

Thiết kế vector biểu hiện mang gen *OsNAC1* được điều khiển bởi promoter cảm ứng điều kiện bất lợi *RD29A*

Phạm Thu Hằng^{1,*}, Nguyễn Duy Phương¹, Trần Lan Đài³,
Phan Tuấn Nghĩa², Phạm Xuân Hội¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Quy Nhơn, 170 An Dương Vương, Quy Nhơn, Bình Định, Việt Nam

Nhận ngày 27 tháng 5 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 28 tháng 8 năm 2014, Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 11 năm 2014

Tóm tắt: Gen *OsNAC1* đã được nghiên cứu và chứng minh vai trò tăng cường khả năng kháng hạn của lúa. Việc sử dụng các promoter cảm ứng với điều kiện bất lợi của môi trường, trong đó có promoter *RD29A*, để điều khiển biểu hiện của gen đáp ứng stress đã được rất nhiều nghiên cứu trước đây áp dụng thành công. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập và nhân dòng promoter cảm ứng hạn *RD29A* từ hệ gen của cây *Arabidopsis thaliana* bằng phản ứng PCR và thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* dựa trên bộ khung của vector pCambia1301. Trình tự mã hóa *OsNAC1* được tách dòng từ vector nhân dòng pJET/*OsNAC1* và lắp ghép vào hệ vector biểu hiện pCAM-Rd. Các vector tái tổ hợp pCAM-Rd/*NAC1-S* và pCAM-Rd/*NAC1-AS* sẽ được sử dụng cho nghiên cứu chuyển gen vào cây mô hình thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Từ khóa: Chịu hạn, lúa, *OsNAC1*, *RD29A*, chuyển gen.

1. Mở đầu

Dưới điều kiện bất lợi của môi trường như hạn, mặn, lạnh..., thực vật phải thay đổi các quá trình sinh lý và sinh hóa để tồn tại và thích nghi. Ở mức độ phân tử, điều kiện bất lợi môi trường sẽ làm cho thực vật gia tăng mức độ biểu hiện và tích lũy của hàng loạt các gen và protein đáp ứng bất lợi môi trường. Quá trình biểu hiện của các gen liên quan tới đáp ứng

chống chịu điều kiện bất lợi của thực vật được điều khiển bởi một loạt các promoter cảm ứng stress [1]. Trong số đó, *RD29A* là một promoter cảm ứng với các điều kiện môi trường bất lợi như hạn, mặn và lạnh và đã được nghiên cứu rất chi tiết. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng, trình tự promoter *RD29A* chứa hai vùng có hoạt tính cis liên quan đến sự biểu hiện dưới điều kiện bất lợi của môi trường là vùng đáp ứng ABA (the ABA-responsive element (ABRE)) và vùng cảm ứng mất nước (the dehydration – responsive element (DRE)/C-repeat (CRT)) [2]. Promoter *RD29A* đã được phân lập và nghiên

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-983938784
Email: phamthuhang2412@gmail.com

cứ chức năng hoạt động trên nhiều đối tượng cây khác nhau như *Arabidopsis thaliana*, thuốc lá và lúa mì [3-6].

Họ NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) là họ gen lớn nhất thuộc nhóm gen mã hóa nhân tố phiên mã được tìm thấy ở thực vật, có vai trò quan trọng trong sự phát triển và đáp ứng với điều kiện bất lợi của thực vật. Các protein trong họ gen này có đặc điểm chung là trình tự liên kết DNA bảo thủ được biết đến như là miền NAC ở vùng đầu N. Ngược lại, vùng đầu C biến đổi thường chứa các miền hoạt hóa và rất đa dạng cả về chiều dài và trình tự [7]. Cho tới nay đã có khoảng 117 gen NAC trong hệ gen *Arabidopsis* và 151 gen NAC trong hệ gen lúa. 26 gen NAC ở họ cam chanh, 152 gen NAC ở đậu tương và thuốc lá đã được phân lập nhưng chỉ một số ít gen NAC được nghiên cứu chức năng [8-10].

