

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI DU SAM ĐÁ VÔI (*Keteleeria davidiana* (Bertrand) Beissn.) BẰNG KỸ THUẬT RAPD

Trần Ngọc Hải¹, Phùng Thị Tuyền¹

TÓM TẮT

Hiện nay, số lượng cá thể Du sam đá vôi phân bố trên các đỉnh núi đá vôi trong tự nhiên còn ít và đang trong tình trạng nguy cấp. Để có cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn nguồn gen đạt hiệu quả cao, việc đánh giá đa dạng di truyền của các cá thể Du sam đá vôi còn sót lại là quan trọng và cần thiết. Bài viết này là kết quả phân tích đa dạng di truyền 7 mẫu lá của các loài: Du sam núi đất phân bố tại Sơn La, Du sam đá vôi phân bố tại Bắc Kạn và Cao Bằng với 10 mẫu ngẫu nhiên bằng kỹ thuật RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) đã thu được 104 phân đoạn ADN (*Acid Deoxyribo Nucleic*) trong đó có 72 phân đoạn đa hình và tổng số thu được 463 băng ADN được nhân bản với 239 băng đa hình chiếm 51,6%. Kết quả nghiên cứu cũng đã xác định được mức độ đa dạng di truyền giữa 7 cá thể nghiên cứu khá cao đạt từ $0,0866 \div 0,4616$, thiết lập được sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ giữa 7 cá thể trên.

Từ khóa: ADN, Du sam đá vôi, đa dạng di truyền, RAPD.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Du sam đá vôi (*Keteleeria davidiana* (Bertrand) Beissn.) là loài cây gỗ lớn, mọc trên đỉnh núi đá vôi ở một số vùng núi đá vôi phía Bắc Việt Nam, cây cao tới 25m, đường kính tới 0,8m, vỏ thân nứt dọc, bong mảng, lá hình vẩy, mọc xoắn, gỗ tốt, vân thớ đẹp. Do bị khai thác mạnh, loài cây này hiện được xếp trong Sách đỏ Việt Nam 2007, nhóm nguy cấp (EN). Để có cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn nguồn gen đạt hiệu quả cao, trước tiên cần phải tiến hành đánh giá đa dạng di truyền của các cá thể Du sam đá vôi còn sót lại. Có rất nhiều kỹ thuật phân tích sinh học phân tử được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của các loài động - thực vật, trong đó kỹ thuật RAPD được sử dụng

khá rộng rãi bởi sự đơn giản nhưng vẫn cho kết quả có thể tham khảo (Williams *et al.*, 1990). Trong những năm gần đây kỹ thuật RAPD đã được sử dụng nhiều trong phân tích đa dạng di truyền của các loài cây rừng (Nguyễn Hoàng Nghĩa *et al.*, 2005; Nguyễn Đức Thành *et al.*, 2005; Trần Quốc Trọng *et al.*, 2005; Sarmah *et al.*, 2007). Xuất phát từ thực tiễn trên đã tiến hành nghiên cứu: Đánh giá mức độ đa dạng di truyền loài Du sam đá vôi bằng kỹ thuật RAPD.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá của 7 cá thể Du sam núi đất và đá vôi thu thập tại vùng Sơn La, Bắc Kạn và Hà Giang, ghi chú tại bảng 01.

Bảng 01. Ký hiệu các mẫu Du sam dùng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu mẫu	Xuất xứ
1	DS núi đất - SL	Sơn La
2	DS đá vôi 1 - BK	Bắc Kạn
3	DS đá vôi 2 - BK	Bắc Kạn
4	DS đá vôi 3 - BK	Bắc Kạn
5	DS đá vôi 4 - BK	Bắc Kạn
6	DS đá vôi 5 - BK	Bắc Kạn
7	DS đá vôi - HG	Hà Giang

¹TS, ThS. Trường Đại học Lâm nghiệp

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số

Mẫu lá bánh tẻ Du sam sau khi cắt được bỏ vào túi nilon, đánh mã số rõ ràng, buộc kín bảo quản tạm thời và được sử dụng ngay cho việc tách chiết ADN hoặc bảo quản trong tủ lạnh -80°C sử dụng khi cần thiết. Mẫu lá được nghiền bằng cối chày sứ với nitơ lỏng -196°C . Tiếp đó tiến hành các bước trong quy trình tách chiết ADN của Xavier và Karine (2000).

