



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.107

ĐỊNH DANH TỎI LÝ SƠN (*Allium sativum* L.) DỰA VÀO CÁC ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CỦ VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Nguyễn Minh Lý*, Mai Xuân Cường và Đinh Thị Thùy Trinh

Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

Người chịu trách nhiệm chính về bài viết: Nguyễn Minh Lý (email: nmly@ued.udn.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/01/2019

Ngày nhận bài sửa: 26/02/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

Title:

Identification of Ly Son garlic (*Allium sativum* L.) using morphological characteristics of bulbs and molecular markers

Từ khóa:

Cấu trúc củ tỏi, chỉ thị phân tử, định danh, hình thái củ tỏi, tỏi Lý Sơn

Keywords:

Ly Son garlic, identification, molecular marker, morphological characteristics of garlic bulbs, structure of garlic bulbs.

ABSTRACT

The study was carried out to identify the brand of Ly Son garlic (*Allium sativum* L.) in Quang Ngai province by using morphological characteristics of bulbs and molecular markers. Six garlic accessions were collected from local farms and supermarkets including Ly Son, Phan Rang, Khanh Hoa, Lam Dong and Hai Duong and China. A total of 10 morphological and structural characteristics of garlic bulbs and 5 markers has been evaluated. The results showed that Ly Son garlic was distinct from garlic of Hai Duong, Lam Dong and China based on the color of bulb skin, bulb diameter, root zone diameter. However, there were many similar characteristics between Ly Son bulb garlic and Phan Rang, Khanh Hoa garlic. Therefore, it was necessary to evaluate the number of cloves per bulb, bulb diameter and root zone diameter. Ly Son garlic had 19.8 ± 3.7 cloves; bulb diameter - 2.79 ± 0.2 cm; root zone diameter - 1.11 ± 0.09 cm. The cpSSR and cpSTR markers designed in the present study only allow distinguishing between Ly Son garlic and Phan Rang, Lam Dong, Khanh Hoa, Chinese garlic. Application of molecular markers confirmed the genetic homogeneity of Ly Son and Khanh Hoa garlic.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm góp phần định danh chính xác thương hiệu tỏi Lý Sơn, tỉnh Quảng Ngãi thông qua các đặc điểm hình thái củ và chỉ thị phân tử. Sáu loại tỏi đã được thu thập từ các địa phương trồng tỏi và các siêu thị có nguồn gốc rõ ràng bao gồm: Lý Sơn - Quảng Ngãi, Phan Rang - Ninh Thuận, Khánh Hòa, Đà Lạt - Lâm Đồng, Hải Dương và Trung Quốc. Đã có tổng số 10 đặc điểm hình thái và cấu trúc của tỏi được đánh giá và 5 chỉ thị phân tử được sử dụng. Theo kết quả nghiên cứu, tỏi Lý Sơn dễ dàng được phân biệt với tỏi Hải Dương, Lâm Đồng và Trung Quốc dựa vào màu sắc vỏ lụa, đường kính củ, đường kính vùng rễ. Để phân biệt được tỏi Lý Sơn với tỏi Phan Rang và Khánh Hòa cần thông qua số lượng tép, đường kính củ và đường kính rễ. Số lượng tép của tỏi Lý Sơn là $19,8 \pm 3,7$ tép; đường kính củ - $2,79 \pm 0,2$ cm; đường kính vùng rễ - $1,11 \pm 0,09$ cm. Các chỉ thị cpSSR và cpSTR được thiết kế trong nghiên cứu chỉ cho phép phân biệt tỏi Lý Sơn với tỏi Phan Rang, Lâm Đồng, Khánh Hòa, Trung Quốc. Thông qua các chỉ thị phân tử cũng có thể khẳng định sự đồng nhất về mặt di truyền giữa tỏi Lý Sơn và tỏi Khánh Hòa.

Trích dẫn: Nguyễn Minh Lý, Mai Xuân Cường và Đinh Thị Thùy Trinh, 2019. Định danh tỏi Lý Sơn (*Allium sativum* L.) dựa vào các đặc điểm hình thái củ và chỉ thị phân tử. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 45-52.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỏi (*Allium sativum* L.) là một trong những loại cây nông nghiệp quan trọng có giá trị dinh dưỡng, dược liệu và kinh tế cao. Tỏi thường được sử dụng rất phổ biến như loại gia vị để chế biến các món ăn khác nhau. Bên cạnh đó, tỏi cũng được dùng làm nguyên liệu để sản xuất các loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao như tỏi đen lên men, nước ép tỏi. Sản phẩm từ tỏi lên men thành tỏi đen cũng là nguồn dược liệu quý hiếm trong việc điều trị các bệnh huyết áp cao và các bệnh về tim mạch, phòng ngừa hỗ trợ tiểu đường, ngăn ngừa sự phát triển của các tế bào ung thư (Kim *et al.*, 2012). Tỏi có khả năng thích nghi tốt với nhiều điều kiện sinh thái khác nhau, và được trồng ở rất nhiều nước trên thế giới. Trong đó, những nước đứng đầu về sản lượng tỏi là Trung Quốc, Ấn Độ và Hàn Quốc (Diriba - Shiferaw, 2016). Tại Việt Nam, loại cây này được trồng hầu hết ở các tỉnh thành, trong đó một số địa điểm nổi tiếng như Lý Sơn - Quảng Ngãi, Hải Dương, Lâm Đồng, Khánh Hòa, Phan Rang,... Đặc biệt, trong số các loại tỏi của Việt Nam thì thương hiệu tỏi Lý Sơn được đánh giá là có giá trị kinh tế cao và đã được nhà nước công nhận thương hiệu tỏi quốc gia vào năm 2009.

