

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC MẪU TÙNG LA HÁN BẢN ĐỊA TẠI HUYỆN ĐẢO CÔ TÔ, QUẢNG NINH BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD

Trần Văn Tam¹, Đặng Văn Đông¹, Đặng Văn Lâm¹,

Trần Duy Dương², Trần Đăng Khánh²

TÓM TẮT

Việc sử dụng chỉ thị phân tử để đánh giá mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu giống tùng La Hán (*Podocarpus macrophyllus*) tại huyện đảo Cô Tô, Quảng Ninh sẽ góp phần phục vụ công tác thu thập, phân loại, đánh giá và bảo tồn nguồn gen cũng như cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền giữa các giống tùng La Hán làm cơ sở cho các chương trình chọn tạo giống. Phản ứng PCR-RAPD của 32 mẫu ngẫu nhiên thuộc nhóm OPA, OPB, OPC, OPD và OPN sử dụng nghiên cứu đa dạng di truyền trên 12 mẫu tùng La Hán đều cho đa hình. Thực hiện 384 phản ứng PCR RAPD nhận lên được tổng số 1692 băng thuộc 504 loại băng có kích thước khác nhau. Trung bình mỗi mẫu nhận được 52,87 băng, trung bình mỗi giống xuất hiện 4,82 băng. Qua sơ đồ hình cây phả hệ cho thấy, 12 mẫu giống tùng La Hán chia ra làm hai nhóm chính và có hệ số tương đồng di truyền dao động 62-99,9% trong đó hai mẫu tùng La Hán số 3 và số 4 có hệ số tương đồng cao nhất là 99,9%.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, đa dạng di truyền, tùng La Hán (*Podocarpus macrophyllus*), mới.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông La Hán hay tùng La Hán (*Podocarpus macrophyllus*) là một loài cây cảnh thuộc họ Thông tre (*Podocarpaceae*) có nguồn gốc từ Nhật Bản và Trung Quốc thường được trồng làm cảnh trong công viên, đình chùa, vườn nhà. Cây thuộc loại cây gỗ lớn, cành nhánh nhiều, dài, mọc ngang hay rủ xuống. Lá hình giải hẹp, thuôn nhọn ở đỉnh, gốc có cuống ngắn, màu xanh bóng ở mặt trên, hơi xám ở mặt dưới. Nón dục dạng bông. Nón cái gần tròn, màu xanh, hạt tròn màu tím nhạt. Lá cây hình kim, lớn nhỏ dài ngắn khác nhau. Lá mọc cách dạng ốc xoắn, bề mặt màu xanh đậm, mặt lưng nhạt hơn. Cây có thể cao hơn 10 m. Dáng cây đẹp, có xua phong nhã. Lá cây lượn vòng, xanh tươi mạnh mẽ. Về số lượng loài, *Podocarpaceae* là họ cây lá kim lớn thứ hai với hơn 100 loài khác nhau (Farjon, 2001). Chúng có nhiều nhất ở vùng nhiệt đới giữa đến vùng nhiệt độ cao, nơi chúng phát triển mạnh trên vùng đất nghèo dinh dưỡng. Ngoài ra, *Podocarpaceae* được tìm thấy trong một số loại rừng có độ cao thấp khác thường. Tùng La Hán (*Podocarpus macrophyllus*) còn được biết là có dược tính có lợi cho con người và động vật (Abdillahi và cs., 2010; Abdillahi và cs., 2012). Thân và lá cây tùng La Hán chứa nhiều hợp chất hoạt tính

sinh học như chất chống oxy hóa như nordither terpenes, axit podocarpic và tatarol (Bauch, 1977; Abdillahi và cs., 2010; Symonds và cs., 2012). Một số hợp chất này có đặc tính kháng khuẩn, chống nấm hoặc vi khuẩn (Abdillahi và cs., 2008; Abdillahi và cs., 2010). Các hợp chất khác có đặc tính gây độc tế bào có thể hữu ích trong việc tiêu diệt tế bào ung thư (Abdillahi và cs., 2010).

Ở Việt Nam, tùng La Hán mọc tự nhiên trong rừng lá rộng thường xanh nhiệt đới và á nhiệt đới thuộc các tỉnh Quảng Ninh, Hòa Bình, Lào Cai, Hà Giang... và được trồng làm cảnh khắp đất nước. Cây tùng La Hán có ở Việt Nam được nhiều người biết đến như 1 loại cây cảnh quý, có giá trị rất cao. Theo các nhà thực vật học, cây tùng La Hán ở Việt Nam có nhiều các biến chủng khác nhau, được phân bố nhiều ở Cô Tô, tuy nhiên những năm qua bị khai phá mạnh, nên những vùng có tùng La Hán tự nhiên không nhiều, chỉ còn lại một số nơi rừng núi ít người đặt chân đến. Chính vì có giá trị, nhiều loài tùng La Hán có nguy cơ bị khai thác quá tải nên có thể bị đe dọa tiêu diệt.