2.2.2. Phương pháp định lượng ADN bằng quang phổ kế

Dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng ở bước sóng 260nm của các base purine và pyrimidine, sẽ đo được giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm ($\text{OD}_{260\text{nm}}$ – Optical Density 260nm) của các mẫu và cho phép xác định nồng độ ADN trong mẫu dựa vào tương quan sau: một đơn vị $\text{OD}_{260\text{nm}}$ tương ứng với một nồng độ là: 50($\mu\text{g/ml}$) cho một dung dịch ADN sợi đôi. Do đó nồng độ ADN trong mẫu được tính theo công thức sau: $C_{\text{ADN}} (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Độ pha loãng}$.

Để kiểm tra độ sạch của dung dịch, người ta đo thêm giá trị OD ở bước sóng 280nm ($\text{OD}_{280\text{nm}}$). 280nm là bước sóng mà ở đó các protein có mức hấp thụ cao nhất, nhưng các protein cũng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm như các axit nucleic và do đó làm sai lệch giá trị thật của nồng độ axit nucleic. Một dung dịch axit nucleic được xem là sạch (không tạp nhiễm protein) khi tỉ số $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ nằm trong khoảng 1,8 – 2,0.

2.2.3. Phương pháp PCR với đoạn môi ngẫu nhiên (RAPD)

Kỹ thuật chạy PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Phản ứng chuỗi trùng hợp) của ADN hệ gen với các môi ngẫu nhiên được thực hiện

trên máy PCR 9800 Fast Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ). Mỗi phản ứng được thực hiện trong thể tích 25 μl , bao gồm: 1X đệm PCR; 2,5mM MgCl_2 ; 150 μM mỗi loại dNTPs; 400nM mỗi; 1,25 đơn vị *Taq* polymerase (Fermatas, Mỹ) và 20ng ADN khuôn.

Trộn đều các hỗn hợp trên rồi chuyển vào máy PCR sau đó chạy theo chương trình RAPD đã cài đặt sẵn, gồm các bước: Bước 1: 94°C -3 phút; bước 2: 94°C -30 giây; bước 3: 36°C -1 phút; bước 4: 72°C -2 phút; bước 5: 72°C -10 phút; bước 6: lưu giữ ở 4°C . Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ.

2.2.4. Phương pháp điện di sản phẩm RAPD trên gel agarose

Trong điện di trên gel agarose, các đoạn ADN được hiện hình dưới tia tử ngoại (UV) nhờ Ethidium bromide (EtBr) có khả năng gắn xen giữa các base của ADN phát huỳnh quang dưới tác dụng của tia UV. Sau điện di, gel được chiếu sáng bằng tia UV, các đoạn ADN hiện thành vạch sáng màu trên bản gel. Để ước lượng kích thước các trình tự ADN trong gel agarose, người ta dùng “yếu tố đánh dấu trọng lượng phân tử” (molecular weight marker – MWM). Đó là một tập hợp trình tự ADN có kích thước đã biết (thang ADN – marker).

Bước tiến hành:

Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1,2%.