OsNAC1 là một gen mã hóa nhân tố phiên mã thuộc họ NAC có liên quan đến tính chống chịu với bất lợi môi trường ở lúa được phân lập từ lúa và đã được nghiên cứu chi tiết đặc tính [11-13]. Cây lúa chuyển gen *OsNAC1* tăng cường tính chịu hạn, mặn và kết quả phân tích microarray cho thấy biểu hiện của gen ngoại sinh *OsNAC1* đã hoạt hóa hàng loạt gen chức năng liên quan đến tính chịu hạn. Kết quả thử

nghiệm trên đồng ruộng các cây lúa chuyển gen *SNAC1* cho năng suất cao hơn 22-34% so với các cây đối chứng ở điều kiện hạn [12].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chúng tôi tiến hành thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *OsNAC1* dưới sự điều khiển biểu hiện của promoter *RD29A* với mục tiêu làm tạo nguồn vật liệu cho công tác nghiên cứu tạo giống cây trồng chống chịu hạn, mặn theo định hướng chuyển gen.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Hạt giống cây *Arabidopsis thaliana* kiểu *Colombia* do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp; chủng vi khuẩn *E. coli* DH5a và các vector pCAM-Ubi, pJET/NAC1 do Bộ môn Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

Các đoạn oligonucleotide dùng cho phản ứng PCR nhân bản gen được thiết kế dựa trên trình tự gen đã công bố trên Ngân hàng gen thế giới (mã số AY973635.1) và tổng hợp bởi hãng Sigma (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các oligonucleotide sử dụng trong nghiên cứu

Tên mỗi	Trình tự mỗi
RD-Fw	5'-AAGCTTCGACTCAAAACAACCTTA-3'
RD-Rv	5'-GGATCCAAATCAAACCCCTTATTATCC-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
NOS-Rv	5'-AGACCGGCAACAGGATTCAA-3'
35S-Fw	5'-CCCACTATCCTTCGCAA-3'
GUS-Rv	5'-GATTTACGGGTTGGGGTTTCT-3'
NAC1-Fw	5-GGATCCATGGGGATGGGGATGAGGAG-3'
NAC1-Rv	5'-GGATCCTCAGAACGGGACCATGCCCA-3'

2.2. Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của cây *Arabidopsis* được tách chiết theo phương pháp của Doyle và cộng sự [14], sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu mô thực vật tươi (100 mg) được nghiền trong nito lỏng, sau đó được bổ sung 500 μ l dung dịch CTAB 2% (có chứa ARNase 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. 500 μ l hỗn hợp phenol : chloroform : isoamyl (25 : 24 : 1) được bổ sung vào dung dịch để kết tủa protein. Hỗn hợp sau được ly tâm tốc độ 13.000 vòng/phút để thu DNA tinh sạch.

Phân lập promoter RD29A:

Promoter RD29A phân lập từ DNA tổng số của cây *A. thaliana* bằng kỹ thuật PCR với chu kỳ nhiệt: 94°C-5 phút; (94°C - 30 giây, 56°C - 20 giây, 72°C - 40 giây) x 35 chu kỳ; 72°C - 7 phút và bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng bộ kit *GenJET-TM Gel Extraction* của hãng Fermentas. Promoter RD29A nhân bản bằng PCR được nhân dòng bằng bộ kit pGEMT Easy theo qui trình đi kèm của hãng Promega. Plasmid tái tổ hợp pGEMT/RD29A được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit *GenJET-TM Plasmid Miniprep* của hãng Fermentas và bảo quản ở -20°C.

Thiết kế vector pCAMBIA-RD29A:

Vector tách dòng pGEM- RD29A và vector pCAMBIA-Ubi được xử lý đồng thời với *Hind*III và *Bam*HI. Trình tự promoter RD29A được ghép nối vector pCAMBIA1301 mạch bằng enzyme T4 ligase (Invitrogen) để tạo vector tái tổ hợp pCAM-RD29A. Plasmid tái tổ hợp pCAM-RD29A được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* bằng bộ kit *GenJET-TM Plasmid Miniprep* (Fermentas) và bảo quản ở -20°C.

Thiết kế cấu trúc biểu hiện promoter RD29A:OsNAC1:NosT

Vector tách dòng pJET-OsNAC1 và vector biểu hiện pCAM-RD29A được xử lý đồng thời với enzyme *Bam*HI. Trình tự mã hóa của *OsNAC1* được ghép nối vào vector biểu hiện tại vị trí đa điểm cắt (Multi cloning sites) nằm giữa vùng promoter RD29A và vùng kết thúc phiên mã *NosT* nhờ enzyme T4 Ligase (Invitrogen). Thể biến nạp sau khi sàng lọc bằng phản ứng PCR với hai cặp mồi RD-Fw/NAC1-Rv và RD-Fw/NAC1-Fw được nuôi trong môi trường LB để tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp.

