

SỰ KHÁC BIỆT VỀ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ LOÀI TRONG CHI BƯƠNG (*DENDROCALAMUS NEES*) Ở VIỆT NAM

Trần Ngọc Hải¹, Lê Văn Vương², Nguyễn Hoàng Anh³

^{1,2}Trường Đại học Lâm nghiệp

³Chi cục Kiểm lâm Thanh Hóa

TÓM TẮT

Chi Bương (*Dendrocalamus Nees*) có khá nhiều loài, mỗi loài có nét đặc trưng về hình thái, năng suất và chất lượng măng khác nhau. Nghiên cứu này làm sáng tỏ về mối quan hệ di truyền của các loài trong chi Bương (*Dendrocalamus Nees*). Tiến hành phân tích trên 10 mẫu lá cụ thể: Bương phấn (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương ngọt (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương mai (Đồng Bàng, Hòa Bình); Luồng (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương tên (Đồng Bàng, Hòa Bình); Luồng (Mai Châu, Hòa Bình); Lùng (Mộc Châu, Sơn La); Bương mốc (Tân Lĩnh, Ba Vì); Bương mốc (Yên Sơn, Ba Vì) và Bương mười (Đồng Bàng, Hòa Bình). Mẫu lá tươi được cho vào túi ziplock chứa silica gel và chuyển về phòng thí nghiệm lưu trữ ở -80°C cho đến khi ADN được tách chiết. ADN hệ gen được tách chiết theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) của Saghai Maroof et al., 1984. 10 mỗi RAPD (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, CP7, CP8, CP9 và CP10 từ hãng Operon, Mỹ) được khuếch đại bằng máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ) theo phương pháp của Williams et al., (1990). Sản phẩm PCR_RAPD được mã hóa theo ma trận nhị phân. Số liệu sau đó được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 (Rohlf et al., 2002). Nghiên cứu đã xác định tỷ lệ ADN đa hình giữa các mẫu nghiên cứu là 35,58% trong đó, locus CP1 cho tỷ lệ đa hình cao nhất (57,45%). 10 mẫu nghiên cứu có sự đa dạng di truyền không cao với hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 0,65 đến 0,9 và ở mức độ tương đồng 80%, các mẫu Bương hợp thành phân nhóm phân biệt với các mẫu Luồng và Lùng, đặc biệt mẫu Lùng (Mộc Châu, Sơn La) cho sự khác biệt di truyền lớn nhất.

Từ khóa: ADN mã vạch, chi Bương (*Dendrocalamus*), mỗi RAPD, phân tích đa dạng di truyền.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tre trúc rất phong phú, đa dạng về thành phần loài và phân bố rộng khắp trên thế giới, đặc biệt là ở châu Á trong đó có Việt Nam. Theo thống kê của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, tính đến năm 2013 Việt Nam có 1.277.317 ha trong đó rừng tự nhiên trồng thuần loài và hỗn giao là 1.190.665 ha; rừng trồng tre luồng là 86.652 ha) với 216 loài thuộc 25 chi tre trúc phân bố tự nhiên (*nguồn Thống kê Bộ NN&PTNT năm 2013*).

Chi Bương (*Dendrocalamus Nees*) có nhiều loài như Bương phấn, Bương ngọt, Bương mai, Luồng... Đây là những loài có kích thước lớn, năng suất và chất lượng măng cao dùng làm thực phẩm, thân khí sinh cung cấp nguyên vật liệu xây dựng, ván ghép thanh, bột giấy... Hơn nữa những loài này là cây bản địa phù hợp với điều kiện lập địa, sinh trưởng tốt nên được người dân ưu tiên chọn lựa để gây trồng.

Tuy nhiên, chưa có một nghiên cứu nào về

thành phần loài cũng như đặc điểm của các loài, làm sáng tỏ về mối quan hệ di truyền của các loài trong chi Bương ở mức độ phân tử liệu chúng là những giống khác nhau hay thuộc cùng một loài hoặc loài phụ. Phân biệt sự sai khác di truyền và mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi Bương ở mức độ phân tử làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Việc bảo tồn và sử dụng có hiệu quả nguồn đa dạng sinh học nói chung và nguồn gen chi Bương nói riêng hiện nay đang là vấn đề cấp thiết. Để góp phần hiểu biết sâu hơn về bản chất di truyền của các loài trong chi Bương nhằm phục vụ cho việc bảo tồn và sử dụng có hiệu quả các nguồn gen bản địa của địa phương.

