

TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI KIM TUYẾN ĐÁ VÔI (*Anoectochilus calcareus* Aver.) TẠI QUẢN BẠ - HÀ GIANG

Nguyễn Thị Thơ¹, Nguyễn Thị Hải Hà², Phùng Văn Phê¹,
Vũ Quang Nam³, Đỗ Quang Trung¹, Hồ Hải Ninh¹

¹ThS. Trường Đại học Lâm nghiệp

²CN. Trường Đại học Lâm nghiệp

³TS. Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Kim tuyến đá vôi (*Anoectochilus calcareus* Aver.), họ Lan (Orchidaceae), là loài đặc hữu và nguồn gen quý của Việt Nam. Loài này đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên do mức độ khai thác quá mức. Để có cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn và phát triển loài đạt hiệu quả, 20 cá thể của loài Kim tuyến đá vôi thu thập tại Bát Đại Sơn và Cán Tỷ thuộc Huyện Quản Bạ - Hà Giang được đánh giá bằng kỹ thuật phân tử RAPD với 8 mồi ngẫu nhiên. Kết quả phân tích đa hình ADN genome cho thấy 20 cá thể Kim tuyến đá vôi nghiên cứu có mức độ sai khác di truyền trong khoảng 2-25%. Trong đó, mức độ sai khác giữa 18 mẫu Kim tuyến đá vôi ở Bát Đại Sơn là 20-22%; hai mẫu Kim tuyến đá vôi ở Cán Tỷ có mức độ tương đồng di truyền rất cao (0,98). Kết quả này cho thấy nguồn gen của quần thể Kim tuyến đá vôi tại Quản Bạ - Hà Giang có mức độ đa dạng không cao, bị suy giảm nghiêm trọng. Vì vậy, cần có biện pháp bảo tồn hiệu quả để phục vụ cho việc nhân giống và phát triển loài cây quý hiếm này trước nguy cơ bị tuyệt chủng.

Từ khóa: *Anoectochilus calcareus*, đa dạng di truyền, Kim tuyến đá vôi, RAPD.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kim tuyến đá vôi hay Lan gấm đá vôi có tên khoa học là *Anoectochilus calcareus* Aver., thuộc họ Lan (Orchidaceae), là loài đặc hữu và nguồn gen quý của Việt Nam. Kim tuyến đá vôi là loài có thể dùng làm cảnh và làm thuốc có giá trị (Sách đỏ Việt Nam, 2007). Kim tuyến đá vôi có phân bố và nơi cư trú chia cắt, số lượng cá thể tại mỗi khu vực thường ít và rải rác. Ngoài ra, chúng là đối tượng săn lùng thu hái theo phương thức tận diệt (nhổ toàn cây) của tư thương để làm thuốc, dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên của loài rất cao. Để có cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn nguồn gen đạt hiệu quả cao, nhóm tác giả tiến hành đánh giá đa dạng di truyền của quần thể Kim tuyến đá vôi tại Quản Bạ, Hà Giang.

Hiện nay, có rất nhiều kỹ thuật 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 đáng tin cậy.

Trong nghiên cứu này, 20 cá thể Kim tuyến đá vôi thu tại Quản Bạ - Hà Giang được đánh giá bằng kỹ thuật RAPD nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn nguồn gen của loài cây quý hiếm này.

II. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Hai mươi mẫu lá của 20 cá thể Kim tuyến đá vôi (*Anoectochilus calcareus*) thu thập tại một cách ngẫu nhiên tại Quản Bạ - Hà Giang (mẫu 1 - 18 được thu thập tại khu bảo tồn Bát Đại Sơn, mẫu 19 - 20 được thu thập tại Cán Tỷ).

- 08 mồi RAPD gồm CP1, CP9, CP10, CP11, CP14, CP15, CP18, CP20 và hóa chất của hãng Sigma - Mỹ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết ADN hệ gen

ADN tổng số của Kim tuyến đá vôi được tách chiết theo phương pháp của Xavier và

Karine (2000) và có cải tiến, cụ thể: Nghiền 200 mg lá trong nitor lỏng bằng cối chày sứ thành dạng bột mịn. Chuyển bột đã nghiền vào ống ly tâm 1,5 ml, bổ sung 1 ml đệm CTAB và các ống ở 65°C trong 60 phút. Ly tâm 10 phút ở 4°C, tốc độ 12.000 vòng/phút. Chuyển phần dịch phía trên sang ống ly tâm mới, thêm 500 µl dung dịch phenol/Chloroform/isoamy alcohol (25:24:1), ly tâm 5 phút ở 4°C tốc độ 12.000 vòng/phút ở 4°C. Chuyển lớp trên cùng vào ống ly tâm mới (1,5 ml) và bổ sung 500 µl Chloroform/isoamy alcohol (24:1), ly tâm 13.000 vòng/ phút trong 5 phút ở nhiệt độ là 4°C. Lấy phần dịch phía trên chuyển sang ống effendorf mới và bổ sung 1 ml isopropanol lạnh, ủ ở nhiệt độ -20°C trong 60 phút để thu tủa. Rửa tủa 2 lần bằng cồn 70%. Hòa tan ADN bằng dung dịch TE. Nồng độ và độ sạch của ADN được xác định bằng điện di trên gel agarose 0,8% và máy quang phổ hấp phụ.

