

MỘT SỐ KỸ THUẬT PHÂN TỬ TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC CÓ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG Ở LÂM ĐỒNG

PGS.TS. LÊ XUÂN THẨM

Phó giám đốc Sở Khoa học và Công nghệ Lâm Đồng

Một trong những kỹ thuật sinh học phân tử được triển khai khá rộng rãi có hiệu quả trong những năm gần đây là kỹ thuật PCR và dòng hóa, giải trình tự genes có ý nghĩa. Trên thực tế, những khái niệm “*phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase*”, giải trình tự ADN “*DNA sequencing*”, dòng hóa genes “*gene cloning*”... đã trở nên quen thuộc và là bài giảng cơ sở về sinh học phân tử cho sinh viên các ngành y - sinh học - nông nghiệp... Những ứng dụng này đang ngày càng trở nên thiết thực và hiệu quả. Các cơ sở nghiên cứu - triển khai - kiểm định và đào tạo ở Đà Lạt - Lâm Đồng có tiềm năng để tiếp nhận một số kỹ thuật đang thông dụng sau đây:

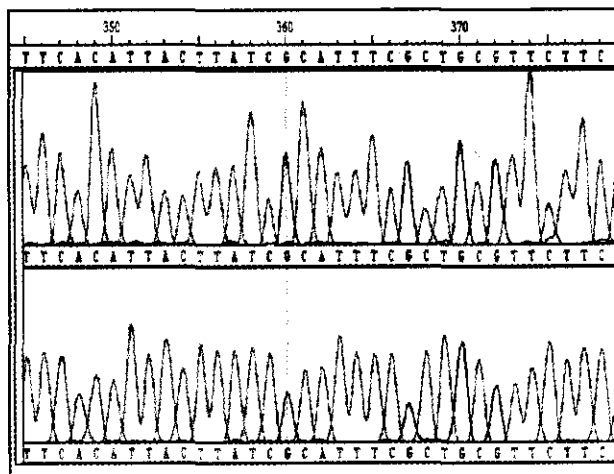
Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

Bản chất của kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi trùng hợp, phản ứng chuỗi polymerase) là kỹ thuật tổng hợp nhân tạo các đoạn ADN với tốc độ nhanh chưa từng thấy và độ chính xác rất cao với thiết bị chuyên dùng (máy PCR) - khá rẻ tiền và thông dụng. Các phương pháp phân tích ADN sử dụng kỹ thuật PCR làm nền nhưng khác ở chỗ là sử dụng các môi (primer) được thiết kế khác nhau.

Giải trình tự ADN (DNA sequencing)

Cuối những năm 70 của thế kỷ trước, các nhà khoa học đã hoàn thiện phương pháp phân tích nhanh trình tự ADN và phổ biến rộng rãi trong các phòng thí nghiệm sinh học phân tử trên thế giới. Theo phương pháp này, trình tự

của hàng trăm bazơ - nucleotide có thể được xác định trên một đoạn gene riêng biệt. Sau đó các thông số về trình tự được so sánh và xem xét bằng máy vi tính. Phương pháp này đã và đang được sử dụng để xác định loài và mối quan hệ phát sinh chủng loại của hầu hết các nhóm sinh vật. Dưới đây là một kết quả thí dụ giải trình tự ADN ở đoạn tiêu biểu gồm nhiều nucleotide (Glen M, 2006).



Phổ sơ cấp đọc trình tự cấu trúc ADN (Glen M, 2006)

Cho đến nay, đã có hàng loạt kỹ thuật sinh học phân tử được áp dụng trong nghiên cứu nhóm sinh vật, bao gồm các kỹ thuật như phân tích trình tự axit amin, cấu trúc protein (proteomics), thành phần bazơ nitơ của ADN, lai axit nucleic, phân tích đoạn ADN dựa trên sự đa hình về độ dài các đoạn giới hạn (RFLP), đa hình các đoạn ADN nhân bản ngẫu nhiên (RAPD), sự đa hình chiều dài của các phân đoạn ADN được nhân bản (ALFP), vi vệ tinh (microsatellite SSR), giải trình tự

ADN, dòng hóa genes... Đây là hệ kỹ thuật hiện đại đóng vai trò chủ chốt trong chương trình giải mã bộ gene các sinh vật, mà thành tựu to lớn trong 5 năm vừa qua có thể nêu ra là bộ genes người, bộ genes cây lúa...

