

Xác định đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử và khả năng tái sinh chồi *in vitro* của các giống dâu tây tại Lâm Đồng

Nguyễn Bá Nam^{1*}, Lương Vũ Mai Quỳnh¹, Lê Trịnh Huy Trà¹, Lê Ngọc Triệu¹, Nguyễn Văn Bình¹, Phan Hoàng Đại¹, Lê Thế Biên^{2,3}, Trần Hiếu⁴, Hoàng Thanh Tùng², Dương Tấn Nhựt²

¹Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Phân hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh tại Ninh Thuận, 8 Yên Ninh, thị trấn Khánh Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/10/2022; ngày chuyển phản biện 6/10/2022; ngày nhận phản biện 25/10/2022; ngày chấp nhận đăng 29/10/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, đa dạng di truyền của 10 giống dâu tây được phân tích thông qua hai kỹ thuật Start codon targeted (SCoT) polymorphism và CAAT box-derived polymorphism (CBDP). Ngoài ra, mẫu lá *in vitro* của 10 giống dâu tây (Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Panchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion) được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu cho nghiên cứu tái sinh chồi. Kết quả cho thấy, trong tổng số 9 đoạn mỗi SCoT và 9 đoạn mỗi CBDP đã phát hiện tính đa dạng di truyền của 10 giống dâu tây. Kỹ thuật SCoT tỏ ra hiệu quả hơn với tỷ lệ band đa hình là 74,49%, cao hơn so với kỹ thuật CBDP là 71,15%. Trong khi đó, các chỉ số về đa dạng di truyền từ dữ liệu tổng hợp ở hai kỹ thuật SCoT và CBDP đạt được kết quả như sau: độ dị hợp trung đợi (H_e) là 0,2480, chỉ số Shannon (I) là 0,3749, tỷ lệ band đa hình là 75,56%. Mức độ tương đồng di truyền giữa các giống khảo sát cao nhất là 0,827 (giữa giống Aicyberry và Kayonoka), thấp nhất là 0,586 (giữa giống Aicyberry và Selva), trung bình ở mức 0,724. Ngoài ra, khi nghiên cứu khả năng tái sinh chồi của các giống dâu tây với kích thước mẫu lá nuôi cấy khác nhau cho thấy: khả năng tái sinh chồi dâu tây phụ thuộc rất lớn vào đặc tính của giống, một số giống phụ thuộc vào kích thước của mẫu cấy còn một số giống thì không phụ thuộc. Giống Camarosa với mẫu lá nuôi cấy có đường kính 3 mm cho kết quả tái sinh tốt nhất trên nền môi trường MS bổ sung 7 g/l agar, 30 g/l sucrose và 2 mg/l TDZ.

Từ khóa: CAAT box-derived polymorphism, dâu tây, đa dạng di truyền, start codon targeted, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây dâu tây (*Fragaria x ananassa* Duch.) thuộc họ Hoa hồng (*Rosaceae*) được canh tác trên 71 quốc gia. Tổng sản lượng dâu tây trên toàn thế giới là 8,9 triệu tấn, trong đó, Trung Quốc dẫn đầu với 3,3 triệu tấn, chiếm 38% [1]. Dâu tây được sản xuất nhiều ở các vùng ôn đới và cận nhiệt đới, nhưng tập trung nhiều nhất ở Bắc Mỹ và châu Âu. Ở Việt Nam, dâu tây được trồng chủ yếu ở Lâm Đồng và một số tỉnh phía bắc như: Lào Cai, Sơn La, Lạng Sơn. Hiện nay, dâu tây là một trong những loại quả chiếm ưu thế hơn các loại cây ăn quả khác và được tỉnh Lâm Đồng xếp vào danh sách cây ưu tiên bởi giá trị kinh tế cũng như giá trị về mặt du lịch. Bên cạnh giống Mỹ đá (trái to, cứng, vận chuyển xa dễ dàng), thì thời gian gần đây, rất nhiều cơ sở đã tự nhập thêm một số giống dâu tây từ nhiều quốc gia khác nhau như: Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Mỹ... nên không thể thống kê được chủng loại giống hiện có ở Việt Nam. Do đó, cần xác định tính đa dạng di truyền của các giống này cũng như xây dựng phương pháp nhân giống để cung cấp cho người trồng.

*Tác giả liên hệ: Email: namnb@dlu.edu.vn

Việc sử dụng các chỉ thị phân tử dựa trên DNA giúp các nhà chọn giống hiểu được sự biến đổi và các mối quan hệ di truyền giữa các kiểu gen và nguồn gốc của giống [2]. Hiện nay, kỹ thuật chỉ thị phân tử DNA như RFLP, RADP, AFLPs... được sử dụng phổ biến để xác định và nhận dạng giống cây trồng. Sử dụng phương pháp so sánh đặc trưng nhận dạng DNA để xác định, nhận dạng các chủng giống cũng được sử dụng phổ biến phục vụ cho nhiều mục đích khác như công tác bảo tồn, cung cấp cây giống chuẩn. Bên cạnh đó, kỹ thuật tạo dấu vân tay DNA (DNA fingerprinting) cũng được sử dụng để đánh giá tính ổn định di truyền của cây giống qua các thế hệ nhân giống vô tính *in vitro* hoặc *ex vitro*. SCoT là một kỹ thuật đơn giản ra đời chưa lâu, nguyên lý của kỹ thuật này là tạo dấu vân tay DNA thông qua PCR bán ngẫu nhiên, sử dụng một môi có trình tự 5'-NNNNNNNATGNNNNNNNN-3' (trình tự cố định 5'-ATG-3' có thể nằm ở bất kỳ vị trí nào trong trình tự môi) để khuếch đại các phân đoạn trong bộ gen, đặc điểm của các phân đoạn được khuếch đại này là gắn liền với codon mở đầu của các gen chức năng (5'-CAT-3') [3]. Do đặc trưng dạng DNA đa locus nhận được, chỉ thị SCoT có thể được