Mối quan hệ di truyền của 10 mẫu đã chỉ ra rằng kết quả hoàn toàn phù hợp giữa đặc điểm kiểu hình với sự phân bố địa lý của từng loài trong chi.

II. NỘI DUNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Tách chiết ADN và khuếch đại PCR – PAPD và so sánh các mẫu trong chi Bương.

- Xác định sự khác biệt di truyền và mối quan hệ di truyền giữa các loài ở mức độ phân tử.

2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu

Lựa chọn và cách lấy mẫu

10 mẫu lá tươi từ 10 cá thể thuộc họ tre nứa được thu lấy từ các vùng khác nhau, cụ thể: Bương phần (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương ngọt (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương mai (Đồng Bàng, Hòa Bình); Luồng (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương tên (Đồng Bàng, Hòa Bình); Luồng (Mai Châu, Hòa Bình); Lùng (Mộc Châu, Sơn La); Bương mốc (Tản Lĩnh, Ba Vi); Bương mốc (Yên Sơn, Ba Vi) và Bương mười (Đồng Bàng, Hòa Bình). Các mẫu lá được ký hiệu lần lượt là: BuongphanHB,

BuongngotHB, BuongmaiHB, LuongHB, BuongtenHB, LuongMC, LungSL, BuongmocTL, BuongmocYS, và BuongmuoiDB. Mẫu lá tươi ngay sau đó được cho vào túi ziplock chứa silica gel và vận chuyển về phòng thí nghiệm lưu trữ ở -80°C cho đến khi ADN được tách chiết.

Hoá chất

EDTA, Tris-HCl, SDS, Proteaza K, RNaza, chloroform, NaCl, agarose, 2X PCR Master mix Solution (*i-Taq*) của các hãng Sigma, Merck, Amersham Pharmacia Biotech, Fermentas, iNtRON Biotechnology... Các loại máy móc chuyên dụng thuộc phòng thí nghiệm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trình tự môi RAPD

TT	Tên môi	Nhiệt độ bắt cặp (°C)	Trình tự nucleotid
1	CP1	32	GGACTGGAGT
2	CP2	34	TGCTCTGCC
3	CP3	34	GGTGACGCAG
4	CP4	34	TGGGGGACTC
5	CP5	32	GTAGACCCGT
6	CP6	34	TTCCCCCGCT
7	CP7	34	TGGACCGGTG
8	CP8	32	AAGCCTCGTC
9	CP9	32	ACTTCGCCAC
10	CP10	34	AACCGACGGG

Tách chiết ADN hệ gen

ADN hệ gen được tách chiết theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) của Sanghai Maroof *et al.*, 1984. Khoảng 100 mg mô lá được nghiền trong cối bằng chày sứ trong 600 ml đệm CTAB (2% CTAB, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% beta-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl pH 8.0). Mẫu được chuyển vào ống ly tâm 1,5 ml và ủ ở 65°C trong bể ổn nhiệt 30 phút, sau đó được chiết xuất với cùng một thể tích với chlorophorm. Các mẫu được ly tâm ở 10.000 vòng/phút. Pha dung dịch được chuyển sang ống ly tâm 1,5 ml mới. ADN được kết tủa bằng cách thêm 500 µl isopropanol lạnh và ly tâm ở 10.000 vòng/phút. ADN tủa sau đó được rửa sạch bằng cồn 70%. Làm khô và hòa tan ADN

trong 100 µl đệm TE.