Bước 2: Tra mẫu ADN

Bước 3: Chạy điện di

Bước 4: Nhuộm mẫu

Bước 5: Quan sát và chụp ảnh

2.2.5. Phương pháp phân tích số liệu RAPD

Sản phẩm PCR với các môi RAPD sau khi chạy điện di trên gel agarose 1,2% sẽ được nhuộm và chụp ảnh để phân tích số liệu. Công việc đầu tiên là xác định băng đơn hình và đa hình dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện

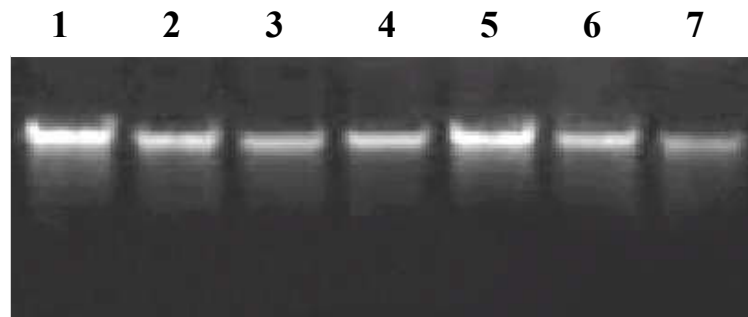
của băng đó giữa các dòng (mẫu) nghiên cứu. Nếu một băng ADN (có kích thước cụ thể) xuất hiện ở dòng i nhưng không xuất hiện ở dòng j hoặc đồng thời xuất hiện ở cả i và j nhưng không xuất hiện ở các dòng khác thì băng ADN này gọi là băng đa hình. Ngược lại, nếu băng ADN này xuất hiện ở tất cả các dòng nghiên cứu thì gọi là băng đơn hình. Tiếp theo các băng này được mã hoá bằng số tự nhiên 0 và 1. Nếu băng đa hình xuất hiện ở dòng nào thì tại đó ký hiệu là 1 và ngược lại được ký hiệu là 0. Số liệu thu được, được nhập trực tiếp vào phần mềm Excel. Sau đó được xử lý bằng

chương trình NTSYSpc version 2.02h để tính ma trận tương đồng giữa các đôi mẫu. Sau đó số liệu lần lượt được xử lý qua các bước trong NTSYS – SIMQUAL, SAHN và cuối cùng là Tree để vẽ biểu đồ phân tích mối tương quan di truyền giữa các mẫu nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá Du sam

Kết quả tách chiết ADN được thể hiện trên ảnh điện di (hình 01).



Hình 01. ADN tổng số tách chiết từ 7 mẫu Du sam điện di trên gel agarose 1%

Giếng số 1. DS núi đất-SL, 2. DS đá vôi 1- BK, 3. DS đá vôi 2- BK, 4. DS đá vôi 3- BK, 5. DS đá vôi 4- BK, 6. DS đá vôi 5 - BK và 7. DS đá vôi - HG

Trên ảnh điện di đồ, băng ADN tổng số của 7 mẫu Du sam thu được đều gọn, tập trung, không dính giếng cũng như không xuất hiện vệt sáng phía sau kéo dài. Điều đó cho thấy các mẫu ADN tách chiết được có độ nguyên vẹn cao, không lẫn protein, các loại ARN và các tạp chất khác.

3.2. Kết quả phân tích RAPD 7 mẫu Du sam với 10 mỗi ngẫu nhiên

Phản ứng RAPD được tiến hành gồm các thành phần: ADN khuôn, môi đơn, *Taq* polymerase, 4 loại deoxynucleotit triphosphat (dNTPs) và dung dịch đệm, muối $MgCl_2$. Trong nghiên cứu này, phản ứng RAPD được tiến hành trên khuôn là 7 mẫu ADN genome

tách chiết từ 7 cá thể Du sam với 10 đoạn mỗi ngẫu nhiên để tiến hành phân tích mức độ đa dạng di truyền.

