

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN TẾ BÀO VÀ DI TRUYỀN TẾ BÀO PHÂN TỬ ĐỂ XÁC ĐỊNH NGUỒN GỐC THỂ NHIỄM SẮC CỦA CÂY LAI TỰ NHIÊN GIỮA CÁC LOÀI TRONG CHI KHOAI MÔN *COLOCASIA* (ARACEAE)

NGUYỄN XUÂN VIẾT

Trường đại học Sư phạm Hà Nội

Hiện tượng lai tự nhiên giữa loài khoai môn và loài dọc mùng trong chi Khoai môn *Colocasia* đã được chúng tôi phát hiện dựa trên các nghiên cứu biến dị điện di isôzym [5]. Tuy nhiên, nguồn gốc của thể nhiễm sắc (TNS) trong tế bào cây lai này vẫn chưa được xác định.

Lai tại chỗ bộ gien nhân (genomic in situ hybridization, GISH) là một kỹ thuật xác định vị trí trên TNS trình tự ADN bổ sung với trình tự của mẫu dò ADN đã được đánh dấu. Kỹ thuật GISH đã được ứng dụng thành công trong nhiều nghiên cứu để xác định nguồn gốc của TNS trong các cây lai khác loài, kiểm tra nguồn gốc của các thể nhị bội tự nhiên hoặc kiểm tra sự xuất hiện những biến dị trong các genôm v.v.. [1, 4, 10].

Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả phân tích di truyền tế bào và di truyền tế bào phân tử có thể giúp xác định nguồn gốc của TNS của cây lai tự nhiên khác loài trong chi *Colocasia*. Các cây lai tự nhiên này đã được chúng tôi phát hiện qua nghiên cứu biến dị điện di isôzym và đã công bố trong bài báo trước [5].

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Cây khoai môn *Colocasia esculenta* (L.) Schott và cây dọc mùng *Colocasia gigantea* (Bl.) Hook f. thuộc chi Khoai môn (*Colocasia*), họ Ráy (Araceae) đã được dùng để chiết tách ADN tổng số. Lai tại chỗ ADN bộ gien được tiến hành trên tiêu bản TNS làm từ đỉnh rễ của cây C81126 và cây C81114-những cây được giả định là cây lai tự nhiên giữa khoai môn và dọc mùng bởi chúng mang đặc trưng phổ điện di isôzym của cả khoai môn và dọc mùng [5].

2. Phương pháp

Quan sát hình thái và đếm số lượng TNS trong kỳ giữa của tế bào đỉnh rễ tiến hành như mô tả trong báo cáo trước [3]. Quan sát TNS trong giảm phân được tiến hành trên các tế bào mẹ của hạt phấn lấy từ hoa còn non và được nhuộm bằng 2% oxêin axêtic trong 5 phút. Độ hữu thụ của hạt phấn đã được tính toán dựa trên tiêu bản nhuộm hạt phấn bằng cacmin axêtic. Hạt phấn hữu thụ có dạng hình cầu và nhuộm màu đỏ đậm.

Tiêu bản TNS sử dụng để tiến hành lai ADN được chuẩn bị theo phương pháp tiêu bản kính phết. Rễ cố định sau khi đã ngâm rửa khoảng 10 phút trong nước cất được thủy phân bằng ủ trong dung dịch enzym (2% (w/v) xenlulaza (Onozuka R-10) và 2% (w/v) pectinaza (Sigma) hoà tan trong đệm 0,1 M natri xitrat, pH 4,9) khoảng một giờ tại nhiệt độ 37°C. Loại bỏ vách tế bào bằng ly tâm và rửa bằng dung dịch cố định mới (3 cồn : 1 axêtic). Dịch huyền phù tế bào được nhỏ lên lam kính sạch và làm khô tự nhiên. Các tiêu bản được giữ trong tủ -20°C cho đến khi tiến hành lai.

ADN tổng số của khoai môn và dọc mùng được chiết tách từ lá tươi trong đệm CTAB [9] có thay đổi nhỏ. Mẫu dò ADN được đánh dấu bằng digoxigenin-high prime (DIG-High Prime). Phát hiện ADN đánh dấu DIG bằng anti-digoxigenin-AP.

