

KHẢO SÁT THÔNG TIN TRÌNH TỰ VÀ THIẾT KẾ MỒI PCR CHO CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN CON ĐƯỜNG SINH TỔNG HỢP CHẤT GÂY ĐẮNG Ở DƯA LEO

Đào Nhuận Ngân⁽¹⁾, Lê Trần Kim Phương⁽¹⁾, Nguyễn Hoài Nguyên⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 10/4/2024; Chấp nhận đăng 12/5/2024

Liên hệ email: nguyen.nhoai@ou.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2024.03.571>

Tóm tắt

Ở dưa leo, một số giống cho trái có vị đắng nên không được ưa chuộng. Do đó, trái dưa leo không có vị đắng cũng góp phần quan trọng trong việc xác định chất lượng trái dưa leo. Một vài nghiên cứu trên thế giới đã khái quát được con đường sinh tổng hợp chất gây đắng trên trái dưa leo (cucurbitacin C). Thông tin trình tự của các gen mã hóa cho các enzyme tham gia trong con đường này đã được công bố trên một số giống dưa leo trên thế giới. Tuy vậy, vẫn chưa có nghiên cứu nào nhằm tìm hiểu trình tự các gen gây đắng của các giống/dòng dưa leo ở Việt Nam. Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát, thu thập và tổng hợp thông tin chức năng và trình tự DNA của các gen gây đắng từ các nghiên cứu đã công bố trên thế giới. Dựa vào các công bố trước đây trên thế giới, thông tin về chức năng, tên và mã định danh của các gen gây đắng được tổng hợp. Các thông tin này có vai trò quan trọng trong việc thu thập trình tự DNA của các gen gây đắng từ các cơ sở dữ liệu DNA. Bên cạnh đó, các môi PCR cho các gen này cũng được thiết kế và kiểm tra tính khả dụng cũng như độ đặc hiệu. Kết quả thu được từ nghiên cứu này có thể được áp dụng trên các nghiên cứu thực nghiệm nhằm tìm hiểu trình tự các gen gây đắng ở dưa leo Việt Nam.

Từ khóa: cucurbitacin C, dưa leo, gen gây đắng, môi PCR, trình tự DNA

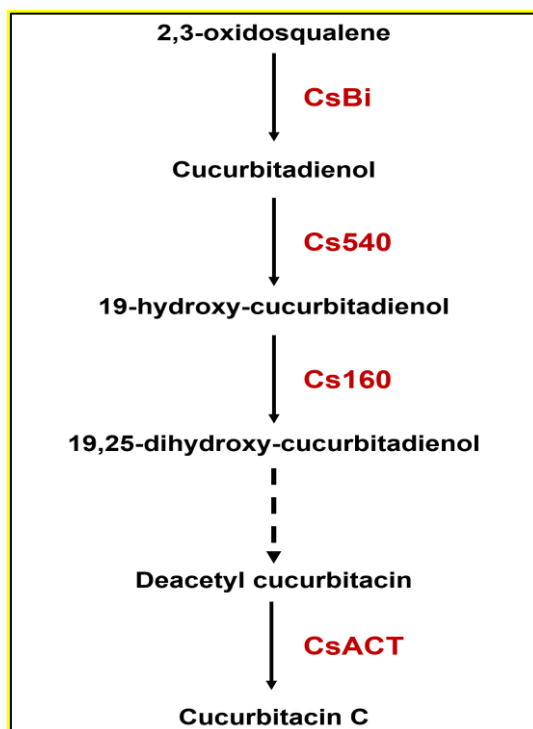
Abstract

DNA SEQUENCE AND PCR PRIMER COLLECTIONS OF GENES INVOLVED IN CUCURBITACIN BIOSYNTHESIS IN CUCUMBER

In cucumber, several cultivars exhibit bitter fruit phenotype, and these are not preferred by consumers. Thus, non-bitter taste is one of the key characteristics to determine the value of cucumbers. A few previous studies preliminarily unraveled a biosynthetic pathway of bitterness compound (namely, cucurbitacin C) in this species (*Cucumis sativus*). In the world, DNA sequences of the genes encountered for the enzymes participating in this biosynthetic pathway were uncovered in some cucumber cultivars/lines. However, these gene sequences in the cucumber cultivars/lines growing in Vietnam have not been characterized. This work aimed to study and collect the datasets of function and gene ID information of the bitterness genes reported previously. Based on the collected datasets, the DNA sequences of these genes were gathered. In addition, we also designed PCR primers which can be used to amplify these genes in future experiments. The primers were further tested for their characteristics as well as specificity *in silico*. The obtained results are meaningful and useful for further experimental work aiming to study the actual sequences of bitterness genes in the cucumber cultivars/lines growing in Vietnam.

