

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA TẬP ĐOÀN GIỐNG XOÀI TẠI VÙNG ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Quảng Ngọc Vàng và Võ Công Thành¹

ABSTRACT

*Mango species in the Mekong Delta of Viet Nam was considered as in the region of original center of polyembryo mangoes (Vo Cong Thanh and Huynh Ky, 2000). A twelve economic mango varieties propagated by seeds such as 'Cat Chu', 'Thanh ca', 'Thom' planting in the region, six mango varieties in the germplasm of Cantho University were also analysed by leaf protein (SDS-PAGE) and DNA (CAPS-PCR run with 5 primer: CAP1A, CAP3A, CAP3B, CAP5A, CAP12A) methods. Results showed that any young leaf samples in the same tree had the same proteins, a sexual plant could distinguish with asexual plants by leaf protein method easily. CAP5A could be applied to distinguish polyembryos into one sexual and asexual embryos. Mango varieties such as 'Du Du', 'Thom', 'Buoì', and 'Hon' were classified into the same group (*M. odorata*). Other varieties including 'Bac', 'Cat Chu', 'Cat', 'Tuong', 'Cat Hoa Loc' were *M. indica*, and 'Thanh Ca' variety has confirmed as *M. mekongensis* (Pham Hoang Ho 2001).*

Keywords: *Mangifera spp.*, *M. mekongensis*, *Cat Hoa Loc*, *protein*, *DNA*

Title: *Genetic diversity of mango cultigen resources in the Mekong Delta*

TÓM TẮT

Đồng Bằng Sông Cửu Long nằm trong vùng khởi nguyên của cây xoài trồng. Xoài là loại cây ăn trái vừa có phẩm chất ngon, vừa thích hợp với thị hiếu của người tiêu dùng, do đó nó có giá trị cao về mặt kinh tế. Với kỹ thuật điện di protein (bằng phương pháp SDS-PAGE) và điện di ADN (primer CAP 5A) đã nhận diện được cây lai và cây phôi tâm của 6 giống xoài: Trung Quốc, Martin, Cát Vân Đen, Cát Hòa Lộc, Phim Xẻng Mãng, Namdorkmai. Kết quả điện di protein cũng cho thấy các giống: (1) Giống xoài Bưởi, Du Đủ, Hòn và Thom thuộc loài *Mangifera odorata*; (2) Giống xoài Cát, Cát Chu, Lai, Cát Hòa Lộc, Tượng và Bắc thuộc loài *Mangifera indic*; (3) Giống xoài Thanh Ca thuộc loài *Mangifera mekongensis*.

Từ khóa: *SDS-PAGE*, *primer*, *protein*, *DNA*, *Mangifera spp*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Xoài (Mango) là loại cây ăn trái có giá trị kinh tế cao và được coi là "vua trái cây" có tiềm năng phát triển rất mạnh đáp ứng nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Theo Việt Chương (1999), cây xoài rất thích hợp để trồng ở Việt Nam đặc biệt ở Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) được coi là "vùng đặc địa" của các giống xoài.

Hầu hết các giống xoài đang trồng trong sản xuất đều thuộc dạng đa phôi, trong số các phôi này chỉ có một phôi hữu tính, còn lại là các phôi vô tính. Trước đây việc nhân giống xoài bằng hạt đã được áp dụng rộng rãi, song với phương pháp nhân giống này đã cho một tỉ lệ giống xoài lai và trên thực tế ở các vườn xoài lâu năm đã xuất hiện nhiều cây có dạng hình khác nhau.

Việc nhận diện các cây xoài vô tính và cây hữu tính ở giai đoạn cây con từ trước đến nay vẫn chủ yếu dựa vào dạng cây lớn, nhỏ. Thông thường người dân cho rằng những cây con khỏe, thân to là những cây vô tính nên được nhà vườn giữ lại, trong khi các cây hữu tính thường phát triển chậm, yếu ớt, do đó dễ bị loại bỏ trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên, với cách phân biệt này dễ dẫn đến sự nhầm lẫn, vì qua thực tế vẫn có một số

¹ Khoa Nông Nghiệp và Sinh học ứng dụng

trường hợp cây con khỏe được giữ lại khi trưởng thành mới phát hiện có đặc tính khác với cây mẹ ban đầu.