GISH đã được tiến hành theo Murata (1992) [3] có cải tiến. Xử lý tiêu bản TNS trong 2 × SSC chứa 100 µg/ml RNaza tại 37°C trong 1 giờ. Rửa tiêu bản 2 lần bằng 2 x SSC tại nhiệt độ phòng. Khử nước bằng ngâm lần lượt qua các dung dịch cồn (70⁰, 85⁰, 99,5⁰) trong 5 phút đối với mỗi loại. Hỗn hợp dung dịch lai chứa

50%(v/v) phócmanit, 10% (v/v) dextran sunfat, $2 \times$ SSC, 20 ng/ μ l ADN của khoai môn hoặc dọc mùng đã đánh dấu bằng digoxigenin và 400 ng/ μ l ADN không đánh dấu của dọc mùng hoặc khoai môn.

30 μ l hỗn hợp dung dịch lai đã được nhỏ lên trên mỗi tiêu bản TNS, đặt lamén và gắn kín bằng keo. Tiêu bản sau đó được đặt trên đĩa nóng 92~94°C trong 3 phút để làm biến tính ADN. Ủ tiêu bản trong hộp giữ ẩm tại 37°C trong 16~18 giờ để thực hiện lai ADN-ADN. Gỡ bỏ lamén bằng $2 \times$ SSC và rửa tiêu bản trong dung dịch $2 \times$ SSC 50% phócmanit tại 37°C trong 10 phút, $2 \times$ SSC tại 37°C trong 10 phút và 2 lần trong $2 \times$ SSC tại nhiệt độ phòng.

ADN đánh dấu DIG được phát hiện bằng ủ tiêu bản trong anti-digoxigenin-AP một giờ trong hộp giữ ẩm 37°C. Rửa tiêu bản 4 lần (5 phút/lần) trong dung dịch $2 \times$ SSC/0,05% Tween 20 tại nhiệt độ phòng. Các vị trí lai với mẫu dò đánh dấu DIG được phát hiện sau khi ủ tiêu bản trong dung dịch chứa NBT/X-phốtphát một giờ tại 37°C.

TNS được nhuộm phụ bằng 4',6 diamidino-2-phenylidol (DAPI, 2 μ g/ml). Các TNS nhuộm DAPI hoặc NBT/X-phốtphát sẽ được chụp ảnh bằng phim 400 ASA/ISO (Fuji super HG) dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi huỳnh quang có kính lọc UV. Các nghiên cứu được tiến hành tại phòng Di truyền tế bào và chọn giống thực vật, khoa Nông nghiệp, trường đại học Tổng hợp Okayama, Nhật Bản.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Các cây C81126 và C81114 được giả định là những cây lai tự nhiên giữa loài khoai môn *C. esculenta* và loài dọc mùng *C. gigantea* dựa trên kết quả phân tích điện di isôzym [5].

Về hình thái, cây lai có thân và lá giống với các cây môn khác đã sử dụng trong nghiên cứu biến dị isôzym [4], hình 1A.