1. Đặt vấn đề

Trái dưa leo thường được sử dụng làm các món ăn, nước uống với nhiều công dụng khác nhau tốt cho sức khỏe. Dưa leo (*Cucumis sativus*) là một loài thực vật thuộc họ bầu bí (Cucurbitaceae), được trồng rộng rãi trên khắp thế giới với nhiều giống (cultivars) khác nhau. Ở Việt Nam, dưa leo được trồng từ rất lâu đời và hiện có rất nhiều giống địa phương, ví dụ như giống dưa leo H'Mông, dưa Mán (của dân tộc Dao), dưa Tày, dưa Nùng, dưa leo thơm ở Bình Định (Nguyễn Trường Giang và nnk., 2021). Một số trường hợp người ăn cảm thấy rất khó chịu khi ăn phải những trái có vị đắng. Ngày nay, người ta biết được rằng vị đắng của trái dưa leo là do sự hiện diện của các hợp chất gọi chung là cucurbitacins (Venkatesh và nnk., 2018). Cucurbitacins tạo ra vị đắng ở dưa leo, nhưng trên phương diện thực vật học, hợp chất này góp phần quan trọng trong cơ chế phòng vệ, giúp bảo vệ cây khỏi sự tấn công và phá hoại của các tác nhân gây hại như chim, côn trùng, nấm và vi khuẩn (Bruno và nnk., 2023). Tính đắng của cây dưa leo còn phụ thuộc vào các điều kiện môi trường (nhiệt độ, dinh dưỡng, nước tưới) (Zhang và nnk., 2013; Shang và nnk., 2014; Zhou và nnk., 2016; Ma và nnk., 2023). Ví dụ, một số giống dưa leo sẽ tăng sinh tổng hợp cucurbitacin C khi được trồng trong điều kiện nhiệt độ lạnh (Chen, 2015). Cucurbitacins là một nhóm hợp chất thuộc họ triterpenoids được tìm thấy tự nhiên trong nhiều loại cây thuộc họ Cucurbitaceae, bao gồm cả cây dưa leo (Fan và nnk., 2024). Trong số các hợp chất gây đắng này (ví dụ như cucurbitacins B, C hay E), cucurbitacin C được tìm thấy nhiều nhất ở dưa leo (Kano và Goto, 2003). Ở mô lá và trái dưa leo, cucurbitacin C được sinh tổng hợp từ một hợp chất ở hạ nguồn của con đường mevalonate (cụ thể là 2,3-oxidosqualene), trải qua nhiều bước chuyển hóa dưới sự xúc tác của các enzyme khác nhau (hình 1) (Ma và nnk., 2022; Shang và nnk., 2014).



Hình 1. Con đường sinh tổng hợp cucurbitacin C trong dưa leo

Mặc dù cucurbitacin C gây ra vị đắng không mong muốn trong trái dưa leo, nhưng trong một số trường hợp thì chất này có lợi cho việc hỗ trợ điều trị một số vấn đề sức khỏe ở con người như chống ung thư, chống viêm, ứng dụng làm các thuốc nhuận tràng hay chống các vi khuẩn có hại (Everts, 2016). Việc tìm ra và xác định chính xác các gen gây đắng ở dưa leo có thể đem lại nhiều lợi ích cho việc chọn tạo giống và trồng trọt loại cây này. Ví dụ như việc lai tạo nhằm phát triển giống dưa leo mới có nhiều đặc tính sinh trưởng tốt, hàm lượng dinh dưỡng cao và không bị đắng. Trên thế giới, các nghiên cứu tìm hiểu thông tin và chức năng của các gen gây đắng ở một vài giống dưa leo đã được thực hiện và công bố. Tuy nhiên, việc nghiên cứu thông tin, đặc điểm trình tự và chức năng cụ thể của các gen gây đắng ở các giống dưa leo đang được trồng ở Việt Nam còn khá khiêm tốn (thậm chí có thể nói là chưa có nghiên cứu nào cụ thể được công bố về vấn đề này).