Hệ kỹ thuật này được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực:

- Nhân bản các gene, đoạn gene mong muốn, tạo ra và phát hiện đột biến gene, xác định đặc trưng cấu trúc gene... Kỹ thuật này đã đóng góp cơ bản vào công nghệ gene (GMO), đưa đến cuộc cách mạng về sinh vật chuyển gene và các sản phẩm công nghệ gene (dược phẩm, vaccine, trị liệu genes...). Đà Lạt nổi tiếng với Viện Pasteur do A. Yersin sáng lập (nay là Công ty Vaccine Đà Lạt) có tiềm năng để phát triển ứng dụng các công nghệ này.

- Nghiên cứu mối quan hệ di truyền của các nhóm sinh vật, giống vật nuôi cây trồng... ngày càng đóng vai trò quan trọng trong công tác chọn tạo giống năng suất và chất lượng cao, xác định quan hệ huyết thống...

Phát triển các chỉ thị phân tử đặc biệt ứng dụng trong chọn giống sạch bệnh, chẩn đoán bệnh nhiễm trên vật nuôi, cây trồng nông lâm nghiệp, đặc biệt là nhóm cây gỗ và cây dược liệu quý có giá trị kinh tế cao của Lâm Đồng: Thông đỏ *Taxus wallichiana*, Atiso *Cynara scolymus*, Sâm *Panax vietnamensis*..., động vật quý hiếm: Bò rừng *Bos banteng*, Tê giác Cát Tiên *Rhinoceros sondaicus*, thùy đặc sản: cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss*, cá tầm, cá Lăng nha...), chẩn đoán vi sinh tạp nhiễm trên thực phẩm, nông sản (kể cả các nông sản chuyển gene)... Đặc biệt hiệu quả trong chẩn đoán các bệnh virus, chọn dòng sạch virus trên các giống cây trồng (trà, cà phê, cây ăn trái, hoa lan...), phát hiện chính xác các nhóm virus thú y (gây bệnh lở mồm long móng ở trâu bò, heo tai xanh, cúm gia cầm...).

Cùng với kỹ thuật Elisa và các kỹ thuật kinh

diễn khác, kỹ thuật này là công cụ kiểm định, kiểm dịch hữu hiệu, có tầm quan trọng to lớn về quản lý, kiểm soát đảm bảo pháp lý cho phát triển công nghệ sinh học y sinh - nông - lâm nghiệp cao nguyên Lâm Đồng trong giai đoạn tới.

Lâm Đồng có nguồn tài nguyên về đa dạng sinh học hàng đầu ở Việt Nam, là một trong những vùng có nhiều loài quý hiếm, đặc hữu của Đông Nam Á và thế giới: nhóm thông cổ hai lá dẹt, thông năm lá, thông ba lá... Đây là những nhóm thực vật cổ có ý nghĩa lớn về tiến hóa phát sinh nguồn gốc của thực vật hạt trần và hạt kín cổ sơ; các loài lan Hải *Paphiopedilum* spp., Địa lan *Cymbidium* spp., Tuyết lan *Coelogyne* spp., *Dendrobium* spp., *Vanda* spp., *Phalaenopsis* spp... Và tài nguyên nấm hết sức quý giá. Vì vậy, việc ứng dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu để sử dụng tốt nhất nguồn tài nguyên này là hết sức cần thiết. Mới đây, Luật Đa dạng sinh học và Luật Công nghệ cao vừa được Quốc hội thông qua, Chương trình của Chính phủ về công nghệ sinh học, bảo tồn đa dạng sinh học, bảo vệ môi trường và lưu vực sông Đồng Nai sẽ mở ra một giai đoạn phát triển bền vững kinh tế cao nguyên, bao hàm một giai đoạn thử thách đối với khoa học công nghệ của Đà Lạt - Lâm Đồng, trong đó công nghệ sinh học hiện đại với các kỹ thuật phân tử là một tất yếu.