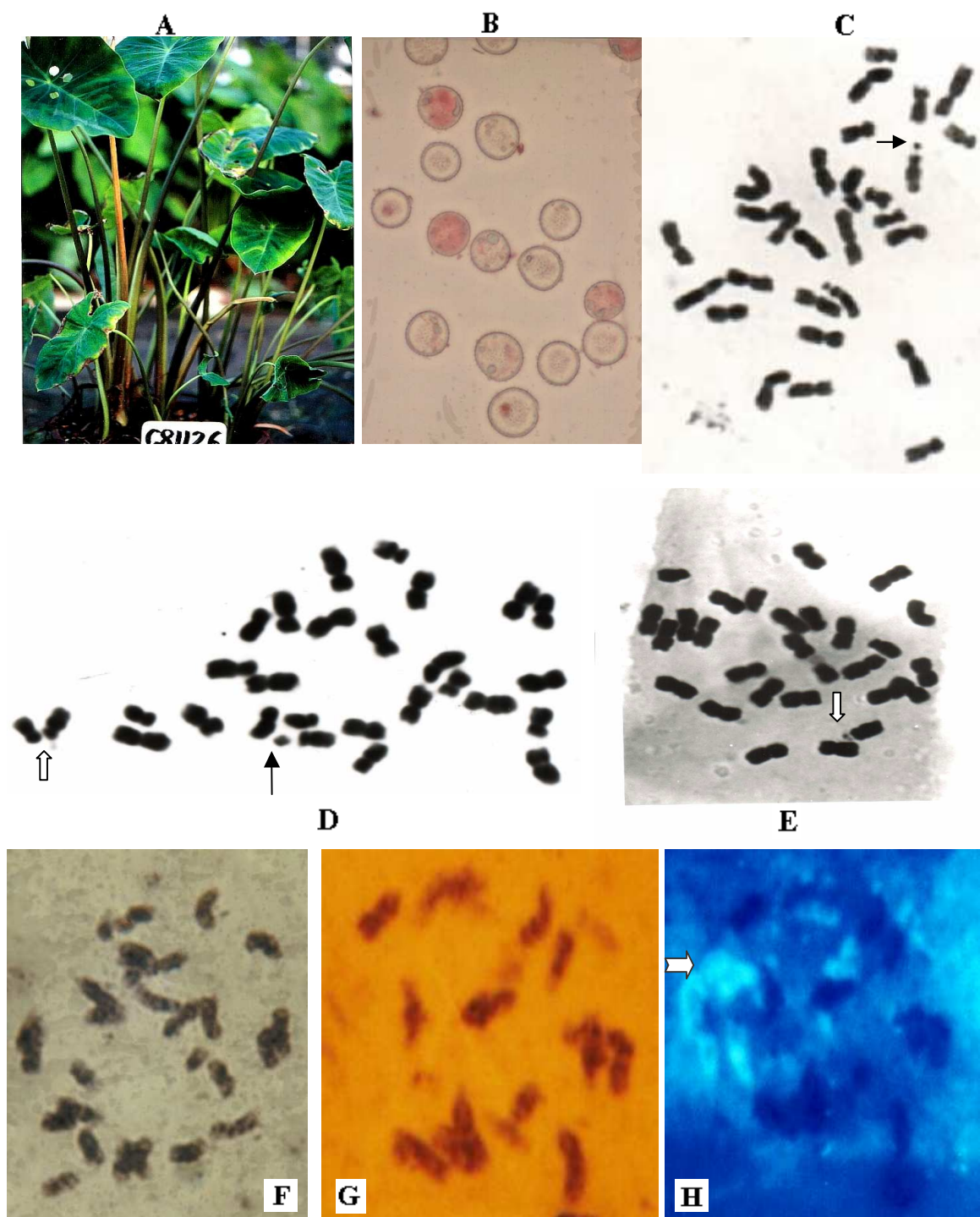
Số lượng TNS của cả hai loài khoai môn và dọc mùng đã được báo cáo trong nhiều công trình [2, 7]. Theo các báo cáo này thì cả hai loài đều có các dạng bội TNS $2n = 28$ và 42 TNS. Trong nghiên cứu này, số lượng TNS của các cây đã dùng làm vật liệu nghiên cứu đều có số

lượng TNS $2n = 28$ (hình 1C, 1D và 1E).