Kết quả điện di sản phẩm RAPD cho thấy cả 10 đoạn mỗi ngẫu nhiên sử dụng đều có xuất hiện phân đoạn ADN khi soi bản gel dưới đèn UV. Trong 10 mỗi nghiên cứu 9/10 cho kết quả đa hình băng ADN giữa 7 mẫu nghiên cứu, trừ mỗi CP10 cho kết quả đơn hình băng ADN. Mỗi RA46, R50, RA142 và RA159 xuất hiện phân đoạn ADN nhiều nhất $15 \div 16$ phân đoạn; mỗi RA45 xuất hiện 10 phân đoạn ADN, các mỗi còn lại xuất hiện $3 \div 9$ phân đoạn ADN.

Kết quả tổng hợp phân tích RAPD của 7 mẫu Du sam với 10 mỗi ngẫu nhiên:

Bảng 02. Số loại phân đoạn ADN được nhân bản, số loại phân đoạn đa hình và số băng ADN được nhân bản, số băng đa hình của 7 mẫu Du sam phân tích

Tên môi	Số loại phân đoạn ADN được nhân bản	Loại phân đoạn ADN đa hình		Số băng ADN được nhân bản	Băng ADN đa hình	
		Số lượng	Tỷ lệ (%)		Số lượng	Tỷ lệ (%)
PC14	9	5	55,6	44	16	36,4
RA46	16	12	75	71	43	60,6
PC10	3	0	0	21	0	0,0
PC07	7	6	85,7	29	22	75,9
PC20	8	7	87,5	30	23	76,7
RA36	6	5	71,4	17	10	58,8
RA45	14	8	57,1	70	28	40
RA50	16	12	75	65	37	56,9
RA142	10	7	70	48	27	56,3
RA159	15	10	66,7	68	33	48,5
Tổng	104	72	69,2	463	239	51,6

Kết quả phân tích sản phẩm RAPD của 7 mẫu Du sam như bảng trên cho thấy, sử dụng 10 môi ngẫu nhiên thu được 104 loại phân đoạn ADN được nhân bản, trong đó có 72 loại phân đoạn đa hình, chiếm 69,2%. Các môi cho tỷ lệ phân đoạn ADN đa hình dao động từ 0% (PC10) đến 87,5% (PC20). Tổng số băng ADN được nhân bản, tương ứng với tổng số vạch

xuất hiện trên điện di đồ sản phẩm RAPD của 7 mẫu với cả 10 môi là 463 băng, trong đó băng đa hình là 239, chiếm 51,6%, các băng có kích thước dao động từ 0,4 - 3,0Kb. Kết quả nghiên cứu cho thấy mức độ đa hình ADN giữa 7 cá thể Du sam nghiên cứu khá cao.

3.3. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa 7 mẫu Du sam

Bảng 03. Hệ số tương đồng di truyền khi so sánh từng cặp của 7 mẫu Du sam

	DS-SL	DS1-BK	DS2-BK	DS3-BK	DS4-BK	DS5-BK	DS-HG
DS-SL	1,0000						
DS1-BK	0,6923	1,0000					
DS2-BK	0,5384	0,7307	1,0000				
DS3-BK	0,6538	0,7500	0,7692	1,0000			
DS4-BK	0,5769	0,7115	0,8269	0,7500	1,0000		
DS1-HG	0,5384	0,7692	0,7884	0,6923	0,7692	1,0000	
DS2-HG	0,5480	0,7019	0,7980	0,7403	0,7980	0,9134	1,0000