Genetic diversity analysis using molecular markers and *in vitro* shoot regeneration of strawberry cultivars in Lam Dong

Ba Nam Nguyen^{*}, Vu Mai Quynh Luong¹, Trinh Huy Tra Le¹, Ngoc Trieu Le¹, Van Binh Nguyen¹, Hoang Dai Phan¹, The Bien Le^{2,3}, Hieu Tran⁴, Thanh Tung Hoang², Tan Nhut Duong²

¹Dalat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street, Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Tay Nguyen Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology, 116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁴Nong Lam University - Ho Chi Minh City, Ninh Thuan Campus,

8 Yen Ninh Street, Khanh Hai Town, Ninh Hai District, Ninh Thuan Province, Vietnam

Received 3 October 2022; revised 25 October 2022; accepted 29 October 2022

Abstract:

In the present study, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) molecular markers were used to study the genetic diversity of ten strawberry cultivars. In addition, shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of ten commercial cultivars, i.e Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, and Albion, was also investigated. The result showed that a total of 9 SCoT primers and 9 CBDP primers detected genetic polymorphism among ten strawberry cultivars. Comparatively, SCoT markers proved to be more efficient than CBDP markers in terms of percentage polymorphism as the former detected an average of 74.49% and the latter at 71.15%. Meanwhile, the indices of genetic diversity from the aggregated data of two techniques SCoT and CBDP are as follows: expected heterozygosity (H_e) 0.2480, Shannon index (I) 0.3749, polymorphic band ratio 75.56%. The highest level of genetic similarity among the cultivars was 0.827 (between Aicyberry and Kayonoka varieties), the lowest was 0.586 (between Aicyberry and Selva varieties), and the average was 0.724. In addition, the results of shoot regeneration of strawberry varieties from leaf discs with different sizes were strongly dependent on the genotype and weakly on explant size. Leaf explants (3 mm in size) of Camarosa cultivar cultured on MS medium supplemented with 7 g/l agar, 30 g/l sucrose and 2 mg/l TDZ gave the best shoot regeneration.

Keywords: CAAT box-derived polymorphism, genetic diversity, shoot regeneration, start codon targeted, strawberry.

Classification number: 4.6

ứng dụng để nghiên cứu về đa dạng di truyền các tập đoàn giống và nhận dạng, phân biệt các giống trong tập đoàn đó. CBDP cũng là kỹ thuật khuếch đại DNA bán ngẫu nhiên dựa vào PCR định hướng vào hộp CAAT trong cấu trúc promoter của các gen, trong trường hợp này trong trình tự của mỗi sử dụng có phần 5'-CCAAT-3' để nhắm vào trình tự bảo thủ cao của hộp CAAT là 5'-GGTTA-3' [4]. Hiện nay, hai kỹ thuật SCoT và CBDP được quan tâm và nghiên cứu thành công trên các đối tượng thực vật như xoài [5], trà mi hoa vàng [6]. Phương pháp thực hiện các kỹ thuật này không quá phức tạp cũng như không đòi hỏi các trang thiết bị quá đặc thù và chi phí cao... Do vậy, trong nghiên cứu này, hai kỹ thuật SCoT và CBDP được sử dụng để phân biệt một số giống dâu tây hiện có tại Lâm Đồng.

Việc phát triển cây dâu tây là một việc thiết yếu, khi nhu cầu sản xuất dâu tây càng tăng thì yêu cầu về cây giống cũng tăng theo. Phương pháp nhân giống *in vitro* được xem là biện pháp tiên tiến giúp tạo ra số lượng cây trồng lớn trong thời gian ngắn [7]. Phương pháp tái sinh từ mẫu lá là một phương pháp tiềm năng, giúp việc chọn tạo giống được rút ngắn và đồng nhất về mặt di truyền, đáp ứng được nhu cầu về số lượng lớn cây giống chất lượng cao và ổn định cho sản xuất. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử và khảo sát khả năng tái sinh chồi của các giống dâu tây thông qua nuôi cấy mẫu lá 10 giống dâu tây gồm: Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amauo, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion với các kích thước khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu này, 10 giống dâu tây được chia thành 2 nhóm: một nhóm có nguồn gốc từ Nhật Bản và một nhóm có nguồn gốc từ Mỹ (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các giống dâu tây được sử dụng trong nghiên cứu.