Những nghiên cứu về đa dạng di truyền tùng La Hán ở nước ta cho đến nay chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái, chưa có công trình nào trong nước nghiên cứu đánh giá, tư liệu hoá ở mức độ phân tử một cách sâu rộng, bài bản và có hệ thống. Trong công tác bảo tồn, việc đánh giá đa dạng hình thái vẫn

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả

² Viện Di truyền Nông nghiệp

con chưa đủ, chính vì vậy mà yêu cầu cấp bách đặt ra là cần phải điều tra, thu thập để từng bước tiến tới tư liệu hóa nguồn gen, nghiên cứu phân loại, bảo tồn và khai thác hợp lý nguồn gen tằm La Hán địa bàn địa Việt Nam. Với sự phát triển mạnh mẽ của các phương pháp và kĩ thuật sinh học phân tử hiện nay đã có nhiều ứng dụng để giúp nhận diện và đánh giá đa dạng di truyền các loài sinh vật sống như các chỉ thị phân tử RAPD, AFLP, ISSR, SSR, ITS (Neale và Williams, 1991; Krap và cs., 1998; Zhang và cs., 1999; Mohammadi và Prasanna, 2003; Parab và Krishnan, 2008; Sharma và cs., 2012; Zhang và cs., 2001; Wang và cs., 2011; Liu và cs., 2014; Jaranilla và cs., 2016). So với tất cả các chỉ thị phân tử trên, chỉ thị phân tử RAPD đơn giản, nhanh và rẻ hơn so với các chỉ thị khác trong việc đánh giá đa dạng di truyền. Tuy nhiên, chỉ thị RAPD có mặt hạn chế về khả năng lặp lại thí nghiệm không cao, không ổn định mặc dù vấn đề này có thể được khắc phục bằng việc sử dụng nhiều mẫu và với các tiêu chí khắt khe hơn trong việc phân tích kết quả (Carvalho và Vieira, 2001).

Trong nghiên cứu này, đã sử dụng thị phân tử RAPD đánh giá đa dạng di truyền của 12 mẫu tằm

La Hán được thu thập tại huyện đảo Cò Tô, Quảng Ninh. Các kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học cho công tác chọn tạo giống cũng như quản lý, phân loại, bảo tồn tại cây tằm La Hán tại huyện đảo Cò Tô, Quảng Ninh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Là tập đoàn bao gồm 12 mẫu tằm La Hán bản địa của Việt Nam được thu thập tại vùng Cò Tô, Quảng Ninh. Hiện nay, các mẫu tằm La Hán nghiên cứu đang được lưu giữ tại Vườn Quốc gia Bái Tử Long và xã Đông Tiến, huyện Cò Tô, vườn tập đoàn của Viện Nghiên cứu Rau quả.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu là tằm La Hán sau khi thu được ghi số và bảo quản trong tủ lạnh -20°C . ADN được chiết tách từ lá tằm La Hán theo quy trình của Doyle và Doyle (1990) cải tiến. Sau khi chiết tách ADN, tiến hành kiểm tra sản phẩm ADN tổng số bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Các mẫu PCR-RAPD dùng trong nghiên cứu do Hãng Bioneer cung cấp (Bảng 1).

Bảng 1. Tên và trình tự các mẫu PCR-RAPD được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Trình tự nucleotit (5' - 3')	STT	Tên mẫu	Trình tự nucleotit (5' - 3')
1	OPA2	TGCCGAGCTG	17	OPD20	ACCCGGTCAC
2	OPA5	AGGGGTCTTG	18	OPN1	CTCACGTTGG
3	OPA6	AAGTGCACGG	19	OPN2	ACCAGGGGCA
4	OPA7	GAAACGGGTG	20	OPN3	GGTACTCCCC
5	OPA10	GTGATCGCAG	21	OPN4	GACCGACCCA
6	OPA11	CAATCGCCGT	22	OPN6	GAGACGCACA
7	OPA12	TCGGCGATAG	23	OPN7	CAGCCACAGAG
8	OPA14	AAGTGCGACC	24	OPN9	TGCCGGCTTG
9	OPA18	AGGTGACCGT	25	OPN11	TCGCCGAAA
10	OPB5	TGCGCCCTTC	26	OPN12	CACAGACACC
11	OPB6	TGCTCTGCC	27	OPN13	AGCGTCACTC
12	OPC11	AAAGCTGCCG	28	OPN14	TCGTGCGGGT
13	OPC18	TGAGTGGGTG	29	OPN16	AAGCGACCTG
14	OPC19	GTTGCCAG	30	OPN18	CATGGGGGGG
15	OPD4	TCTGGTGAGG	31	OPN19	GTCCGTACTG
16	OPD18	GGGGTGACGA	32	OPN20	GGTGTCTCGT

Các mẫu ADN được phân tích kiểu gen bằng 32 đoạn mẫu ngẫu nhiên RAPD theo phương pháp của Williams và cs., 1990 như trong bảng 1. Phản ứng PCR được thực hiện trong các tube với tổng số 15 μl bao gồm: 1,5 μl dung dịch đệm có MgCl_2 (10X), 0,2