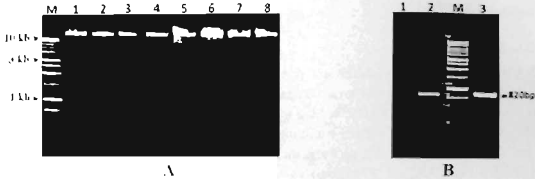
Giải và phân tích trình tự promoter RD29A

Vector tái tổ hợp pGEM-RD29A được giải trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự [15] và đọc bằng hệ thống máy giải trình tự ABI 3100. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. Trình tự gen sau khi xử lý được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Gene Bank và phân tích bằng phần mềm Genetyx 4.0.

3. Kết quả và thảo luận

Phân lập promoter RD29A từ DNA tổng số của cây *Arabidopsis*

Trước đây đã có nhiều nghiên cứu chứng minh vai trò của promoter RD29A đối với đáp ứng chống chịu điều kiện bất lợi của cây *A. thaliana* [1]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập promoter RD29A từ cây *A. thaliana* để phục vụ thí nghiệm thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa nhân tố phiên mã tăng cường tính chống chịu điều kiện bất lợi ở lúa *OsNAC1*. Hạt *A. thaliana* được gieo trồng đến giai đoạn một tháng tuổi, chúng tôi thu toàn bộ lá và thân cây, nghiền mẫu trong nito lỏng, sau đó tách chiết DNA tổng số bằng CTAB. Kết quả điện di mẫu tách chiết DNA trên gel agarose 1% cho thấy các mẫu DNA thu được hoàn toàn tinh sạch, không bị lẫn RNA (hình 1A). Mẫu DNA tách chiết được bảo quản trong đệm TE ở -20°C.



Hình 1. Kết quả nhân bản trình tự promoter RD29A từ DNA tổng số.

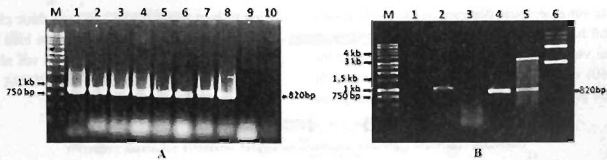
Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm DNA tổng số của *A. thaliana* trên gel agarose 1%; giếng 1 - 8. các mẫu DNA tổng số tách chiết từ *A. thaliana*. (B) Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn promoter RD29A trên gel agarose 1%; giếng 1: đối chứng âm (không có DNA khuôn); giếng 2: khuôn là DNA tổng số, giếng 3: sản phẩm PCR tinh sạch bằng bộ kit GenJET-™ Gel Extraction. Giếng M: thang DNA chuẩn 1 kb.

Dựa vào trình tự nucleotide của gen RD29A được công bố trên ngân hàng gen (AY973635.1), chúng tôi đã thiết kế cặp mồi RD29A-F/RD29A-R (bảng 1) để sử dụng cho phản ứng PCR nhân bản promoter RD29A từ cây *Arabidopsis thaliana*. Phản ứng PCR được thực hiện 35 chu kỳ, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 20 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 40 giây. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy chúng tôi đã thu được một băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 0,8 kb (hình 1B, giếng 2), tương ứng với kích thước lý thuyết của promoter RD29A cần nhân bản là 823 bp. Đối với phản ứng đối chứng âm không có DNA tổng số trong hỗn hợp phản ứng, chúng tôi không thu được băng DNA này (hình 1B, giếng 1). Kết quả này cho thấy chúng tôi đã nhân bản được đoạn DNA mong muốn từ DNA tổng số của *A. thaliana* bằng cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế. Sản phẩm PCR nhân bản promoter RD29A sau đó được chúng tôi tinh sạch bằng bộ kit GenJET-™ Gel Extraction (Fermentas) và điện di kiểm tra lại trên gel agarose 1% (hình 1B, giếng 3). Sản phẩm

PCR tinh sạch này được chúng tôi sử dụng cho thí nghiệm nhân dòng và giải trình tự sau này.

Nhân dòng promoter RD29A

Sản phẩm PCR tinh sạch được chúng tôi ghép nối trực tiếp với vector pGEM-T, sử dụng bằng bộ kit nhân dòng pGEM®-T Vector System II (Promega). Sản phẩm của phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α và cấy trải trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung chất kháng sinh ampicillin 50µg/ml, chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal. Theo lý thuyết, các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường có màu trắng là khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp, trong khi đó các khuẩn lạc có màu xanh là những khuẩn lạc mang plasmid nguyên bản tự đóng vòng. Kết quả kiểm tra các thể biến nạp bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu (RD-Fw/RD-Rv) cho thấy chúng tôi đã thu được các thể biến nạp dương tính (hình 2A). Để khẳng định kết quả thu được, chúng tôi đã tinh sạch plasmid từ khuẩn lạc dương tính và kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi khác nhau và xử lý cắt bằng enzyme giới hạn HindIII/BamHI.