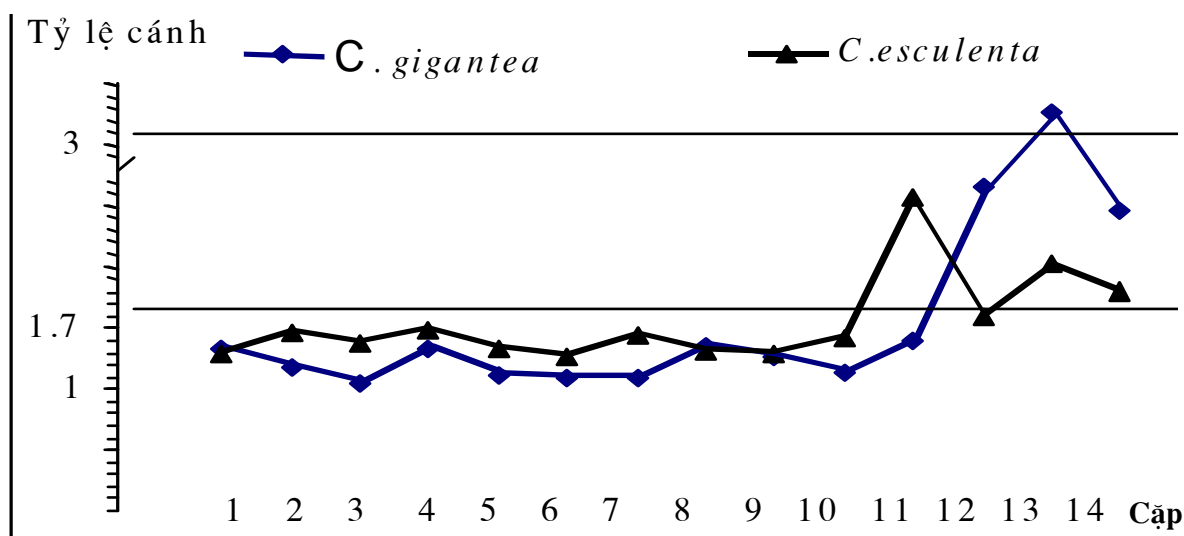
Phân tích kiểu nhân cho thấy các TNS trong nhân tế bào của khoai môn có kích thước lớn hơn TNS của dọc mùng. Chiều dài TNS nằm trong khoảng 1,92 μ m~3,75 μ m đối với khoai môn và 1,72 μ m~3,27 μ m ở dọc mùng. Cả hai loài đều có một cặp TNS có thể kèm, nhưng cặp TNS này ở khoai môn là cặp TNS có tâm lệch giữa còn ở dọc mùng là cặp NST có tâm lệch mút ($r > 3,0$, hình 2). Cặp thể kèm trong nhân tế bào của khoai môn cũng lớn hơn nhiều so với thể kèm của dọc mùng (hình 1C và 1D). Mặc dầu, các vật liệu để phân tích kiểu nhân của khoai môn và dọc mùng có thể không phải là bố mẹ đã trực tiếp tạo ra cây lai C81126 và C81114, chúng được lấy rất ngẫu nhiên trong các cây cùng được thu thập ở Népan, nhưng kích thước của cặp thể kèm trong nhân của tế bào cây lai (hình 1E) cho thấy một thể kèm có kích thước lớn, thể kèm còn lại có kích thước bé. Chiều dài của TNS nằm trong khoảng 1,75~3,82 μ m. Kết quả quan sát này phán đoán nguồn gốc khác nhau của các TNS này trong tế bào của cây lai.

Vì số tế bào mẹ của hạt phấn được quan sát TNS giảm phân trong nghiên cứu này còn quá ít (chỉ 4 tế bào) để có thể rút ra kết luận có ý nghĩa về số cặp TNS tương đồng trong tế bào cây lai, nhưng các quan sát trong các tế bào này cho thấy có từ 1-3 cặp lưỡng trị (bivalent), số còn lại là các đơn trị. Sự bất bình thường trong giảm phân này có lẽ đã là nguyên nhân đưa đến sự bất thụ của hầu hết các tế bào của hạt phấn. Tỷ lệ hạt phấn hữu thụ của cây lai C81126 vào khoảng 1 % (hình 1B).

Lai ADN: ADN tổng số của khoai môn và dọc mùng đã chiết tách từ lá tươi cho thấy đủ sạch để tiến hành lai. Đánh dấu DIG tạo mẫu dò được tiến hành đối với ADN của cả 2 loài. Một thử nghiệm kiểm tra hiệu quả đánh dấu DIG và xác định điều kiện lai được tiến hành đối với mỗi một loài. Các mẫu dò của mỗi loài đã được lai trên tiêu bản TNS của chính loài đó. TNS của tế bào dọc mùng đã được lai bằng mẫu dò là ADN bộ gien của dọc mùng đánh dấu bằng DIG (hình 1F). Kết quả quan sát cho thấy cả 28 TNS trong tế bào đều xảy ra hiện tượng lai. Từ kết quả đó, cho phép phán đoán cả ADN đánh dấu và các điều kiện trong quy trình là phù hợp để tiến hành lai kiểm tra nguồn gốc của TNS của cây lai.