Để có một kết luận khoa học hơn, bước đầu chúng tôi ứng dụng phương pháp điện di protein trên lá xoài nhằm mục đích: tìm hiểu tính đa dạng di truyền của một số giống xoài đang trồng phổ biến ở ĐBSCL và nhận diện cây vô tính, cây hữu tính so với cây mẹ.

2 PHƯƠNG TIỆN - PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

- Mẫu lá xoài con được thu tại các tỉnh Cần Thơ, Vĩnh Long, Đồng Tháp, Tiền Giang để đánh giá tính đa dạng di truyền, bao gồm 12 giống xoài là: Cát Chu, Thanh Ca, Thơm, Cát Hòa Lộc, Bưởi, Đu Đủ, Cát, Bắc (Battambang), Tượng, Lai, Hòn. Mỗi giống thu 50 mẫu, số mẫu tổng cộng cho 12 giống là 600 mẫu.
- Mẫu lá xoài non được thu ở vườn thực nghiệm giống cây trồng, khu II, Đại Học Cần Thơ để theo dõi hiện tượng đa phôi bao gồm 6 giống xoài là: Trung Quốc, Martin, Cát Vân Đen, Cát Hòa Lộc, Phim Xẻng Măng, Namdorkmai.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Các bước trong qui trình phân tích protein lá xoài

- Nghiền mịn lá với TCA 10%, -20°C/ 30 phút.
- Rửa trắng mẫu với aceton, -20°C/ 30 phút.
- Ly trích mẫu qua đêm bằng dung dịch ly trích lá.
- Bộ điện di gel protein.
- Nhuộm gel bằng dung dịch Nitrat bạc.

2.2.2 Các bước trong qui trình ly trích ADN trên lá xoài

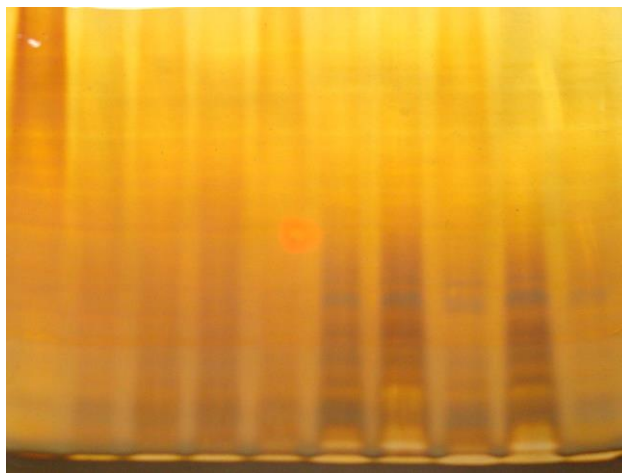
- Nghiền 50g mẫu lá với 500µl Isolation buffer (trữ lạnh), ly tâm 10.000 vòng /phút.
- Thêm 250µl dịch trích ADN, thêm 30µl sarcosin 10%, ủ trong phòng 10 phút, thêm 300µl CTAB, ủ 65°C trong 15 phút, ly tâm 6.000 vòng/10 phút.
- Chuyển phần dung dịch phía trên sang tube mới, thêm 500µl Isopropanol, trộn đều, sau đó để yên 15 phút, ly tâm 13.000/15 phút.
- Rửa sạch bằng ethanol 70% & ly tâm 6.000 vòng/5 phút, phơi khô, thêm 500µl TE, thêm 500µl Phenol:chloroform, ly tâm 6.000 vòng/5 phút.
- Chuyển phần dung dịch phía trên sang tube mới, thêm 500µl Isopropanol, trộn đều, sau đó để yên 15 phút, ly tâm 13.000/15 phút.
- Loại bỏ dung dịch bên trên, rửa sạch bằng ethanol 70% & ly tâm 6.000 vòng/5 phút, phơi khô rồi thêm 100µl TE. Cuối cùng là thao tác chạy gel và xử lý kết quả.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định sự biến động protein trong tán cây xoài

Qua kết quả điện di protein trên các vị trí lá xoài /cây của năm giống xoài: Falun, Cát Hòa Lộc, Trung Quốc, Úc, Namdorkmai (Hình1) chúng tôi ghi nhận như sau:

Ở những vị trí khác nhau trên cùng một cây, các băng protein đều biểu hiện giống nhau. Kết quả này là một bằng chứng chứng minh được rằng phương pháp điện di protein bằng kỹ thuật SDS - PAGE có tính ổn định rất cao, lấy mẫu ở bất kỳ vị trí nào trên cây cũng đại diện cho cả thể được nghiên cứu.