μl dNTPs (10 mM/ μl), 0,1 μl *Taq* ADN polymerase (5 u/ μl), 1,5 μl mẫu (10 pmol/ μl), 1 μl ADN khuôn (25-50 ng/ μl) và 10,7 μl H_2O . Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR khởi đầu bằng giai đoạn biến tính ADN ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, theo sau là 40 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: biến tính ADN ở 94°C

trong 30 giây, gắn mỗi ở 33°C trong 15 giây, tổng hợp ADN ở 72°C trong 1 phút và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 10 phút và lưu trữ ở 4°C. Sản phẩm PCR của các mẫu ADN điện di trên agarose gel 2% ở hiệu điện thế 60V trong 2 giờ với thang chuẩn 1 kb ladder của Fermentas. Các band ADN thu được sau khi điện di được mã hóa bằng hệ nhũ phân để phân nhóm di truyền sử dụng phần mềm NTSYS2.1 theo phương pháp UPGMA (Rohlf, 2000).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích đa hình các mẫu tằm La Hán bằng chỉ thị PCR-RAPD

Phản ứng PCR-RAPD của 32 mẫu ngẫu nhiên thuộc nhóm OPA, OPB, OPC, OPD, OPN và đã được

nhân lên thành công. Thực hiện 384 phản ứng PCR-RAPD nhân lên được tổng số 1692 băng thuộc 504 loại băng có kích thước khác nhau. Kết quả PCR-RAPD với 32 mẫu đều cho đa hình rõ rệt, không có mẫu nào đơn hình giữa các mẫu tằm La Hán nghiên cứu. Băng nhỏ nhất có kích thước khoảng 220 bp ở mẫu số 9 và số 10 của cây tằm La Hán với mẫu OPN9 và băng có kích thước lớn nhất khoảng trên gần 6000 bp ở các mẫu số 4, 5, 6, 7, 9, 11 và 12 ở mỗi OPN16. Trong số 32 mẫu ngẫu nhiên, mỗi OPA18 có tổng số băng nhân lên được nhiều nhất (98 băng), mỗi OPN7 có tổng số băng nhân lên được băng thấp nhất (27 băng). Thống kê kết quả phân tích tính đa hình bằng kĩ thuật PCR-RAPD của 12 mẫu tằm La Hán nghiên cứu với 32 mẫu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Tổng hợp kết quả phân tích số liệu với 32 mẫu RAPD

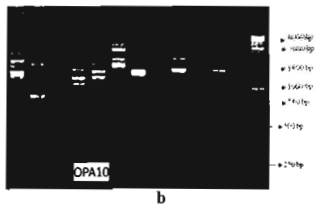
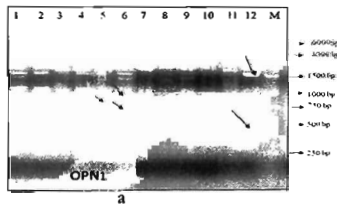
STT	Tên mẫu	Số băng thu được trên mỗi	Số băng ADN trung bình/mẫu	Số loại băng ADN khác nhau	Số băng ADN cá biệt/ hoặc băng khuyết
1	OPA2	95	7,91	21	2
2	OPA5	36	3,00	16	0
3	OPA6	30	2,50	13	3
4	OPA7	40	3,33	13	0
5	OPA10	59	4,91	14	4
6	OPA11	32	2,67	17	3
7	OPA12	54	4,50	12	1
8	OPA14	74	6,16	17	0
9	OPA18	98	8,10	18	1
10	OPB5	89	7,40	19	2
11	OPB6	41	3,41	17	1
12	OPC11	66	5,50	13	1
13	OPC18	55	4,58	16	0
14	OPC19	63	5,25	21	4
15	OPD4	29	2,41	11	2
16	OPD18	53	4,41	15	1
17	OPD20	63	5,25	18	0
18	OPN1	43	3,58	16	5
19	OPN2	54	4,50	13	3
20	OPN3	35	2,91	11	2
21	OPN4	45	3,75	17	3
22	OPN6	60	5,00	15	1
23	OPN7	27	2,25	14	3
24	OPN9	80	6,67	23	1
25	OPN11	55	3,67	19	1
26	OPN12	39	3,25	12	2

27	OPN13	51	4,25	18	3
28	OPN14	40	3,33	14	2
29	OPN16	52	4,33	14	1
30	OPN18	53	4,41	15	0
31	OPN19	32	2,67	17	2
32	OPN20	49	4,08	15	1
	Tổng	1692	139,9	504	55

Kết quả phân tích ở bảng 2 cho thấy trong tổng số 1692 băng thì mỗi OPA18 cho số băng nhiều nhất (98 băng), với 18 loại băng ADN khác nhau. Mỗi cho số loại băng nhiều nhất là mỗi OPN9 với 23 loại băng ADN khác nhau, mỗi có số loại băng ADN ít nhất là mỗi OPN3, với 11 loại băng khác nhau. Trung bình mỗi mẫu nhân được 52,87 băng, trung bình mỗi mẫu xuất hiện 4,82 băng. Các mẫu có số băng ADN trung bình 15-21 loại băng là mỗi OPA5, OPA11, OPA14, OPA18, OPB5, OPB6, OPC18, OPC19, OPD18, OPD20, OPN1, OPN4, OPN11, OPN13, OPN18, OPN19 và OPN20, còn lại là các mẫu có số loại băng dao động 11-14 loại băng khác nhau. Phân tích PCR-RAPD cho thấy tất cả 32 mẫu đều cho đa hình rõ rệt, không có mẫu nào cho kết quả băng đơn hình, kích thước các băng dao động từ khoảng 200 đến 6000 bp.