Theo số liệu báo cáo của UBND huyện Lý Sơn năm 2018, diện tích trồng tỏi trên đảo Lý Sơn hiện nay đạt 326,5 ha với năng suất 83,7 tạ/ha, sản lượng 2731,6 tấn. Tại đây, mỗi năm chỉ canh tác được một vụ tỏi, thời gian bắt đầu xuống giống vào khoảng giữa tháng 9 âm lịch và thu hoạch xong vào khoảng cuối tháng 2 năm sau. Tỏi Lý Sơn là một trong số những giống tỏi có giá trị kinh tế cao, giá tỏi thường dao động từ 40.000 – 50.000 đồng/kg. Tổng giá trị sản xuất tỏi chiếm đến khoảng 60% giá trị nông nghiệp của cả huyện đảo Lý Sơn, vì vậy việc nghiên cứu phát triển nghề trồng tỏi được hết sức quan tâm và chú trọng tại đây. Năm 2009, Hồ Huy Cường đã thực hiện đề tài nghiên cứu với mục đích khôi phục giống tỏi có năng suất cao, sinh trưởng và phát triển tốt trong các điều kiện khắc nghiệt của địa phương, giúp nâng cao đời sống của người dân trồng tỏi ở huyện đảo Lý Sơn.

Tuy nhiên, hiện nay thương hiệu tỏi Lý Sơn đang phải đối mặt với nhiều thách thức, cụ thể như kỹ thuật canh tác còn chưa được hoàn thiện, năng suất và chất lượng tỏi còn phụ thuộc nhiều vào yếu tố tự nhiên (khí hậu, thổ nhưỡng), chưa có những nghiên cứu sâu về đặc điểm di truyền, thành phần và hàm lượng các hoạt chất của loại tỏi này, nguồn giống tỏi Lý Sơn chưa được đảm bảo ổn định. Đặc biệt, trên thị trường xuất hiện nhiều loại tỏi có xuất xứ và nguồn gốc khác nhau nhưng mang những đặc điểm

hình thái củ tương đồng như tỏi Lý Sơn, dẫn đến sự xuất hiện của tỏi Lý Sơn giả.

Việc phân biệt tỏi Lý Sơn với một số loại tỏi khác trên thị trường là điều hết sức khó khăn và chưa có bất kỳ một nghiên cứu cụ thể và cơ sở khoa học nào. Điều này đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc bảo vệ thương hiệu tỏi Lý Sơn bản địa và niềm tin của người tiêu dùng.

Để định danh tỏi có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau như hình thái, hóa sinh, tế bào học, sinh học phân tử (Anwar *et al.*, 2018). Trong số những phương pháp kể trên, phương pháp định danh tỏi qua các đặc điểm hình thái củ với ưu điểm dễ dàng tiếp cận và nghiên cứu, dễ quan sát, không đòi hỏi thiết bị đặc biệt hay quy trình phức tạp, cho phép sử dụng nó một cách rộng rãi, được tiến hành trực tiếp tại hiện trường.

Bên cạnh đó, trong những năm gần đây để tăng độ chính xác và tin cậy của việc định danh sản phẩm nông nghiệp, có thể sử dụng công cụ chỉ thị phân tử (Kesawat and Das, 2009). Trong đó, chỉ thị SSR (simple sequence repeats) được sử dụng tương đối rộng rãi vì tính phổ biến của nó trong hệ gen, khả năng lặp lại kết quả và mức độ đa hình cao, tính chất di truyền đồng trội (Hanci and Gokce, 2016). Đối với tỏi, trong những năm gần đây, việc phân loại, đánh giá nguồn gen và tính đặc trưng của giống ở cấp độ phân tử đã được tiến hành bằng các chỉ thị SSR trong nhiều nghiên cứu (Chung and Staub, 2003; Cunha *et al.*, 2012; Sabir *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018).

Từ những cơ sở trên, nghiên cứu này đã được tiến hành với mục tiêu đề xuất được phương pháp định danh tỏi Lý Sơn hiệu quả trên thị trường dựa trên đặc điểm hình thái củ và đặc điểm di truyền của tỏi Lý Sơn bằng chỉ thị phân tử cpSSR (chloroplast simple sequence repeats) và cpSTR (chloroplast short tandem repeats). Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu cũng có thể là cơ sở phục vụ cho các nghiên cứu chọn tạo giống tỏi Lý Sơn.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là các củ tỏi được thu thập trực tiếp từ các vùng chuyên canh gồm có tỏi Lý Sơn - Quảng Ngãi (Tọa độ: N15°23'0.0996" E 109°6'38.5596"), Đà Lạt - Lâm Đồng (Tọa độ: N 11°44'3.408" E 108°25'24.2652"), Khánh Hòa (Tọa độ: N 12°34'33.1392" E 109°9'5.3892") và Phan Rang - Ninh Thuận (Tọa độ: N 11°35'28.014" E 109°1'29.5212"). Ngoài ra, trong nghiên cứu còn sử dụng các loại tỏi Hải Dương, tỏi Trung Quốc được thu thập từ siêu thị Mega market Đà Nẵng có nguồn gốc rõ ràng. Đối với mỗi loại tỏi, chọn ra ngẫu nhiên

35 củ đại diện để tiến hành đánh giá đặc điểm hình thái và di truyền bằng chỉ thị phân tử.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Đánh giá đặc điểm hình thái củ tỏi

Các tính trạng hình thái bên ngoài củ tỏi được quan sát bao gồm màu sắc vỏ lụa, hình dạng đáy củ, kích thước đường kính củ (ĐKC), đường kính vùng rễ (ĐKVR), tỷ lệ ĐKC/ĐKVR (Hồ Huy Cường, 2009; Wang *et al.*, 2014). Các kích thước củ được đo bằng thước kẹp panme.