Tên giống	Nguồn gốc	Quang chu kỳ
Aicyberry	Nhật Bản	Trung tính
Kayonoka	Nhật Bản	Trung tính
Tochiotome	Nhật Bản	Ngày ngắn
Penchika	Nhật Bản	Trung tính
Amauo	Nhật Bản	Trung tính
Pajado	Mỹ	Trung tính
Selva	Mỹ	Trung tính
Monterey	Mỹ	Trung tính
Camarosa	Mỹ	Ngày ngắn
Albion	Mỹ	Trung tính

Các mẫu lá của cây dâu tây *in vitro* được nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng của các giống dâu tây 1 năm tuổi. Các giống dâu tây này được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Nông nghiệp Công nghệ cao thuộc Trường Đại học Đà Lạt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo nguồn mẫu ban đầu: Chồi có chứa đỉnh sinh trưởng cây dâu tây được khử trùng với cồn 70% (v/v) trong vòng 30 giây và HgCl₂ 0,1% (w/v) trong vòng 5 phút, sau đó rửa 4 lần với nước cất vô trùng. Tách đỉnh sinh trưởng và cấy vào bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường MS [8], bổ sung 0,3 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8,5 g/l agar. Sau đó sử dụng các mẫu lá của cây dâu tây *in vitro* trên cho tất cả các nghiệm thức. Mẫu lá *in vitro* được nuôi cấy trong bình thủy tinh 250 ml chứa 30 ml môi trường MS bổ sung 2 mg/l TDZ, 7 g/l agar và 30 g/l sucrose [9] đã được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Các bình nuôi cấy được nuôi trong phòng nuôi cấy với nhiệt độ khoảng 25±2°C, độ ẩm tương đối khoảng 60%, được đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với quang chu kỳ 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng là 40-45 μmol.m⁻².s⁻¹.

Nhận dạng, xác định quan hệ di truyền và đánh giá đa dạng di truyền các giống dâu tây thông qua kỹ thuật SCoT và CBDP: Mẫu lá *in vitro* (5 g) của 10 giống dâu tây được thu nhận và sử dụng làm nguồn vật liệu để tách chiết DNA. Các mẫu lá tươi được tách chiết DNA tổng số theo quy trình CTAB cải tiến dựa trên cải biến quy trình CTAB I của K. Weising và cs (2005) [10]. Kiểm tra nồng độ, chất lượng DNA bằng phương pháp đo mật độ quang dựa trên giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0 để xác định độ tinh sạch theo phương pháp của K. Weising và cs (2005) [10], sau đó, pha loãng về nồng độ 100 ng/μl để sử dụng làm mẫu (template) trong quá trình PCR về sau. 15 môi SCoT và 15 môi CBDP tham khảo từ hai nghiên cứu tương ứng của B.C.Y. Collard và cs (2009) [3] và A.K. Singh và cs (2014) [4] được làm vật liệu môi. Tiêu chí để sàng lọc môi là ghi nhận được sản phẩm khuếch đại bằng PCR và có ít nhất một băng đa hình trên 5 mẫu ngẫu nhiên từ tập hợp mẫu khảo sát. Sau quá trình khảo sát, 6 môi SCoT và 6 môi CBDP không xác định được kết quả do số band bị mờ không rõ. Do đó, có 9 môi SCoT và 9 môi CBDP hình thành nên band rõ ràng được chọn làm vật liệu môi để khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu (bảng 2).

Bảng 2. Các môi Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism khảo sát.

Thứ tự	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Tài liệu tham khảo
Sử dụng trong kỹ thuật SCoT				
1	SCoT 3	CAACAATGGCTACCACCG	50	
2	SCoT 12	ACGACATGGCGACCAACG	50	
3	SCoT 13	ACGACATGGCGACCATCG	50	
4	SCoT 18	ACCATGGCTACCACCGCC	50	
5	SCoT 19	ACCATGGCTACCACCGGC	50	[3]
6	SCoT 22	AACCAATGGCTACCACCAC	50	
7	SCoT 23	CACCAATGGCTACCACCAG	50	
8	SCoT 29	CCATGGCTACCACCGCC	50	
9	SCoT 30	CCATGGCTACCACCGCG	50	
Sử dụng trong kỹ thuật CBDP				
1	CBDP 2	TGAGCACGATCCAATAAT	50	
2	CBDP 3	TGAGCACGATCCAATACC	50	
3	CBDP 5	TGAGCACGATCCAATCTA	50	
4	CBDP 8	TGAGCACGATCCAATCGG	50	
5	CBDP 9	TGAGCACGATCCAATGAT	50	[4]
6	CBDP 10	TGAGCACGATCCAATGTT	50	
7	CBDP 11	TGAGCACGATCCAATGTC	50	
8	CBDP 12	TGAGCACGATCCAATATA	50	
9	CBDP 14	TGAGCACGATCCAATGCG	50	

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích 50 μl chứa 25 ul 2X My HS Mix, 5 μl mỗi 10 pmol/μl BSA 1 μl 50 ng khuôn mẫu DNA theo khuyến cáo của nhà sản xuất (kit MyTaq™ HS Mix, 2x, Hãng Bioline). Quá trình khuếch đại DNA được thực hiện trên hệ máy luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Pro S (Hãng Eppendorf, Đức) với chu trình nhiệt sử dụng cho từng kỹ thuật như sau:

Kỹ thuật SCoT được thực hiện theo phương pháp của B.C.Y. Collard và cs (2009) [3] gồm các bước: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 36 chu kỳ gồm 94°C trong 45 giây, 50°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; bước kéo dài mạch cuối cùng ở 72°C trong 15 phút; bảo quản ở 4°C.

Kỹ thuật CBDP được thực hiện theo phương pháp của A.K. Singh và cs (2014) [4] gồm các bước: biến tính ban đầu ở 94°C trong 6 phút; 5 chu kỳ gồm 94°C trong 45 giây, 35°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 20 giây và 35 chu kỳ

gồm 94°C trong 45 giây, 50°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 20 giây; bước kéo dài mạch cuối cùng ở 72°C trong 10 phút; bảo quản ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% ở điện thế 80 V trong 2 giờ. Sau khi chạy điện di, lấy bản gel nhuộm với Ethidium Bromide (EtBr) và quan sát dưới ánh sáng cực tím (UV) và chụp ảnh trên hệ thiết bị UVP Gel Studio PLUS (Hãng Analytik Jena, Đức).