Khuếch đại PCR RAPD

10 môi RAPD (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, CP7, CP8, CP9 và CP10 từ hãng Operon, Mỹ) được khuếch đại bằng máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ) theo phương pháp của Williams *et al.*, (1990). Hỗn hợp phản ứng PCR (25µl) gồm: 2,5 µl đệm 10X Taq, 2,0 µl hỗn hợp dNTP (2,0 mM), 2,5 µl cho mỗi môi (10 µM), 0,5 µl cho 5 U/µl Taq ADN polymerase, 1 µl ADN khuôn (50 ng/µl) và H₂O cho tổng thể tích đạt là 25µl. Chu kỳ nhiệt cho PCR: 94°C trong 3 phút; (94°C: 30 giây, 37°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) lặp lại 45 chu kỳ; 72°C trong 7 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%.

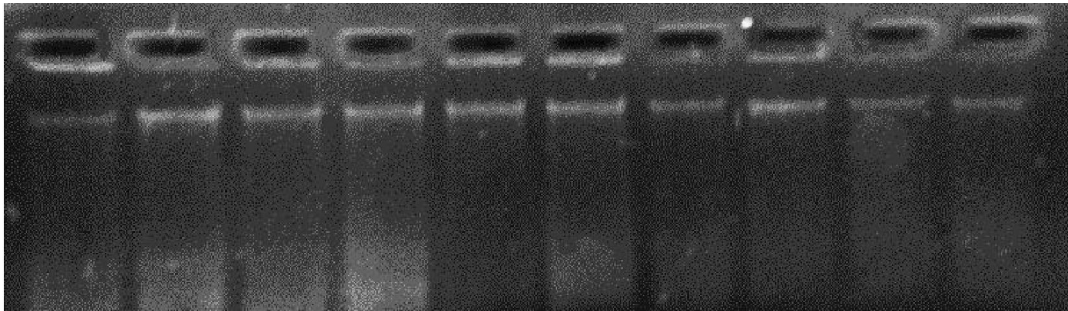
Phân tích dữ liệu PCR_RAPD

Sản phẩm PCR_RAPD được mã hóa theo ma trận nhị phân (các băng vạch sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0). Số liệu sau đó được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 (Rohlf et al, 2002).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tách chiết ADN và khuếch đại PCR-RAPD

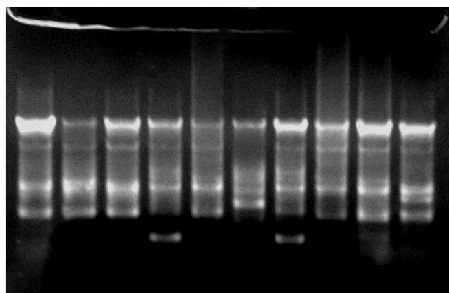
Mẫu ADN sau khi tách chiết được điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả thu được các vạch ADN sáng, nét và gọn không bị đứt gãy (hình 1). Mặt khác không thấy xuất hiện các vết sáng kéo dài phía dưới, kết quả này là đủ điều kiện cho thực hiện khuếch đại PCR-RAPD.



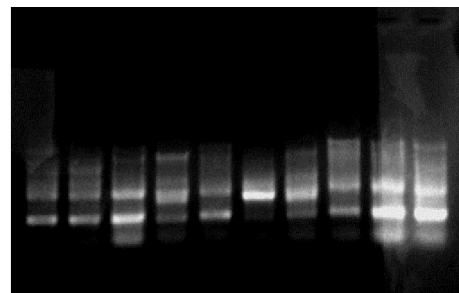
Hình 1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ 10 mẫu nghiên cứu

ADN tổng số thu được ở trên được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR-RAPD. Tỷ lệ PCR thành công là 100%, xuất hiện vạch băng ADN (allen) ở tất cả 10 mẫu nghiên cứu và 10

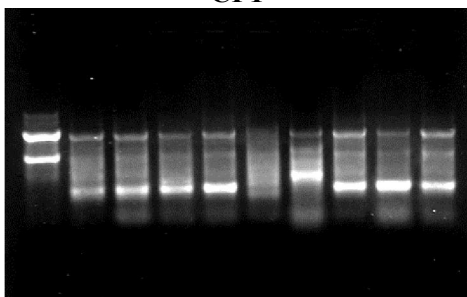
mồi RAPD (locus), kích thước các vết băng dao động trong khoảng từ 100 bp đến 900 bp. Một số kết quả được thể hiện ở hình 2.