Hình 1: Phổ điện di protein lá xoài Cát Hoà Lộc, so sánh 5 vị trí khác nhau /cây

3.2 Nhận diện cây đa phôi

3.2.1 Nhận diện cây đa phôi bằng phương pháp điện di protein

Bảng 1: Chiều cao và đường kính thân của những hạt có xuất hiện cả cây lai và cây giống mẹ qua kết quả điện di

Giống	STT cây	Cây phôi tâm		Cây lai	
		Chiều cao (cm)	Đường kính (mm)	Chiều cao(cm)	Đường kính (mm)
PXM	1	87	8,4	52	10,28
	2	41	4,72	63	6,8
	3	67	5,94	77	10
	4	51	6,3	51	7,74
TB		61,5	6,34	60,75	8,71
CVD	1	30	4	89	11,44
	2	49	4,32	81	10
	3	42	4,72	74	8,18
	4	40	4,32	33	3,74
	5	61	6,82	59	5,9
	6	69	5,96	32,5	4,2
	7	40	5,16	82	8,3
TB		89	11,1	82	8,3
TB		53,63	5,8	64,36	7,39
CHL	1	91	9,4	61	6,48
	2	30	3,2	39	3,463
	3	52	7,66	33	7
	4	45	4,2	58	
TB		69	7,52		
TB		57,4	6,4	47,75	4,99
Martin	1	83	10,6	106	17,14
	2	58,5	6,1	106,5	14
	3	59	6,1		
TB		82	10,9	94	11,36
TB		59	6,88		
TB		68,3	8,12	102,17	14,17
NDM	1	36	4,8	65	6,62
	2	50	4,6	61	9
TB		43	4,7	63	7,81
TB chung		57,9	6,41	65,85	8,23

Ghi chú: PXM là Phim Xêng Mãng, CHL là Cát Hòa Lộc, CVD là Cát Vân Đen, NDM là Namdorkmai.

Đánh giá phổ điện di protein của một mẫu vật nghiên cứu là đánh giá gián tiếp về sự biểu hiện toàn bộ kiểu gen, hay nói cách khác là biểu hiện ADN của nó. Vì vậy, nếu là cây phôi tâm thì protein của cây con hoàn toàn giống với cây mẹ. Ngược lại, cây lai thì lại xuất hiện protein khác với cây mẹ cho biểu hiện kiểu gen dị hợp. Qua nhận diện trên phổ điện di chúng tôi phân loại cây phôi tâm và cây lai hữu tính biểu hiện qua kiểu hình tương ứng theo chiều cao và đường kính thân của các giống được trình bày trong Bảng 1.

Qua phân tích thống kê trên chiều cao và đường kính thân của giống Phim Xẻng Măng, Cát Vân Đen, Cát Hòa Lộc, Namdorkmai cho thấy giữa cây phôi tâm và cây lai khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%, chỉ có giống Martin là khác biệt có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% (tức là ở giống này những cây cao, đường kính thân lớn lại là cây lai). Riêng chỉ có giống xoài Trung Quốc chỉ có 1 cây/hột nên chưa có thể kết luận được. Từ đó ta có thể kết luận rằng giữa cây lai và cây phôi tâm không có khác biệt nhau về kích cỡ bên ngoài.

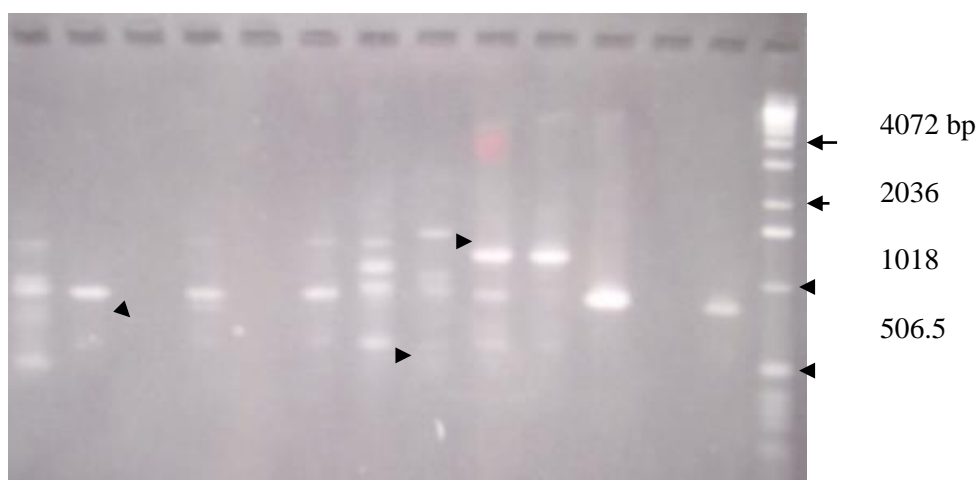
Qua kết quả số liệu ở Bảng 1 cho thấy cây lai xuất hiện ở cả cây lớn và cây nhỏ. Hơn nữa, chiều cao cũng như đường kính thân giữa cây lai và cây phôi tâm lại khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%. Nếu chỉ dựa vào hình dạng, kích thước bên ngoài để phân biệt thì có thể dẫn đến sự nhầm lẫn. Do đó, dùng phương pháp điện di để nhận diện cây lai sẽ có tính chính xác và khoa học hơn.