2.3. Tái sinh chồi dâu tây từ lá in vitro

Mẫu lá dâu tây của 10 giống (Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amaou, Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion) *in vitro* được cắt bằng dụng cụ inox đục lỗ tròn lần lượt ở các đường kính 3, 5 và 7 mm nhằm khảo sát ảnh hưởng kích thước mẫu đến khả năng tái sinh của mẫu cấy.

2.4. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý thống kê

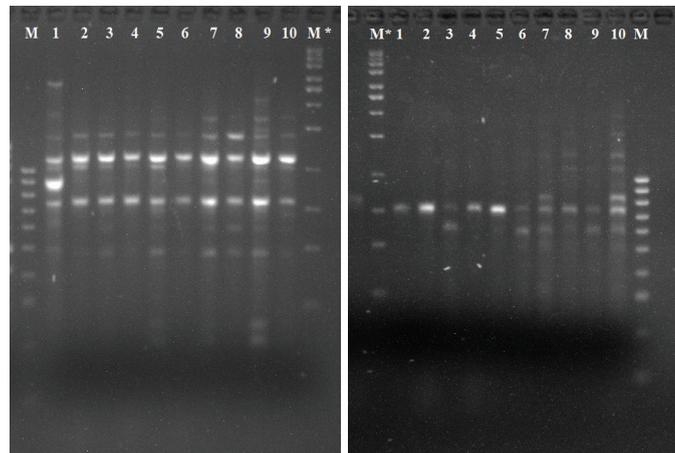
Phân tích kết quả đa dạng di truyền sử dụng phần mềm Popgene 32 để tính toán các thông số của các mẫu đại diện cho tập hợp 10 mẫu khảo sát, bao gồm tỷ lệ band đa hình (PPB), độ dị hợp trông đợi (H_e) và chỉ số Shannon (I) [11]. Phần mềm NTSys để tính toán chỉ số tương đồng di truyền giữa các mẫu khảo sát và xây dựng cây quan hệ di truyền giữa các mẫu khảo sát [12].

Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu (chồi), khối lượng tươi mẫu, hình thái chồi để khảo sát khả năng cảm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường agar với mỗi giống và kích thước khác nhau. Mỗi thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên hai yếu tố. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần để tính trung bình mỗi lần thực hiện với 15 mẫu lá. Tất cả số liệu thu nhận sẽ được xử lý bằng phần mềm Minitab 18.0 theo phương pháp Turkey's test.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính đa dạng và mức độ tương đồng di truyền của các giống dâu tây thông qua kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism

Mẫu lá *in vitro* từ 10 giống dâu đã được tách chiết DNA thành công với nồng độ DNA của các mẫu đạt trong khoảng 400-900 ng/ μ l, độ tinh sạch được thể hiện qua chỉ số OD₂₆₀/OD₂₈₀ đều dao động trong khoảng 1,8-2,0. Ngoài ra, kết quả PCR trên ảnh điện di của mỗi SCoT 30 và mỗi CBDP 10 với 10 mẫu dâu tây được thể hiện ở hình 1 là 2/18 mỗi, bao gồm 9 mỗi SCoT và 9 mỗi CBDP có tính đa hình thể hiện hình ảnh rõ ràng và có khả năng khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu. Các thông số đa hình của các môi được xác định dựa trên hai kỹ thuật SCoT và CBDP thể hiện ở bảng 3.



Hình 1. Kết quả PCR của mỗi Start codon targeted 30 (trái) và CAAT box-derived polymorphism 10 (phải) với 10 mẫu DNA dâu tây. M: thước 100 bp (HyperLadder™ 100 bp, Hãng Bioline); M*: thước 1 kb (innuSTAR 1 kb DNA Ladder Express, Hãng AnalytikJena); 1: Aicyberry; 2: Kayonoka; 3: Penchika; 4: Tochiotome; 5: Pajado; 6: Amaou; 7: Monterey; 8: Camarosa; 9: Selva; 10: Albion.

Bảng 3. Các thông số đa hình của các môi trên hai kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism với 10 giống dâu tây.

Thứ tự	Kỹ thuật SCoT			Kỹ thuật CBDP		
	Môi	Số lượng band đa hình	Tỷ lệ band đa hình (%)	Môi	Số lượng band đa hình	Tỷ lệ band đa hình (%)
1	SCoT 3	11	90,90	CBDP 2	9	66,67
2	SCoT 12	23	82,61	CBDP 3	11	54,54
3	SCoT 13	24	70,83	CBDP 5	9	77,78
4	SCoT 18	13	53,85	CBDP 8	10	90,00
5	SCoT 19	13	84,61	CBDP 9	7	28,57
6	SCoT 22	14	57,14	CBDP 11	8	75,00
7	SCoT 23	12	83,33	CBDP 12	9	77,78
8	SCoT 29	18	72,22	CBDP 14	10	80,00
9	SCoT 30	16	75,00	CBDP 10	10	90,00
Tổng		144			83	
Trung bình		16	74,49		9,22	71,15

Khi tiến hành phản ứng khuếch đại giữa 9 môi SCoT và 9 môi CBDP với 10 giống dâu tây, kết quả đối với 9 môi SCoT thu nhận được tổng 144, tỷ lệ đa hình cao nhất ở môi SCoT 3 với 90,90%. Số band cho mỗi môi dao động từ 11 đến 24 band. Số band trung bình cho từng môi được ghi nhận là 16 band/môi với tỷ lệ đa hình trung bình đạt 74,49%. Trong khi đó, 9 môi CBDP thu được tổng 83 band đa hình, số band dao động 7-11. Số band trung bình cho từng môi là 9,22 band/môi với tỷ lệ đa hình trung bình là 71,15%.