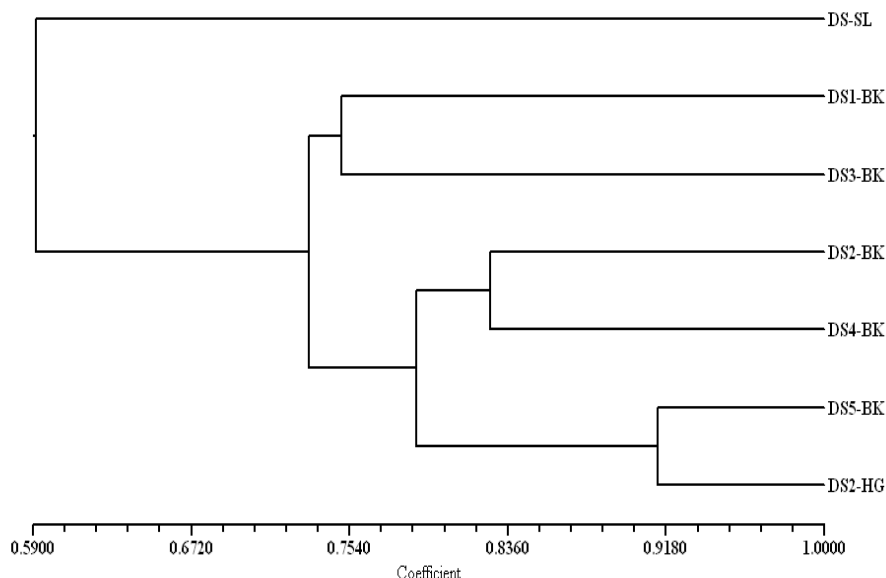
Kết quả thu được trình bày ở bảng 03 cho thấy hệ số tương đồng di truyền từng cặp mẫu nằm trong khoảng từ 0,5384 ÷ 0,9134 (tương ứng với từ 53,84% ÷ 91,34%). Mức

độ đa dạng di truyền giữa các cá thể nằm trong khoảng từ 0,0866 (1-0,9134) ÷ 0,4616 (1-0,5384). Điều này cho thấy 7 cá thể Du sam thu thập tại Sơn La, Bắc Kạn và Hà

Giang có mức độ đa dạng về ADN genome khá cao. Hai mẫu Du sam đá vôi 5 Bắc Kạn và Hà Giang có hệ số tương đồng di truyền về ADN hệ gen cao 91,34%. Mẫu Du sam núi đất thu tại Sơn La có mức độ sai khác di truyền lớn nhất so với các mẫu Du sam đá vôi thu tại Bắc Kạn và Hà Giang ($0,3077 \div 0,4616$) tương ứng với ($30,77\% \div 46,16\%$). 4 mẫu Du sam đá vôi 1, 2, 3 và 4 thu tại Bắc Kạn cũng có mức độ đa dạng di

truyền khá cao, hệ số dao động từ $0,1731(1-0,7115) \div 0,2885(1-0,8269)$ tương ứng với $17,31\% \div 28,85\%$.

Dựa vào giá trị hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu khi so sánh với nhau, phần mềm NTSYS tự động sắp xếp các mẫu có hệ số tương đồng cao vào một nhóm và kết quả thu được một biểu đồ hình cây phát sinh thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 7 mẫu Du sam với nhau (hình 0.2).



Hình 02. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 7 cá thể Du sam

Từ biểu đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền cho phép chia 7 mẫu Du sam thành 2 nhánh chính: Nhánh 1 chỉ có duy nhất mẫu DS-SL là mẫu Du sam núi đất thu tại Sơn La có mức độ sai khác di truyền cao nhất so với 6 mẫu còn lại; Nhánh 2 gồm 6 mẫu còn lại, được chia thành 2 nhánh phụ. Nhánh phụ 1 gồm 2 mẫu là DS1-BK và DS3-BK thu tại Bắc Kạn, hệ số tương đồng di truyền giữa 2 mẫu là 0,75 (75%). Nhánh phụ 2 gồm 4 mẫu chia làm 2 nhánh nhỏ: DS2-BK và DS4-BK xếp vào một nhóm với hệ số tương đồng di truyền là 0,8269 (82,69%); DS5-BK và DS-HG xếp vào cùng một nhóm với hệ số tương đồng di truyền 91,34%.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã tách chiết được ADN tổng số của 7 cá

thể Du sam, với độ tinh sạch cao, đảm bảo chất lượng để thực hiện các phân tích phân tử, các mẫu ADN đã được bảo quản trong tủ lạnh - 25°C để sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn.