Việc nghiên cứu lai tạo để loại bỏ đặc điểm trái có vị đắng chiếm vai trò quan trọng trong chọn giống ở dưa leo. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu xác định được thông tin trình tự và chức năng của một vài gen liên quan con đường sinh tổng hợp chất gây đắng ở cây dưa leo (trong đề tài này, chúng tôi tạm gọi là các gen gây đắng ở dưa leo). Ở Việt Nam, nghiên cứu phân tích đặc điểm di truyền giống dưa leo Dương Thành cho thấy tính trạng đắng ở dưa leo được quy định bởi một gen trội (Nguyễn Trường Giang và nnk., 2021). Tuy vậy, hiện trạng vẫn chưa có nghiên cứu nào đi sâu khảo sát trình tự những gen gây đắng ở các giống dưa leo trồng tại Việt Nam. Việc tìm hiểu rõ và chính xác trình tự các gen gây đắng ở dưa leo có ý nghĩa quan trọng cho công tác phát triển các marker DNA ứng dụng trong chọn tạo giống dưa leo hiệu quả và kinh tế hơn. Nhằm mục tiêu sàng lọc và thu thập thông tin các gen gây đắng ở dưa leo đã được công bố trước đây, các công bố khoa học có nội dung liên quan đến hướng nghiên cứu của đề tài được tập hợp và tìm hiểu. Từ những thông tin nghiên cứu này, các gen gây đắng sẽ được ghi nhận và tập hợp từ các cơ sở dữ liệu DNA trên toàn cầu. Tiếp theo, các gen có trình tự hoàn chỉnh sẽ được sử dụng để thiết kế các cặp mồi PCR khuếch đại toàn bộ vùng DNA (bao gồm mã mở đầu và kết thúc). Hơn nữa, các cặp mồi được kiểm tra tính khả dụng cũng như độ đặc hiệu dựa trên các công cụ phân tích trên máy tính.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Khảo sát *in silico* thông tin trình tự các gen gây đắng ở dưa leo

Tìm kiếm và thu thập thông tin chi tiết về các công bố khoa học liên quan đến hướng nghiên cứu của đề tài. Tập trung vào các công bố liên quan đến con đường sinh tổng hợp chất gây đắng (cucurbitacin C) ở cây dưa leo.

Từ những thông tin thu thập được bao gồm tên gen, mã số và chức năng, tiến hành tra cứu và khảo sát trên nhiều cơ sở dữ liệu DNA khác nhau như Genbank - NCBI, Cucurbit Genomics Database (CuGenDB) và Phytozome để tìm kiếm và thu thập trình tự DNA của các gen này.

2.2. Thiết kế bộ mồi PCR cho các gen gây đắng và kiểm tra tính khả dụng cũng như độ đặc hiệu của chúng (*in silico*)

Sử dụng thông tin trình tự DNA của các gen gây đắng thu thập được từ nội dung trên, nhóm nghiên cứu tiến hành thiết kế các mồi PCR nhằm khuếch đại toàn bộ vùng mã hóa của từng gen.

Tính khả dụng của các mồi PCR cho từng gen được đánh giá dựa trên các tiêu chí bao gồm: (1) chiều dài từ 18-24 nucleotides; (2) nhiệt độ nóng chảy của từng mồi (T_m) trong khoảng 50-65°C và giữa hai mồi trong một cặp không chênh lệch quá 5°C; (3) %GC trong khoảng từ 45-55%; và (4) không có hiện tượng hình thành cấu trúc thứ cấp như việc tự bắt cặp hay bắt cặp chéo giữa hai mồi trong một cặp. Công cụ “Multiple Primer Analyzer” của hãng Thermo Fisher Scientific được sử dụng để kiểm tra các thông số nêu trên.

Tiếp theo, các mồi PCR được kiểm tra độ đặc hiệu bằng công cụ BLAST của Phytozome. Từng mồi PCR sẽ được BLAST lên bộ gen dưa leo thuộc cơ sở dữ liệu Phytozome, mồi được đánh giá đặc hiệu khi chỉ bắt (match) với đúng một vị trí trên bộ gen loài cây này.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Khảo sát *in silico* thông tin trình tự các gen gây đắng ở dưa leo