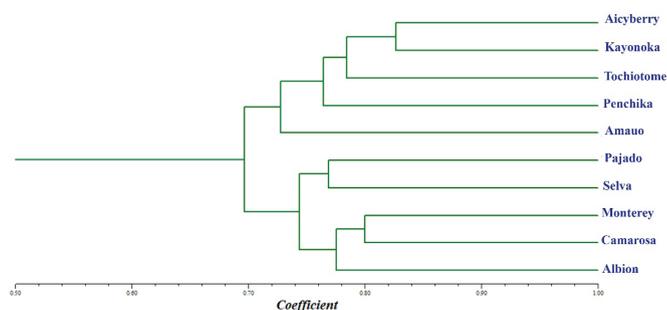
Kết quả phân tích ma trận tương đồng cho thấy, mức độ tương đồng di truyền giữa các giống đạt khá cao, trung bình ở mức 0,724. Mức cao nhất là 0,827 (giữa giống Aicyberry và Kayonoka), thấp nhất là 0,586 (giữa giống Aicyberry và

Selva). Tương đồng di truyền giữa 10 giống dâu tây khảo sát dựa trên phối hợp cả hai kỹ thuật SCoT và CBDP được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Tương đồng di truyền giữa các giống dựa trên hai kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism.

	Aicyberry	Kayonoka	Penchika	Tochiotome	Pajado	Amauo	Monterey	Camarosa	Selva	Albion
Kayonoka	0,827									
Penchika	0,697	0,817								
Tochiotome	0,742	0,826	0,777							
Pajado	0,693	0,795	0,755	0,782						
Amauo	0,640	0,760	0,746	0,764	0,715					
Monterey	0,635	0,746	0,724	0,688	0,791	0,711				
Camarosa	0,640	0,724	0,702	0,657	0,715	0,697	0,800			
Selva	0,586	0,662	0,666	0,648	0,768	0,635	0,791	0,697		
Albion	0,653	0,746	0,706	0,706	0,746	0,737	0,777	0,773	0,720	

Dựa trên sự phối hợp hai bộ dữ liệu hình thành bằng kỹ thuật SCoT và CBDP, kết quả tính toán tỷ lệ band đa hình (PPB), độ dị hợp trông đợi (H_e) và chỉ số Shannon (I) dựa trên tính toán bằng phần mềm Popgene 32. Các chỉ số về đa dạng di truyền từ dữ liệu tổng hợp ở hai kỹ thuật SCoT và CBDP như sau: $H_e=0,2480$; $I=0,3749$; $PPB=75,56\%$. Dựa trên hệ số tương đồng di truyền giữa các giống dâu tây khảo sát trên hai kỹ thuật SCoT và CBDP, cây quan hệ di truyền được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Sơ đồ dạng cây về quan hệ di truyền giữa các cá thể khảo sát dựa trên hai kỹ thuật Start codon targeted và CAAT box-derived polymorphism.

Qua sơ đồ cây ở hình 2 nhận thấy 10 giống dâu tây chia thành 2 nhóm. Tương đồng di truyền của cả hai nhóm 1 và 2 trên mức 0,700. Nhóm 1 bao gồm các giống Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome, Penchika, Amauo với hệ số tương đồng thấp nhất (khoảng 0,725). Trong khi đó, nhóm 2 bao gồm các giống Pajado, Selva, Monterey, Camarosa, Albion với hệ số tương đồng khoảng 0,745. Các giống Aicyberry, Kayonoka, Tochiotome có mức độ tương đồng tương đối cao và cùng nhóm 1 vì cùng xuất xứ là dâu tây có nguồn gốc Nhật Bản. Trong nhóm này, giống Aicyberry và Kayonoka có mối quan hệ chặt chẽ về mặt di truyền (đạt 0,83). Trong khi Aicyberry và Selva có giá trị tương đồng thấp nhất thuộc

2 nhóm khác nhau, vì Aicyberry là giống dâu tây có nguồn gốc xuất xứ Nhật Bản còn Selva là giống dâu tây có nguồn gốc xuất xứ từ Mỹ. Điều này cho thấy, các giống dâu tây khác nhau về mặt di truyền phân bố theo nguồn gốc xuất xứ.

Đối với các giống Penchika, Selva, Albion, Monterey cùng là giống dâu tây có xuất xứ từ Mỹ nhưng vẫn có sự khác biệt về mặt di truyền. Các giống dâu tây này có sự khác biệt như vậy có thể là do quá trình lai tạo từ những nguồn vật liệu khác biệt di truyền lớn trong việc chọn tạo giống. Bên cạnh đó cũng không loại trừ khả năng biến động di truyền (trình tự DNA có thể biến đổi) trong quá trình canh tác quá lâu nên xảy ra lai tạp. Như vậy, các mẫu giống dâu tây khá đa dạng, có thể cho lai các giống giữa nhóm 1 và nhóm 2, tạo ra các sản phẩm mới và chất lượng, phục vụ công tác sản xuất và chọn tạo giống.