Hiện nay, một số Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học ở các viện nghiên cứu, trường đại học, trung tâm phân tích kiểm nghiệm ở Đà Lạt đang được đầu tư trang thiết bị cho PCR, Sequencing... Hy vọng rằng chúng ta sẽ sớm bắt nhịp kịp với tiến trình công nghệ sinh học ở Việt Nam và thế giới để nghiên cứu, khai thác bền vững nguồn tài nguyên sinh học phong phú, ứng dụng một cách hiệu quả công nghệ sinh học vào sản xuất nông lâm nghiệp công nghệ cao, một điểm đột phá để phát triển kinh tế - xã hội địa phương. ■

Một ứng dụng kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu tài nguyên nấm Hoàng chi *Tomophagus*

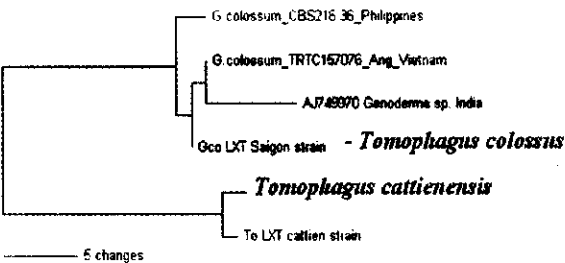
Cho đến nay, chi *Tomophagus* Murr. (1905) thuộc họ Linh chi vẫn chỉ có một loài duy nhất: *T. colossus*, phát tán phân bố khá rộng (từ Florida - Bắc Mỹ - Trung Mỹ, châu Phi và châu Á), với các chủng đồng nhất, kể cả về thành phần sinh hóa hoạt chất triterpenoid-colossolactones (Kleinwachter et al., 2001 - chủng thu ở Huế; Ofodile et al., 2005 - chủng thu ở Nigeria; El Dine et al., 2008 - chủng thu ở Sài Gòn). Mới đây (2007-2008), chúng tôi đã tìm thấy các chủng Hoàng chi ở Vườn Quốc gia Cát Tiên, Đồng Nai và vùng Tp. Hồ Chí Minh.

Kết quả phân tích ITS (rADN) cho thấy độ trùng khớp rất lớn giữa 2 chủng ở Huế và Sài Gòn (chỉ sai khác 1 nucleotide), với các chủng thu ở Philippines (Moncalvo, 1995), Ấn Độ (Sharma et al., 2005 - sai khác 3-5 nucleotide)...

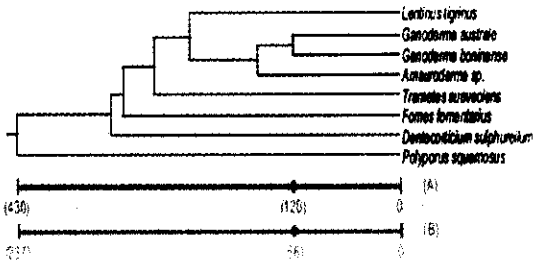
Sự khác nhau giữa chủng Huế và chủng Philippines rất nhỏ, chỉ là 1% (cả 3 biến đổi đều là thay thế nucleotide). Kết quả so sánh cũng cho thấy chủng Sài Gòn (*G. co*) cũng có độ tương đồng rất cao với chủng Huế (được giải trình tự tại Đại học Toronto, Canada), chỉ có sai biệt ở 1 nucleotide, tức là <1%.

Kết quả cho thấy sự phân hóa mạnh của Hoàng chi Cát Tiên (*To*), theo đó loài mới *T. cattienensis* đã được xác lập. Trình tự ADN ITS1 của *Tomophagus cattienensis* tương đồng thấp ~92,7% (202/218 bp) với đoạn ADN ITS1 của *Tomophagus colossus*. Trình tự ADN ITS2 của chủng *Tomophagus cattienensis* tương đồng ~95,7% (243/254 bp) với đoạn ADN ITS2 của *Tomophagus colossus*. So sánh kết quả đọc trình tự vùng ITS của *Tomophagus colossus* đoạn gần 600 bp, chúng tôi xác định được có 26 vị trí biến đổi; 2 vị trí thiếu và thêm nucleotide so với *Tomophagus cattienensis*, khác nhau ~ 8-9% - tổng số 37 bp đã thay đổi.