Cucurbitacins là một nhóm các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học gây ra vị đắng ở lá và trái của nhiều loài thực vật thuộc họ bầu bí như bí xanh, khổ qua và dưa leo. Trong con đường sinh tổng hợp cucurbitacin C ở dưa leo, bước chuyển hóa đầu nguồn từ 2,3-oxidosqualene sang cucurbitadienol được xúc tác bởi enzyme CsBi (hình 1). Một vài nghiên cứu trước đây đã xác định được một gen mã hóa cho enzyme này (Shang và nnk., 2014; Zhou và nnk., 2016). Bước tiếp theo được xúc tác bởi nhóm enzyme CYP (Cs540/Cs890) được mã hóa bởi hai gen tương ứng. Ngoài ra, các kết quả phân tích trình tự toàn bộ gen dưa leo cho thấy còn có bảy gen *CYPs* khác có trình tự

tương đồng cao với *Cs540/Cs890* cũng được chúng tôi liệt kê trong bảng 1. Dựa trên các công bố trước đây, nhóm nghiên cứu tiếp tục thu thập thông tin các gen mã hóa cho các enzyme chủ chốt khác (*Cs160* và *CsACT*) trong con đường sinh tổng hợp cucurbitacin C và trình bày chi tiết trong bảng 1. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Shang và nnk. (2014) cũng phát hiện ra hai gen mã hóa cho hai yếu tố điều hòa phiên mã (*CsBl* và *CsBt*) đóng vai trò quan trọng trong điều hòa biểu hiện các gen mã hóa enzyme tham gia quá trình sinh tổng hợp cucurbitacin C ở hai cơ quan lá và trái của dưa leo (Shang và nnk., 2014). Thông tin của hai gen này cũng được nhóm nghiên cứu liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp cucurbitacin C ở dưa leo

STT	Tên gen	Mã ID của gen	Chức năng	Tài liệu tham khảo
1	<i>Cucumis sativus</i> Bitterness (<i>CsBi</i>)	Csa6G088690 (CuGenDB)	Mã hóa cho enzyme <i>CsBi</i> xúc tác phản ứng sinh tổng hợp cucurbitadienol từ 2,3-oxidosqualene	Shang và nnk., 2014; Zhou và nnk., 2016
2	<i>CYP88A60.1</i> (<i>Cs540</i>)	Csa3G903540 (CuGenDB)	Mã hóa cho enzyme <i>Cs540</i> xúc tác phản ứng sinh tổng hợp 19-hydroxy-cucurbitadienol từ cucurbitadienol	
3	<i>CYP87D20</i> (<i>Cs890</i>)	Csa1G044890 (CuGenDB)	Mã hóa cho enzyme <i>Cs890</i> xúc tác phản ứng sinh tổng hợp 19-hydroxy-cucurbitadienol từ cucurbitadienol	
4	<i>CYP712D8</i> (<i>Cs490</i>)	Csa3G698490 (CuGenDB)		
5	<i>CYP88A60.2</i> (<i>Cs510</i>)	Csa3G903510 (CuGenDB)		
6	<i>CYP88A60.3</i> (<i>Cs530</i>)	Csa3G903530 (CuGenDB)	Các phân tích trình tự <i>in silico</i> dự đoán các gen này mã hóa cho các enzyme có thể cùng nhóm chức năng với <i>Cs540</i> và <i>Cs890</i> , nhưng chưa được chứng minh bằng thực nghiệm	
7	<i>CYP88L3</i> (<i>Cs550</i>)	Csa3G903550 (CuGenDB)		
8	<i>CYP88L4</i> (<i>Cs560</i>)	Csa3G903560 (CuGenDB)		
9	<i>CYP87D19</i> (<i>Cs710</i>)	Csa6G088710 (CuGenDB)		
10	<i>CYP81Q58</i> (<i>Cs160</i>)	Csa6G088160 (CuGenDB)	Mã hóa cho enzyme <i>Cs160</i> xúc tác phản ứng sinh tổng hợp 19,25-dihydroxy-cucurbitadienol từ 19-hydroxy-cucurbitadienol	
11	<i>CYP89A140</i> (<i>Cs170</i>)	Csa6G088170 (CuGenDB)	Các phân tích trình tự <i>in silico</i> dự đoán các gen này mã hóa cho các enzyme có thể cùng nhóm chức năng với <i>Cs160</i> , nhưng chưa được chứng minh bằng thực nghiệm	
12	<i>CYP81Q59</i> (<i>Cs180</i>)	Csa6G088180 (CuGenDB)		
13	<i>Cucumis sativus</i> Acetyltransferase (<i>CsACT</i>)	Csa6G088700 (CuGenDB)	Mã hóa cho enzyme <i>CsACT</i> xúc tác phản ứng sinh tổng hợp Cucurbitacin C từ Deacetyl cucurbitacin C	
14	<i>Cucumis sativus</i> Bitter leaf (<i>CsBl</i>)	Csa5G156220 (CuGenDB)	Mã hóa cho yếu tố điều hòa phiên mã (transcription factor) có vai trò kiểm soát sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp Cucurbitacin C ở lá dưa leo	
15	<i>Cucumis sativus</i> Bitter fruit (<i>CsBt</i>)	Csa5G157230 (CuGenDB)	Mã hóa cho yếu tố điều hòa phiên mã (transcription factor) có vai trò kiểm soát sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp Cucurbitacin C ở trái dưa leo	