3.2. Tái sinh chồi từ mẫu lá dâu tây *in vitro*

Với mục đích hoàn thiện quy trình nhân giống, thí nghiệm tái sinh chồi từ mẫu lá dâu tây *in vitro* được tiến hành nhằm đánh giá khả năng tạo chồi bất định của từng giống, góp phần chứng minh giữa các giống khác nhau có sự khác biệt trong quá trình tái sinh và xác định các yếu tố ảnh hưởng đến chúng. Giai đoạn tạo nguồn mẫu ban đầu là quan trọng để khởi đầu cho một quy trình nhân giống. Trong trường hợp số lượng giống ban đầu còn hạn chế hoặc chỉ chọn được 1-2 cá thể có tính trạng tốt thì phương pháp tái sinh chồi từ mẫu lá là tối ưu. Ngoài ra, việc xác định kích thước mẫu cho quá trình tái sinh là tiền đề quan trọng cho những nghiên cứu chọn giống bằng phương pháp chuyển gen, xử lý hoá chất hoặc chiếu xạ. Trong nghiên cứu này, sự tái sinh chồi của mẫu lá 10 giống dâu tây ở 3 kích thước khác nhau (3, 5, 7 mm) được ghi nhận (bảng 4). Mẫu lá sau 1 tuần đã xuất hiện cảm ứng và thấy mô sẹo hình thành xung quanh vết cắt sau đó lan dần đến toàn bộ bề mặt lá. Kết quả này cho thấy, sự khác nhau về tỷ lệ tái sinh chồi giữa các giống là đáng kể, dao động từ 0,00 đến 93,09%. Trong đó, tỷ lệ tái sinh cao nhất là 93,09% xảy ra ở giống Camarosa ở kích thước 3 mm. Đồng thời, giống Amauo cũng có tỷ lệ tái sinh là 93,09% nhưng lại ở kích thước 7 mm. Tuy nhiên, giống Camarosa có chồi lớn hơn, chắc khỏe và đồng đều hơn. Trong khi đó, giống dâu tây có tỷ lệ tái sinh ít nhất là giống Aicyberry với tỷ lệ tái sinh là 0,00% trên cả 3 kích thước khác nhau. Với giống Aicyberry, đa số vết thương không có khả năng tái sinh, dễ bị hoại tử, hóa đen hoặc có cảm ứng mô sẹo, mô sẹo có màu xanh nhưng không nhiều và chưa tạo chồi sau 6 tuần nuôi cấy. Điều này cho thấy, sự khác nhau về giống, kích thước có ảnh hưởng lớn đến khả năng tái sinh. Kiểu gen là một trong những yếu tố quyết định chính cho sự hình thành và phát triển của

chồi. Trong nghiên cứu này có sự khác biệt về hình thành mô sẹo và số lượng chồi/mẫu. Mặc dù, tỷ lệ tái sinh của Amauo thấp hơn Camarosa nhưng số chồi/mẫu của Amauo cao hơn Camarosa. Ngoài ra, giống Aicyberry cũng như tỷ lệ tái sinh cho số chồi/mẫu là thấp nhất. Xét về kích thước thì nghiệm thức này cũng không có sự khác biệt quá lớn, tuy nhiên, kích thước 3 và 5 mm vẫn cho tỷ lệ cao hơn.

Sau 6 tuần nuôi cấy, tỷ lệ chồi cao hơn 0,5 cm xuất hiện với tỷ lệ rất thấp ở các giống. Tuy tỷ lệ tái sinh của giống Amauo không cao bằng giống Camarosa nhưng lại có tỷ lệ chồi cao hơn 0,5 cm cao nhất, đặc biệt cảm ứng mạnh ở đường kính 3 mm. Theo sau đó là giống Camarosa đạt tỷ lệ 3,75%. Chiều cao của chồi cũng không có sự khác biệt lớn giữa các nghiệm thức này (bảng 5).

Bảng 5. Khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá của 10 giống dâu tây sau 6 tuần nuôi cấy.

