoa xoắn gồm ba mẫu X1, X3 và X4; Nhóm 2: *Annona squamosa* L. Bà Đen hoa xoắn,

giống Thái Lan gồm một mẫu X2; Nhóm 3: *Annona squamosa* L. Bà Đen hoa thẳng gồm 6 mẫu T1, T2, T3, T4, T5 và T6.

Tỷ lệ tương đồng (%) và khoảng cách tương đồng của ba nhóm *Annona squamosa* L. Bà Đen được nêu trong Bảng 7.

Bảng 7. Tỷ lệ tương đồng, khoảng cách tương đồng của ba nhóm *A. squamosa* L. Bà Đen [8]

Nhóm A. <i>squamosa</i> L. Bà Đen	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3	
	Tương đồng	Khoảng cách	Tương đồng	Khoảng cách	Tương đồng	Khoảng cách
Nhóm 1	100%	0.000	90%	0.102	92%	0.073
Nhóm 2	90%	0.102	100%	0.000	87%	0.127
Nhóm 3	92%	0.073	87%	0.127	100%	0.000

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Tách chiết và thu nhận được DNA tổng số của 10 mẫu mẫu cây dai (*Annona squamosa* L.) vùng núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh bằng phương pháp CTAB có một số hiệu chỉnh;

Khuếch đại được vùng gene matK, kết quả thu được sản phẩm đúng kích thước, không tạp nhiễm;

Cặp mồi 2.1F và 5R có hiệu quả trong việc giải trình tự hai chiều gene matK với toàn bộ 10 mẫu *Annona squamosa* L. Bà Đen;

Sau khi so sánh trình tự gene matK với cơ sở dữ liệu GenBank, cho thấy tất cả 10 trình tự gene matK đều thuộc loài *Annona squamosa* L. với độ bao phủ 100% và độ tương đồng 99%. Điều này cho thấy, mẫu vật thu thập ngoài thực địa không bị lẫn tạp các mẫu khác, quá trình bảo quản mẫu tốt và đạt độ tin cậy cao;

Xây dựng được cây phát sinh loài của 10 mẫu *Annona squamosa* L. Bà Đen dựa trên trình tự gene matK;

Lần đầu tiên giải trình tự gene matK thành công cho ba nhóm loài được định danh sơ bộ hình thái gồm *Annona squamosa* L. hoa xoắn (X1, X3 và X4), *Annona squamosa* L. hoa xoắn, giống Thái (X2), *Annona squamosa* L. hoa thẳng (T1, T2, T3, T4, T5 và T6).

Kiến nghị:

Thu thập thêm mẫu mẫu cây dai (*Annona squamosa*) ở các vùng phụ cận núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh để nghiên cứu đa dạng di truyền của loài này;

Cần sử dụng thêm một số marker trình tự của các vùng khác như rpoB, rbcL, accD,... để có thể định danh loài, dưới loài và xây dựng hệ thống DNA barcode cho các loài *Annona squamosa* L. Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barthet, Michelle M.; Hilu, Khidirw (2007), *Expression of matk: functional and evolutionary implications*.
2. Daniell H., Lee S. B., Grevich J., Saski C., Quesada Vargas T., Guda C. B., Tomkins J., Jansen R. K. (2006), *Complete chloroplast genome sequences of Solanum bulbocastanum, Solanum lycopersicum and comparative analyses with other Solanaceae genomes*, Theoretical and Applied Genetics 112.
3. Hilu K. W., T. Borsch, Muller K., Soltis D. E., V. Savolainen MW (2003), *Angiosperm phylogeny based on matK sequence information*, American Journal of Botany 90.
4. Hirdayesh Anuragi, Haresh L. Dhaduk, Sushil Kumar, Jitendra J. Dhruve, Mithil J. Parekh, Amar A. Sakure (2016), *Molecular diversity of Annona species and proximate fruit composition of selected genotypes*, 3 Biotech (2016) 6:204, Springerlink.com.
5. Nerea Larranaga, José I. Hormaza (2015), *DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus Annona (Annonaceae)*, Frontiers in Plant Science, Volume 6.
6. Steane D. A. (2005), *Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the Tasmanian blue gum, Eucalyptus globulus (Myrtaceae)*, DNA Research 12.
7. Trương Thế Quang (2017), *Tin sinh học (Bioinformatics)*, Giáo trình lưu hành nội bộ, Trường Đại học Văn Lang.
8. Trương Thế Quang, Võ Trần Bảo Vy (2017), *Xác định quan hệ di truyền và phân bố địa lý các loài mãng cầu dai (Annona squamosa L.) vùng núi Bà Đen, tỉnh Tây Ninh dựa trên trình tự vùng gene lục lạp matK*, Trường Đại học Văn Lang.
9. Whitten et al. (2000), *Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence*, American Journal of Botany 87(12).

Ngày nhận bài: 15/01/2018. Ngày biên tập xong: 17/01/2018. Duyệt đăng: 17/3/2018.