Từ những thông tin thu thập được (bảng 1), nhóm nghiên cứu tiếp tục khảo sát các cơ sở dữ liệu khác nhau như NCBI, Phytozome và CuGenDB nhằm thu thập các trình tự hiện có của 15 gen này một cách đầy đủ nhất. Dưới đây là bảng 2 trình bày thông tin về hiện trạng trình tự DNA của các gen liên quan đến sinh tổng hợp cucurbitacin C ở dưa leo.

Trong số 15 gen này, hiện vẫn còn năm gen có thông tin trình tự chưa được hoàn chỉnh bao gồm các gen *CYP88A60.2*, *CYP88A60.3*, *CYP88L4*, *CYP81Q59* và *CsBt* (lần lượt có số thứ tự 5, 6, 8, 12 và 15 trong bảng 1 và 2). Gen *CYP88A60.2* (số 5) đã xác định được mã mở đầu nhưng không rõ vị trí của mã kết thúc (bảng 2 và phụ lục 1). Bên cạnh đó, vùng thượng nguồn của gen này vẫn còn chứa các nucleotide chưa xác định rõ (nên được ký hiệu bằng ký tự "N") (bảng 2 và phụ lục 1). Ký tự "N" thường được sử dụng để biểu thị cho một trong bốn loại nucleotide bao gồm: adenine (A), cytosine (C), thymine (T) hoặc guanine (G). Gen *CYP88A60.3* (số 6) hiện vẫn chưa có trình tự hoàn chỉnh và thống nhất giữa các cơ sở dữ liệu (bảng 2 và phụ lục 1). Gen *CYP88L4* (số 8) hiện vẫn chưa xác định được vị trí của mã mở đầu trong trình tự của gen (bảng 2 và phụ lục 1). Gen *CYP81Q59* (số 12) chưa xác định được vị trí mã mở đầu và mã kết thúc (bảng 2 và phụ lục 1). Gen *CsBt* (số 15) đã cho thấy mã mở đầu nhưng mã kết thúc vẫn chưa xác định được (bảng 2 và phụ lục 1). Các thông tin này sẽ góp phần quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo, ví dụ như việc khảo sát, so sánh trình tự các gen này giữa các giống dưa leo khác nhau nhằm hướng đến phát triển các marker DNA liên kết với tính trạng vị đắng ở dưa leo.

Bảng 2. Thông tin về trình tự DNA hiện có của 15 gen mã hóa cho enzyme và yếu tố điều hòa phiên mã tham gia trong con đường sinh tổng hợp cucurbitacin C ở dưa leo

STT	Tên gen	Thông tin hiện trạng trình tự DNA
1	<i>Cucumis sativus Bitterness (CsBi)</i>	Thông tin đầy đủ
2	<i>CYP88A60.1 (Cs540)</i>	Thông tin đầy đủ
3	<i>CYP87D20 (Cs890)</i>	Thông tin đầy đủ
4	<i>CYP712D8 (Cs490)</i>	Thông tin đầy đủ
5	<i>CYP88A60.2 (Cs510)</i>	Thông tin chưa đầy đủ
6	<i>CYP88A60.3 (Cs530)</i>	Thông tin chưa đầy đủ
7	<i>CYP88L3 (Cs550)</i>	Thông tin đầy đủ
8	<i>CYP88L4 (Cs560)</i>	Thông tin chưa đầy đủ
9	<i>CYP87D19 (Cs710)</i>	Thông tin đầy đủ
10	<i>CYP81Q58 (Cs160)</i>	Thông tin đầy đủ
11	<i>CYP89A140 (Cs170)</i>	Thông tin đầy đủ
12	<i>CYP81Q59 (Cs180)</i>	Thông tin chưa đầy đủ
13	<i>Cucumis sativus Acetyltransferase (CsACT)</i>	Thông tin đầy đủ
14	<i>Cucumis sativus Bitter leaf (CsBl)</i>	Thông tin đầy đủ
15	<i>Cucumis sativus Bitter fruit (CsBt)</i>	Thông tin chưa đầy đủ