Giống	Ø (mm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ chồi >0,5 cm (%)	Khối lượng mẫu (mg)		Hình thái
					Tươi	Khô	
Camarosa	3	93,09 ^a	4,99 ^{a,d}	4,10	319,55 ^{a,c}	38,25 ^{a,c}	Chồi lớn, phiến lá cup, tái sinh không đồng đều
	5	85,54 ^a	3,94 ^{a,d}	2,27	378,97 ^b	40,72 ^{a,c}	Chồi mảnh, phiến lá xòe, mô sẹo dễ vỡ
	7	76,94 ^{ab}	3,93 ^{a,d}	5,17	573,10 ^a	62,38 ^a	Chồi lớn, có cuống lá, phiến lá xòe thùy
Aicyberry	3	-	-	-	18,34 ^b	8,91 ^b	Mô bị hoại tử
	5	-	-	-	56,44 ^{a,b}	27,70 ^b	Mô bị hoại tử
	7	-	-	-	141,18 ^{a,b}	37,29 ^{b,f}	Mô bị hoại tử
Kayonoka	3	10,06 ^{c,c}	0,54 ^d	2,08	48,78 ^{b,b}	18,95 ^{b,e}	Chồi ít nhưng đôi lớn, lá màu xanh đậm, có cuống lá, phiến lá xòe
	5	-	-	-	45,36 ^{b,b}	20,72 ^{c,e}	Mô hoại tử
	7	-	-	-	78,00 ^{a,b}	31,24 ^{a,e}	Mô hoại tử
Selva	3	28,12 ^{c,c}	3,45 ^{a,d}	-	55,60 ^{a,b}	16,10 ^{a,e}	Chồi nhỏ, không đồng đều, phiến lá cup
	5	56,96 ^{c,c}	4,56 ^{a,d}	2,69	115,71 ^{b,b}	26,84 ^{a,e}	Chồi lớn, chồi có hình thái rõ ràng
	7	43,32 ^{a,d}	3,47 ^{a,d}	-	118,96 ^{b,b}	28,88 ^{a,e}	Mô sẹo nhiều, chồi nhỏ, phân hóa rõ ràng
Tochiotome	3	-	-	-	33,37 ^b	10,85 ^b	Mô sẹo hóa đen
	5	3,42 ^b	0,06 ^d	-	30,32 ^b	13,49 ^{a,e}	Mô sẹo ít, đa số mô sẹo hóa đen
	7	-	-	-	71,41 ^{a,b}	20,73 ^{c,e}	Mô sẹo hóa đen
Penchika	3	65,16 ^{c,c}	4,35 ^{a,d}	-	138,03 ^{b,b}	27,73 ^{a,e}	Chồi nhỏ, li ti, có cuống lá, phiến lá cup
	5	73,01 ^{ab}	7,22 ^{a,c}	-	215,59 ^{a,e}	39,75 ^{a,e}	Chồi tái sinh nhiều, nhỏ, đồng đều, phiến lá xòe
	7	76,94 ^{ab}	3,93 ^{a,d}	0,58	287,82 ^{a,d}	57,17 ^{ab}	Chồi lớn, tái sinh nhiều, đồng đều, có cuống lá, phiến lá xòe
Pajado	3	72,21 ^{ab}	4,35 ^{a,d}	1,40	168,99 ^{b,b}	31,90 ^{a,e}	Chồi lớn, có cuống lá, phiến lá xòe, chồi chắc khỏe, lá có màu xanh đậm
	5	38,23 ^{a,d}	1,43 ^{b,c}	-	235,43 ^{a,f}	42,68 ^{a,d}	Chồi lớn, có cuống lá, phiến lá xòe, chồi chắc khỏe
	7	32,59 ^{a,c}	2,34 ^{a,d}	1,12	272,41 ^{a,c}	54,26 ^{a,c}	Chồi lớn, không đồng đều, có cuống lá, phiến lá xòe, chồi chắc khỏe

Giống	Ø (mm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ chồi >0,5 cm (%)	Khối lượng mẫu (mg)		Hình thái
					Tươi	Khô	
Albion	3	3,42 ^b	0,06 ^d	-	62,81 ^{a,b}	14,53 ^{a,e}	Chồi nhỏ li ti, chưa phân hóa rõ ràng
	5	-	-	-	72,26 ^{a,b}	18,80 ^{a,e}	Mô bị hoại tử
	7	-	-	-	128,32 ^{b,b}	30,90 ^{a,e}	Mô bị hoại tử
Monterey	3	58,87 ^{c,c}	3,80 ^{a,d}	-	41,19 ^{a,b}	10,81 ^b	Chồi nhỏ, phân hóa rõ ràng
	5	66,35 ^{c,c}	9,34 ^{ab}	1,36	201,71 ^{b,e}	38,26 ^{a,c}	Chồi cao lớn, chắc khỏe, phân hóa rõ ràng
	7	14,48 ^{b,c}	1,25 ^d	1,44	149,81 ^{b,b}	34,14 ^{a,e}	Chồi nhỏ, mảnh
Amauo	3	49,77 ^{a,d}	2,71 ^{a,d}	6,10	156,25 ^{b,b}	23,17 ^{b,e}	Chồi nhỏ, chắc khỏe, có cuống lá, xòe thùy, lá xanh đậm
	5	38,23 ^{a,d}	3,08 ^{a,d}	3,94	168,50 ^{b,b}	29,21 ^{b,e}	Chồi cao lớn, chắc khỏe, lá xanh đậm
	7	93,09 ^a	9,61 ^a	4,03	322,42 ^{a,c}	41,93 ^{a,c}	Chồi cao lớn, chắc khỏe, lá xanh đậm, không đồng đều
Trung bình giống							
Camarosa		85,09 ^a	4,27 ^a	3,75 ^{ab}	417,34 ^a	46,54 ^a	
Aicyberry		-	-	-	62,40 ^{ad}	22,94 ^{cd}	
Kayonoka		1,92 ^b	0,16 ^b	0,51 ^{bc}	56,51 ^{cd}	23,34 ^{cd}	
Selva		41,98 ^a	3,81 ^a	0,64 ^{bc}	94,28 ^{cd}	23,60 ^{cd}	
Tochiotome		0,78 ^b	0,02 ^b	-	43,31 ^d	14,75 ^d	
Penchika		71,65 ^a	5,08 ^a	0,17 ^c	209,22 ^b	40,68 ^{ab}	
Pajado		46,20 ^a	2,59 ^a	0,75 ^{bc}	223,45 ^b	42,46 ^a	
Albion		0,78 ^b	0,02 ^b	-	223,45 ^b	20,89 ^{cd}	
Monterey		42,83 ^a	4,24 ^a	0,83 ^{bc}	120,05 ^{bc}	26,11 ^{b,d}	
Amauo		58,23 ^a	4,73 ^a	4,64 ^a	209,70 ^b	30,97 ^{a,c}	
Kích thước trung bình							
Ø 3		27,69	1,99	0,92	88,40 ^a	19,08 ^c	
Ø 5		24,66	1,99	0,75	133,9 ^b	28,98 ^b	
Ø 7		20,98	1,82	0,88	193,30 ^a	38,86 ^a	
Nguồn biến động							
Giống * Ø		*	*	***	***	***	
Giống		***	***	ns	***	***	
Ø		ns	ns	ns	**	**	

*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; n.s. not significant. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn trong Tukey's test.