Các tính trạng cấu trúc củ tỏi được xác định bao gồm độ chặt của tép tỏi, sự tồn tại thân gỗ cứng bên trong củ, số lượng tép trong củ, số lớp tép, màu sắc vỏ lụa của tép tỏi bên trong, hình dạng củ tỏi. Bên cạnh đó, cũng tiến hành giải phẫu củ tỏi theo chiều ngang để quan sát cấu trúc bên trong, hình dạng mặt cắt ngang và độ đồng đều củ tỏi (Hồ Huy Cường, 2009; Kumar, 2015).

2.2.2 Đánh giá đặc điểm di truyền các giống tỏi bằng chỉ thị phân tử

Tách chiết DNA, phản ứng PCR, điện di

Tách chiết DNA tổng số được tiến hành theo phương pháp CTAB có cải tiến từ các mẫu lá tỏi sau khi ương tại Trại thực nghiệm thuộc Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng năm 2018 (Doyle and Doyle, 1990). DNA được tách chiết từ các cá thể tỏi riêng lẻ của mỗi loại. Sau đó được trộn lại và tạo thành một hỗn hợp DNA đại diện cho từng loại tỏi theo phương pháp BSA (Bulked segregant analysis) (Michelmore *et al.*, 1991).

Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích mỗi phản ứng là 20 µl, bao gồm Master mix PCR 1X (Phu Sa Biochem); 1,0 pmol mỗi đoạn mỗi xuôi và ngược; 0,125 đơn vị *Taq* polymerase và 40 ng DNA tổng số. Quá trình nhân bản được tiến hành trên máy ESCO Aeris - BG096 theo chu trình nhiệt sau: (1) Biến tính ban đầu: 95°C trong 5 phút; (2) Biến tính: 94°C trong 30 giây, (3) Bắt cặp: nhiệt độ tùy thuộc vào từng cặp môi trong 30 giây; (4) Kéo dài: 72°C trong 30 giây; (5) Lặp lại (2) đến (4) 35 chu kỳ; (6) Phản ứng kết thúc hoàn toàn: 72°C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C cho đến khi điện di. Sản phẩm PCR được nhuộm bằng RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution và điện di trên 1,0% agarose gel trong dung dịch đệm TAE trên bộ điện di Mupid-One (Takara, Nhật Bản). Chụp ảnh trên máy soi gel Clear View UV Transilluminator (Clever Scientific).

Thiết kế các đoạn mồi cpSSR và cpSTR

Các đoạn mồi cpSSR và cpSTR được thiết kế dựa trên hệ gen lục lạp của tỏi KX683282.1 từ

Genbank. Trình tự các đoạn lặp lại đơn (SSR) với số lần lặp tối thiểu là 5 lần đối với dinucleotide (DNR) và trinucleotide (TNR) và lặp lại cho tetranucleotide được xác định bằng phần mềm trực tuyến SSRIT (simple sequence repeat identification tool) (Temnykh *et al.*, 2001). Trình tự lặp lại ngắn liền kề (STR) trong hệ gen lục lạp của tỏi được tìm kiếm bằng phần mềm trực tuyến TRF version 4.09 (tandem repeats finder) (Benson, 1999).

Dựa vào vị trí vùng lặp lại đơn (SSR) và vùng lặp lại song song ngắn (STR), tiến hành tìm kiếm và chọn lọc các đoạn mồi cpSSR và cpSTR bằng phần mềm Primer3Plus Version 2.4.2 (Untergasser, 2012).

2.2.3 Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu nghiên cứu hình thái củ tỏi được xử lý bằng phần mềm IBM Statistics SPSS 22. Tukey test được sử dụng để so sánh giá trị trung bình với độ tin cậy 95%. Các giá trị trung bình được xem là khác nhau có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$ (Hoàng Trọng và Chu Nguyễn Mộng Ngọc, 2008).

Kết quả phân tích các loại tỏi bằng chỉ thị SSR được xử lý bằng phần mềm NTSYS PC version 2.1 với hệ số là NEI72, phương pháp clustering SAHN để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các mẫu tỏi (Rohlf, 2000). Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) được tính trên phần mềm PIC Calculator theo công thức (Anderson *et al.*, 1993):

$$PIC(i)=1-\sum P_{ij}^2$$

Trong đó, n là số lượng allele của chỉ thị i, P_{ij} là tần số của allele j đối với chỉ thị i.

