PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÂY DỨA CAYENNE BẰNG KỸ THUẬT RAPD

Nguyễn Hồng Phong(1) , Trần Thị Dung(2)
1 - Trường ĐH Nông Lâm Tp.HCM
2 - Trường ĐH Tôn Đức Thắng

TÓM TẮT
Nghiên cứu đa dạng nguồn gen dứa Cayenne được thực hiện bằng kỹ thuật marker phân tử nhằm góp phần tìm hiểu nguồn vật liệu ban đầu cho công tác chọn tạo giống dứa. Phương pháp RAPD cho thấy sự phân nhóm khác nhau của 2 nhóm dứa chính Queen và Cayenne. Trong cùng nhóm dứa Cayenne, tuy có sự phân nhóm khác nhau, nhưng mức độ tương đồng về di truyền cao giữa các giống nhập nội (Trung Quốc, Thái Lan) và nội địa (Lâm Đồng).

1. MỞ ĐẦU

Dứa là cây ăn quả nhiệt đới được trồng hầu hết các nước trên thế giới. Trong các giống dứa chính, dứa Cayenne mang nhiều đặc điểm của công nghệ chế biến đồ hộp nên được quan tâm phát triển. Tại Việt Nam, nhằm đáp ứng nhu cầu giống cho việc mở rộng vùng nguyên liệu dứa, chồi giống dứa Cayenne Thái Lan và Trung Quốc được nhập nội. Nhằm bảo vệ nguồn gen các giống cây trồng sẵn có trong nước cũng như tìm hiểu nguồn gen du nhập từ nước ngoài, phương pháp RAPD *(Randomly Amplified Polymorphic DNA)* xác định sự đa hình về kích thước các đoạn DNA giữa các cá thể được sử dụng để nhận diện và đánh giá sự đa dạng di truyền của các giống dứa. Đây cũng là tiền đề góp phần thực hiện có hiệu quả việc nhân và tạo giống dứa ở nước ta.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thời gian và địa điểm thực hiện: từ tháng 1đến tháng 8 năm 2007 tại Viện Công nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM

Vật liệu

Mẫu dứa: Cây dứa Cayenne *in vitro* sau trồng 4 tháng tuổi (9 lá, cao 15cm) từ 3 giống Thái Lan, Trung Quốc, Việt Nam (Lâm Đồng) thu thập tại nông trường Phạm Văn Hai (TP. Hồ Chí Minh) và Thọ Vực (Đồng Nai)

Hoá chất: Các hóa chất ly trích DNA, PCR, điện di và 10 Primer 10-mer (Promega)

Phương pháp

***Tách chiết DNA tổng số**

Mẫu lá dứa Cayenne cắt thành từng mảnh kích thước nhỏ hơn 0,5 mm, đem nghiền thành bột mịn trong nitơ lỏng rồi tiến hành tách chiết DNA tổng số. Dung dịch DNA sau tách chiết được bảo quản ở 4^oC. Sử dụng mẫu DNA của cây dứa Queen và cây lan Dendrobium làm đối chứng

*** Điện di sản phẩm tách chiết**

Kiểm tra chất lượng DNA đã ly trích bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1 % trong dung dịch TAE 1X. Nhuộm gel với Ethidium bromide và chụp hình qua hệ thống gel document

***Tối ưu hoá phản ứng RAPD**

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ *Taq* polymerase với 3 nghiệm thức 0,5 U; 0,75 U; 1U

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ primer với 3 nghiệm thức 0,8 pM**;** 1pM; 1,2pM.

Chương trình nhiệt: 94^0C: 5 phút; 45 chu kỳ (94^0C: 30 giây, 37^0C: 30 giây, 72^0C: 1 phút); 72^0C: 5 phút

***Đánh giá độ đa dạng di truyền của các giống dứa Cayenne**

Sản phẩm RAPD được kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 2%, trong dung dịch đệm TAE 0,5X, dưới hiệu điện thế 50 V trong 60 phút. Sau đó, gel được ngâm trong dung dịch ethidium bromide 10 mg/ml và các vạch DNA sẽ được quan sát dưới tia UV. Phân tích dữ liệu bằng phần mềm NTSYS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

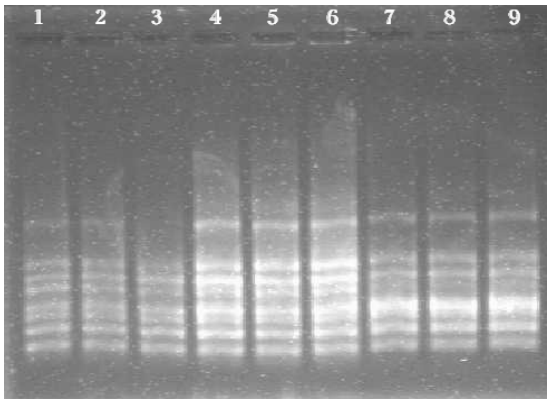
3.1 Kết quả ly trích DNA tổng số từ lá cây dứa Cayenne:

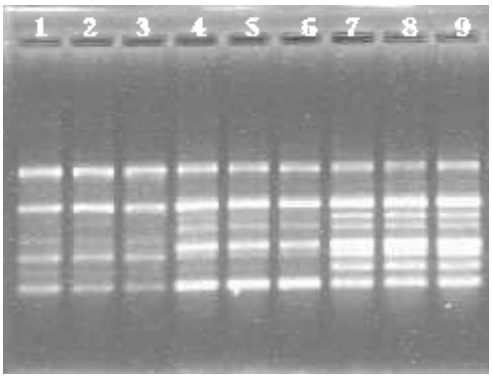
Quy trình của Doyle cải tiến (1990) phù hợp cho việc ly trích DNA của dứa. Sau khi kiểm tra sản phẩm bằng phương pháp điện di, DNA tổng số ly trích cho các band sáng rõ

3.2 Kết quả tối ưu hóa các thành phần trong phản ứng RAPD

Kết quả xác định nồng độ Taq polymerase và nồng độ primer:

Kết quả điện di cho thấy nồng độ Taq 0,75 U và nồng độ primer 1,2pM cho band sáng rõ nhất, sản phẩm PCR được tạo ra nhiều nhất so với những nghiệm thức còn lại





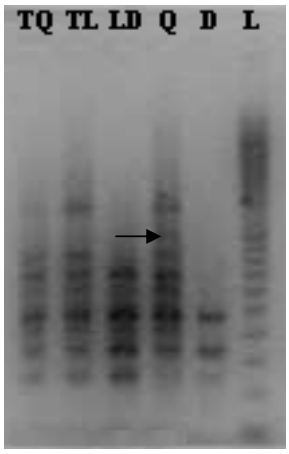
***Hình1**: Kết quả khảo sát nồng độ Taq polymerase*
Giếng 1, 2, 3: Nồng độ Taq 0,5 U
Giếng 4, 5, 6 : Nồng độ Taq 0,75 U
Giếng 7, 8, 9 : Nồng độ Taq 1 U

***Hình 2**: Kết quả khảo sát nồng độ primer*
Giếng 1, 2, 3: Nồng độ primer 0,8pM
Giếng 4, 5, 6 : Nồng độ primer 1pM
Giếng 7, 8, 9 : Nồng độ primer 1,2pM

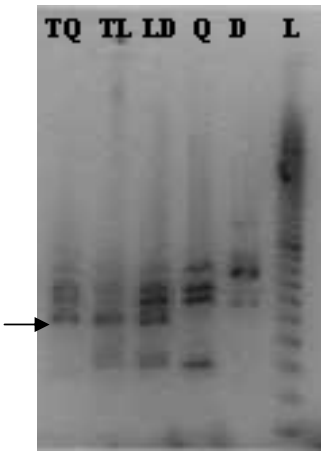
Kết quả đánh giá độ đa dạng di truyền của các giống dứa Cayenne:

Trong số 10 primer sử dụng thì có 7 primer cho đa hình, các primer còn lại hoặc không cho sản phẩm RAPD hoặc đồng hình ở tất cả các band hoặc cho số band khác nhau qua các lần PCR.

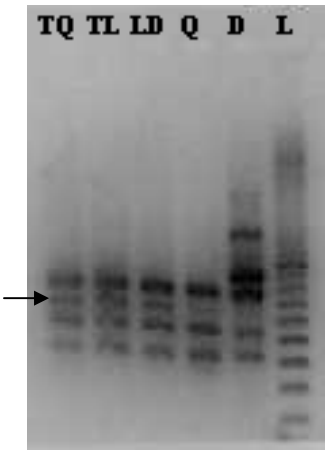
- Primer OPAC10 cho số band trên dứa nhiều nhất. Số band đa hình trên dứa là 4 và đa hình giữa dứa và lan dendro là 2. Trong đó band đa hình 1000bp chỉ xuất hiện ở dứa Queen, có thể đây là chỉ thị phân tử để phân biệt dứa Queen và dứa Cayenne.
- Primer OPB08 khuếch đại 7 band trên dứa trong đó có 4 band đa hình. Band đa hình 500bp có ở tất cả các giống dứa Cayenne mà không có ở giống dứa Queen nên đây có thể là chỉ thị giúp phân biệt dứa Queen và Cayenne.
- Primer V20 chỉ khuếch đại 4 band trên dứa và có 1 band đa hình 610bp chỉ xuất hiện ở dứa Cayenne. Đây có thể là chỉ thị phân tử giúp phân biệt dứa Cayenne và dứa Queen.



