

PHÂN TÍCH BIẾN DỊ DI TRUYỀN GIỮA MÌ CAO SU (*Manihot glaziovii* Muel-Arg) VÀ MỘT SỐ GIỐNG TRỒNG KHOAI MÌ (*Manihot esculenta* Crantz) BẰNG KỸ THUẬT PCR-RAPD

Phan Ngô Hoang và Bùi Trang Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 29 tháng 8 năm 2003)

TÓM TẮT: Trong một bài báo trước đây, sự vi ghép giữa khoai mì (*M. esculenta* Crantz) làm gốc ghép và mì cao su (*M. glaziovii* Muel-Arg) làm cành ghép, sự dung hợp tế bào trần giữa hai loài (sử dụng PEG) đã được mô tả. Trong bài báo này, chúng tôi giải thích sự biến dị di truyền giữa mì cao su và 4 dòng khoai mì bằng kỹ thuật PCR-RAPD với 30 môi nhân tạo. DNA được ly trích từ mô sẹo được tạo từ các lá mì cao su và 4 dòng khoai mì *in vitro* 3-4 tuần tuổi, trên môi trường MS có bổ sung 2mg/l 2,4-D và 0,5mg/l BA.

Từ khoá: *Manihot esculenta*, *Manihot glaziovii*, mô sẹo, PCR-RAPD, biến dị di truyền.

Mở đầu

Để chứng minh các tế bào chuyển gen hay để nghiên cứu sự phát sinh loài và mối liên hệ giữa các loài trong giống *Manihot*, người ta thường dùng kỹ thuật “DNA fingerprinting” để phân tích các đoạn DNA. Với ngoại lệ ở các cặp sinh đôi hay các dòng thực vật giống nhau, các băng chứa các đoạn DNA trong các bản gel sau sự điện di có vị trí đặc biệt đối với mỗi cá thể (động vật hay thực vật) (Kendrew 1994, Meyers 1995). Dựa theo nguyên tắc này, RAPD là sự tăng bội các trình tự DNA chưa biết nhờ PCR, bằng cách dùng các môi ngẫu nhiên ngắn, và sau đó là sự phân ly các đoạn DNA nhờ kỹ thuật điện di (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Ngọc Lang, 1999, Williams *et al.* 1990).

Sự ghép thân giữa khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz) và mì cao su (*Manihot glaziovii* Muel-Arg) được áp dụng phổ biến ở Indonesia (De Foresta *et al.* 1994). Trong một công trình nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã thực hiện sự dung hợp và nuôi cấy tế bào trần ở khoai mì và mì cao su (Phan Ngô Hoang và Bùi Trang Việt 1997, Phan Ngô Hoang 1999). Một vấn đề khó khăn trong kỹ thuật dung hợp tế bào trần là sự tuyển chọn các sản phẩm dung hợp. Do đó, trong bài này, chúng tôi dùng kỹ thuật PCR-RAPD để phân tích sự khác biệt giữa mì cao su và một số dòng khoai mì.

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Các lá khoai mì và mì cao su từ các cây *in vitro* (bảng 1):

Bảng 1: Các dòng khoai mì và mì cao su có nguồn gốc khác nhau được sử dụng trong thí nghiệm.

Tên	Nguồn gốc	Ký hiệu
Sắn Nền co	Tỉnh Hòa Bình	1
Khoai mì Cuống trâu	TP. Hồ Chí Minh	2
Mì Cao su	TP. Hồ Chí Minh	3
Sắn xanh	Tỉnh Vĩnh Phú	4
Sắn chuối vàng	Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam	5

Bộ 30 môi được sử dụng trong PCR bao gồm các môi ngắn có 10 nucleotid, được cung cấp bởi Genset Oligos (Singapore):