Trong tổng số 32 mẫu RAPD được sử dụng trong nghiên cứu có 55 loại băng cả biệt hoặc băng khuyết xuất hiện ở các mẫu khác nhau. Mỗi OPN1 cho 05 loại băng khác nhau. Còn lại là các mẫu OPA2, OPA6, OPA7, OPA10, OPA11, OPA12, OPA18, OPB5, OPB6, OPC11, OPC19, OPD4, OPD18, OPD20, OPN2, OPN3, OPN4, OPN6, OPN7, OPN9, OPN11, OPN12, OPN13, OPN14, OPN16, OPN19, OPN20 xuất hiện 1-4 băng cả biệt/hoặc băng khuyết. Với các mẫu còn lại cũng cho kết quả đa hình cao, số lượng các loại băng có kích thước khác nhau nhiều, kích thước băng dao động lớn và cho 1-3 loại băng cả biệt hoặc không có băng cả biệt nào. Dưới đây là kết quả phân tích một số mẫu điển hình:

- Kết quả phân tích với mỗi OPN1, OPA10



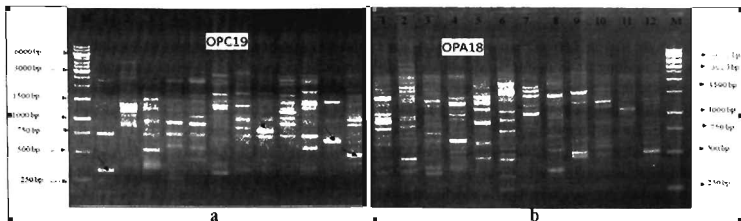
Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR-RAPD của 12 mẫu tằm La Hán

Giống 1-12: Các mẫu giống tằm La Hán bản địa ; M: 1kb ladder

Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD của 12 mẫu tằm La Hán với mỗi OPN1 thu được tổng số 43 băng thuộc 16 loại băng có kích thước khác nhau, trung bình 3,58 băng/mẫu, 100% số băng cho kết quả đa hình (Hình 1a). Với mỗi OPA10 thu được tổng số 59 băng thuộc 13 loại băng có kích thước khác nhau, trung bình 4,91 băng/mẫu. Các mẫu xuất hiện băng khá đậm, tách biệt rõ ràng (Hình 1b). Ở mỗi OPN1 xuất hiện 5 băng cả biệt xuất hiện duy nhất ở các

mẫu (1500 bp, 480 bp ở mẫu tằm La Hán số 12; 970 bp, 750 bp ở mẫu số 6 và 800 bp ở mẫu số 5). Đây là mỗi trong số 32 mẫu có số băng cả biệt nhiều nhất (Hình 1a). Với mỗi OPA10 xuất hiện 4 băng cả biệt với mẫu số 2 có 2 băng cả biệt ở băng có kích thước 900 bp và 300 bp; mẫu số 3 ở băng có kích thước 460 bp và mẫu số 8 xuất hiện băng cả biệt ở kích thước khoảng 550 bp (Hình 1b).

- Kết quả phân tích với mỗi OPN1, OPA10



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR-RAPD của 12 mẫu tùng La Hán

Giờng 1-12: Các mẫu giống tùng La Hán bản địa ; M: 1kb ladder

Qua kết quả điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu tùng La Hán với mỗi OPC19 thu được tổng số 63 băng gồm 18 loại băng có kích thước khác nhau, trung bình 5,25 băng/mẫu. Các mẫu xuất hiện băng khá đậm, tách biệt rõ nét (Hình 2a). Với mỗi OPC19 xuất hiện 4 băng cá biệt ở mẫu số 1 với kích thước 300 bp, ở mẫu số 8 với kích thước khoảng 750 bp, ở mẫu số 11 với kích thước khoảng 550 bp và mẫu số 12 ở kích thước khoảng 400 bp. Trong số tất cả 32 mỗi thì mỗi OPA18 cho tổng số băng nhiều nhất là 98 băng, với 18 loại băng khác nhau, trung bình 8,1 băng/mẫu. Tuy nhiên với mỗi OPA18 không xuất hiện băng cá biệt nào cả (Hình 2b).

Tóm lại, với kết quả phân tích trên đã nhận thấy có thể dựa vào chỉ thị RAPD để nhận dạng một số mẫu tùng La Hán bản địa của Việt Nam qua việc xác định được các băng cá biệt xuất hiện ở các mẫu RAPD với từng mẫu tùng La Hán. Kết quả này cũng khá phù hợp với kết quả nghiên cứu của Chattopadhyay và cộng sự., 2012; Trần Duy Dương và cộng sự., 2013, trong nghiên cứu nhận dạng các mẫu hoa lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*), cây Trà kỷ tử (*Lycium barbarum*), cây Đẳng sâm (*Codonopsis*) (Zhang và cs., 2001; Zhang và cs., 1999). Chỉ thị phân tử nói chung và chỉ thị RAPD nói riêng là công cụ được sử dụng phổ biến trong đánh giá đa dạng di truyền, nhận dạng các loài (Zhang và cs., 2001; Ajit và cs., 2002). Với đặc điểm phân ảnh trực tiếp bản chất di truyền, chỉ thị RAPD vượt trội so với chỉ thị hình thái về mức độ tin cậy trong nghiên cứu đa dạng di truyền, phân loại trên cây thực vật (Zha và cs., 2009; Chattopadhyay và cs., 2012; Wang và cs., 2011). Tuy nhiên, với những đối tượng nghiên cứu có đặc điểm hình thái như cây tùng La Hán thì chỉ thị RAPD rõ ràng không thể phát huy ưu điểm phân loại loài/dưới loài. Do đó chỉ có thể đánh giá một phần