Hình 2. Kết quả nhân dòng promoter *RD29A* vào vector pGEM-T.

Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR trực tiếp từ khuẩn lạc mang pGEM/RD29A với cặp mồi đặc hiệu RD-Fw/RD-Rv: giếng 1 - 9 sản phẩm PCR từ khuẩn lạc số 1 - 9; giếng 10: đối chứng âm (khuẩn là H₂O). (B) Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp pGEM/RD29A bằng PCR (giếng 1 - 4) và phản ứng cắt giới hạn (giếng 5 & 6): giếng 1 & 2: PCR với cặp mồi T7/SP6; giếng 3 & 4: PCR với cặp mồi RD-Fw/RD-Rv; giếng 1 & 3: đối chứng âm (khuẩn là H₂O); giếng 2 & 4: khuôn là pGEM/RD29A; giếng 5: sản phẩm phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI/*Hind*III; giếng 6: vector pGEM/RD29A nguyên bản. Giếng M. Thang chuẩn DNA 1 kb.

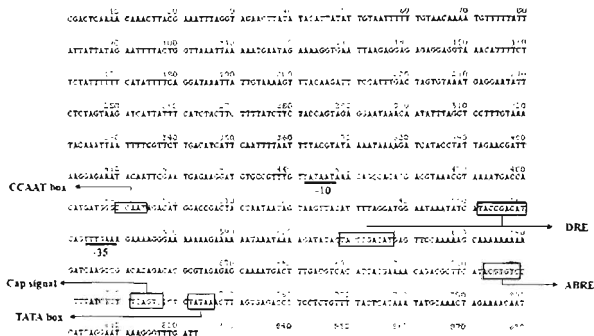
Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được chúng tôi thực hiện với 2 cặp mồi: cặp mồi đặc hiệu của vector pGEM-T (T7/SP6) có khoảng cách 186 bp trên vector pGEM-T và cặp mồi đặc hiệu của đoạn gen *RD29A* (RD-Fw/RD-Rv). Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1% . Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% trên hình 2B cho thấy với cặp mồi đặc hiệu chúng tôi thu được một băng DNA có kích thước khoảng 0,8 kb (hình 2B, giếng 4). Sản phẩm PCR với cặp mồi vector cho một băng DNA có kích thước khoảng 1,0 kb, kích thước này phù hợp với kích thước đoạn DNA theo tính toán lý thuyết, bao gồm 823 bp của đoạn gen *RD29A* và 186 bp của vector pGEM-T (hình 2B, giếng 2). Tiếp đó, do trên cặp mồi đặc hiệu được dùng để nhân bản đoạn gen *RD29A* chúng tôi có thiết kế trình tự nhận biết của hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III, vì vậy, để kiểm plasmid tái tổ hợp thu được, chúng tôi thực hiện phản ứng cắt đồng thời bằng enzyme giới hạn *Bam*HI/*Hind*III. Kết quả thu được trên hình 2B cho thấy sản phẩm của phản ứng cắt cho hai băng DNA, băng DNA thứ nhất có kích thước khoảng 3,0 kb là bộ khung nguyên bản của vector pGEM-T,

băng DNA còn lại là đoạn promoter *RD29A* có kích thước khoảng 0,8 kb (hình 2B, giếng 5). Các kết quả thu được này cho phép chúng tôi khẳng định chắc chắn hơn việc nhân dòng thành công trình promoter *RD29A* vào vector pGEM-T.

Để khẳng định chính xác đoạn DNA được nhân dòng vào vector pGEM-T có đúng là promoter *RD29A* mong muốn hay không, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn DNA này trong vector tái tổ hợp pGEM-RD29A. Kết quả giải trình tự sau đó được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với trình tự gen *RD29A* đã được công bố trên Ngân hàng Gen Thế giới (AY973635.1). Kết quả phân tích trình tự DNA cho thấy đoạn DNA phân lập được có chiều dài 823 bp, có trình tự tương đồng 100% với trình tự đã công bố trước đây của promoter *RD29A* [11]. Trình tự DNA phân lập được có chứa các vùng trình tự đặc trưng cần thiết của một promoter điều hòa biểu hiện gen: TATA-box (742-746), CCAAT-box (489-494); vùng tín hiệu gắn mũ G (732-737), vùng giàu GC (472-509) và hai yếu tố hoạt hóa *cis-acting* (552-560 và 609-617). Các phân tích sâu hơn cho thấy đoạn DNA của chúng tôi cũng chứa