- | | | |
|---------------------|---------------------|----------------------|
| R1: 5'GGTGCGGGAA3' | R11: 5'TCGTAACGGG3' | R21: 5'GTTGCGATCC3' |
| R2: 5'GTTTCGCTCC3' | R12: 5'AGTTCGGCA3' | R22: 5'CCACAGCAGT3' |
| R3: 5'GTGCGTCTTT3' | R13: 5'GGGGAATTGG3' | R23: 5'CCGCATCTAC3' |
| R4: 5'AAGAGCCCGT3' | R14: 5'TCCCAATGGC3' | R24: 5'ATGGATCCCG3' |
| R5: 5'AACGCGCAAC3' | R15: 5'TGGCATCGTC3' | R25: 5'GGACCCTTAC3' |
| R6: 5'CCCGTCAGCA3' | R16: 5'TAAGGGGGAC3' | R26: 5'TTTGCCCGGA3' |
| R7: 5'TCCCAGCCAT3' | R17: 5'GCCAGCCTTT3' | R27: 5'GGAGGGGTGTT3' |
| R8: 5'AACGGGTTCC3' | R18: 5'ACGTCATCCG3' | R28: 5'GTTGCCAGCC3' |
| R9: 5'TAGGCCTAGG3' | R19: 5'GAGCTTGGCA3' | R29: 5'AAGCCTCGTC3' |
| R10: 5'GCCCCCTTTT3' | R20: 5'ACCCCCCTAA3' | R30: 5'GGGGGTCTTT3' |

Phương pháp

Sự tạo mô sẹo từ lá khoai mì

Các lá từ các cây khoai mì và mì cao su 3-4 tuần tuổi trên môi trường MS được cắt rời khỏi thân và bỏ cuống, rạch những đường ngang qua vùng gân lá và đặt trên môi trường MS (Murashige & Skoog 1962) được làm rần bởi aga 5g/l, bổ sung 2,4-D 2mg/l và BA 0,5mg/l, sacaroz 30g/l. Các mẫu cấy được nuôi trong tối, ở nhiệt độ 28 ± 2°C, ẩm độ 65 ± 5%.

Ly trích DNA

Mô sẹo từ lá khoai mì và mì cao su sau 3 tuần nuôi cấy được dùng để ly trích DNA theo Frederick *et al.* (1992): 1g mô sẹo được nghiền trong 3ml dịch trích (Tris-HCl 1M, pH7,4; EDTA 0,5M, pH8; NaCl 5M và SDS 10%), ly tâm ở 14.000v/p trong 10 phút; thu dịch nổi, bổ sung 1 phần thể tích NaCl 5M và 2 phần thể tích etanol 90%, ly tâm ở 14.000v/p trong 10 phút; thu cặn và cho vào 1ml etanol 70%, ly tâm ở 14.000v/p trong 10 phút. Thu cặn, để khô tự nhiên trong 2 giờ, sau đó hoà cặn nhẹ nhàng trong 30µl nước 2 lần cất. Dịch trích DNA được xác định nồng độ và độ tinh sạch nhờ quang phổ kế Eppendorf ở 260nm và 280nm.

Khuyếch đại DNA nhờ kỹ thuật PCR

Dung dịch phản ứng 25µl gồm: 2,5µl dung dịch đệm 10X, 2µl MgCl₂ 25mM, 2,5µl dNTP, 0,45µl Taq-polymerase 5Unit, 1,8µl mỗi, 2µl DNA khuôn có nồng độ 50ng/ml và 13,65µl nước cất. Tiến trình của phản ứng như sau: biến tính DNA ở 95°C trong 5phút, tiếp sau là 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn: 95°C trong 30 giây, 36°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây. Sau cùng đặt dung dịch phản ứng ở 72°C trong 5 phút, và sản phẩm được giữ ở 4°C (Rolfs *et al.* 1992, Charlieu 1992).