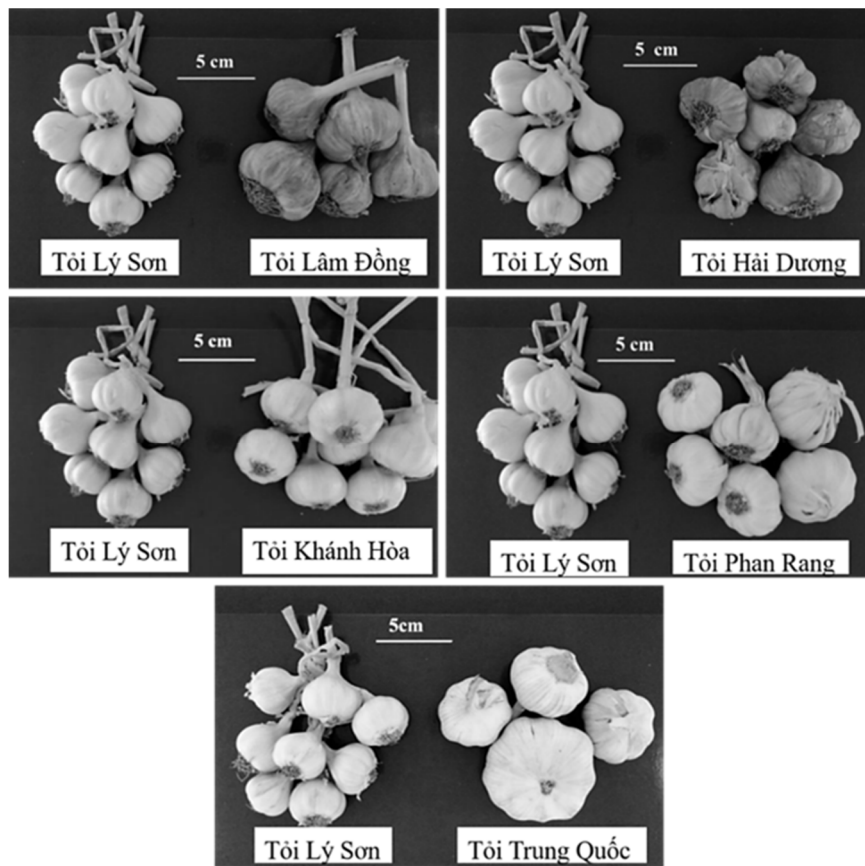
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm hình thái củ của các loại tỏi

3.1.1 Màu sắc vỏ lụa

Kết quả đánh giá màu sắc vỏ lụa củ bên ngoài cho phép chia các loại tỏi thành ba nhóm. Nhóm thứ nhất có màu sắc vỏ lụa bên ngoài màu trắng, gồm tỏi Lý Sơn, tỏi Khánh Hòa, tỏi Phan Rang. Nhóm thứ hai chỉ gồm tỏi Trung Quốc với vỏ lụa màu trắng, nhưng có thêm sắc tố anthocyanin dưới dạng các sọc màu tím chạy theo chiều dọc xung quanh vỏ lụa. Nhóm thứ ba có màu sắc vỏ lụa bên ngoài màu tím (tía) - chứa sắc tố anthocyanin, gồm tỏi Lâm Đồng và tỏi Hải Dương (Hình 1).

Sắc tố anthocyanin tạo ra các màu sắc tự nhiên cho thực vật, trong trường hợp củ tỏi, sắc tố anthocyanin tạo ra màu tía của củ, có chức năng chống oxy hóa và peroxide hóa lipid (Jackman *et al.*, 1987; Fossen and Andersen, 1996).



Hình 1: Màu sắc vỏ lụa của các loại củ tỏi

3.1.2 Đường kính củ và đường kính vùng rễ

Từ số liệu Bảng 1 cho thấy tỏi Trung Quốc, Lâm Đồng và Hải Dương có đường kính củ lớn nhất. Tính trạng này cho phép phân biệt được rõ ràng 3 loại tỏi Lý Sơn, Khánh Hòa và Phan Rang. Trong đó, tỏi Lý Sơn có đường kính củ ($2,79 \pm 0,2$ cm), nhỏ hơn tỏi Khánh Hòa ($3,33 \pm 0,25$ cm) và tỏi Phan Rang ($3,81 \pm 0,15$ cm).

Ngoài ra, kết quả đánh giá đường kính vùng rễ của các loại tỏi cũng cho thấy tính trạng này có thể được sử dụng để định danh tỏi Lý Sơn với các loại tỏi khác, đặc biệt là tỏi Khánh Hòa và Phan Rang. Tỏi Khánh Hòa có nguồn gốc từ tỏi Lý Sơn, vì vậy, sự khác biệt giữa hai loại tỏi này về kích thước củ có thể giải thích là do sự không đồng nhất của điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu giữa hai vùng này tạo nên.

Bảng 1: Đặc điểm bên ngoài của các loại củ tỏi

Loại tỏi	Màu sắc vỏ lụa	Sắc tố anthocyanin	Hình dạng đáy củ	Đường kính củ (ĐKC)(cm)	Đường kính vùng rễ (ĐKVR)(cm)	Tỷ lệ ĐKC/ĐKVR
Hải Dương	Nâu tía	Có	Lồi	$3,51 \pm 0,38^d$	$1,58 \pm 0,1^d$	$2,22 \pm 0,11^b$
Lâm Đồng	Nâu tía	Có	Lồi	$4,31 \pm 0,69^d$	$1,78 \pm 0,09^d$	$2,42 \pm 0,31^b$
Trung Quốc	Trắng tía	Có ít	Bằng	$4,37 \pm 0,29^d$	$2,01 \pm 0,11^c$	$2,17 \pm 0,05^a$
Lý Sơn	Trắng	Không	Bằng	$2,79 \pm 0,2^a$	$1,11 \pm 0,09^a$	$2,52 \pm 0,16^b$
Khánh Hòa	Trắng	Không	Bằng	$3,33 \pm 0,25^b$	$1,33 \pm 0,09^b$	$2,51 \pm 0,14^b$
Phan Rang	Trắng	Không	Bằng	$3,81 \pm 0,15^c$	$1,57 \pm 0,13^c$	$2,44 \pm 0,17^b$

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác giữa các giá trị có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Tại Lý Sơn, nguồn nước ngọt dành cho nông nghiệp rất hạn chế, đây cũng là vấn đề khó khăn lớn nhất trong việc canh tác trồng tỏi của người dân.