các vùng liên quan đến cảm ứng trong điều kiện khô hạn: DRE (497-502), ABRE (712-719) và hai vùng trình tự 20 Nucleotide lập trước (546-560) và lập sau (603-622). Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện một vùng trình tự gần giống với

trình tự hoạt hóa As1 (682-689) đã được chứng minh là có chức năng điều khiển gen biểu hiện đặc hiệu ở rễ. Kết quả này phù hợp với những công bố trước đây về promoter *RD29A* của *Arabidopsis*.



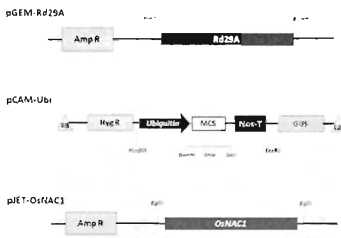
Hình 3. Kết quả phân tích trình tự gen *RD29A*.

Từ các kết quả thu được ở trên, chúng tôi có thể khẳng định đã phân lập và nhân dòng thành công promoter *RD29A* ở *A. thaliana*. Sản phẩm nhân dòng sẽ được chúng tôi tiếp tục sử dụng cho các nghiên cứu thiết kế vector biểu hiện mang gen *OsNAC1* được đặt dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng điều kiện bất lợi *RD29A*.

Thiết kế vector biểu hiện pCAMBIA1301 mang promoter điều khiển *RD29A*

Trong nghiên cứu này, để thiết kế vector biểu hiện gen *OsNAC1* dựa trên hệ vector thương mại pCAMBIA1301, chúng tôi đã sử dụng vector pCAM-Ubi do phòng Bệnh học phân tử đã thiết kế làm nguyên liệu cho thí nghiệm (hình 4). Để thay thế trình tự promoter

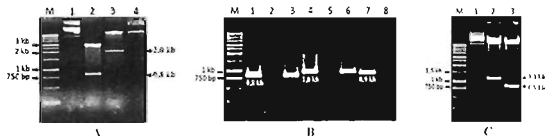
RD29A vào vị trí promoter *Ubiquitin* trong vector biểu hiện pCAM-Ubi, chúng tôi đã xử lý đồng thời 2 vector pGEM-*RD29A* và pCAM-Ubi với *HindIII/BamHI* (hình 5A). Sau khi tinh sạch sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn từ gel agarose, trình tự promoter *RD29A* (0,8 kb) được chèn vào vị trí promoter *Ubiquitin* (2,0 kb) đã được cắt bỏ trên vector biểu hiện pCAM-Ubi dưới tác dụng của enzyme T4 ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng DH5α. Sau khi sàng lọc thể biến nạp dương tính bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu promoter *RD29A* (RD-Fw/RD-Rv), chúng tôi tiến hành tinh sạch plasmid từ các thể biến nạp này và kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 4. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pCAM-Rd/OsNAC1.

Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuôn là plasmid tích sạch cho thấy, với cặp mỗi đặc hiệu cho promoter *RD29A* (RD-Fw/RD-Rv) và đặc hiệu cho hệ vector pCAMBIA1301 (35S-Fw/Gus-Rv) chúng tôi thu được các sản phẩm PCR có kích thước lần lượt khoảng 0,8 kb (hình 5B, giếng 1) và 1,0 kb (hình 5B, giếng 6), bằng với kích thước của hai băng DNA của phản ứng đối chứng dương sử dụng vector pGEM/RD29A (hình 5B, giếng 1) và vector pCAM-Ubi làm khuôn (hình 5B, giếng 3). Đối

với phản ứng PCR sử dụng mỗi đặc hiệu cho promoter *RD29A* và mỗi đặc hiệu cho vùng NOS, chúng tôi thu được một băng DNA có kích thước khoảng 0,9 kb đúng với kích thước tính toán lý thuyết (hình 5A, giếng 7). Khu xử lý plasmid tái tổ hợp này bằng *HindIII/BamHI*, chúng tôi thu được băng DNA có kích thước 0,8 bp tương ứng với đoạn trình tự promoter *RD29A* và một băng DNA kích thước khoảng 12 kb là bộ khung vector pCAMBIA1301 (hình 4; hình 5C, giếng 3).