Điện di trên gel agrose

DNA trích từ mô sẹo và sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích nhờ sự điện di trên gel agarose 1,5%, với hiện diện của thang DNA có khoảng cách các băng là 100bp (DNA ladder 100bp Invitrogen). Bản điện di được nhuộm ethidium bromid và chụp ảnh dưới UV.

Kết quả

Sự tạo mô sẹo từ lá khoai mì và mì cao su

Mô sẹo xuất hiện từ các vết cắt và thấy được bằng mắt thường sau 2 tuần nuôi cấy, tương tự như sự tạo mô sẹo được thấy ở khoai tây (Lê Thị Thủy Tiên và Bùi Trang Việt 2000).

Nồng độ DNA từ mô sẹo và độ tinh sạch của dịch trích

DNA được ly trích từ mô sẹo có nồng độ dao động từ 77 đến 136ng/g mô sẹo, độ tinh sạch của dịch trích từ 1,7 - 1,9 (bảng 2).

Bảng 2: Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được trích từ mô sẹo các dòng khoai mì và mì cao su.

Kí hiệu	Tên	Nồng độ (ng/gTLT)	Độ tinh sạch (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)
1	Sắn Nền co	77,022s	1,91
2	Khoai mì Cuống trâu	135,966	1,69
3	Mì cao su	116,793	1,78

4	Sắn xanh	113,845	1,79
5	Sắn chuối vàng	112,746	1,86

Trên điện di đồ, DNA từ các mẫu đều cho 3 băng cơ bản ở khoảng 500bp, 600bp và 1300bp. Riêng (3), (4) và (5) có thêm 1 băng ở vị trí khoảng 1200bp (ảnh 1). Với độ tinh sạch và mức độ nguyên vẹn như vậy, DNA được dùng cho PCR-RAPD.

Phân tích tính đa hình của các dòng khoai mì bởi kỹ thuật PCR-RAPD

Trong số 30 mẫu được sử dụng có 17 mẫu cho các băng rõ rệt trên băng điện di (ảnh 2-18). Chúng tôi đặc biệt chú ý những vị trí khác biệt sau đây trên các điện di đồ. Đối với R1, mì cao su (3) có 1 băng ở vị trí khoảng 2000bp, không ở các dòng khoai mì. Đối với R3, (2), (4) và (5) có 1 băng ở khoảng 800bp, không có ở (3) và (1); ngoài ra, (3) có một băng ở vị trí khoảng 1400bp trong khi (1) không có. Đối với R4, (3) có 1 băng ở khoảng 1200bp, không có ở các dòng khoai mì. (4) và (5) có một băng ở vị trí trước 2072bp, (1) (2) và (3) không có. Đối với R5, (3) có 1 băng ở khoảng 600-700bp, không có ở các dòng khoai mì. (4) và (5) có một băng ở vị trí khoảng 1000-1100bp trong khi (1) và (2) không có. Đối với R6, (3) có 1 băng ở vị trí trước 2072bp, không có ở các dòng khoai mì. Đối với R7, (3), (4) và (5) có 1 băng ở khoảng 1100-1200bp, không có ở (1) và (2). Đối với R13, (1) và (2) có 1 băng ở vị trí khoảng 300-400bp, không có ở (3), (4) và (5). Đối với R15, (3) có 1 băng ở 400-500bp, không có ở các dòng khoai mì. (1) và (2) có 1 băng ở 300-400bp, không có ở (3), (4) và (5). Đối với R16, (3) có 1 băng ở vị trí trước 2072bp, không có ở các dòng khoai mì. Đối với R18, (3), (4) và (5) có 2 băng ở giữa 1500-2072bp, không có ở (1) và (2).