nhỏ chứ không thể đánh giá bao quát toàn bộ sự đa dạng trong bộ gen của cây tùng La Hán. Để đảm bảo tính chính xác trong việc xác định giữa các loài, dưới loài cần phải làm DNA barcoding như kết hợp giải trình tự ADN lục lạp như vùng *ITS*, hoặc giải trình tự gen *matK*, gen *rbcL* (Richardson và cs., 2001; Sharma và cs., 2012; Liu và cs., 2014; Hofbauer và cs., 2016; Pironratva và cs., 2018).

3.2. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu tùng La Hán

Xét ở mức độ tương đồng di truyền 62%, 12 mẫu tùng La Hán chia thành 2 nhóm chính. Nhóm I gồm các mẫu số 1, 2, 3, 4, 5 và có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 62-99,9% và chia ra thành hai nhóm phụ khác nhau (Hình 3).

Nhóm phụ thứ I.1 bao gồm mẫu số 1 và số 2 có hệ số tương đồng là 79%; nhóm phụ thứ I.2 gồm ba mẫu là mẫu số 3, 4, 5 có hệ số tương đồng di truyền 81-99,9% trong đó hai mẫu 3 và mẫu 4 có hệ số tương đồng là 99,9%. Giải thích cho hiện tượng này có thể hai mẫu 3 và 4 có quan hệ rất gần gũi với nhau, chúng có thể là các con lai cùng bố mẹ.

Nhóm II bao gồm 6 mẫu là các mẫu số 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 và có hệ số tương đồng di truyền dao động 62-94% và chúng chia ra làm 4 nhóm phụ khác nhau:

Nhóm phụ thứ II.1 bao gồm hai mẫu là các mẫu số 6 và số 7 với hệ số tương đồng di truyền là 88%. Nhóm phụ thứ II.2 bao gồm hai mẫu số 11, 12 với hệ số tương đồng di truyền là 79%. Nhóm còn lại là nhóm thứ II.3 gồm hai mẫu là mẫu số 9, 10 với hệ số tương đồng là 94%. Riêng nhóm phụ cuối cùng II.4 duy nhất một mẫu số 8 với khoảng cách di truyền khá xa với các nhóm còn lại 62-70%.

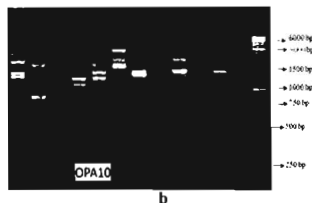
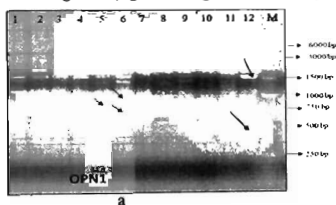
Như vậy, kết quả phân tích đa dạng di truyền của 12 mẫu tùng La Hán bản địa bằng chỉ thị phân tử

27	OPN13	51	4,25	18	3
28	OPN14	40	3,33	14	2
29	OPN16	52	4,33	14	1
30	OPN18	53	4,41	15	0
31	OPN19	32	2,67	17	2
32	OPN20	49	4,08	15	1
	Tổng	1692	139,9	504	55

Kết quả phân tích ở bảng 2 cho thấy trong tổng số 1692 băng thì mỗi OPA18 cho số băng nhiều nhất (98 băng), với 18 loại băng ADN khác nhau. Mỗi cho số loại băng nhiều nhất là mỗi OPN9 với 23 loại băng ADN khác nhau, mỗi có số loại băng ADN ít nhất là mỗi OPN3, với 11 loại băng khác nhau. Trung bình mỗi mẫu nhân được 52,87 băng, trung bình mỗi mẫu xuất hiện 4,82 băng. Các mẫu có số băng ADN trung bình 15-21 loại băng là mỗi OPA5, OPA11, OPA14, OPA18, OPB5, OPB6, OPC18, OPC19, OPD18, OPD20, OPN1, OPN4, OPN11, OPN13, OPN18, OPN19 và OPN20, còn lại là các mẫu có số loại băng dao động 11-14 loại băng khác nhau. Phân tích PCR-RAPD cho thấy tất cả 32 mẫu đều cho đa hình rõ rệt, không có mẫu nào cho kết quả băng đơn hình, kích thước các băng dao động từ khoảng 200 đến 6000 bp.