***Hình 3**: Sản phẩm khuếch đại RAPD với primer OPAC10*
TQ: dứa Cayenne Trung Quốc ; TL: dứa Cayenne Thái Lan; LD: dứa Cayenne Lâm Đồng; Q: dứa Queen; D : lan Dendrobium ; L : thang chuẩn



***Hình 4**: Sản phẩm khuếch đại RAPD với primer OPB08*
TQ: dứa Cayenne Trung Quốc ; TL: dứa Cayenne Thái Lan; LD: dứa Cayenne Lâm Đồng; Q: dứa Queen; D : lan Dendrobium ; L : thang chuẩn



***Hình 5**: Sản phẩm khuếch đại RAPD với primer V20*
TQ: dứa Cayenne Trung Quốc ; TL: dứa Cayenne Thái Lan; LD: dứa Cayenne Lâm Đồng; Q: dứa Queen; D : lan Dendrobium ; L : thang chuẩn

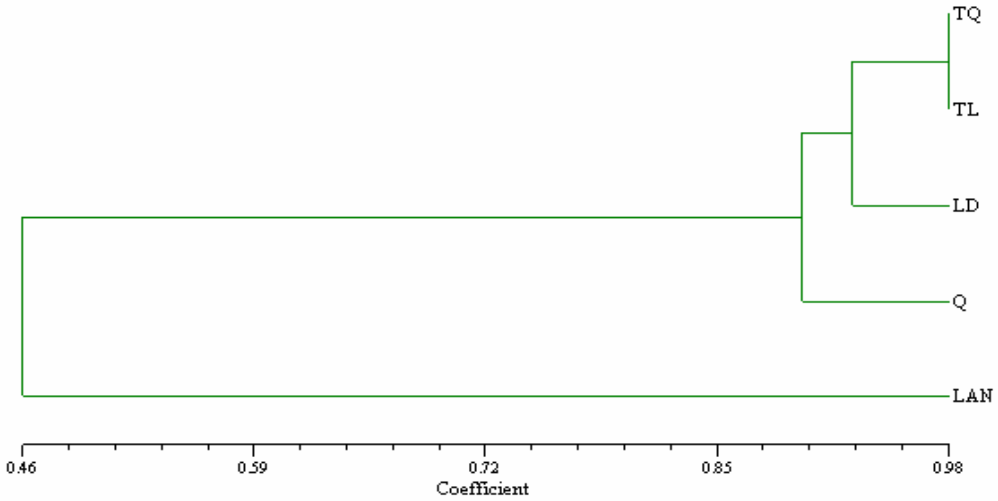
3.3 Phân tích số liệu RAPD bằng phần mềm NTSYS-pc và Winboot

Kết quả RAPD thu được trên gel điện di được mã hóa thành dạng nhị phân và đưa vào phân tích bằng phần mềm NTSYS-pc. Sử dụng Coefficient là DICE để tính ma trận tương đồng. Cây phân nhóm di truyền được tạo ra bằng phương pháp UPGMA dựa trên ma trận tương đồng

Bảng 1: Hệ số đồng dạng di truyền của 3 giống dứa Cayenne và các đối chứng

Rows\Cols	TQ	TL	LD	Q	LAN
TQ	1.0000000				
TL	0.9787234	1.0000000			
LD	0.9130435	0.9361702	1.0000000		
Q	0.9333333	0.9130435	0.8444444	1.0000000	
LAN	0.4583333	0.4489796	0.4583333	0.4680851	1.0000000

Kết quả cho thấy mức tương đồng gene cao nhất giữa hai giống Cayenne Trung Quốc và Cayenne Thái Lan (0,978) chứng tỏ hai giống này có cùng nguồn gốc và đứng rất gần nhau trong cây phân nhóm. Mức tương đồng gene thấp nhất giữa hai giống Cayenne Trung Quốc và Lâm Đồng chứng tỏ hai giống này đứng xa nhau trong cây phân nhóm

