

# NGHIÊN CỨU SỰ KHÁC NHAU CỦA ADN CHUỐI TIÊU (*MUSA CAVENDISHII* LAMB) NUÔI CẤY MÔ ĐỘT BIẾN BẰNG KỸ THUẬT RAPD- PCR

Lê Đức Anh, Nguyễn Văn Mùi

*Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN*

## 1. Đặt vấn đề

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là kỹ thuật chủ yếu của công nghệ sinh học thực vật. Nó có những đóng góp to lớn cho nền nông nghiệp thế giới. Ở Việt Nam nuôi cấy mô mới được nghiên cứu 1/4 thế kỷ, đến nay đã có khá nhiều kết quả. Nuôi cấy mô thực vật trước hết nghiên cứu ứng dụng nhân nhanh và phục tráng một số giống cây trồng như: chuối, dứa, cam, nho, khoai tây...[1]. Cây chuối đã được nghiên cứu và nhân giống hàng loạt ở nhiều phòng thí nghiệm của các trường Đại học và các Viện nghiên cứu trên cả nước. Nhưng vấn đề đặt ra ở đây là trong quá trình nuôi cấy mô, ngoài sản phẩm cây giống thu được có chất lượng tốt và sạch bệnh thì xuất hiện những cây giống có kiểu hình khác thường do đột biến tạo nên. Để đánh giá sự sai khác về mặt phân tử của những cây có kiểu hình khác thường với cây bình thường trong quá trình nuôi cấy, chúng tôi sử dụng kỹ thuật RAPD - PCR để phân tích sự sai khác của ADN hệ gen các mẫu chuối đột biến do nuôi cấy invitro tạo ra.

## 2. Nguyên liệu và phương pháp

### 2.1. Nguyên liệu

- Các mẫu chuối nuôi cấy mô bị đột biến do Viện rau quả trung ương cung cấp là giống chuối Tiêu Nghệ An (*Musa cavendishii* Lamb) gồm:

- 1- Cây đột biến thân cao (C1)
- 2- Cây đột biến hình dạng phiến lá (C2)
- 3- Cây đột biến thân lùn (C3)
- 4- Cây đột biến đường kính thân (C4)
- 5- Cây đối chứng (C5)

Trong nghiên cứu chúng tôi đã sử dụng hoá chất của các hãng: Sigma, Merk và Invitrogen.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tách chiết ADN: ADN được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp CTAB của Saghai – Maroof (1994) [2]

- ADN tổng số được điện di trên gel agarosa 0,8 % [3]
- Kỹ thuật PCR với các môi RAPD [4].

Tên và trình tự các môi đã sử dụng dưới bảng sau:

**Bảng 1: Tên và trình tự các môi RAPD đã sử dụng**

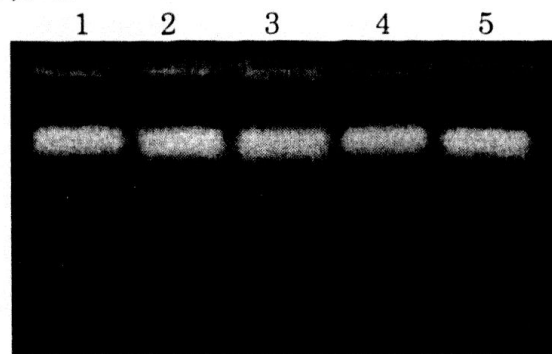
STT	Tên môi	Trình tự môi	STT	Tên môi	Trình tự môi
1	OBA1	TTCCACCCA	2	OBA2	TGCTCGGCTC
3	OBA5	TGCGTTCCAC	4	OBA6	GGCAGCACCTC
5	OBA7	GGGTGCACT	6	OBA12	TGTTGGGCAG
7	OBB6	CTGAAGTCGG	8	OBC2	ACAGTAGCGG
9	OBC4	GCACGTGCCA	10	OBC10	AAGGTCGAGG

- Phản ứng PCR của ADN hệ gen với môi RAPD ngẫu nhiên trên máy Thermal 480.
- Sản phẩm PCR thu được, điện di trên gel agarosa 1,2% [3]
- Phân tích số liệu: Số liệu được xử lý trên phần mềm NTSYS \_ pc [5]

### 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

#### 3.1. Kết quả tách chiết ADN

Sau khi thu được ADN tổng số của các mẫu chuỗi nghiên cứu, chúng tôi tiếp tục điện di trên gel agarosa 0,8%.