Trong tổng số 32 mẫu RAPD được sử dụng trong nghiên cứu có 55 loại băng cá biệt hoặc băng khuyết xuất hiện ở các mẫu khác nhau. Mỗi OPN1 cho 05 loại băng khác nhau. Còn lại là các mẫu OPA2, OPA6, OPA7, OPA10, OPA11, OPA12, OPA18, OPB5, OPB6, OPC11, OPC19, OPD4, OPD18, OPD20, OPN2, OPN3, OPN4, OPN6, OPN7, OPN9, OPN11, OPN12, OPN13, OPN14, OPN16, OPN19, OPN20 xuất hiện 1-4 băng cá biệt/hoặc băng khuyết. Với các mẫu còn lại cũng cho kết quả đa hình cao, số lượng các loại băng có kích thước khác nhau nhiều, kích thước băng dao động lớn và cho 1-3 loại băng cá biệt hoặc không có băng cá biệt nào. Dưới đây là kết quả phân tích một số mẫu điển hình:

- Kết quả phân tích với mỗi OPN1, OPA10



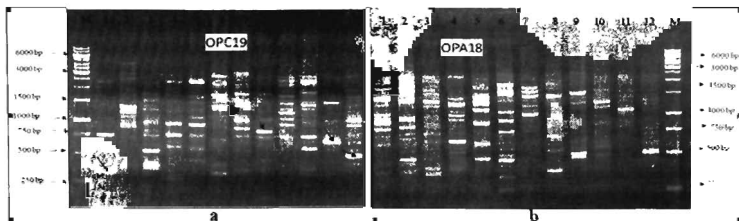
Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR-RAPD của 12 mẫu tằm La Hán

Giống 1-12: Các mẫu giống tằm La Hán bản địa; M: Lkb ladder

Kết quả điện di sản phẩm PCR-RAPD của 12 mẫu tằm La Hán với mỗi OPN1 thu được tổng số 43 băng thuộc 16 loại băng có kích thước khác nhau, trung bình 3,58 băng/mẫu, 100% số băng cho kết quả đa hình (Hình 1a). Với mỗi OPA10 thu được tổng số 59 băng thuộc 13 loại băng có kích thước khác nhau, trung bình 4,91 băng/mẫu. Các mẫu xuất hiện băng khá đậm, tách biệt rõ ràng (Hình 1b). Ở mỗi OPN1 xuất hiện 5 băng cá biệt xuất hiện duy nhất ở các

mẫu (1500 bp, 480 bp ở mẫu tằm La Hán số 12; 970 bp, 750 bp ở mẫu số 6 và 800 bp ở mẫu số 5). Đây là mỗi trong số 32 mẫu có số băng cá biệt nhiều nhất (Hình 1a). Với mỗi OPA10 xuất hiện 4 băng cá biệt với mẫu số 2 có 2 băng cá biệt ở băng có kích thước 900 bp và 300 bp; mẫu số 3 ở băng có kích thước 460 bp và mẫu số 8 xuất hiện băng cá biệt ở kích thước khoảng 550 bp (Hình 1b).

- Kết quả phân tích với mỗi OPN1, OPA10



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR-RAPD của 12 mẫu tùng La Hán

Gióng 1-12: Các mẫu giống tùng La Hán bản địa ; M: 1kb ladder

Qua kết quả điện di sản phẩm PCR của 12 mẫu tùng La Hán với mỗi OPC19 thu được tổng số 63 băng gồm 18 loại băng có kích thước khác nhau, trung bình 5,25 băng/mẫu. Các mẫu xuất hiện băng khá đậm, tách biệt rõ nét (Hình 2a). Với mỗi OPC19 xuất hiện 4 băng cá biệt ở mẫu số 1 với kích thước 300 bp, ở mẫu số 8 với kích thước khoảng 750 bp, ở mẫu số 11 với kích thước khoảng 550 bp và mẫu số 12 ở kích thước khoảng 400 bp. Trong số tất cả 32 mỗi thí nghiệm mỗi OPA18 cho tổng số băng nhiều nhất là 98 băng, với 18 loại băng khác nhau, trung bình 8,1 băng/mẫu. Tuy nhiên với mỗi OPA18 không xuất hiện băng cá biệt nào cả (Hình 2b).

Tóm lại, với kết quả phân tích trên đã nhận thấy có thể dựa vào chỉ thị RAPD để nhận dạng một số mẫu tùng La Hán bản địa của Việt Nam qua việc xác định được các băng cá biệt xuất hiện ở các mẫu RAPD với từng mẫu tùng La Hán. Kết quả này cũng khá phù hợp với kết quả nghiên cứu của Chattopadhyay và cộng sự., 2012; Trần Duy Dương và cộng sự., 2013, trong nghiên cứu nhận dạng các mẫu hoa lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*), cây Trà kỷ tử (*Lycium barbarum*), cây Đẳng sâm (*Codonopsis*) (Zhang và cs., 2001; Zhang và cs., 1999). Chỉ thị phân tử nói chung và chỉ thị RAPD nói riêng là công cụ được sử dụng phổ biến trong đánh giá đa dạng di truyền, nhận dạng các loài (Zhang và cs., 2001; Ajit và cs., 2002). Với đặc điểm phản ánh trực tiếp bản chất di truyền, chỉ thị RAPD vượt trội so với chỉ thị hình thái về mức độ tin cậy trong nghiên cứu đa dạng di truyền, phân loại trên cây thực vật (Zha và cs., 2009; Chattopadhyay và cs., 2012; Wang và cs., 2011). Tuy nhiên, với những đối tượng nghiên cứu có đặc điểm hình thái như cây tùng La Hán thì chỉ thị RAPD rõ ràng không thể phát huy ưu điểm phân loại loài/dưới loài. Do đó chỉ có thể đánh giá một phần

nhỏ chứ không thể đánh giá bao quát toàn bộ sự đa dạng trong bộ gen của cây tùng La Hán. Để đảm bảo tính chính xác trong việc xác định giữa các loài, dưới loài cần phải làm DNA barcoding như kết hợp giải trình tự ADN lục lạp như vùng *ITS*, hoặc giải trình tự gen *matK*, gen *rbcL* (Richardson và cs., 2001; Sharma và cs. 2012; Liu và cs., 2014; Hofbauer và cs., 2016; Piroonratva và cs., 2018).