Tái sinh chồi từ lá dâu tây được thực hiện trong nhiều nghiên cứu với các điều kiện khác nhau như: chất điều hoà sinh trưởng [13], điều kiện nuôi cấy [14], giống và loại mẫu [15]. Trong nghiên cứu này, kích thước và giống của mẫu lá khác nhau sẽ cho các kết quả tái sinh khác nhau. Mẫu lá mang kích thước 3 và 5 mm cho khả năng tái sinh chồi với số chồi và tỷ lệ tái sinh tốt hơn ở mẫu cây có kích thước 7 mm. Khối lượng tươi và khối lượng khô đạt cao nhất ở tất cả mẫu cây 7 mm ở hầu hết các giống (trừ giống dâu tây Monterey). Điều này cho thấy, khi diện tích tiếp xúc của vết thương lá càng nhiều thì tỷ lệ cảm ứng mô sẹo càng cao, dẫn đến làm tăng sinh khối của cụm chồi. Tóm lại, kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng tái sinh chồi dâu tây phụ thuộc rất lớn vào đặc tính của giống, kích thước của mẫu cây.

4. Kết luận

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 10 giống dâu tây với chỉ thị SCoT và CBDP cho thấy hiệu quả của việc ứng dụng các kỹ thuật này trong xây dựng hệ thống dữ liệu phân tử đối với các giống và loài thực vật. Nghiên cứu này là cơ sở để đánh giá tính đa dạng di truyền giữa các cá thể trong cùng một giống, khi kết hợp với kết quả của nghiên cứu tái sinh từ mẫu lá sẽ giúp phục vụ tốt hơn công tác chọn giống dâu tây. Xa hơn nữa, kết quả nghiên này có thể ứng dụng trong truy xuất nguồn gốc giống của các sản phẩm dâu tây trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Food and Agriculture Organization (2019), *FAO Stat*, <https://www.fao.org/faostat/en/#home>, accessed 25 December 2019 .

[2] V.M. Whitaker (2011), “Applications of molecular markers in strawberry”, *Journal of Berry Research*, **1(3)**, pp.115-127, DOI: 10.3233/BR-2011-013.

[3] B.C.Y. Collard, D.J. Mackill (2009), “Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants”, *Plant Molecular Biology Reporter*, **27**, pp.86-93, DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5.

[4] A.K. Singh, M.K. Rana, S. Singh, et al. (2014), “CAAT box-derived polymorphism (CBDP): A novel promoter-targeted molecular marker for plants”, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **23(2)**, pp.175-183, DOI: 10.1007/s13562-013-0199-5.

[5] N.T. Nha, L.T. Thanh, V.T.H. Trang (2021), “Genetic diversity of mango cultivars in Central and Southern Vietnam using start codon target (SCoT) marker”, *Journal of Agriculture and Rural Development*, **18**, pp.113-120 (in Vietnamese).

[6] L.N. Trieu, T.T. Bich, N.V. Ket (2022), “Population genetic diversity of *Camellia dilinhensis* on the Di Linh Plateau of Vietnam revealed by ISSR and Scot markers”, *Dalat University Journal of Science*, **12(3)**, pp.43-55, DOI: 10.37569/DalatUniversity.12.3.954(2022).

[7] C.S. Mattick (2018), “Cellular agriculture: The coming revolution in food production”, *Science Bulletin*, **74(1)**, pp.32-35, DOI: 10.1080/00963402.2017.1413059.

[8] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures”, *Physiologia Plantarum*, **15(3)**, pp.473-497, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

[9] S. Yin, W. Jin, P. Wang, et al. (2003), “Effects of thidiazuron (TDZ) on inducing adventitious shoot of strawberry *in vitro*”, *Journal of Agricultural Biotechnology*, **1(4)**, pp.379-382 (in Chinese with English abstract).

[10] K. Weising, H. Nybom, M. Pfenninger, et al. (2005), *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*, CRC Press, 472pp.

[11] F. Yeh, R.C. Yang, T.B.J. Boyle, et al. (2000), "PopGene32, microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32", *Science Open*, <https://www.scienceopen.com/document?vid=2d45ad78-b140-4b66-b80f-2c9f513ec997>, accessed 24 July 2022.

[12] F.J. Rohlf (2000), "NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.11x", *Science Open*, <https://www.scienceopen.com/book?vid=40c2e0a8-f43d-4a9b-9414-6bf32f3fbc1a>, accessed 24 July 2022.

[13] F. Haddadi, M.A. Aziz, H. Kamaladini, et al. (2013), “Thidiazuron-and zeatin-induced high-frequency shoot regeneration from leaf and shoot-tip explants of strawberry”, *HortTechnology*, **23(3)**, pp.276-281.

[14] H. Wang, M. Li, Y. Yang, et al. (2015), “Histological and endogenous plant growth regulators changes associated with adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. ‘Honeoye’)", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **123**, pp.479-488, DOI: 10.1007/s11240-015-0851-y.

[15] A. Passey, K. Barrett, D. James (2003), “Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types”, *Plant Cell Reports*, **21(5)**, pp.397-401, DOI: 10.1007/s00299-002-0530-4.