3.2. Thiết kế bộ môi PCR (DNA primers) cho các gen gây đắng và kiểm tra tính khả dụng cũng như độ đặc hiệu của chúng (in silico)

Nội dung trên đã trình bày chi tiết trình tự DNA của các gen gây đắng ở giống dưa leo được nghiên cứu trước đây trên thế giới, cụ thể là giống dưa Gy14 (Gy14 gynocious inbred line). Dựa trên thông tin trình tự DNA của các gen liệt kê ở nội dung trên, các cặp môi PCR nhằm khuếch đại toàn bộ vùng gen (bao gồm mã mở đầu và kết thúc) được thiết kế. Các cặp môi có thể được ứng dụng trong thực nghiệm nhằm khuếch đại các gen gây đắng ở các giống dưa leo tại Việt Nam. Sản phẩm khuếch đại có thể được sử dụng cho mục đích giải trình tự để tìm hiểu chính xác trình tự các gen này ở những giống dưa leo địa phương. Các cặp môi PCR cho gen gây đắng được thiết kế và trình bày chi tiết ở bảng 3. Sau khi thiết kế, các môi được kiểm tra độ đặc hiệu và tính khả dụng trên máy tính.

Để kiểm tra độ khả dụng *in silico*, các chỉ tiêu như nhiệt độ nóng chảy (T_m), %GC và khả năng hình thành cấu trúc thứ cấp (môi tự bắt cặp và bắt cặp chéo) được khảo sát và trình bày chi tiết ở bảng 3. Kết quả cho thấy tất cả môi đều có nhiệt độ nóng chảy từ trên 54 đến dưới 67°C, sự chênh lệch

Tm giữa 2 môi trong cùng 1 cặp không quá 5°C (bảng 3). Hầu hết các môi đều cho %GC trong khoảng 45-55%, tuy vậy, riêng cặp môi cho gen *CsACT* chỉ thu được %GC khá thấp (36,8 và 33,3% cho môi xuôi và ngược) (bảng 3). Lý do là đặc điểm gen này có quá nhiều nucleotide A/T ở xung quanh 2 đầu của gen nên nhóm nghiên cứu đã rất cố gắng để thiết kế được cặp môi này đảm bảo tiêu chí Tm không quá thấp và không hình thành cấu trúc thứ cấp. Bên cạnh đó, toàn bộ môi đều không tạo cấu trúc thứ cấp như trình bày trong bảng 3.

Về độ đặc hiệu, từng môi PCR được BLAST lên hệ thống cơ sở dữ liệu DNA thực vật Phytozome (bao gồm cả thông tin bộ gen dưa leo), toàn bộ môi thiết kế được chỉ bắt đúng 1 vị trí của gen đích và không có hiện tượng bắt cặp nhầm trên các vị trí khác trong bộ gen (bảng 3). Trong số 15 gen này, hiện vẫn còn năm gen chưa tìm thấy trình tự đầy đủ (đã trình bày ở nội dung trên). Do đó, chúng tôi không tiến hành thiết kế môi cho các gen này. Trong tương lai, nhóm sẽ tiếp tục theo dõi, cập nhật các nghiên cứu từ khắp nơi trên thế giới nhằm thu thập thông tin đầy đủ của gen này.

Bảng 3. Thông tin chi tiết các môi PCR của các gen liên quan đến con đường sinh tổng hợp chất gây đắng ở dưa leo