Rõ ràng kết quả giải trình tự ITS 1-2 (đoạn gene hết sức quan trọng) chỉ ra rằng nấm Hoàng chi Cát Tiên không đồng nhất với Hoàng chi chuẩn *Tomophagus colossus* (chủng Huế và chủng Sài Gòn...). Mức khác biệt thể hiện cao (tới 8-9%) cả về số lượng và bản chất trình tự rADN (gene ribosome). Trong khi đó ở loài chuẩn *T. colossus* dù là các chủng địa lý rất xa nhau (Bắc Mỹ, Nigeria, Ấn Độ, Philippines,...) thì sự phân hóa ITS cũng khá nhỏ (<2%), do đó chỉ có thể thừa nhận rằng Hoàng chi Cát Tiên là một loài khác - nghĩa là có loài thứ 2 cho chi *Tomophagus*, cần được xác lập. Tại hội nghị công nghệ nấm Đông Á (18-22/9/2008) tổ chức tại Nhật Bản đã phân tích sự phân hóa của các chủng địa lý thuộc *Tomophagus colossus* và nêu giả định tồn tại: *Tomophagus cattienensis* (Le Xuan Tham et al., 2008). Chúng tôi đã cùng GS. JM Moncalvo hợp tác phân tích và nêu ra quan hệ phát sinh chủng loại (phylogenetic tree) giữa chúng.



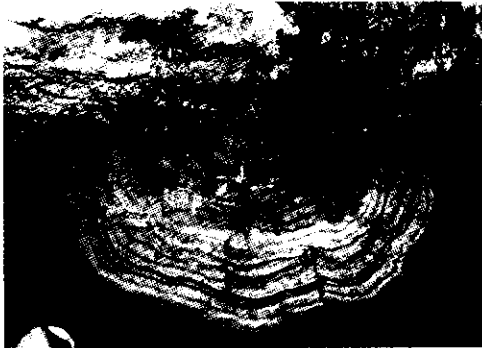
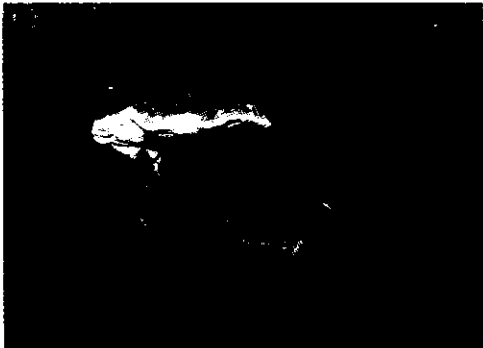
Hình: Quan hệ chủng loại phát sinh của nấm Hoàng chi *Tomophagus colossus* (các chủng: Philippine, India, Sài Gòn, Huế) và *Tomophagus cattienensis* (Cát Tiên) (Le Xuan Tham, JM Moncalvo et al., 2008: *tư liệu chưa công bố*)



Hình: Thời điểm phân ly chủng loại phát sinh nấm Linh chi đen *Amauroderma* với Linh chi thường *Ganoderma* bắt đầu từ 120 triệu năm (Gondwana - Laurasia phân tách đại lục) - đến 66 triệu năm - kết thúc phân tách (Moncalvo & Buchanan, 2008)

GS. JM Moncalvo và TS. PK Buchanan (New Zealand) mới đây (2008) cũng dùng phương pháp giải trình tự rADN (ITS) chứng minh rằng nấm Linh chi đen *Amauroderma* (hàng niên) đã tách ly khỏi nhóm Cổ Linh chi (đa niên) *Ganoderma* khoảng 120-66 triệu năm về trước.

Và thật lý thú chúng tôi đã tìm thấy các nhóm Linh chi này ở Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà, Đà Lạt và Vườn quốc gia Cát Tiên. Nghĩa là Việt Nam có thể cũng nằm trong vùng phân ly đó.



Hình: Cổ Linh chi Đà Lạt *Ganoderma australe* và Hoàng chi Cát Tiên *Tomophagus cattienensis* - nguồn tài nguyên nấm dược liệu quý ở Lâm Đồng (kích thước có thể đạt mức khổng lồ ~50-60 cm)