Hình 5 Kết quả ghép nối trình tự promoter *RD29A* vào hệ vector pCAMBIA1301.

Ghi chú: (A) Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn pGEM/RD29A (giếng 1&2) và pCAM-Ubi (giếng 3&4) bằng *HindIII/BamHI* trên gel agarose 1%; giếng 1&4: vector nguyên bản; giếng 2&3: vector được xử lý với *HindIII/BamHI*. (B) Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp pCAM-Rd; giếng 1 – 3: PCR với cặp mỗi RD-Fw/RD-Rv; giếng 4 – 6: PCR với cặp mỗi 35S-Fw/GUS-Rv; giếng 7 & 8: PCR với cặp mỗi RD-Fw/NOS-Rv; giếng 1, 4 & 7: khuôn là pCAM-Rd; giếng 2, 5 và 8: đối chứng âm (khuôn là H₂O), giếng 3: đối chứng dương (khuôn là pGEM/RD29A), giếng 6: đối chứng dương (khuôn là pCAM-Ubi). (C) Kết quả điện di sản phẩm cắt enzyme giới hạn pCAM-Rd; giếng 1: vector pCAM-Rd nguyên bản; giếng 2: sản phẩm cắt enzyme giới hạn *HindIII/EcoRI*, giếng 3: sản phẩm cắt enzyme giới hạn *HindIII/BamHI* Giếng M: Thang chuẩn DNA 1 kb

trong CQ rất phát triển, với nhiều suối tạm thời hoặc quanh năm. Địa hình có dạng lồi tựa như rừng giữa núi.

Nét đặc trưng của quần xã thực vật ở đây là sự có mặt của loài Thông lá dẹt- *Ducampopinus krempfii* (Pinaceae). Các cây mọc thành từng nhóm, cùng có khi riêng lẻ. Chiều cao cây tới 40m, đường kính thân 90 -120cm. Tán thưa khi mọc đơn lẻ và đan xen nhau khi mọc thành nhóm. Trên cành của *D. krempfii* có rất nhiều thực vật bì sinh, trong đó thường gặp là những đại diện của chi *Vaccinium* (Ericaceae) và của họ Lan (Orchidaceae).

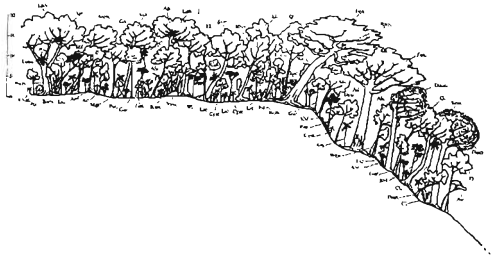
Tầng hai rất phát triển, cao 18 - 24m, đường kính thân 30 - 60cm. Ở gốc một số loài cây phát triển rễ bệnh vè. Tán cây khá dày, thường tiếp xúc nhau. Các loài tạo tầng là *Lithocarpus* sp., *Castanopsis* sp., *Quercus* sp. (Fagaceae), Hồng quang-*Rhodoleia championi* (Rhodoleiaceae), Hồi đá vôi-*Illicium griffithii* (Illiciaceae), Cáp mọc hình sao-*Craibiodendron stellatum*

(Ericaceae), Lương xương-*Anneslea fragrans*, *Gordonia* sp. (Theaceae), *Altingia* sp. (Alingiaceae)...

Tầng ba có tính phân mảnh, thường gặp các loài: *Lasianthus* sp., *Ardisia* sp. (Myrsinaceae), Dầu dẫu-*Euodia pasteuriana* (Rutaceae). Độ che phủ của cây thân thảo khoảng 20%, thường gặp các đại diện của họ gừng (Zingiberaceae), đặc biệt là loài *Alpinia* sp.

b) Quần xã thực vật với loài Pơ mu-*Fokienia hodginsii*

Những cây có kích thước lớn nhất trong quần xã là *F. hodginsii*, mọc ở phần trên và phần giữa của các CQ sườn dốc. Chiều cao cây 20 - 25 m, đường kính thân 100 - 120cm, tán dày và tỏa rộng với bán kính tới 8m. Tham gia tạo nên tầng trên cùng của quần xã còn có Hoàng đàn giả-*Dacrydium elatum* và Thông nang-*Podocarpus imbricatus* (Podocarpaceae), song số lượng cá thể của chúng không nhiều.



Hình 2. Cấu trúc thực vật với loài Pơ mu-*F. Hodginsii*.