Điều này kết hợp với các điều kiện canh tác có sử dụng cát san hô làm cho củ tỏi được trồng ở Lý Sơn trở nên săn chắc, hương vị cay nồng (Hồ Huy Cường, 2009). Mặc dù điều kiện nước tưới ở Khánh

Hòa được đảm bảo hơn, củ tỏi phát triển tốt hơn về kích thước, nhưng hương vị tỏi ở đây nhạt hơn và nhiều nước hơn tỏi Lý Sơn. Tuy có sự khác biệt về đường kính củ và rễ, nhưng tỷ lệ đường kính củ/đường kính rễ không cho thấy sự khác biệt giữa các loại tỏi Việt Nam. Chỉ duy nhất tỏi Trung Quốc có tỉ lệ này nhỏ hơn tỏi Việt Nam. Như vậy, việc sử dụng các đặc điểm đường kính củ và đường kính vùng rễ cho phép phân biệt tỏi Lý Sơn với những loại tỏi khác, bao gồm tỏi Khánh Hòa.

3.1.3 Hình dạng đáy củ

Về hình dạng đáy củ, các loại tỏi được chia thành hai nhóm, nhóm đáy lõm gồm tỏi Hải Dương và Lâm Đồng, nhóm đáy bằng gồm 4 loại tỏi Lý Sơn, Khánh Hòa, Phan Rang, Trung Quốc. Kết quả phân chia này cũng tương đồng với phân tích màu sắc từ vỏ lụa bên ngoài củ tỏi.

3.1.4 Đặc điểm tép tỏi

Kết quả đánh giá số lượng tép trong 1 củ tỏi cho thấy, so với tỏi Khánh Hòa và Phan Rang, tỏi Lý Sơn có số lượng tép ít hơn với $19,8 \pm 3,7$ tép (Bảng 2). Ngoài ra, tỏi Trung Quốc có số lượng tép ít nhất với $10,8 \pm 0,8$ tép. Số lượng tép của tỏi Hải Dương và Lâm Đồng tương đồng với tỏi Lý Sơn. Kết quả này tương tự như một số nghiên cứu trong nước trước đây về số lượng tép của tỏi Lý Sơn (Hồ Huy Cường, 2009).

Các loại tỏi Phan Rang, Lý Sơn và Khánh Hòa có cùng số lớp tép của củ. Các loại củ tỏi này cấu tạo từ 2 lớp tép, lớp bên ngoài gồm các tép to đều,

còn bên trong là các tép nhỏ, chúng xếp đều nhau theo một trật tự nhất định. Trong khi đó, tỏi Hải Dương, Lâm Đồng và Trung Quốc chỉ có 1 lớp tép, gồm các tép xếp xung quanh tâm giữa. Ngoài ra, giữa 2 nhóm tỏi cũng có sự khác biệt về màu sắc vỏ lụa của tép tỏi, màu sắc vỏ lụa củ tỏi.

3.1.5 Mặt cắt ngang củ tỏi

Theo hệ thống phân loại tỏi, khi quan sát mặt cắt ngang của củ tỏi và sự có mặt của thân gỗ cứng nằm ở trung tâm củ, có thể chia các loại tỏi thành hai nhóm chính: *Allium sativum* var *sativum* (tỏi mềm - Softneck) và *Allium sativum* var *ophioscorodon* (tỏi cứng - Hardneck) (Maab and Klaas, 1995). Theo kết quả nghiên cứu, hai loại tỏi Hải Dương và Lâm Đồng thuộc nhóm tỏi cứng còn tỏi Trung Quốc, Lý Sơn, Khánh Hòa và Phan Rang thuộc nhóm tỏi mềm. Theo nghiên cứu của Lee và các cộng tác viên, trong các loại tỏi cứng chứa hàm lượng methiin, alliin và tổng lượng acid amin tự do lớn hơn so với tỏi mềm (Lee et al., 2005).

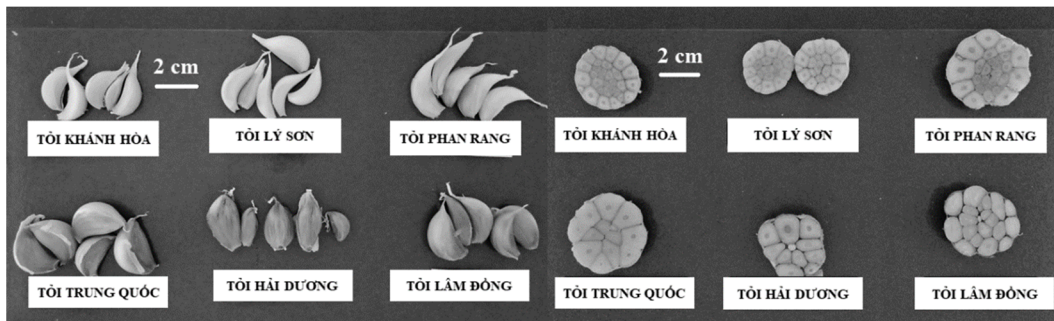
Về hình dạng mặt cắt ngang, tỏi Lý Sơn, Khánh Hòa, Phan Rang, Trung Quốc có hình tròn, tỏi Hải Dương và Lâm Đồng là hình ô van. Kết quả hình dạng mặt cắt được xác định dựa vào tỷ lệ hai đường chéo vuông góc và mức độ đối xứng trục của các củ tỏi (Hình 2).