STT	Tên gen	Trình tự môi (5'-3')	Tm (°C)	%GC	Tự bắt cặp	Bắt cặp chéo	Tính đặc hiệu
1	<i>Cucumis sativus</i> Bitterness (<i>CsBi</i>)	F: GGTTTCGTTACGTGGAAGAAGA	63.3	47.6	Không có	Không có	Đạt
		R: TCTCCTAATCCATGGCCAAAC	65.2	47.6			
2	<i>CYP88A60</i> (<i>Cs540</i>)	F: TAGCAGCCAAATACGTGC R: CCACTCACTTTAGTGACGATAC	59.4 57.3	50.0 45.5	Không có	Không có	Đạt
3	<i>CYP87D20</i> (<i>Cs890</i>)	F: GCCACTCCCATAAAGTCTTC R: GGCCATTAATGAAACCATGC	60.6 64.3	50.0 45.0	Không có	Không có	Đạt
4	<i>CYP712D8</i> (<i>Cs490</i>)	F: CTGGTGACCAATTGGCACTA R: GAGATCCACCACTCTCCA	62.8 57.9	50.0 55.6	Không có	Không có	Đạt
5	<i>CYP88A60</i> (<i>Cs510</i>)	F: R:					
6	<i>CYP88A60</i> (<i>Cs530</i>)	F: R:					
7	<i>CYP88L3</i> (<i>Cs550</i>)	F: GTTGGAGCATGCTAGTTG R: CCTACTGCATCAATCTCTCTC	57.4 58.6	50.0 47.6	Không có	Không có	Đạt
8	<i>CYP88L4</i> (<i>Cs560</i>)	F: R:					
9	<i>CYP87D19</i> (<i>Cs710</i>)	F: CGTGGCCTTTGATAATGTTGC R: GTGTAGGCAAGGATTTGGATAG	66.6 61.7	47.6 45.5	Không có	Không có	Đạt
10	<i>CYP81Q58</i> (<i>Cs160</i>)	F: GCAGCTTAGTAAAGGAGCCG R: GGAAGATGAAGTCTCTTGC	63.3 60.9	55.0 50.0	Không có	Không có	Đạt
11	<i>CYP89A140</i> (<i>Cs170</i>)	F: GAAAGGAAAGGGTGAAAGAG R: GAATGGTGGCATAAACATGG	63.2 63.0	47.6 45.0	Không có	Không có	Đạt
12	<i>CYP81Q59</i> (<i>Cs180</i>)	F: R:					
13	<i>Cucumis sativus</i> Acetyltransferase (<i>CsACT</i>)	F: GGGTTTGTGTTTCATATTC R: GTTATTACAAACAACAGCATC	54.8 54.4	36.8 33.3	Không có	Không có	Đạt
14	<i>Cucumis sativus</i> Bitter leaf (<i>CsBl</i>)	F: GGTTAGATTTACAAACCCTCC R: CACATCAAGGCAATCAACTCG	61.6 65.9	47.6 47.6	Không có	Không có	Đạt
15	<i>Cucumis sativus</i> Bitter fruit (<i>CsBt</i>)	F: R:					