Hình 1. A) Cây lai (C81126), B) Hạt phấn của C81126, C) TNS của *C. esculenta* với 1 cặp thể kèm lớn, D) TNS của *C. gigantea* với cặp thể kèm bé, E) TNS của C81126 với một thể kèm lớn và một thể kèm bé, F) TNS của *C. gigantea* lai với mẫu dò ADN chính nó được đánh dấu bằng DIG, G và H: TNS của C81126 được lai với ADN của *C. gigantea* đánh dấu DIG (G: 14 TNS lai quan sát thấy dưới kính hiển vi quang học và H: các TNS không lai quan sát thấy dưới kính hiển vi huỳnh quang). Dấu → : thể kèm có nguồn gốc từ *C. esculenta*. ⇨ : thể kèm có nguồn gốc từ *C. gigantea*. ⇩⇨: TNS không lai với ADN đánh dấu DIG.



Hình 2. Tỷ lệ cánh TNS trong kiểu nhân của *C. esculenta* và của *C. gigantea*

Hỗn hợp dung dịch lai chứa 20 ng/μl ADN của dọc mùng đánh dấu bằng DIG và ADN của khoai môn không đánh dấu (tỷ lệ 1:20) đã được lai trên tiêu bản TNS của C81126. Kết quả quan sát cho thấy 14 TNS nhuộm màu xanh đậm và 5 TNS khác nhuộm màu rất nhạt (hình 1G). Khi tiêu bản này được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, các TNS vốn không nhìn thấy dưới kính hiển vi quang học đã có thể quan sát thấy dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong 14 TNS nhuộm màu huỳnh quang, có 9 TNS phát quang rất rõ (hình 1H). Kết quả này cho thấy 14 TNS bắt màu đậm nhìn thấy dưới kính hiển vi quang học là NST có nguồn gốc từ dọc mùng mang trình tự bổ sung với ADN của dọc mùng đánh dấu DIG. Các TNS nhìn thấy dưới kính hiển vi huỳnh quang có nguồn gốc từ khoai môn không mang trình tự bổ sung với ADN mẫu dò của dọc mùng. Trong một phép lai tiến hành trên một tiêu bản khác, hỗn hợp ADN mẫu dò là ADN của khoai môn đánh dấu DIG với ADN không đánh dấu của dọc mùng (1:20) đã cho kết quả tương tự. Các TNS nhuộm màu xanh đậm cho thấy hiện tượng lai đã xảy ra. TNS xảy ra sự lai mang trình tự bổ sung với mẫu dò ADN của khoai môn đánh dấu bằng DIG. TNS không lai quan sát thấy dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Prana (1984), Okada và Hambali (1989) đã báo cáo về tần số hình thành cặp TNS trong giảm phân ở cây lai giữa khoai môn và dọc mùng do họ tạo ra. Theo báo cáo của Okada và

Hambali (1989) thì số cặp lưỡng bội hình thành trong giảm phân ở tế bào mẹ của hạt phấn từ 0~3, số đơn bội từ 21~28, đồng thời cũng ghi nhận về sự hiện diện của một cặp thể kèm có kích thước không như nhau trong tế bào của cây lai [6, 8]. Kết quả quan sát trong nghiên cứu này cũng trùng hợp với những nhận xét trên.

Kết quả lai ADN cho thấy ADN tổng số từ một loài bố mẹ đánh dấu DIG có thể được dùng như là một mẫu dò cho lai tại chỗ để phân biệt các TNS đặc trưng loài trong tế bào của cây lai. 14 trong số 28 TNS quan sát thấy trên tiêu bản tế bào đỉnh rễ khi được lai với ADN của khoai môn hoặc ADN của dọc mùng đánh dấu bằng DIG cho phép khẳng định sự tồn tại của hai bộ đơn bội TNS của cả hai loài này trong tế bào cây lai C81126, và phương pháp lai tại chỗ GISH đã là một phương pháp hữu hiệu cho phép xác định nguồn gốc của TNS của cây lai tự nhiên trong chi *Colocasia*.