Căn cứ vào mặt cắt ngang khả năng tách các tép tỏi khỏi củ tỏi, tất cả các loại tỏi Việt Nam trong nghiên cứu này đều có kết cấu chặt (khó tách), chỉ riêng tỏi Trung Quốc là tương đối dễ tách hơn.

Bảng 2: Đặc điểm cấu trúc bên trong của các loại củ tỏi

Loại tỏi	Màu vỏ tép	Thân gỗ cứng bên trong củ	Hình mặt cắt ngang củ	Số tép	Số lớp tép	Độ chặt của tép tỏi
Hải Dương	Tím	Có	Ô van	$15,0^{b \pm 2,2}$	1	Chặt
Lâm Đồng	Tím	Có	Ô van	$19,0^{b \pm 2,3}$	1	Chặt
Trung Quốc	Nâu tím	Không	tròn	$10,8^{a \pm 0,8}$	1	Hơi chặt
Lý Sơn	Trắng	Không	tròn	$19,8^{b \pm 3,7}$	2	Chặt
Khánh Hòa	Trắng	Không	tròn	$24,6^{c \pm 3,5}$	2	Chặt
Phan Rang	Trắng	Không	tròn	$28,1^{c \pm 5,8}$	2	Chặt

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Hình 2: Màu sắc vỏ tép và mặt cắt ngang của củ các loại củ tỏi

3.2 Định danh bằng chỉ thị phân tử

3.2.1 Thiết kế đoạn mồi cpSSR và cpSTR

Kết quả phân tích và chọn lọc các trình tự lặp lại đơn trên hệ gen lục lạp KX683282 của tỏi (*Allium sativum* L.) bằng phần mềm SSRIT cho thấy trong tổng số 153172 nucleotid có 18 trình tự lặp lại 2 nucleotide và không có trình tự lặp lại 3 nucleotide với số lần lặp lại tối thiểu 5 lần. Trong số này, đa số

các trình tự lặp lại nhỏ hơn 10 lần và phổ biến nhất là (AT) và (TA). Từ những trình tự này, đã thiết kế được 2 chỉ thị SSR được sử dụng trong nghiên cứu (Bảng 3). Phần mềm TRF cho phép nhận diện được 38 trình tự lặp lại liên kề với độ dài dao động từ 13 - 30 nucleotide và thiết kế được 3 chỉ thị cpSTR phục vụ cho nghiên cứu. Nhiệt độ bắt cặp của các đoạn mồi dao động trong khoảng từ 57-60°C.

Bảng 3: Trình tự các cặp mồi cpSSR và cpSTR được thiết kế và sử dụng

Chỉ thị phân tử	Trình tự đoạn mồi (5'-3')	Nhiệt độ bắt cặp (°C)
cpSSR1	F: GGATCCCCGCTATTAGCTGT R: CCCTTTTCGAACGAAATCAGAGG	60
cpSSR2	F: TTCGTGGATCGGATCATCGG R: TGTTGATTGCCATTGGGAGAGA	57
cpSTR1	F: CGTTTTGCTCGAACTCCATCA R: TTGGGAAATCCATAGGGCCA	57
cpSTR2	F: CATAGGTCGTTCGATTCGGCA R: TCGTTTCCTTAGGCCACTGG	58
cpSTR3	F: ATAGCGTCTCTGCCCATGAC R: AGTTTCATTAGCTCCCGAGGT	58

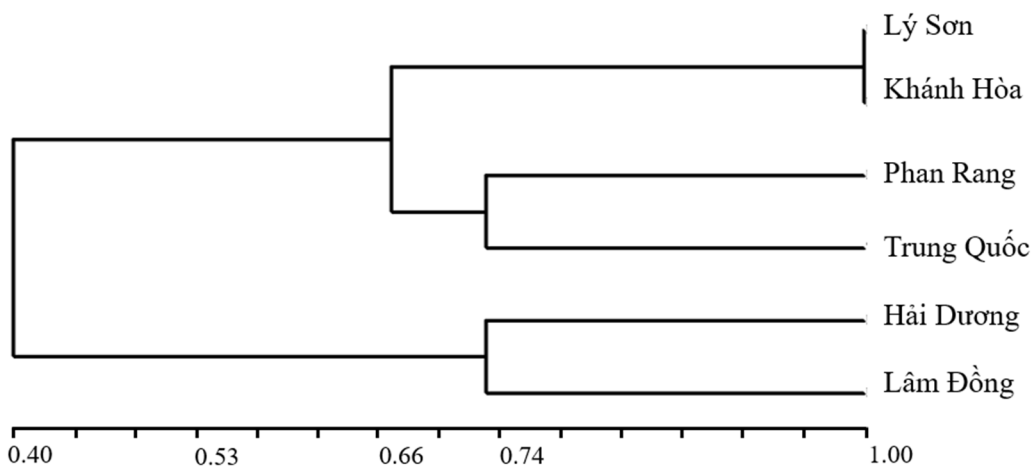
3.2.2 Phân tích tính đa hình bằng các chỉ thị phân tử

Kết quả phân tích các mẫu tỏi bằng các chỉ thị phân tử thiết kế được cho thấy, tất cả các chỉ thị là đa hình, tổng số có 15 allen đa hình và không có allen đơn hình đối với 6 loại tỏi. Trong đó, chỉ thị cpSSR2 thể hiện tính đa hình cao nhất với 5 allen, chiếm 33,33% tổng số allen đa hình; chỉ thị cpSTR2 và cpSSR1 có tính đa hình thấp nhất là 2 allen chiếm tỉ lệ 13,33%.