Ngoài những loài lá kim kể trên, tham gia cấu trúc tầng thứ nhất còn có các loài thuộc họ Chè-Theaceae (*Ternstroemia* sp., *Camellia* sp.), họ Dè-Fagaceae (*Lithocarpus* spp., *Quercus*

spp.), họ Côm-Elaeocarpaceae (*Elaeocarpus* spp.) và họ Đậu-Fabaceae (*Archidendron* sp.). Chiều cao của các loài này 8-12m, đường kính 10 - 25cm, đôi khi tới 40cm.

Tầng hai cao tới 5m, được cấu trúc từ các loài: Ông ành hồng-*Vaccinium bracteatum* (Ericaceae), Thông tre-*Podocarpus nerifolius* (Podocarpaceae), Dầu dẫu Pasteur-*Euodia pasteuriana* (Rutaceae) Hồi đá vôi-*Illicium griffithii* (Illiciaceae), Đỗ quỳ-*Rhododendron cf. moullainense* (Ericaceae). Tầng ba cao tới 3m với loài trội là *Lasianthus* sp. (Rubiaceae) và *Poilannammia cf. allomorphaioidea* (Melastomataceae); trong tầng này cũng ghi nhận được các loài *Eurya* sp., *Ardisia* sp., và thường gặp các cây cọ *Pinanga* sp. và *Licuala* spp.

Tầng thân thảo khá phát triển, độ che phủ đạt 30 - 40%. Dây leo chủ yếu là *Smilax* sp. (Smilacaceae) và *Embelia* sp.. Loài *Calamus* sp. (Arecaceae) cũng thường ghi nhận ở khu vực này.

3.5. Bàn luận về thực vật trong cảnh quan rừng KBT Hòn Bà

Cấu trúc thảm thực vật trong CQR của KBTTN Hòn Bà có sự phân hóa khá mạnh, song vẫn giữ được tính đặc trưng của cấu trúc nguyên sinh, đặc biệt là ở các quần xã phân bố từ độ cao 500m trở lên. Từ kết quả nghiên cứu cho phép nhận định, dải núi chính với phương kinh tuyến là lá chắn tự nhiên, tạo cho phần Tây của KBTTN ít chịu ảnh hưởng trực tiếp của gió biển. Cùng với địa hình phức tạp đã tạo ra trên các dải núi nhiều quần xã thực vật có tính đặc thù.

Cho tới độ cao 800m, trên những sườn núi thoải đã hình thành những CQR với những loài thực vật đặc trưng cho rừng đồng bằng ở miền Nam Việt Nam. Từ độ cao trên 1.000m, thực vật trong CQ bắt đầu thể hiện tính trội của các loài thuộc các họ thực vật núi như Fagaceae, Magnoliaceae, Theaceae, Podocarpaceae.

Với quá trình hình thành lâu đời, ổn định cùng điều kiện khí hậu - thổ nhưỡng, đã hình thành ở KBTTN Hòn Bà nhóm thực vật lá kim như *Fokienia hodginsii*, *Podocarpus imbricatus*, *Podocarpus nerifolius*, *Ducampopinus krempfii*, *Dacrydium elatum*. Đây đều là những loài có ý nghĩa quan trọng trong sự hình thành và duy trì cấu trúc CQR hiện tại ở những nơi chúng xuất hiện.

Địa hình núi phức tạp, hệ thống thủy văn phát triển tạo điều kiện cho sự hình thành những CQ đặc biệt với những điều kiện tiểu khí hậu phù hợp cho một số cây gỗ và cây thảo, chúng đạt được những kích thước rất lớn mà ở khu vực khác không có được như: *Ducampopinus krempfii* ở CQ đồi trong thung lũng; *Craibiodendron stellatum* (Ericaceae) ở CQ thung lũng giữa núi ở độ cao 1.260m; dương xỉ *Marattia pellucida* (Marattiaceae) trong CQ với các dòng suối có nước chảy quanh năm ở độ cao 1.400 m; Móc-*Caryota urens* trong CQ thung lũng giữa núi với các dòng suối nước chảy quanh năm, lòng suối nền đá ở độ cao 1.200 đến 1.400m...