3.2. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu tùng La Hán

Xét ở mức độ tương đồng di truyền 62%, 12 mẫu tùng La Hán chia thành 2 nhóm chính. Nhóm I gồm các mẫu số 1, 2, 3, 4, 5 và có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 62-99,9% và chia ra thành hai nhóm phụ khác nhau (Hình 3).

Nhóm phụ thứ I.1 bao gồm mẫu số 1 và số 2 có hệ số tương đồng là 79%; nhóm phụ thứ I.2 gồm ba mẫu là mẫu số 3, 4, 5 có hệ số tương đồng di truyền 81-99,9% trong đó hai mẫu 3 và mẫu 4 có hệ số tương đồng là 99,9%. Giải thích cho hiện tượng này có thể hai mẫu 3 và 4 có quan hệ rất gần gũi với nhau, chúng có thể là các con lai cùng bố mẹ.

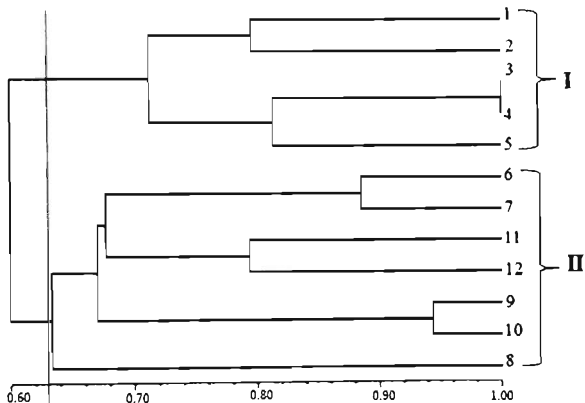
Nhóm II bao gồm 6 mẫu là các mẫu số 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 và có hệ số tương đồng di truyền dao động 62-94% và chúng chia ra làm 4 nhóm phụ khác nhau:

Nhóm phụ thứ II.1 bao gồm hai mẫu là các mẫu số 6 và số 7 với hệ số tương đồng di truyền là 88%. Nhóm phụ thứ II.2 bao gồm hai mẫu số 11, 12 với hệ số tương đồng di truyền là 79%. Nhóm còn lại là nhóm thứ II.3 gồm hai mẫu là mẫu số 9, 10 với hệ số tương đồng là 94%. Riêng nhóm phụ cuối cùng II.4 duy nhất một mẫu số 8 với khoảng cách di truyền khá xa với các nhóm còn lại 62-70%.

Như vậy, kết quả phân tích đa dạng di truyền của 12 mẫu tùng La Hán bản địa bằng chỉ thị phân tử

PCR-RAPD với 32 mỗi ngẫu nhiên cho thấy hệ số tương đồng di truyền của các mẫu tằm La Hán nghiên cứu dao động từ 45 đến 99%. Mỗi quan hệ di truyền giữa các mẫu tằm La Hán được thể hiện trên hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ về cây phát sinh loài (Hình 3). Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu tằm La Hán cao hơn rất nhiều so với đối tượng Địa lan đã được Kiều Thị Dung công bố năm 2009. Khi đánh giá đa dạng di truyền tập đoàn Địa lan bản địa của Việt Nam bằng chỉ RAPD, tác giả đã chỉ ra hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu Địa lan bản địa

dao động từ 0,45 đến 0,88% (Dung và cs., 2009). Kết quả này cũng có sự khác biệt so với nghiên cứu khác như Zha và cộng sự., 2009 khi sử dụng chỉ thị RAPD để đánh giá đa dạng di truyền và nhận dạng trên 9 mẫu cây thông của Trung Quốc. Tác giả đã chỉ ra hệ số tương đồng của các mẫu cây Thông dao động từ 0,5614 đến 0,704 % (Lee và cs., 2009). Qua so sánh hệ số tương đồng di truyền của các mẫu tằm La Hán tại Cổ Tô, Quảng Ninh, chúng tôi nhận thấy về mặt di truyền của 12 mẫu tằm La Hán có quan hệ gần gũi với nhau.



Hình 3. Sơ đồ hình cây phát hệ về mối quan hệ di truyền của 12 mẫu tằm La Hán dựa trên chỉ thị phân tử PCR-RAPD

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Phản ứng PCR-RAPD của 32 mỗi ngẫu nhiên thuộc nhóm OPA, OPB, OPC, OPD và OPN sử dụng nghiên cứu đa dạng di truyền trên 12 mẫu tằm La Hán đều cho đa hình. Thực hiện 384 phản ứng PCR-RAPD nhận lên được tổng số 1692 băng thuộc 504 loại băng có kích thước khác nhau. Trung bình mỗi nhân được 52,87 băng, trung bình mỗi mẫu xuất hiện 4,82 băng.