Thảo luận

Trong các nghiên cứu di truyền và nhận dạng thực vật (plant identification), các chỉ thị phân tử như RFLP (restriction fragment length polymorphism) và isozym đã được dùng rộng rãi. Tuy nhiên, RFLP cần nhiều thời gian, một lượng lớn DNA (2-10 μ g), các dò thích hợp và các đồng vị phóng xạ. Phân tích các isoenzym đòi hỏi các phản ứng màu rất phức tạp và chỉ giới hạn trong một số ít vị trí (Griffin & Griffin 1992). Gần đây hơn, người ta thường dùng chỉ thị RAPD (random amplified polymorphic DNA) kết hợp với PCR (polymerase chain reaction) để tạo các "DNA fingerprints" nhờ các môi oligonucleotid ngẫu nhiên được tổng hợp nhân tạo. Sự nhận dạng thực vật nhờ RAPD thường được dùng trong mục đích cấp bằng sáng chế, xác nhận cây cha mẹ trong lai tạo, quản lý ngân hàng gen, phân tích các biến dị, phát hiện các vụ đánh cắp bản quyền... So với RFLP, RAPD ít tốn kém, nhanh hơn, chỉ cần một lượng nhỏ DNA (0,5-50ng) và không dùng các đồng vị phóng xạ. Sự đa hình được quan sát nhờ RAPD có thể do các đột biến điểm, sự xen, loại hay đảo; các RAPD thường là các chỉ thị trội (dominant markers) và được di truyền theo kiểu Mendel đơn giản (Griffin & Griffin 1992, Meyers 1995). Trong các kết quả được trình bày, để phân biệt mì cao su với các dòng khoai mì, nhìn chung ta có thể ưu tiên sử dụng các mẫu: R1, R3, R4, R5, R6, R7, R13, R15, R16 và R18. Mặt khác, ở tất cả các mẫu trên, sắn xanh (4) và sắn chuối vàng (5) cho các chỉ thị RAPD hầu như giống nhau hoàn toàn.

Mô sẹo là vật liệu đặc biệt thích hợp để ly trích DNA đủ số lượng cũng như độ tinh sạch cần thiết cho các nghiên cứu so với các vật liệu khác như lá hay thân cây. Mì cao su và khoai mì rất dễ tạo ra mô sẹo từ lá cây *in vitro* (do đó không có vấn đề thiếu vật liệu để ly trích), mô sẹo ít tiết phenol và không chứa các sắc tố như diệp lục tố... Tuy nhiên, để tránh các biến dị có thể xảy ra trong quá trình phát sinh mô sẹo trên các môi trường có chứa một auxin mạnh như 2,4-D, và để có kết luận chính xác, sau sự nhận dạng sơ khởi sự khác biệt của các đối tượng khác nhau từ DNA được ly trích từ mô sẹo, chúng ta cần kiểm chứng kết quả bằng cách so sánh các DNA được ly trích trực tiếp từ các cơ quan thực vật.

Kết luận và đề xuất

Những kết quả đạt được cho phép chúng ta có thể sử dụng kỹ thuật PCR-RAPD để sơ khởi phân biệt mì cao su với các giống trồng khoai mì. Do đó, trong tương lai, chúng tôi sẽ sử dụng kỹ thuật PCR-RAPD để bước đầu nhận dạng các sản phẩm dung hợp từ mì cao su và các dòng khoai mì.

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Du Sanh (Trường ĐH. Khoa học Tự nhiên - ĐHQG HCM) và TS. Nguyễn Thị Ngọc Huệ (Viện KHKT Nông nghiệp Việt Nam) đã tặng các vật liệu thí nghiệm; Phòng thí nghiệm Wellcome Trust Clinical Research Unit (thuộc Bệnh viện Bệnh nhiệt đới TP. Hồ Chí Minh) đã tạo điều kiện thuận lợi để tiến hành thí nghiệm.