Nét độc đáo nữa trong cấu trúc thực vật của CQR KBTTN Hòn Bà là sự tham gia của các loài loài dương xỉ. Từ những loài dương xỉ thân gỗ kích thước lớn xuất hiện trong CQ từ độ cao 800 - 900m đến các loài bì sinh *Aglaomorpha coronans* và *Asplenium nidus*, trong đó, những cá thể lớn nhất của loài *Aglaomorpha coronans* ưa mọc trên những cây to tại khu vực thoải rợp bóng, còn loài *Asplenium nidus* phát triển nhiều trong các CQ thuộc dải núi chính, có mặt hầu như trên tất cả các cây gỗ kích thước lớn.

So sánh với những khu vực khác mà chúng tôi đã nghiên cứu trên lãnh thổ Việt Nam có thể khẳng định, những CQ vùng chân núi Hòn Bà là giới hạn phía bắc đối với sự phân bố của khá nhiều loài thực vật thuộc đồng bằng miền Nam, trong khi những điều kiện ở những CQ thung lũng giữa núi lại thuận lợi cho sự tồn tại những

loài từ phía Bắc. Đây là những ghi nhận có ý nghĩa cho việc hiểu thêm về phân bố địa lý của thực vật trong các CQR lãnh thổ Việt Nam.

4. Kết luận

Cấu trúc thực vật của KBTN Hòn Bà có mức độ đa dạng cao và duy trì được tính chất nguyên sinh, đặc biệt từ độ cao 500m trở lên. Theo sự phân hoá của các yếu tố thành tạo CQ và sinh thái phát sinh, đã hình thành nên ở khu vực này nhiều quần xã thực vật tự nhiên: quần xã thực vật thung lũng vùng thấp, các quần xã trên địa hình sườn ở độ cao dưới 1.000m, quần xã thực vật đỉnh núi...

Với lịch sử phát triển lâu đời và ổn định đã hình thành nên ở Hòn Bà những CQR chứa đựng các kiểu quần xã thực vật hỗn giao á nhiệt đới với các loài lá kim quý hiếm. Đây là cơ sở hình thành nên các loại CQR hỗn giao đặc trưng được hình thành bởi các loài hạt trần *Ducampopinus krempfi* và *Fokienia hodginsii*.

Cấu trúc tầng tán của các quần xã thực vật trong CQ thường từ 2 – 4 tầng, song quy luật liên tục hay phân mảnh không thể hiện rõ giữa các quần xã. Điển hình trong đó là tầng trên cùng ở nơi này thì phân mảnh, nơi khác lại khá liên tục. Thêm vào đó, tính chất của đất, điều kiện thủy văn có ảnh hưởng rõ rệt đến cấu trúc thành phần loài và hình thái các quần xã thực vật của KBTN Hòn Bà.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Đăng Hội, Kuznetsov A. N., "Vai trò của yếu tố địa hình trong việc phân hoá thảm thực vật tự nhiên Vườn Quốc gia Bidoup – Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng", Báo cáo khoa học Hội nghị Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật toàn quốc lần thứ 3, tr. 1347-1352, Hà Nội, 2009.
- [2] Nguyễn Đăng Hội, "Cơ sở địa lý tự nhiên của việc quản lý, bảo tồn đa dạng sinh học VQG Bidoup – Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng", Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc lần thứ nhất hệ thống Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Hà Nội, 2011, tr. 386-392.
- [3] Lê Bá Thảo, Thiên nhiên Việt Nam, Nxb. Giáo Dục, Hà Nội, 2003.
- [4] Кузнецов А. Н., Кузнецова С. П., Фан Лонг, "Растительность горных массивов Би Дуп и Хон Ба – южной оконечности меридианального гималайского хребта Чьюнг Шон". Материалы зоолого-ботанических исследований в горных массивах Би Дуп и Хон Ба, лалатское плато, южный Вьетнам, Москва – Ханой, 2006.
- [5] Trần Thế Bách và nnk, "Bước đầu nghiên cứu đa dạng thực vật thuộc ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) ở Khu bảo tồn thiên nhiên Hòn Bà, tỉnh Khánh Hòa", Báo cáo khoa học Hội nghị Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật toàn quốc lần thứ 5, Hà Nội, 2013, tr. 379-383.
- [6] Nguyễn Văn Trương, Quy luật cấu trúc rừng gỗ hỗn loại, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1983.
- [7] Nguyễn Đăng Hội, Kuznetsov A. N. "Đặc điểm cấu trúc các quần xã thực vật trong cảnh quan rừng tự nhiên VQG Phú Quốc", Journal of Science, ĐHQGHN, Số 4S, tr. 65-73.
- [8] Phạm Hoàng Hộ, Cây cỏ Việt Nam. 1, 2, 3, Nxb. Trẻ. TP. Hồ Chí Minh, 1999.