3.2.2 Kiểm nghiệm cây đa phôi bằng kỹ thuật điện di DNA (CAPS-PCR)

Để khẳng định tính chính xác giữa hai kỹ thuật trên chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sự khác biệt giữa cây phôi tâm và cây lai hữu tính ở mức độ phân tử ADN.

Qua phân tích chạy điện di DNA của 4 giống: Namdorkmai, Cát Hòa Lộc, Trung Quốc, Phim Xẻng Măng (Hình 3) trên 5 primer khác nhau (CAP 1A, CAP 3A, CAP 3B, CAP 5A, CAP 12A) cho thấy CAP 5 có khả năng phân biệt được cây vô tính và cây hữu tính của những cây trên cùng một hạt. Mặt khác, kết quả này lại trùng hợp với kết quả điện di protein. Do đó cho phép chúng tôi khẳng định rằng phương pháp điện di protein có kết quả khá chính xác để phân biệt, nhận diện ra cây lai. Đây là một phương pháp rất khả thi để ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp ngày nay.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Hình 2: Phổ điện di ADN lá xoài non phân biệt cây đa phôi

- | | | | |
|--------------|-------------|--------------------|------------|
| 1 Namdorkmai | 5. CHL | 9. TQ 1* | 13 PXM |
| 2 NDM * | 6. CHL | 10. TQ 2 | 14. Marker |
| 3 NDM | 7. CHL * | 11. Phim Xẻng Măng | *. cây lai |
| 4 CHL stock | 8. TQ stock | 12 P.X. M* | |
- *: hybrid

Kết quả Hình 3 được ghi nhận như sau:

- Giếng 1, 2, 3 có cùng giống là Namdorkmai. Trong đó, cây lai (giếng 2) khác biệt so với cây mẹ (giếng 1) ở vị trí 911bp.
- Giếng 4, 5, 6 và 7 là giống Cát Hoà Lộc. Trong đó, cây lai (giếng 7) khác biệt so với cây mẹ (giếng 4) ở vị trí 1.208 bp. Cây phiêu tâm (giếng 5 và giếng 6) không khác biệt với cây mẹ.
- Tương tự là giếng 8, 9, 10 là giống Trung Quốc. Trong đó, cây lai (giếng 9 và giếng 10) khác biệt so với cây mẹ ở vị trí 1.328 bp.

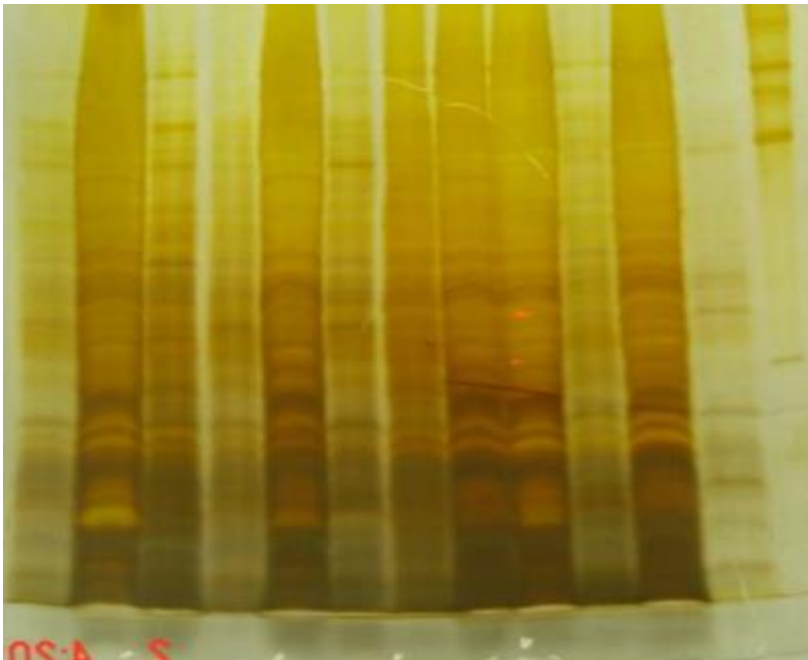
3.3 Phân nhóm giống xoài nhờ marker protein