Hình 1: Băng điện di ADN của các mẫu chuỗi 1. mẫu C1, 2. mẫu C2, 3. mẫu C3, 4. mẫu C4, 5. mẫu C5

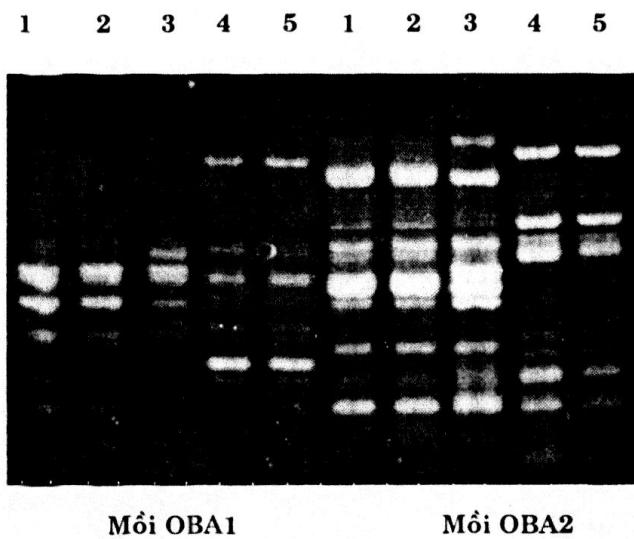
Kết quả điện di cho thấy tất cả ADN của các mẫu chuỗi nghiên cứu đều có một băng ADN. Như vậy ta có thể sử dụng ADN thu được cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### 3.2. Phân tích sự sai khác ADN của các mẫu chuỗi nghiên cứu bằng kỹ thuật RAPD-PCR

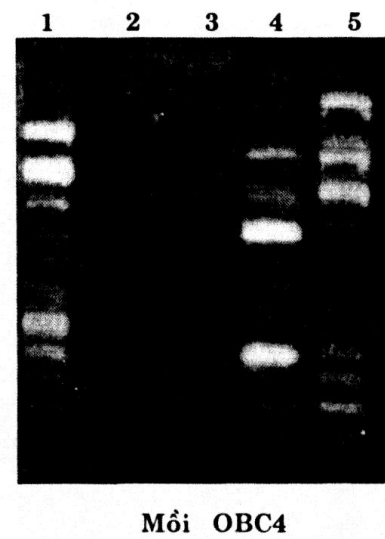
Với ADN của 5 mẫu chuỗi nghiên cứu có hình thái khác nhau đã được nhân với 10 môi RAPD. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 1,2%. Kết quả cho thấy hầu

hết các môi đều nhân được ADN tổng số, chúng có từ 1 đến 19 băng, tùy từng môi nhân. Trong số 10 môi RAPD sử dụng thì có 8 môi nhân được cả 5 mẫu ADN nghiên cứu, đó là OBA1, OBA6, OBA12, OBB6, OBC2, và OBC10 (hình 2,4,6,7). Còn môi OBC4 không nhân được ADN của chuối đột biến dạng phiến lá và chuối đột biến thân lùn (hình 3), môi OBC 8 không nhân được ADN của mẫu chuối đối chứng (không bị biến đổi về hình thái) (hình 6).