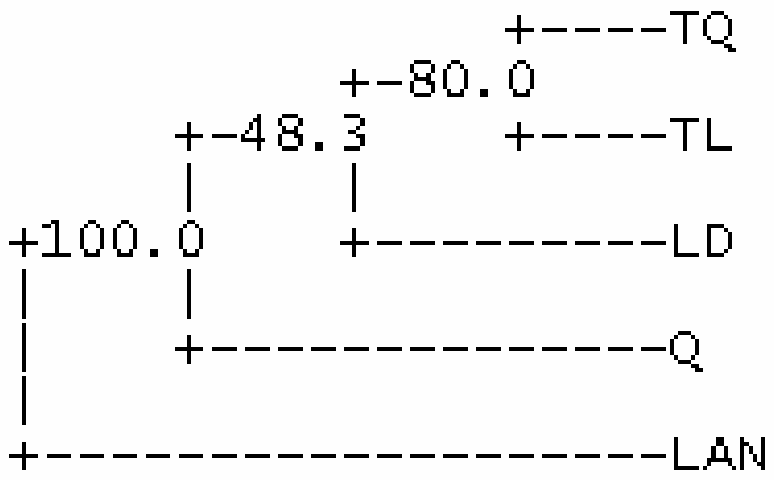


Hình 6: *Cây phân nhóm di truyền dựa vào kết quả RAPD*

Sơ đồ cây phân nhóm di truyền cho thấy nhóm dứa và đối chứng lan cách nhau khá xa với mức tương đồng 0,46 và trong nhóm dứa thì giữa nhóm Cayenne và nhóm đối chứng Queen có hệ số tương đồng là 0,9. Nhóm dứa Cayenne phân thành 2 nhóm nhỏ, nhóm 1 gồm 2 giống Cayenne Trung Quốc và Thái Lan, nhóm 2 là giống Lâm Đồng. Mức tương đồng giữa 2 nhóm khoảng 0,92.

Thông qua 2 đối chứng, cây phân nhóm di truyền đã thể hiện chính xác mối quan hệ di truyền giữa nhóm dứa Cayenne với đối chứng là dứa Queen và Lan. Vì vậy sự phân nhóm di truyền và khoảng cách di truyền của các giống dứa Cayenne có độ tin cậy cao.

Để khẳng định chính xác về kết quả cây phân nhóm di truyền, thực hiện kiểm tra độ tin cậy của các phân nhóm bằng cách dựng bootstrap bằng phần mềm winboot với số lần lặp lại là 10000 lần, coefficient là DICE.



***Hình** 7: Độ tin cậy của các phân nhóm*

Kết quả cho thấy độ tin cậy của phân nhóm Cayenne Trung Quốc và Thái Lan là 80%, độ tin cậy của phân nhóm dứa Cayenne và dứa Queen chỉ có 48,3%, độ tin cậy của phân nhóm dứa với lan là 100%.

Như vậy qua kết quả cây phân nhóm di truyền với hai đối chứng là dứa Queen và lan cùng với kết quả dựng bootstrap với phân mềm winboot, có thể kết luận kiểu phân nhóm di truyền của các giống Cayenne như hình 6 là có độ tin cậy cao nhất với độ tương đồng của 3 nhóm dứa Cayenne là 92%.

4. KẾT LUẬN

Qua khảo sát, các primer cho độ đa hình lần lượt là OPAC10, OPAH13, OPB01, OPB08, S1384 và V20. Có thể sử dụng các primer cho đa hình cao như OPAC10 và OPB08 để sàng lọc marker liên kết.

Các giống dứa Cayenne nhập nội và nội địa thu thập tại các nông trường Phạm Văn Hai và Thọ Vực trong khu vực TP. Hồ Chí Minh và Đồng Nai có độ đa dạng thấp. Như vậy, việc chọn lọc giống dứa có chất lượng cao hoặc lai tạo giống dứa Cayenne mới từ các giống dứa hiện có tại khu vực này là không có lợi cho việc tăng năng suất dứa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cecilia L.Steiger, Ray Ming, 2002, *Genetic diversity in pineapple assessed by AFLP markers*, USA.

2. Coopens d' Eeckenbrugge G., Bernasconi B., Messiaen B., Duval M. F., 1997, Using incompatibility alleles as genetic markers to identify pineapple varieties, *ISHS Acta Horticulturae 425: II International Pineapple Symposium.*

3. Doyle J.J. and Doyle J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*.

4. Drew R.A., 1997, *The application of biotechnology to the conservation and improvement of tropical and subtropical fruit species*, Rome.

5. Duval M.F. and d'Eeckenbrugge G.C., 1993. Genetic variability in the genus Ananas. *Acta Hort* 334: 27 – 32.
6. Duval M.F., Noyer G.L., Perrier X., d'Eeckenbrugge G C. and Hamon P., 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 83 - 90.

ANALYSIS THE GENETIC DIVERSITY OF CAYENNE PINNEAPPLE BY RAPD MARKERS

SUMMARY

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis has been evaluated for detecting DNA polymorphisms in Cayenne pineapple varieties. The genotypic identification based on 7 selected random 10 - mer primers demonstrated that there was a genetic variation between Queen and Cayenne varieties. However, genetic similarity was detected in the same Cayenne even from different location. Results obtained from UPGMA analysis divided 3 groups Cayenne studied into 2 clusters of local and exotic with 92% similarity indices.