Rao *et al*, 1992 cho rằng khi chạy điện di protein mỗi loài đều có băng protein điển hình. Sự hiện diện của loài khác có thể được phân biệt bởi trọng lượng phân tử và vị trí của các polypeptide điển hình của loài. Mỗi loài khác nhau từ 2 - 6 hoặc 7 băng.

Theo phân loại của Phạm Hoàng Hộ (2000) thì xoài Thơm thuộc loài *Mangifera odorata*. Qua kết quả điện di protein ở Hình 3 cho thấy xoài Thơm và xoài Đu Đủ có các dải băng chính hiện diện giống nhau, chỉ có biến dị chút ít. Do đó, bước đầu có thể kết luận xoài Đu Đủ cũng thuộc loài *Mangifera odorata*.

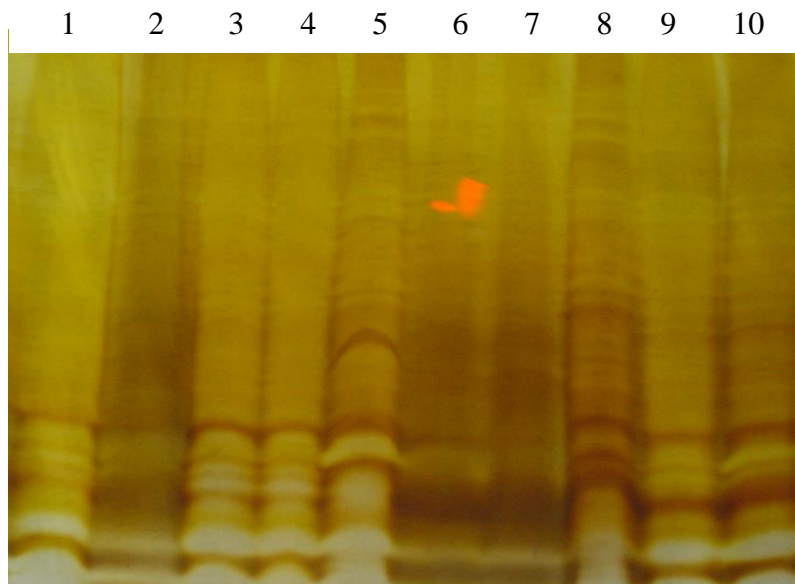
Kết quả điện di ở Hình 3 và 5 cho thấy xoài Bưởi, xoài Hòn cũng thuộc loài *Mangifera odorata*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



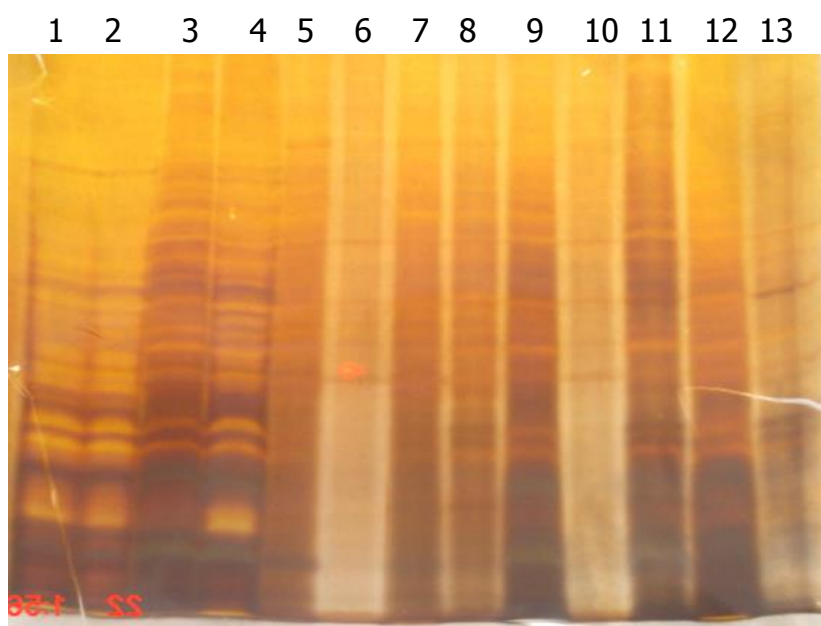
Hình 3: Phổ điện di protein lá xoài giữa các loài khác nhau