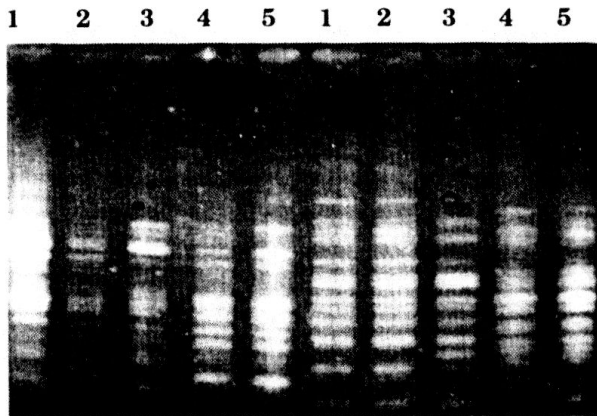
Tổng số băng điện di thu được khi nhân với 10 môi RAPD là 418 trong đó có 189 băng đa hình. Tổng số băng điện di ADN của mẫu chuối đối chứng (C5) là 89 băng, thì có 43 băng đa hình và số băng trung bình là 17,8 ,lớn nhất so với tất cả các mẫu chuối đột biến nghiên cứu. Mẫu chuối đột biến dạng phiến lá (C2) có tổng số băng ADN thu được là 78, số băng đa hình là 32, tỷ số băng trung bình là 15,6. đây là mẫu có số lượng băng ADN ít nhất trong tất cả các mẫu nghiên cứu. Mặt khác tỷ lệ trung bình băng ADN đa hình của 5 mẫu là 45,11%, chứng tỏ sự sai khác rất lớn giữa các mẫu chuối nghiên cứu, mặc dù chúng được nuôi cấy từ một giống (bảng 2).



Hình 2: Sản phẩm RAPD của môi OBA1 và OBA2 với ADN hệ gen của các mẫu chuối  
1.mẫu C1 , 2.mẫu C2 , 3.mẫu C3 , 4.mẫu C4, 5. mẫu C5



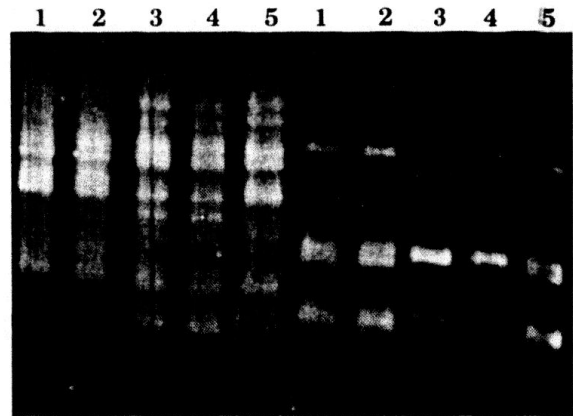
Hình 3: Sản phẩm RAPD của môi OBC4 với ADN hệ gen của các mẫu chuối  
1.mẫu C1 , 2.mẫu C2 3.mẫu C3  
4 .mẫu C4, 5. mẫu C5



Mồi OBA6

Mồi OBA7

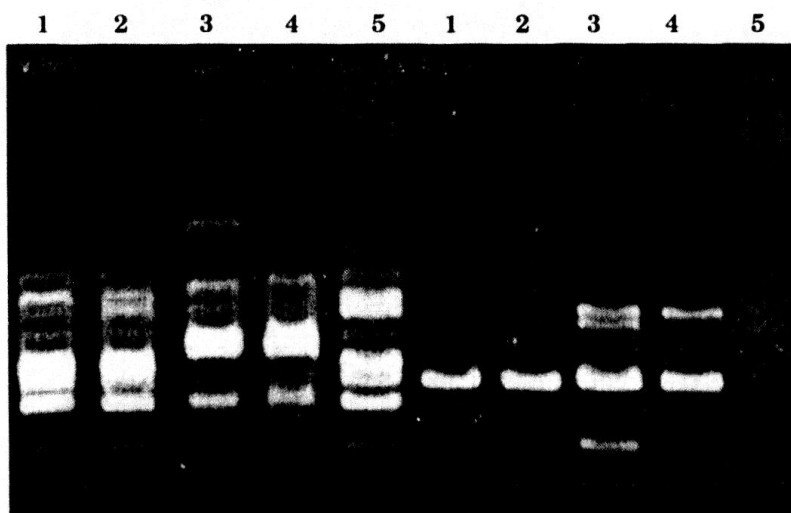
Hình 4: Sản phẩm RAPD của mồi OBA6 và OBA7 với ADN hệ gen của các mẫu chuối  
1. mẫu C1, 2. mẫu C2, 3. mẫu C3  
4. mẫu C4, 5. mẫu C5