2.2.2. Phân tích tính đa hình ADN của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi bằng kỹ thuật RAPD

Kỹ thuật chạy PCR 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; 25 mM MgCl₂; 150 µM mỗi loại dNTPs; 400 nM mỗi; 1,25 đơn vị Taq polymerase (Fermentas, Mỹ) và 20 ng ADN khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: Bước 1: 95°C-3 phút; bước 2: 94°C-1 phút; bước 3: 36°C-1 phút; bước 4: 72°C-1 phút 30 giây; bước 5: 72°C-10 phút; bước 6: lưu giữ ở 4°C. Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ. Điện di để phân tích sản phẩm PCR RAPD trên gel agarose 1,2%.

2.2.3. Phân tích số liệu

Dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn ADN trên điện di đồ (mỗi

phân đoạn tương ứng với một vạch (băng) trên bản điện di). Mã hoá các băng này bằng số tự nhiên 0 (không xuất hiện phân đoạn ADN) và 1 (xuất hiện phân đoạn ADN). Số liệu được xử lý bằng chương trình NTSYSpc version 2.0 để tính ma trận tương đồng và biểu đồ quan hệ di truyền giữa các mẫu Kim tuyến đá vôi. Việc tính toán ma trận tương đồng dựa trên công thức: $J_{ij} = a/(n - d)$, trong đó: a: số băng ADN có ở hai dòng i và j; d: số băng ADN có ở dòng i hoặc dòng j; n: tổng số băng thu được; J_{ij} : hệ số tương đồng Jaccard giữa hai dòng i và j.

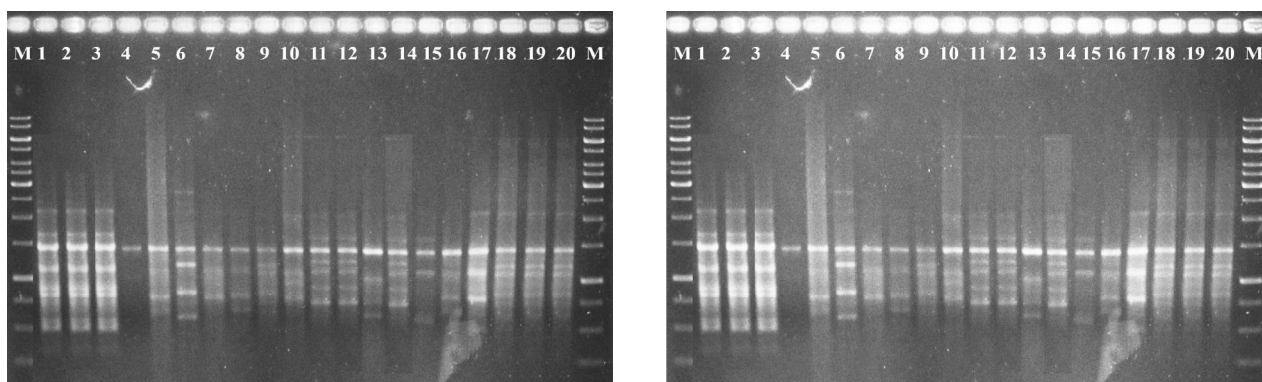
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự đa hình ADN của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi

ADN tổng số của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi sau khi tách chiết được kiểm tra bằng điện di và đo OD, kết quả cho thấy tất cả các mẫu ADN đều có độ nguyên vẹn và độ sạch cao ($OD_{260}/OD_{280} = 1,8 - 2,0$). Các mẫu ADN được pha loãng đến nồng độ 10 ng/µl, để thực hiện phản ứng PCR-RAPD. Kết quả phân tích sản phẩm RAPD của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi (bảng 1) cho thấy, với 8 môi RAPD ngẫu nhiên thu được tổng số 604 băng, trong đó có 204 băng ADN đa hình, chiếm tỷ lệ 33,77%. Bảng 1 cho thấy, tất cả các môi đều có đa hình, mức độ đa hình giữa các môi rất khác nhau và chúng dao động từ 3,23% - 79,79%, trong đó môi CP14 có mức độ đa hình cao nhất với tổng số 99 phân đoạn thu được có 79 phân đoạn đa hình, chiếm 79,79%; môi CP9 thu được tổng số 75 phân đoạn và có 55 phân đoạn đa hình (tương ứng 73,30%); tỷ lệ đa hình thấp nhất ở hai môi CP11 (4,76%) và CP15 (3,23%). Sự đa hình ở các môi RAPD cho thấy các mẫu Kim tuyến đá vôi có sự đa dạng trong hệ gen nhân nhưng ở mức không cao.