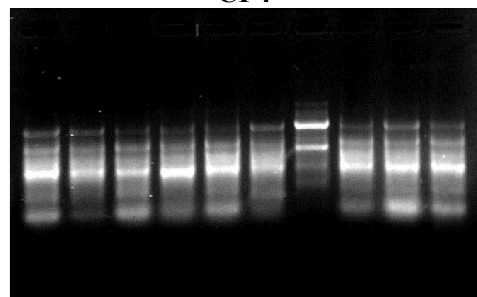
CP1



CP4



CP8



CP9

Hình 2. Sản phẩm PCR-RAPD với mồi CP1, CP4, CP8 và CP9

Tổng số allen thu được là 326/10 locus với giá trị trung bình 32,6/1 locus. Số allen đa hình là 116 (chiếm 35,58%), số lượng allen trên 1 locus dao động từ 13 đến 47, với locus CP1 biểu hiện số allen lớn nhất, 47 allen. Locus CP1 có tỷ lệ băng đa hình cao nhất (57,45%). Trong khi, locus CP6 cho tỷ lệ băng đơn hình

thấp nhất (0%). Xét về đa hình ADN hệ gen, LungHB cho đa hình cao nhất với sự xuất hiện các allen riêng biệt (ví dụ với mồi CP4, mẫu tương ứng với giếng số 06, hình 2). Chi tiết về sự khác biệt di truyền giữa 10 hệ gen được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hệ số di truyền Jaccard (J) giữa 10 mẫu nghiên cứu

	Buongphan HB	Buonggot HB	Buongmai HB	Luong HB	Buongten HB	Lung SL	Luong MC	Buongmoc TL	Buongmoc YS	Buongmuoi DB
BuongphanHB	1,0000									
BuonggotHB	0,9091	1,0000								
BuongmaiHB	0,9091	0,8636	1,0000							
LuongHB	0,7727	0,8182	0,7727	1,0000						
BuongtenHB	0,8636	0,8636	0,8636	0,9091	1,0000					
LungSL	0,6591	0,6591	0,6591	0,7500	0,7045	1,0000				
LuongMC	0,7500	0,7500	0,7500	0,8864	0,7955	0,7727	1,0000			
BuongmocTL	0,8636	0,8636	0,9091	0,8636	0,9545	0,7500	0,7955	1,0000		
BuongmocYS	0,8182	0,8182	0,9091	0,8182	0,9091	0,7045	0,7500	0,9545	1,0000	
BuongmuoiDB	0,8636	0,8182	0,9545	0,7727	0,8636	0,6591	0,7045	0,9091	0,9091	1,0000

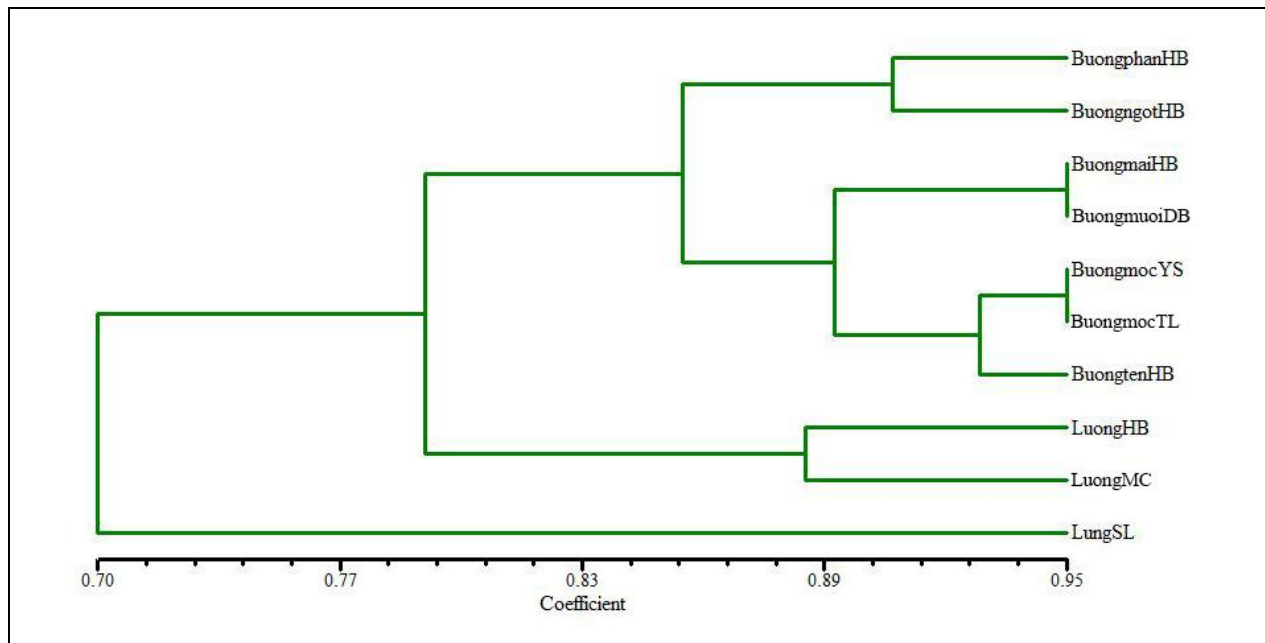
3.2. Tương quan di truyền của 10 hệ gen nghiên cứu