Mồi OBC10

Mồi OBA12

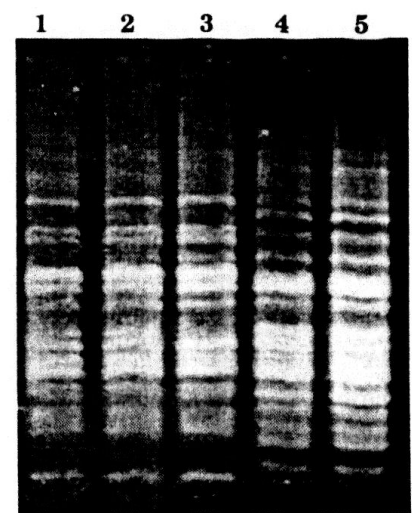
Hình 5: Sản phẩm RAPD của mồi OBC10 và OBA12 với ADN của các mẫu chuối  
1. mẫu C1, 2. mẫu C2, 3. mẫu C3  
4. mẫu C4, 5. mẫu C5



Mồi OBC2

Mồi OBC8

Hình 6: Sản phẩm RAPD của mồi OBC2 và mồi OBC8 với ADN của các mẫu chuối  
1. mẫu C1, 2. mẫu C2, 3. mẫu C3  
4. mẫu C4, 5. mẫu C5



Mồi OBB6

Hình 7: Sản phẩm RAPD của mồi OBB6 với ADN hệ gen của các mẫu chuối  
1. mẫu C1, 2. mẫu C2, 3. mẫu C3  
4. mẫu C4, 5. mẫu C5

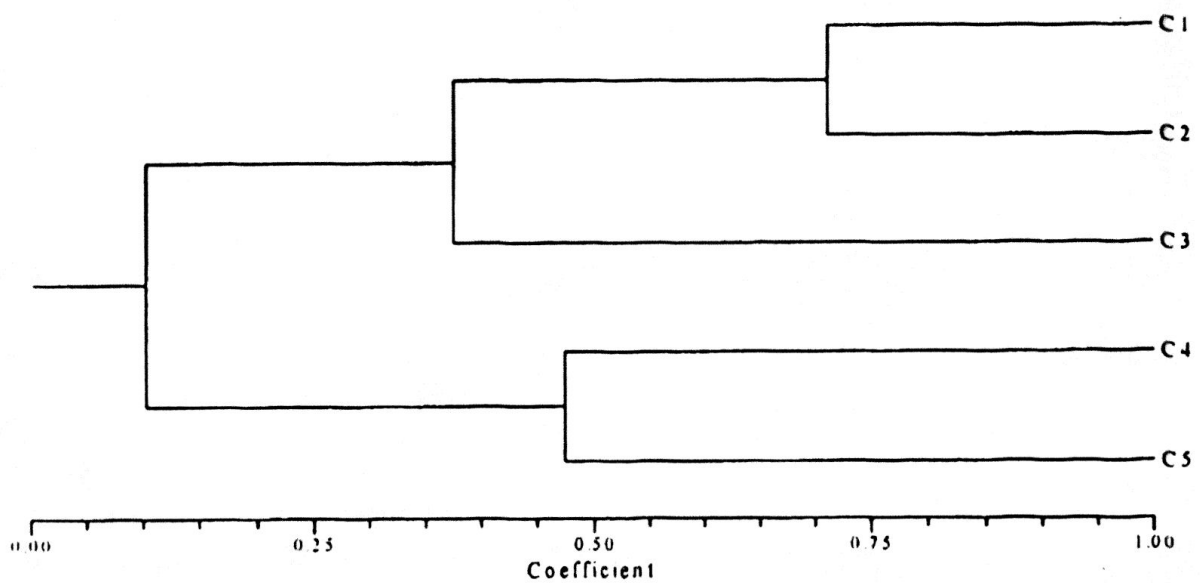
**Bảng 2: Tỷ lệ đa hình của 5 mẫu chuỗi**