Phát hiện hiện tượng lai tự nhiên trong chi *Colocasia* dựa trên các nghiên cứu đa hình biến dị điện di isozym [5] và kết quả phân tích di truyền tế bào và di truyền tế bào phân tử cho phép xác định nguồn gốc của TNS của cây lai tự nhiên trong nghiên cứu này sẽ có ý nghĩa quan trọng để phân loại một cách chính xác ở mức dưới loài, cải tiến giống khoai môn, nghiên cứu sự đa dạng của các giống khoai môn và sự tiến hóa trong chi *Colocasia*.

Lời cảm ơn: Tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Yoshino H., GS. TS. Tahara M., khoa Nông nghiệp, trường đại học Tổng hợp Okayama, Nhật Bản đã tạo mọi điều kiện cần thiết và những hướng dẫn tận tình để công trình được hoàn thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **D'Hon A. et al.**, 1996: Mol. Gen. Genet., 250: 405-413.
2. **Hotta M.**, 1970: Memories of the Faculty of Science, Kyoto University, series of Biology, 9(1): 72-96.
3. **Murata M., N. Nakata and Y. Yasumuro**, 1992: Chromosoma, 102: 27-31.
4. **Nguyen V. X.**, 1998: Isozyme variation and phylogenetic relationships in taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott and related taxa. Ph.D. Thesis, Okayama University, Japan.
5. **Nguyễn Xuân Việt**, 2001: Tạp chí Sinh học, 23(3b): 131-136.
6. **Okada H. and G. Gregori Hambali**, 1989: Cytologia, 54: 389-393
7. **Petterson G.**, 1989: Nord. J. Bot., 9: 119-166.
8. **Prana M. S.**, 1984: Annales Bogorienses, 8(2): 73-76.
9. **Ramser J.**, 1992: A protocol for oligonucleotide DNA fingerprinting of plant species (personal communication), Plant molecular biology, Frankfurt Univ., Germany.
10. **Yoshino H.**, 1994: Studies on phylogenetic differentiation in taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Doctor thesis. The Kyoto University, Japan.

IDENTIFICATION OF THE PARENTAL ORIGIN OF THE CHROMOSOMES IN THE NATURAL INTERSPECIFIC HYBRIDS IN *COLOCASIA* USING CYTOGENETIC AND MOLECULAR CYTOGENETIC TECHNIQUES

NGUYEN XUAN VIET

SUMMARY

Two species of the genus *Colocasia*, *C. esculenta* and *C. gigantea*, can be hybridized, but data on the extent of the hybridization under natural conditions are not available to date.

In the previous paper, we have reported the investigation of the natural interspecific hybrids in the genus *Colocasia* using isozymes [5].

The present study was carried out to identify the parental origin of the chromosomes in the natural hybrids in *Colocasia*, using the cytogenetic and molecular cytogenetic techniques (GISH).

The cytogenetic analysis showed those natural interspecific hybrids having 28 chromosomes. The chromosome size ranged from 1.72~3.75 μm and one satellite pair with different size. These mitotic chromosome characters were consisted in the karyotypic characters of both *C. esculenta* and *C. gigantea*.

The multiunivalent observed in pollen mother cells of the hybrids and their pollen fertilizer was too small indicated an abnormal in meiosis and suggested different chromosome origins in the hybrid cells.

The GISH using the DIG-labeled total DNA of one species as a probe and the non-labeled DNA of the other species as a blocking DNA confirmed the origin of the chromosomes in the hybrids.

The investigation of the natural hybrids and the identification of the parental origin of the chromosomes in these hybrids in our studies could provide useful information for the classification of taro varieties and the research of their phylogenetic relationships.

Ngày nhận bài: 20-9-2002