A PRELIMINARY STUDY FOR THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION BETWEEN *MANIHOT GLAZIOVII* MUEL-ARG AND SOME CULTIVARS OF CASSAVA (*M. ESCULENTA* CRANTZ) USING PCR-RAPD

Phan Ngo Hoang, Bui Trang Viet

University of Natural Sciences – VietNam National University HoChiMinh City

ABSTRACT: In the previous papers, the micrografting in cassava (using nodal segments of *Manihot esculenta* as stocks and *M. glaziovii* as scions), and the protoplast fusion between the two species (using PEG) were described. In this paper, attempts were made to explain the genetic variation between *M. glaziovii* and four cultivars of cassava, by using PCR-RAPD with thirty synthetic oligonucleotide primers. DNA was extracted from calli. These calli were initiated from leaves taken from 3-4 week-old in vitro plantlets of *Manihot glaziovii* and the four cultivars of *Manihot esculenta*, on a MS basal medium supplemented with 2mg/l 2,4-D and 0,5mg/l BA.

Keywords: *Manihot esculenta*, *Manihot glaziovii*, calli, PCR-RAPD, genetic variation.

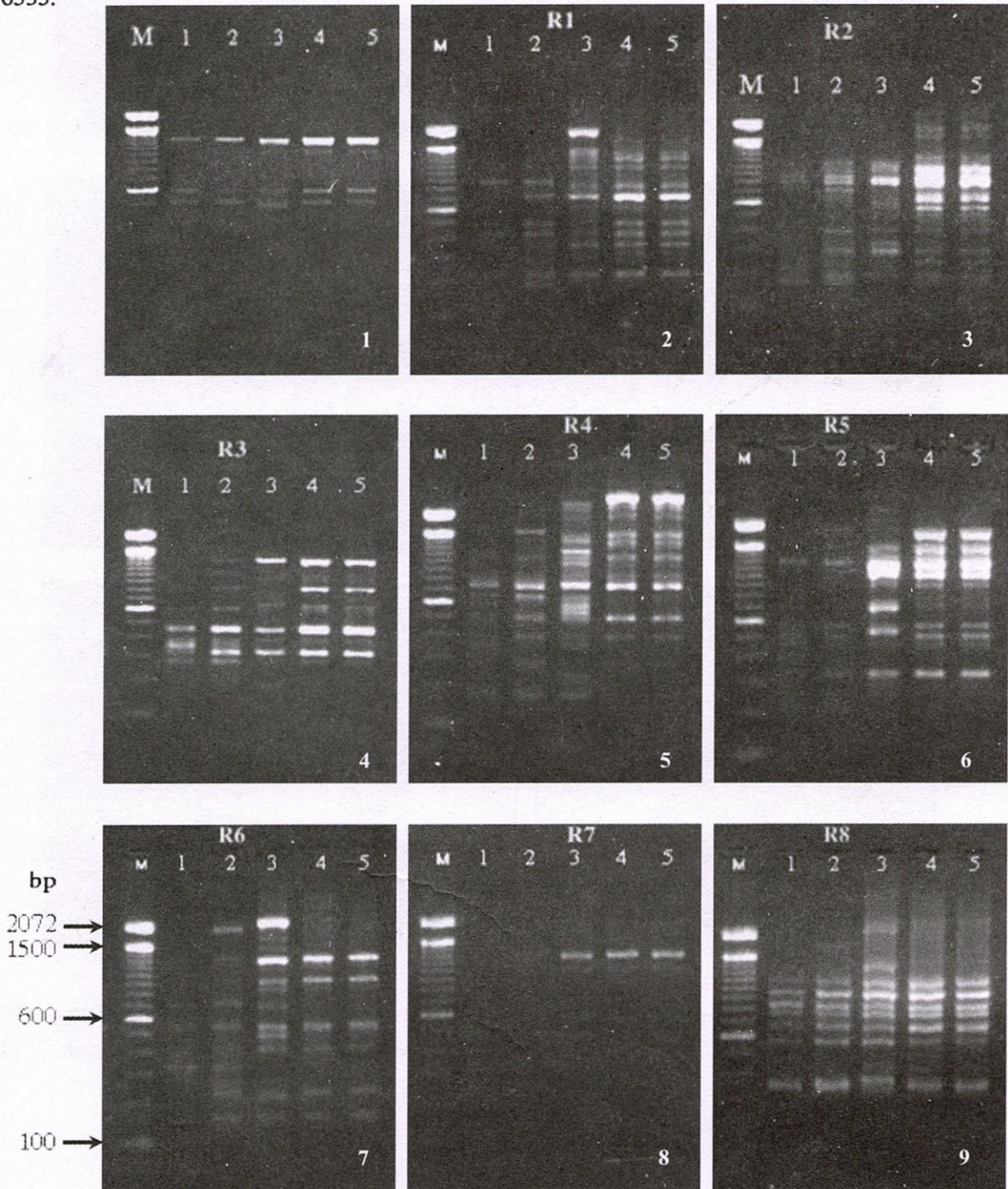
TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Ngọc Lang, 1999. *Di truyền phân tử. Những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng*. Nxb. Nông nghiệp.