Giá trị PIC thể hiện tính đa dạng di truyền của các alen trên từng locus, khi giá trị PIC càng lớn thì tính đa hình càng cao và ngược lại, đồng thời tương ứng với khả năng ứng dụng của chỉ thị phân tử trong đánh giá tính đa dạng di truyền (Chen *et al.*, 2014).

Chỉ thị cpSSR2 có giá trị PIC cao nhất là 0,956 và chỉ thị cpSSR1 và cpSTR2 có giá trị PIC thấp nhất đạt 0,722. Các kết quả này cao hơn so với các kết quả đã được công bố trước đây, cụ thể Chen và cộng tác viên (2014) khi nghiên cứu các chỉ thị SSR và ISSR trên tỏi đã thu được giá trị PIC dao động từ 0,65 - 0,80; đối với nghiên cứu của Cunha và cộng tác viên (2012), giá trị này chỉ đạt 0,189 - 0,775. PIC của các chỉ thị cpSSR và cpSTR trong nghiên cứu này đạt giá trị cao và khẳng định hiệu quả của chúng trong đánh giá tính đa dạng di truyền các loài tỏi.

Kết quả xử lý bằng phần mềm NTSYS_PC version 2.1 cho phép xác định hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ mối quan hệ di truyền giữa các loại tỏi (Hình 3).



Hình 3: Sơ đồ mối quan hệ di truyền của các mẫu tỏi

Hệ số tương đồng di truyền từng cặp mẫu dao động từ 0,33 đến 1,0. Trong đó, mẫu tỏi Lý Sơn và Khánh Hòa có hệ số tương đồng tuyệt đối 1,0, điều này đã khẳng định hai giống tỏi có chung một nguồn gốc xuất xứ. Ngoài ra, cũng có thể nhận thấy tỏi Phan Rang và tỏi Trung Quốc có mối quan hệ gần gũi về mặt di truyền và được xếp vào 1 nhóm riêng. Tỏi Hải Dương và Đà Lạt - Lâm Đồng được tách ra một nhóm riêng với hệ số di truyền giữa 2 loại tỏi này là 0,733. Mặc dù vậy, hệ số tương đồng di truyền giữa các nhóm tỏi khá lớn dao động từ 0,33 - 0,73 cho thấy sự đa dạng cao về mặt di truyền giữa các giống tỏi.

Kết quả phân chia các loại tỏi theo chỉ thị phân tử thành 2 nhóm lớn (nhóm 1 – Lâm Đồng, Hải Dương; và nhóm 2 – Lý Sơn, Khánh Hòa, Phan Rang, Trung Quốc) phù hợp với các nhóm tỏi cứng và tỏi mềm dựa trên sự tồn tại của thân trụ ở giữa củ tỏi (Maab and Klaas, 1995).

Như vậy, việc sử dụng các chỉ thị phân tử chỉ có thể cho phép phân biệt tỏi Lý Sơn với tỏi Phan Rang, Lâm Đồng, Trung Quốc và Hải Dương. Hai loại tỏi Lý Sơn và Khánh Hòa không có sự khác biệt về mặt di truyền, vì vậy công cụ sinh học phân tử không thể sử dụng để phân biệt hai loại tỏi này.

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra được mối quan hệ di truyền dựa trên chỉ thị cpSSR và cpSTR giữa các loại tỏi, và mô tả một số đặc điểm hình thái củ của tỏi Lý Sơn cũng như các loại mẫu tỏi khác được thu thập: tỏi Khánh Hòa, Phan Rang, Lâm Đồng, Hải Dương, Trung Quốc.

Phân biệt tỏi Lý Sơn với tỏi Lâm Đồng và tỏi Hải Dương có thể được tiến hành một cách dễ dàng thông qua màu sắc vỏ lụa bên ngoài của củ tỏi.

Tỏi Lý Sơn được nhận diện khác với tỏi Trung Quốc bởi sự kết hợp giữa đường kính củ, và màu sắc vỏ lụa, màu tép tỏi và số lớp tép tỏi. Đường kính củ của tỏi Lý Sơn nhỏ hơn của tỏi Trung Quốc, màu tép của tỏi Lý Sơn là màu trắng, trong khi đó màu tép tỏi Trung Quốc là màu tím.

Định danh tỏi Lý Sơn gặp khó khăn, khi so sánh với tỏi Phan Rang và Khánh Hòa, vì những loại tỏi này có rất nhiều đặc điểm hình thái giống nhau như màu sắc vỏ lụa, hình dạng đáy củ, độ chặt của tép, số lớp tép tỏi. Tuy nhiên, một số đặc điểm về kích thước củ tỏi Lý Sơn như đường kính củ ($2,79 \pm 0,2$ cm), đường kính vùng rễ ($1,11 \pm 0,09$ cm), số lượng tép ($19,8 \pm 3,7$ cm) có giá trị thấp hơn so với tỏi Khánh Hòa và Phan Rang.