4. Kết luận

Sau quá trình nghiên cứu các công bố trước đây, chúng tôi thu thập được thông tin của 15 gen gây đắng của dưa leo và trình bày chi tiết ở bảng 1. Trong số này, có 10 gen có thông tin trình tự DNA hoàn chỉnh được thu thập từ các cơ sở dữ liệu DNA và trình bày chi tiết ở bảng 2 và phụ lục 1. Bên cạnh đó, năm gen có trình tự chưa hoàn chỉnh cũng được liệt kê trong bảng 2. Dựa trên thông tin trình tự này, các cặp mồi PCR được thiết kế và trình bày ở bảng 3. Các cặp mồi được kiểm tra được nhiệt độ nóng chảy (T_m), %GC, khả năng hình thành cấu trúc thứ cấp (tự bắt cặp và bắt cặp chéo), tính đặc hiệu trên máy tính bằng nhiều công cụ khác nhau. Kết quả kiểm tra *in silico* cho thấy các cặp mồi đều đạt các giá trị về tính khả dụng và độ đặc hiệu tốt. Mặc dù kết quả nghiên cứu này chỉ tạm dừng lại ở mức độ *in silico*, nhưng thông tin về chức năng và trình tự của các gen gây đắng sẽ rất hữu ích cho các đề tài thực nghiệm tiếp theo nhằm xác định chính xác trình tự các gen gây đắng ở các giống dưa leo đang được trồng tại nước ta. Kết hợp việc so sánh và xác định được các điểm khác biệt trong trình tự DNA của các gen gây đắng với kiểu hình lá/trái đắng ở các giống dưa leo khác nhau sẽ góp phần phát triển các marker DNA ứng dụng trong chọn tạo giống dưa leo mới ở Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh tài trợ trong đề tài mã số E2023.10.2 và 1001 (SVNCKH).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bruno, P., Arce, C. C. M., Machado, R. A. R. et al. (2023). Sequestration of cucurbitacins from cucumber plants by *Diabrotica balteata* larvae provides little protection against biological control agents. *Journal of Pest Science*, 96, 1061-1075. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01568-3>
- [2] Chen, X. Y. (2015). Bitter but tasty cucumber. *National Science Review*, 2(2), 129-130. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwv018>
- [3] Everts, S. (2016). Bitterness in wild cucumber, melon, and watermelon. *Chemical & Engineering News*, 94(48). <https://cen.acs.org/articles/94/48/Bitterness-wild-cucumber-melon-watermelon.html>
- [4] Fan, X., Johanningsmeier, S. D., Schultheis, J., Starke, K., Osborne, J. A., Collins, M. (2024). Quantification of cucurbitacin C in bitter cucumber and its reduction by fermentation and acidification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 129, 106065. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106065>
- [5] Huang, S., Li, R., Zhang, Z., et al. (2009). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, 41, 1275-1281. <https://doi.org/10.1038/ng.475>
- [6] Kano, Y., Goto, H. (2003). Relationship between the occurrence of bitter fruit in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and the contents of total nitrogen, amino acid nitrogen, protein and HMG-CoA reductase activity. *Scientia Horticulturae*, 98(1), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00223-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00223-6)
- [7] Ma, L., Wang, Q., Zheng, Y., Guo, J., Yuan, S., Fu, A., Bai, C., Zhao, X., Zheng, S., Wen, C., Guo, S., Gao, L., Grierson, D., Zuo, J., Xu, Y. (2022). Cucurbitaceae genome evolution, gene function and molecular breeding. *Horticulture Research*, 9, uhab057. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab057>
- [8] Ma, Y., Li, D., Zhong, Y., Wang, X., Li, L., Osbourn, A., Lucas, W. J., Huang, S., Shang, Y. (2023). Vacuolar MATE/DTX protein-mediated cucurbitacin C transport is co-regulated with bitterness biosynthesis in cucumber. *New Phytologist*, 238, 995-1003. <https://doi.org/10.1111/nph.18786>
- [9] Nguyễn Trường Giang, Vũ Văn Khuê, Lý Nữ Cẩm Duyên, Lê Đức Dũng (2021). Phân tích di truyền một số tính trạng chất lượng của giống dưa chuột địa phương Dương Thành. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 05(126), 24-28.
- [10] Shang, Y., Ma, Y., Zhou, Y., Zhang, H., Duan, L., Chen, H., Zeng, J., Zhou, Q., Wang, S., Gu, W., Liu, M., Ren, J., Gu, X., Zhang, S., Wang, Y., Yasukawa, K., Bouwmeester, H. J., Qi, X., Zhang, Z., Lucas, W. J., Huang, S. (2014). Plant science. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, 346, 1084-1088. <https://doi.org/10.1126/science>

- [11] Venkatesh, J., Song, K., Lee, J. H., Kwon, J K., Kang, B. C. (2018). Development of *Bi* gene-based SNP markers for genotyping for bitter-free cucumber lines. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59, 231-238. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0029-8>
- [12] Wóycicki, R., Witkowicz, J., Gawroński, P., et al. (2011). The genome sequence of the North-European cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. *PLOS ONE*, 6, e22728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022728>
- [13] Yang, L., Koo, D. H., Li, Y., Zhang, X., Luan, F., Havey, M. J., Jiang, J., Weng, Y. (2012). Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high-density genetic mapping and draft genome assembly. *Plant Journal*, 71, 895-906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05017.x>
- [14] Zhang, S., Miao, H., Sun, R., Wang, X., Huang, S., Wehner, T. C., Gu, X. (2013). Localization of a new gene for bitterness in cucumber. *Journal of Heredity*, 104, 134-139. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess075>
- [15] Zhou, Y., Ma, Y., Zeng, J., Duan, L., Xue, X., Wang, H., Lin, T., Liu, Z., Zeng, K., Zhong, Y., Zhang, S., Hu, Q., Liu, M., Zhang, H., Reed, J., Moses, T., Liu, X., Huang, P., Qing, Z., Liu, X., Tu, P., Kuang, H., Zhang, Z., Osbourn, A., Ro, D. K., Shang, Y., Huang, S. (2016). Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae. *Nature Plants*, 2, 16183. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.183>.
- [16] <https://www.thermofisher.com/vn/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>.