Bảng 1. Số băng ADN được nhân bản và số băng đa hình của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi phân tích

TT	Tên môi	Tổng số băng ADN được nhân bản	Tổng số băng đa hình	Tỷ lệ băng đa hình (%)
1	CP1	97	17	17,53
2	CP9	75	55	73,3
3	CP10	101	21	20,79
4	CP11	42	2	4,76
5	CP14	99	79	79,79
6	CP15	62	2	3,23
7	CP18	42	22	52,38
8	CP20	86	6	6,98
Tổng		604	204	33,77



Hình 1. Bản điện di đồ sản phẩm PCR của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi với môi CP9 (trái) và CP14 (phải). M: marker 1kb, 1-18 (Bát Đại Sơn), 19-20 (Cán Tỷ)

3.2. Mối quan hệ di truyền giữa 20 cá thể Kim tuyến đá vôi

Mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Kim tuyến đá vôi được thiết lập dựa vào sự giống hay khác nhau về số phân đoạn ADN và kích thước của các phân đoạn ADN được thể hiện bằng số vạch và kích thước các vạch trên bản điện di. Việc phân tích các phân đoạn ADN thu được dựa trên sự có mặt hay vắng mặt của các mẫu nghiên cứu. Các phân đoạn ADN được nhân bản chia thành 2 loại: phân đoạn đơn hình là những phân đoạn có mặt ở tất cả các mẫu, phân đoạn đa hình là phân đoạn có ở

mẫu này nhưng vắng mặt ở mẫu khác. Số liệu sau khi được mã hóa bằng số được xử lý bằng phần mềm NTSYS pc version 2.0, kết quả được trình bày trong bảng ma trận về hệ số tương đồng di truyền (bảng 2) và biểu đồ hình cây (hình 2). Kết quả thu được cho thấy, hệ số tương đồng di truyền giữa ở từng cặp mẫu là 0,75 - 0,98 (tương ứng với 75 - 98%). Mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu nằm trong khoảng từ 0,2 (1 - 0,98) - 0,25 (1 - 0,75), tương đương với 2% - 25%. Kết quả này cho thấy, các mẫu Kim tuyến đá vôi phân tích có mức độ đa dạng về ADN nhân không cao.

Từ 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 được thể hiện qua biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 20 mẫu Kim tuyến đá vôi (hình 2). Dựa vào mối quan hệ di truyền của các mẫu Kim tuyến trên hình 2 đã chỉ ra rằng: 20 mẫu nghiên cứu được phân tách thành 2 nhóm chính. Nhóm 1 gồm hai mẫu KT19 và KT20 có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với các nhóm còn lại là 25% (1 - 0,75). Tuy nhiên hai mẫu 19 và 20 lại có mức độ tương đồng di truyền rất cao (98%). Ngoài ra, sự phân nhóm về mức độ sai khác di truyền giữa mẫu KT19, KT20 với các mẫu còn lại thể hiện khoảng cách địa lý của các mẫu nghiên cứu (mẫu

KT19, KT20 được thu thập tại Cán Tỷ). Nhóm 2 gồm 18 mẫu còn lại và được chia thành 3 nhóm phụ có mức độ sai khác di truyền trong khoảng 20% - 22% (1-0,8; 1-0,78): Nhóm phụ 1 bao gồm KT6, KT9 và KT18 có mức độ sai khác di truyền với các nhóm còn lại là 22% (1 - 0,78) và giữa ba mẫu này có mức độ tương đồng di truyền 83,3% - 91,5%. Nhóm phụ 2 gồm các mẫu KT4, KT5, KT7, KT8, KT10, KT11, KT12, KT13, KT14, KT15, KT16, KT17 có mức độ sai khác di truyền với các nhóm còn lại 16,7% và có mức độ tương đồng di truyền giữa các mẫu trong nhóm là 86% - 96%. Nhóm phụ 3 gồm các mẫu còn lại là KT1, KT2, KT3 có mức độ sai khác với các nhóm còn lại là 19,4% và mức độ tương đồng di truyền giữa chúng là 91,5% - 96%.