Các chỉ thị cpSSR và cpSTR được thiết kế trong nghiên cứu chỉ cho phép phân biệt tỏi Lý Sơn với tỏi

Phan Rang, Lâm Đồng, Khánh Hòa, Trung Quốc. Thông qua các chỉ thị phân tử cũng có thể khẳng định sự đồng nhất về mặt di truyền giữa tỏi Lý Sơn và tỏi Khánh Hòa.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được thực hiện dưới sự tài trợ của Văn phòng hợp tác giữa Hội đồng vật học Frankfurt và Khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anderson, J.A., Churchil, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.O. and Sorrels, M.E., 1993. Optimizing parent selection for genetic linkage maps. *Gemnome*. 36(1): 181-186.
- Anwar, G.M., Farag, F.F. and Desoukey, S.Y., 2018. Characterization of some garlic clones using morphological, cytological, molecular and chemical techniques. *J. Adv. Biomed. & Pharm. Sci.* 1: 50-55.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acid Research*. 27(2): 573-580.
- Chen, S.X., Chen, F.X., Shen, X.Q., Yang, Y.T., Liu, Y. and Meng, H.W., 2014. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits. *Biochemical Systematics and Ecology*. 55: 260-267.
- Chung, S.M., and Staub, J.E., 2003. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theoretical and Applied Genetics*. 107(4): 757-767.
- Cunha, C.P., Hoogerheide, E.S., Zucchi, M.I., Monterio, M. and Pinheiro, J.B., 2012. New microsatellite marker for garlic, *Allium sativum* (Alliaceae). *American Journal of Botany*. 99(1): e17-9.
- Diriba-Shiferaw, G., 2016. Review of management strategies of constraints in garlic (*Allium sativum* L.) production. *Journal of Agricultural Sciences-Srilanka*. 11(3): 186-207.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12(1): 13-15.
- Fossen, T. and Andersen, O.M., 1996. Malonated anthocyanins of garlic *Allium sativum* L. *Food chemistry*. 58(3): 215-217.
- Hanci, F. and Gokce, F., 2016. Molecular Characterization of Turkish Onion Germplasm Using SSR Markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 52(2): 71-76.
- Hoàng Trọng và Chu Nguyễn Mộng Ngọc, 2008. Phân tích dữ liệu nghiên cứu với SPSS Tập 2. NXB Hồng Đức. TP. HCM, 295 trang.

- Hồ Huy Cường, 2009. Nghiên cứu phục tráng giống tỏi ở Lý Sơn. Đề tài cấp tỉnh Quảng Ngãi. Mã số 05/2009/HĐ-ĐTKHCN.
- Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A. and Speers, R.A., 1987. Anthocyanins As Food Colorants. A Review Food Biochemistry. 11(3): 201-247.
- Jamshidi, S. and Jamshidi S., 2011. NTSYSpc 2.02e implementation in molecular biodata analysis (clustering, screening, and individual selection). International Conference on Environmental and Computer Science IPCBEE, IACSIT Press, Singapore. 19: 165-169.
- Kesawat, M.S. and Das, B.K., 2009. Molecular marker: It's Application in Crop Improvement. J. Crop Sci. Biotech. 12(4): 168-178.
- Kim, J.H., Nam, S.H., Rico, C.W. and Kang, M.Y., 2012. A comparative study on the antioxidative and anti-allergic activities of fresh and aged black garlic extracts. International Journal of Food Science and Technology. 47(6): 1176-1182.
- Kumar, M., 2015. Morphological characterization of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm. Journal of Plant Development Sciences. 7(5): 473-474.
- Kumar, M., Sharma, V.R., Kumar, V. *et al.*, 2018. Genetic diversity and population structure analysis of Indian garlic (*Allium sativum* L.) collection using SSR markers. Physiology and Molecular Biology of Plants. 25(2): 377-386.
- Lee, J. và Harnly, J.M., 2005. Free amino acid and cysteine sulfoxide composition of 11 garlic (*Allium sativum* L.) cultivars by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection. J. Agric. Food Chem. 53(23): 9100-9104.
- Maab, H.I. và Klaas, M., 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isoenzyme and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetic. 91(1): 89-97.
- Michelmore, R.W., Paran, I. và Kesseli, R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(21): 9828-9832.
- Sabir, M., Singh, D. and Jat, B.L., 2017. Study of morphological and molecular characterization of garlic (*Allium sativum* L.). Asian Journal of Horticulture. 12(1): 141-159.
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S. and McCouch, S., 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome research. 11(8): 1441-1452.
- UBND huyện Lý Sơn, 2018. Báo cáo số 469/BC-UBND, ngày 14/11/2018 về tình hình thực hiện kế hoạch phát triển kinh tế - xã hội, quốc phòng, an ninh năm 2018 và phương hướng nhiệm vụ năm 2019, ngày truy cập: 03/01/2019. Địa chỉ: <http://www.quangngai.gov.vn/vi/lyson/Pages/qnpsub-vanbanhuongdan-2360.html>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T. *et al.*, 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 40(15): e115.
- Wang, H., Li, X., Shen, D., Oiu, Y. and Song J., 2014. Diversity evaluation of morphological and allicin garlic (*Allium sativum* L.) from China. Euphytica. 198: 243-254.