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 - 2: Thanh Ca (<i>M. mekongensis</i>) | 3. Cát Chu (<i>M. indica</i>) |
| 4. Cát (<i>M. indica</i>) | 5. Cát Hoà Lộc (<i>M. indica</i>) |
| 6. Tượng (<i>M. indica</i>) | 7. Lai (<i>M. indica</i>) |
| 8. Bưởi (<i>M. odorata</i>) | 9. Đu Đủ (<i>M. odorata</i>) |
| 10. Bắc (<i>M. indica</i>) | 11-12. Thơm (<i>M. odorata</i>) |
| 13. Marker | |



Hình 4: Phổ điện di protein lá xoài

1-8. Thơm; 9-10. Đu Đủ



Hình 5: Phổ điện di protein lá xoài

1-5. Hòn 6. Cát Hoà Lộc 7-13. Thơm

Cũng từ kết quả điện di ở hình 3 cho thấy các giống xoài Bắc, xoài Cát Chu, xoài Cát, xoài Tượng là có xuất hiện các dải băng giống nhau. Phạm Hoàng Hộ (2000) cho rằng xoài Tượng thuộc loài *Mangifera indica*. Vì vậy, chúng tôi cho rằng xoài Bắc, xoài Cát Chu, xoài Cát cũng thuộc loài *Mangifera indica*. Giống xoài Lai rất giống xoài Cát ở các dải băng đặc biệt, chỉ khác nhau chút ít. Có thể đây là cây hữu tính có nguồn gốc từ xoài Cát (loài *Mangifera indica*). Qua phân tích 42 cây xoài Cát Hòa Lộc chúng tôi nhận thấy sự hiện diện các băng không đồng nhất với nhau nhưng các băng đặc biệt thì rất giống với xoài Tượng. Từ đó cho thấy đây là giống thuộc loài *Mangifera indica* nhưng do ảnh hưởng của gốc ghép nên có sự khác biệt như trên (Võ Công Thành *et al*, 2001).

Xoài Thanh Ca là loài *Mangifera mekongensis* (Phạm Hoàng Hộ, 2000). Kết quả phân tích điện di cũng cho kết quả phù hợp với cách phân loại trên.

4 KẾT LUẬN - ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Từ những kết quả phân tích trên cho phép chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Đánh giá xoài cây con phôi tâm và xoài cây con lai dựa theo kiểu hình chiều cao cây và đường kính thân có mức độ chính xác không cao.
- Tính biến dị protein của mỗi cá thể trong cùng giống và giữa các giống thể hiện cao.
- Giống xoài Bưởi, Đu Đủ, Hòn và Thơm thuộc loài *Mangifera odorata*.
- Giống xoài Cát, Cát Chu, Lai, Cát Hòa Lộc, Tượng và Bắc thuộc loài *Mangifera indica*.
- Giống xoài Thanh Ca thuộc loài *Mangifera mekongensis* (Phạm Hoàng Hộ, 2000) là một loài riêng biệt so với hai loài trên.
- Trong kỹ thuật điện di ADN, primer CAP 5 phân biệt được xoài cây đa phôi.

4.2 Đề nghị

- Ứng dụng kỹ thuật điện di protein để nhận diện và phân nhóm giống xoài phục vụ cho sản xuất..
- Tiếp tục đánh giá tính đa dạng di truyền của các giống còn lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- PHẠM HOÀNG HỘ. 2000. Cây cỏ Việt Nam, tập II, trang 363-368.
- VIỆT CHƯƠNG. 1999. Kỹ thuật trồng cây ăn trái. Nhà xuất bản Đà Nẵng, trang 1-5.
- VÕ CÔNG THÀNH, HUỖNH KỶ. 2001. Tìm qui trình phân tích các tiểu đơn vị protein trên lá xoài. Đề tài cấp trường, 10 trang.
- YUTAKA HIRATA. 1998. Sổ tay qui trình phân tích trên lá buckwheat.