Tên mẫu	Tổng số băng	Số băng đa hình	Số băng trung bình	Tỷ lệ băng đa hình
Chuỗi 1	85	40	17	47.06%
Chuỗi 2	78	32	15.6	41.03%
Chuỗi 3	83	35	16.6	42.17%
Chuỗi 4	83	39	16.6	46.99%
Chuỗi 5	89	43	17.8	48.31%
Tổng số	418	189		42.11%

Xác định mức độ sai khác của các mẫu bằng cách so sánh các băng ADN đa hình. Các băng ADN đa hình được xác định dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của chúng như sau: Nếu trên ảnh điện di có băng ADN xuất hiện ký hiệu là 1, còn không có ký hiệu là 0. Số liệu này được xử lý trên phần mềm NTSTS\_ pc để phân tích mối tương quan giữa các mẫu nghiên cứu [5]. Mẫu nào có hệ số Jaccard càng gần 1 thì sự sai khác về mặt di truyền do đột biến tạo ra càng nhỏ, còn ngược lại mẫu nào có hệ số Jaccard càng gần 0 thì sự sai khác về mặt di truyền do đột biến tạo ra càng lớn. Thông qua bảng số liệu ma trận ta có thể xác định mức độ sai khác giữa các mẫu chuỗi mang đột biến với mẫu đối chứng không đột biến và giữa chúng với nhau.

**Bảng 3: Hệ số tương đồng jaccard của 5 mẫu chuỗi nghiên cứu**

Tên mẫu	Chuỗi 1	Chuỗi 2	Chuỗi 3	Chuỗi 4	Chuỗi 5
Chuỗi 1	1				
Chuỗi 2	0.811764	1			
Chuỗi 3	0.616162	0.688889	1		
Chuỗi 4	0.495327	0.504950	0.580328	1	
Chuỗi 5	0.598039	0.597938	0.490743	0.712766	1



**Hình 8: Biểu đồ cây quan hệ vật chất di truyền của 5 mẫu chuối**  
**C1. Chuối đột biến thân cao, C2 Chuối đột biến hình dạng phiến lá C3. Chuối đột biến thân lùn,**  
**C4 Chuối đột biến đường kính thân C5 Chuối đối chứng**

Dựa vào bảng hệ số di truyền Jaccard (bảng 3) và sơ đồ hình cây (hình 8) biểu thị sự sai khác các đặc điểm hình thái của 5 mẫu chuối nghiên cứu chúng tôi có đánh giá như sau:

Các mẫu đột biến có sự sai khác di truyền lớn so với mẫu chuối C5 (đối chứng), hệ số tương đồng Jaccard dao động từ 0,490743 đến 0,712766. Sắp xếp thứ tự sự sai khác về mặt di truyền của các mẫu chuối đột biến tăng dần từ thấp đến cao như sau: Mẫu chuối C4 đột biến đường kính thân (hệ số Jaccard 0,712766), C1 đột biến thân cao (hệ số Jaccard 0,598039), C2 đột biến dạng phiến lá (hệ số Jaccard 0,597938), và C3 đột biến thân lùn (hệ số Jaccard 0,490743). Mẫu chuối C3 đột biến làm thân lùn có sự sai khác di truyền với mẫu chuối C5 là lớn nhất trên biểu đồ cây quan hệ di truyền, mẫu chuối C3 được biểu diễn ra một nhánh. Giữa mẫu chuối C1, C2 có sai khác di truyền nhỏ nên nằm trên một nhánh nhỏ của cây quan hệ di truyền (hệ số Jaccard 0,811764). So với mẫu chuối C4 và C5 thì mẫu chuối C1, C2 có sai khác về mặt di truyền là khá lớn, còn đối với mẫu chuối C3 thì nhỏ hơn. Vì vậy ba mẫu chuối C1, C2, C3 tạo thành một nửa của cây quan hệ di truyền. Nửa còn lại biểu diễn sai khác giữa mẫu chuối C4 và C5. Sự sai khác này nhỏ hơn sự sai khác của các mẫu C3, C2, C1. Vì vậy qua bảng hệ số tương đồng Jaccard ta có thể kết luận rằng mức độ sai khác về vật chất di truyền giữa các mẫu chuối đột biến với mẫu chuối C5 không đột biến là khác nhau.