Số liệu băng vạch ADN từ PCR-RAPD được mã hóa theo ma trận nhị phân với băng vạch ADN đa hình (băng xuất hiện ở mẫu này mà không xuất hiện ở mẫu kia) được mã hóa là 1 trong khi băng vạch ADN đơn hình (băng xuất hiện ở tất cả 10 mẫu nghiên cứu). Ma trận nhị phân được xử lý trên phần mềm NTSYSpc 2.1 để tính toán sự biến động và tương quan di truyền giữa các mẫu nghiên cứu.

Sự biến động di truyền giữa 10 hệ gen nghiên cứu được thể hiện qua hệ số di truyền Jaccard (bảng 1). Hệ số này dao động trong khoảng từ 0,65 đến 0,9. Kết quả này chỉ ra sự

tương đồng di truyền là 65% đến 90%, tức khác biệt hay đa dạng di truyền ở mức 10% đến 35%. Đây là một sự đa dạng di truyền không cao, kết quả này sẽ là cơ sở cho công tác bảo tồn cũng như chọn tạo giống. Tuy nhiên, sự phản ánh mức độ đa dạng di truyền sẽ rõ ràng hơn khi tăng một số lượng lớn mỗi RAPD và số lượng cá thể đủ lớn.

Từ hệ số di truyền Jaccard thu được, tiếp tục sử dụng phần mềm NTSYSpc 2.1, tính toán theo phương pháp UPGMA nhằm xây dựng cây di truyền phân tử biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa 10 hệ gen nghiên cứu. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Cây di truyền phân tử biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa 10 hệ gen

Ở mức độ tương đồng 0,7 (70%), 10 mẫu nghiên cứu chia thành 02 nhóm: Nhóm thứ nhất gồm duy nhất mẫu LungSL, trong khi nhóm thứ hai gồm 09 mẫu còn lại (BuongphanHB, BuongngotHB, BuongmaiHP, BuongmuoiDB, BuongtenHB, BuongmocTL, BuongmocYS, LuongHB và LuongMC).

Ở mức độ tương đồng 0,8 có 02 nhóm chính: Nhóm thứ nhất với các mẫu Buong và nhóm thứ hai với các mẫu Luong. Trong đó, Buong phan và Buong ngọt thu lấy từ vùng

Đông Bàng, Hòa Bình thuộc phân nhóm ở mức tương đồng 0,9. Tương tự, phân nhóm Buong mai và Buong mười (đều từ Đông Bàng, Hòa Bình) thể hiện mức độ tương đồng đến 95%. Đây cũng là mức tương đồng di truyền xuất hiện ở Buong tên (Đông Bàng, Hòa Bình) và Buong móc (Tân Lĩnh, Ba Vi). Phân nhóm này tương đồng 92% với Buong móc (Yên Sơn, Ba Vi); Nhóm thứ hai thể hiện giữa Luong (Mai Châu, Hòa Bình) và Luong (Đông Bàng, Hòa Bình) có độ tương đồng 87%. Đặc biệt, mẫu

Lùng (Mộc Châu, Sơn La) đứng một mình trong phân nhóm có mức độ khác biệt di truyền cao nhất (35%), vì đây là loài thuộc chi *Bambusa* nên có sự khác biệt rất rõ ràng so với 9 mẫu trong chi *Dendrocalamus*. Kết quả này rất có ý nghĩa cho công tác phân loại, bảo tồn và nhân chọn tạo giống cho các nghiên cứu tiếp theo.