- [2] Charlieu J.P. 1992. *Distinction between almost-identical DNA sequences by polymerase chain reaction*. In: PCR Technology Current Innovations. Edited by Griffin H.G. and Griffin A.M: 101-106, CRC Press.
- [3] De Foresta H., Basri A. and Wiyono 1994. *A very intimate agroforestry association. Cassava and improved homogardens: The Mukibat technique*. Agroforestry Today. Pp: 12-14.
- [4] Frederick M.A., Roger B., Robert E.K., David D.M., Seidman J.G., John A.S. and Kevin S. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.
- [5] Griffin H.G. and Griffin A.M., 1992. *PCR Technology Current Innovations*. CRC Press, 365p.
- [6] Kendrew S.J. 1994. *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science Ltd. 1165p.
- [7] Lê Thị Thủy Tiên và Bùi Trang Việt 2000. *Sự tạo mô sẹo từ chồi và lá khoai tây (Solanum tuberosum L.)*. Tạp chí Phát triển Khoa học Công nghệ Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh số 1, tập 3, trang 68-73.
- [8] Meyers R.A. 1995. *Molecular Biology and Biotechnology*. Wiley – VCH. 1034p.
- [9] Murashige T. and Skoog F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol Plant*. 15: 473- 497.
- [10] Phan Ngô Hoang 1999. *Sự ghép thân non và dung hợp tế bào trần ở khoai mì Manihot esculenta Crantz và ở khoai tây Solanum tuberosum L.* Luận văn Thạc sĩ Khoa học Sinh học Trường ĐH. Khoa học Tự nhiên. Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh, 97 trang.