Những kiểu hình không bình thường do đột biến tạo ra khá đa dạng (chiều cao thân, dạng phiến lá hay đường kính thân...), có thể trong quá trình nuôi cấy mô có những ảnh hưởng của hoá chất, hormone, hay liều lượng sử dụng... làm biến đổi vật chất di truyền, mức độ biến đổi là khác nhau.

Sử dụng hợp lý các loại hoá chất, hormone về liều lượng sẽ hạn chế được những tác động xấu đến quá trình sinh trưởng, phát triển và đặc biệt là đến vật chất di truyền của mô nuôi cấy.

#### 4. Kết luận

1) Đã tách chiết được ADN tổng số của cả 5 mẫu chuỗi nghiên cứu, đủ tiêu chuẩn để thực hiện những thí nghiệm tiếp theo.

2) Trong phản ứng RAPD-PCR sử dụng 10 mồi OBA1, OBA2, OBA5, OBA7, OBA12, OBB6, OBC2, OBC4, OBC10 với 5 mẫu chuỗi nghiên cứu đã thu được 418 băng ADN được nhân ngẫu nhiên, có 189 băng đa hình. Tỷ lệ các băng ADN đa hình của các mẫu chuỗi từ 41.03% đến 48.31%. Tỷ lệ băng ADN đa hình trung bình của cả 5 mẫu chuỗi nghiên cứu là 42.11%.

3) Hệ số di truyền Jaccard giữa các mẫu so với mẫu chuỗi số C5 thay đổi từ 0.490743 đến 0.712766.

4) Đột biến thân cao và đột biến dạng phiến lá gần gũi nhau nhất và xa mẫu đối chứng nhất, còn đột biến đường kính thân gần với mẫu đối chứng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đinh Trường Sơn, Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Khắc Thái Sơn, Nguyễn Thị Hương, "Nghiên cứu cải tiến và xây dựng quy trình sản xuất cây giống dứa Cayenne bắt nguồn từ nuôi cấy mô", *Báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2003*, NXB Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội, 2003, tr. 799-804.
2. Saghai-Marooif M.A., Biashev R.M., Yang G.P., Zhang Q., R.W. Allard, 1994. "Extraordinariness polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosome location, and population dynamics", *Proc.Natl. Acad. Sci., USA*, 1991: p.5466-5470.
3. Reiner Westermeier, *Electrophoresis in Practice*, Second edition, VCH A Wineycompany, 1997, 316pp.
4. Sambrook J. and Russell D.W., *Molecular cloning*, third edition, Cold Spring Harbor, New York, 2001, 825pp.
5. Rohly F.J., *NTSYS\_pc Numerical taxonomy DNA multivariate system*, Version 2.02h, Applied Biostastics Inc, New York, 2000, 50pp

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XXII, N<sub>0</sub>1, 2006

### STUDING THE DIFFERENCES OF DNA TISSUE-CULTURED MUTANT BANANA *MUSA CAVENDISHII* LAMB BY RAPD-PCR TECHNIQUE

Le Duc Anh, Nguyen Van Mui

*Department of Biology, College of Science, VNU*

We have determined the differences of DNA of five banana samples including stem height - changing sample, leaf shape - changing sample, stem low- changed

sample, term diameter- changed sample and control sample by RAPD- PCR technique. We have used 10 randomly primers for RAPD- PCR reaction. From the results of electrophoresis, we have obtained 418 bands. In which, there are 189 polymorphic bands and 229 monomophic bands. The research results showed that the differences of DNA between four mutant banana samples and control banana sample is significant, because the coefficients of genetic similarity were from 0.490743 to 0.71266. And we can also see that the differences between four mutant samples is significant.