IV. KẾT LUẬN

Với 10 môi RAPD, thu được tỷ lệ ADN đa hình giữa các mẫu nghiên cứu là 35,58% trong đó, locus CP1 cho tỷ lệ đa hình cao nhất (57,45%).

10 mẫu nghiên cứu có sự đa dạng di truyền không cao với hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 0,65 đến 0,95 và ở mức độ tương đồng 80%, các mẫu Bương hợp thành phân nhóm phân biệt với các mẫu Luồng và Lùng, đặc biệt mẫu Lùng (Mộc Châu, Sơn La) cho sự khác biệt di truyền lớn nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Saghai Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81: 8014 - 8019.
2. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531 - 6535. PMID: 1979162.
3. Trần Ngọc Hải. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền loài Du sam đá vôi bằng kỹ thuật RAPD. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, số 1/2013, trang 22 - 27.
4. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Thúy Hạnh, Nguyễn Đức Thành (2006). Kết quả phân tích đa dạng di truyền loài Sao lá hình tim bằng chỉ thị phân tử. *Tạp chí NN&PTNT*, trang 75 - 77.
5. Trần Vinh, Nguyễn Hoàng Nghĩa, Bùi Văn Thắng (2010). Đánh giá đa dạng di truyền loài Thủy tùng bằng kỹ thuật RAPD. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(1), trang 75 - 80.
6. Rohlf et al (2002). *NTSYS pc 2.1: Numerical taxonomy system*.

THE DIFFERENCES IN GENETIC IN DENDROCALAMUS GENUS

Tran Ngoc Hai¹, Le Van Vuong², Nguyen Hoang Anh³

^{1,2}*Vietnam National University of Forestry*

³*Ninh Binh Department of Agriculture and Rural Development*

SUMMARY

Dendrocalamus Nees has numerous species, each of them has different characteristics of Shoots' morphology, yield and quality. This research illuminated the genetic relationship of species in *Dendrocalamus* genus. Conducting analysis on 10 leaf samples: Bương phần (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương ngọt (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương mai (Đồng Bàng, Hòa Bình); Luồng (Đồng Bàng, Hòa Bình); Bương tên (Đồng Bàng, Hòa Bình); Luồng (Mai Châu, Hòa Bình); Lùng (Mộc Châu, Sơn La); Bương mốc (Tân Lĩnh, Ba Vi); Bương mốc (Yên Sơn, Ba Vi) and Bương mườì (Đồng Bàng, Hòa Bình). The fresh leaf samples were packaged with Ziplock bag containing silica gel and moved to the laboratory to be stored at -80°C until the DNA was extracted. Genetic DNA was extracted by CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) method of Saghai Maroof et al., 1984. 10 RAPD primer (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, CP7, CP8, CP9 and CP10 from Operon, U.S) were amplified by PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (U.S) according to the method of Williams et al., (1990). PCR_RAPD products were encoded by a binary matrix. The data was then processed by NTSYSpc 2.1 software (Rohlf et al., 2002). The research identified the proportion of polymorphic DNA among research samples is 35.58%, in which, locus CP1 has the highest proportion of 57.45%. The genetic diversity of 10 research samples is not high with the genetic similarity coefficient ranged from 0.65 to 0.95, degree of similarity of 80%, *Dendrocalamus* samples incorporated in a subgroup distinguished from Luồng and Lùng samples, particularly Lùng (Mộc Châu, Sơn La) has the largest differences in genetic.

Keywords: *Dendrocalamus* genus, DNA barcode, genetic diversity analysis.

Ngày nhận bài : 10/4/2017

Ngày phản biện : 15/5/2017

Ngày quyết định đăng : 25/5/2017