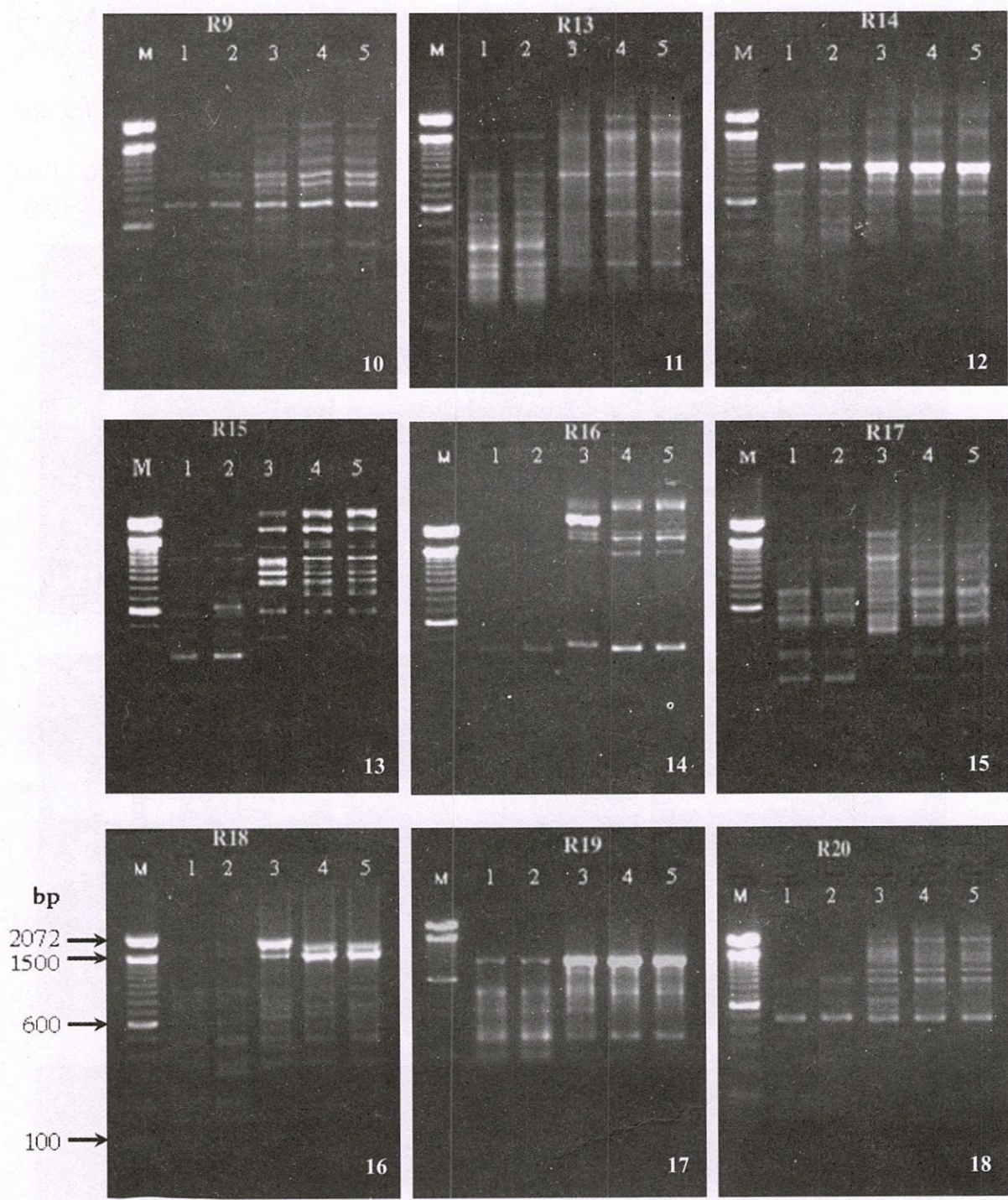
[11] Phan Ngô Hoàng và Bùi Trang Việt 1997. Sự ghép khoai mì *Manihot esculenta* Crantz và *Manihot glaziovii* Muel-Arg. Tập san Khoa học Tự nhiên. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc Gia Hồ Chí Minh, số 2: 121-126.

[12] Rolfs A., Schuller I., Finckh U. and Weber-Rolfs I. 1992. *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 271pp.

[13] Williams J.G.K, Kubelik A.R, Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucl Acids Res 18: 6531-6535.



Ảnh 1- 9: Điện di đồ chỉ sự phân tích DNA của các dòng khoai mì và mì cao su. Ảnh 1: Điện di trực tiếp DNA. Ảnh 2-9: PCR-RAPD. Các giếng: M, thang DNA; 1: sắn nền co, 2: khoai mì củống trâu, 3: mì cao su, 4: sắn xanh, 5: sắn chuối vàng.



Ảnh 10-18: Điện di đồ chỉ sự phân tích DNA của các dòng khoai mì và mì cao su nhờ PCR-RAPD. Các giếng: M, thang DNA; 1: sản nền co, 2: khoai mì cứng trâu, 3: mì cao su, 4: sản xanh, 5: sản chuối vàng.