2. Phân tích ADN genome của 7 cá thể Du sam bằng kỹ thuật RAPD với 10 đoạn ngẫu nhiên thu được 104 phân đoạn ADN trong đó có 72 phân đoạn đa hình, chiếm 69,2% và tổng số thu được 463 băng ADN được nhân bản, trong đó có 239 băng đa hình, chiếm 51,6%.

3. Hệ số tương đồng di truyền từng cặp mẫu khi so sánh giữa 7 cá thể Du sam nằm trong khoảng từ $0,5384 \div 0,9134$ (tương ứng với từ $53,84\% \div 91,34\%$), tức là mức độ đa dạng di truyền giữa 7 cá thể Du sam nghiên cứu khá cao nằm trong khoảng từ $0,0866 \div 0,4616$ (tương ứng với từ $8,66\% \div 46,16\%$).

4. Đã thiết lập được sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa 7 cá thể Du sam thu tại Sơn La, Bắc Kạn và Hà Giang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 1996. *Sách đỏ Việt Nam, phần Thực vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, Nguyễn Văn Thắng và Trần Văn Dương, 2003. Đánh giá tính đa dạng của một số giống lạc trong tập đoàn giống chống chịu bệnh gỉ sắt bằng kỹ thuật RAPD. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*: 805-809.
3. Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thúy Hạnh, Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2005. Nghiên cứu quan hệ di truyền của một số loài thuộc họ Dầu (*Dipterocarpaceae*) ở Việt Nam dựa trên đa hình ADN genome và lục lạp. *Kỷ yếu Hội nghị toàn quốc "Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống"*: 1379-1382.
6. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Thúy Hạnh, Nguyễn Đức Thành, 2006. Kết quả phân tích đa dạng di truyền loài Sao lá hình tim (*Hopea cordata* Vidal) bằng chỉ thị phân tử. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*: 75-77.
7. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Trần Quốc Trọng, Nguyễn Đức Thành (2005) Kết quả bước đầu đánh giá đa dạng di truyền của ba xuất xứ Lim xanh bằng chỉ thị phân tử RAPD và ADN lục lạp. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*: 80-81.
8. Sarmah P, Barua PK, Sarma RN, Sen P, Deka PC, 2007. Genetic diversity among rattan genotypes from India based on RAPD-marker analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54: 593-600.
10. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res*. 18: 6531-6535.
11. Vũ Thị Huệ, Bùi Văn Thắng, Nguyễn Việt Tùng, Đỗ Quang Trung, Hà Văn Huân, Nguyễn Thị Hồng Gấm và Hồ Văn Giảng, 2009. Đánh giá tính đa dạng di truyền các dòng Song mật (*Calamus platyacanthus*) được tuyển chọn làm cơ sở nhân giống. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*.

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF *KETELEERIA DAVIDIANA* (BERTRAND) BEISSN. USING RAPD TECHNIQUE

Tran Ngoc Hai, Phung Thi Tuyen

SUMMARY

The populations of *Keteleeria davidiana* in limestone is very small and this species is considered as one of the most endangered gymnosperm species in Vietnam. In order to get scientific basis for the genetic conservation of the species, an assessment of genetic diversity of remaining population is urgently needed. This study portraying the genetic diversity assessment for seven leaf samples from two species: *Keteleeria evelyniana* distributes on soil mountain in Sơn La province and *Keteleeria davidiana* distributes on lime stone mountain in Bắc Kạn and Cao Bằng provinces by using RAPDs (Random amplified polymorphic DNA) with random primers. 104 DNA segments have been collected of which 72 are polymorphic and 463 bands are copied of which 239 are polymorphic, accounting for 51.6%. The study also found high genetic diversity among 7 individuals, from 0.086 to 0.462 and established the tree depicting the relationship among those individuals.

Key words: *ADN, genetic diversity, Keteleeria davidiana, RAPD.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thế Nhã