Hình 2. Biểu đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền của 20 mẫu Kim tuyến đá vôi dựa vào chỉ thị RAPD

Như vậy, dựa vào kết quả phân tích RAPD ở trên cho thấy các mẫu Kim tuyến đá vôi nghiên cứu có sự khác biệt về hệ gen nhân. Tuy nhiên, mức độ khác biệt di truyền này không cao. Kết quả về mức độ đa dạng di truyền của các mẫu Kim tuyến đá vôi nghiên cứu trên phù hợp với sự hiếm gặp của loài này trong tự nhiên (Sách đỏ Việt Nam, 2007) và thực tế khi thu mẫu loài này chúng tôi đã gặp rất nhiều khó khăn vì sự

phân bố rải rác và mức độ hiếm gặp của chúng. Điều này cho thấy, loài có sự suy giảm nghiêm trọng về nguồn gen cũng như số lượng cá thể trong tự nhiên. Điều này cũng có thể khẳng định loài Kim tuyến đá vôi đang đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên cao. Vì vậy, việc nghiên cứu, bảo tồn và phát triển loài Kim tuyến đá vôi (*Anoectochilus calcareus*) hiện nay là hết sức cấp bách.

IV. KẾT LUẬN

- Mức độ đa dạng di truyền của 20 cá thể Kim tuyến đá vôi nghiên cứu nằm trong khoảng 2-25%.

- Mức độ sai khác giữa 18 mẫu Kim tuyến đá vôi ở Bát Đại Sơn là 20-22%.

- Hai mẫu Kim tuyến đá vôi ở Cán Tỷ có mức độ tương đồng di truyền rất cao (0,98).

- Nguồn gen của quần thể Kim tuyến đá vôi tại Quán Bạ, Hà Giang có mức độ đa dạng không cao. Vấn đề bảo tồn và cải tạo nguồn gen của quần thể Kim tuyến đá vôi này cần được chú trọng tránh cho loài trước nguy cơ bị tuyệt chủng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). *Sách đỏ Việt Nam*. Phần II Thực vật, NXB Khoa học và công nghệ, HN, tr. 401-402.

2. Nguyễn Đức Thành et al (1999). *Phát triển và ứng dụng các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu đa dạng phân tử ở lúa*. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội, tr. 1205-1215.

3. Quách Thị Liên et al (2004). *Sử dụng các chỉ thị RAPD và ADN lục lạp trong nghiên cứu quan hệ di truyền của một số xuất xứ Lim xanh *Erythrophleumfordii* Oliv.* Kỷ yếu Hội nghị toàn quốc “Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống”, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 464-468.

4. Shun-fu Lin et al (2007). *Genetic variation of *Anoectochilus formosanus* revealed by ISSR and AFLP analysis*. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 15, No. 2, Pages 156-162.

5. Sarmah P et al (2007). *Genetic diversity among rattan genotypes from India based on RAPD-marker analysis*. Genetic Resources and Crop Evolution. 54: 593-600.

6. Xavier J.L., Karine L., (2000). *A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-Microsatellite*. Plant Mol Biol Rep. 18): 283a-283g.

ANALYSIS GENETIC DIVERSITY OF *Anoectochilus calcareus* Aver. IN QUAN BA DISTRICT, HA GIANG PROVINCE

Nguyen Thi Tho, Nguyen Thi Hai Ha, Phung Van Phe, Vu Quang Nam, Do Quang Trung, Ho Hai Ninh

SUMMARY

Anoectochilus calcareus Aver. belonging to the family Orchidaceae, is an endemic species and a valuable gene resource in Vietnam. Due to overexploitation, this species has been significantly reduced in the wild. The genetic diversity of twenty *Anoectochilus calcareus* individuals, which were collected in Quan Ba - Ha Giang, was identified by using RAPD with eight random primers. The result of polymorphis analysis of genome DNA showed that the *Anoectochilus calcareus* individuals varied by 2-25%. To specify, the genetically variation of eighteen individuals being collected in Bat Dai Son was from 20% to 22% and the genetic similarity of the rest was 0.98. The gene resource of *Anoectochilus calcareus* population in Quan Ba has lowly genetic diversity. Thus, it is necessary to have effectively solutions for preserving this plant, that supports to propagate and develop this valuable and rare species.

Keywords: *Anoectochilus calcareus* Aver, genetic diversity, RAPD.

Người phản biện: TS. Hoàng Vũ Thơ

Ngày nhận bài : 11/2/2014

Ngày nhận phản biện : 15/5/2014

Ngày quyết định đăng : 10/6/2014