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 12 mẫu tằm La Hán bằng chỉ thị phân tử PCR-RAPD qua sơ đồ hình cây cho thấy 12 mẫu tằm La Hán có mức độ tương đồng di truyền dao động 62-99,9% trong đó hai

mẫu tằm La Hán số 3 và số 4 có mức độ tương đồng cao nhất là 99,9%. Ở mức độ tương đồng 62%, 12 mẫu tằm La Hán chia ra làm hai nhóm chính bao gồm:

+ Nhóm thứ I gồm các mẫu 1, 2, 3, 4, 5 và có hệ số tương đồng di truyền dao động 62-99,9%;

+ Nhóm II: gồm các mẫu số 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 và có hệ số tương đồng di truyền dao động 62-94%.

4.2. Kiến nghị

Cần tiếp tục điều tra, thu thập thêm các mẫu tằm La Hán. Bên cạnh đó để xác định rõ hơn mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu, cần kết hợp với kết quả phân tích đa dạng di truyền ở mức hình thái với chỉ phân tử hoặc lựa chọn thêm

các chi thị khác (gen 16 rRNA, gen ITS, *matK*, vùng *rbcL*, vùng *trnH-psbA*.) để nhận dạng những loài có quan hệ gần nhau trong chi tùng La Hán (*Podocarpus macrophyllus*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Thị Dung, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Thúy Diệp, Vũ Lan Phương, Nguyễn Xuân Việt, Đặng Trọng Lương, Trần Duy Quý (2009). Nghiên cứu đa dạng di truyền ở mức phân tử ADN bằng kỹ thuật RAPD-PCR của một số mẫu giống hoa Đà lan thơm Đà Lạt. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, số 1/2009, tr. 15-21.

2. Trần Duy Dương, Khuất Hữu Trung, Trần Duy Vương, Lê Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Thanh Thủy, 2013. Đánh giá đa dạng di truyền của tập đoàn hoa lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*) bản địa bằng chỉ thị phân tử PCR-RAPD. *Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, trang 756-760.

3. Abdillahi H. S, Verschaeve L, Finnie J. F, Van Staden J (2012). Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African *Podocarpus* species. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 728–738.

4. Abdillahi H. S, Stafford G. I, Finnie J. F, Van Staden J (2010). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Podocarpus* sensu latissimo (s.l.). *South African Journal of Botany* 76: 1–24.

5. Abdillahi H. S, Finnie J. F, Van Staden V (2008). Antibacterial activity of *Podocarpus* species. *South African Journal of Botany* 74: 359–360.

6. Bauch J, Schmidt O, Hillis W. E, Yazaki Y (1977). Deposits in heartshakes of *Dacrydium* species and their toxicity against fungi and bacteria. *Holzforchung* 31: 1–7.

7. Chattopadhyay, P., Nirmalya, B., and Bhupendra, C (2012). Genetic Characterization of Selected Medicinal *Dendrobium* (Orchidaceae) species Using Molecular marker. *Research Journal of Biology*, 2 (4), pp. 117-125.

8. Carvalho, A. O. R. and Vieira, L. G. E. (2001). Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop. Entomol.*, 30, 593-600.

9. Doyle J. J., Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 - 15.

10. Farjon A (2001). World checklist and bibliography of conifers. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 2 editions.

11. Hofbauer W. K., Forrest L. L., Hollingsworth P. M., Hart M. L., 2016. Preliminary insights from DNA barcoding into the diversity of mosses colonising modern building surfaces. *Bryophyte DiversityEvol.* 2016; 38:1-22. <https://doi.org/10.11646/bde.38.1>.

12. Jaranilla Loren Grace, Esperanza Maribel Ago, 2016. Molecular Identification of *Podocarpus* spp. from Bukidnon and Batanes, Philippines using *rbcL* sequences. DOI: 10.15242/IJACEBS.AE0516115).

13. Karp A., Isaac P. G., Ingram G. S., 1998. *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman & Hall, Thompson Sci., London.

14. Lee S. W, Ledig F. T, Johnson D. R., 2002. Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. *Am J Bot* Apr; 89(4):566-77. doi: 10.3732/ajb.89.4.566.

15. Liu Y. T., Chen R. K., Lun S. J., L, Chen Y. C., Chin S. W., Chen F. C., and Lee C. Y (2014). Analysis of sequence diversity through internal transcribed spacers and simple sequence repeats to identify *Dendrobium* species. *Genetics and Molecular Research* 13 (2): 2709-2717.

16. Mohammadi S. A., Prasanna B. M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. *Crop Sci* 43:1235–1248.

17. Neale D. B., Williams C. G., 1991. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. *Can J. Fors. Res* 21:545–554.

18. Parab G. V and S Krishman (2008). Assessment of genetic variation among populations of *Rhynchostylis retusa*, an epiphytic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, (7), pp. 313-319.

19. Piroonrat Dechbumroong, Surattana Aumnouypol, Jessada Denduangborpan, Suchada Sukrong, 2018. DNA barcoding of *Aristolochia* plants and development of species-specific multiplex PCR to aid HPTLC in ascertainment of *Aristolochia*

herbal materials. PLOS ONE
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202625>.

20. Richardson J. E., Weitz F. M., Fay M. F., Cronk Q. C. B., Linder H. P., Reeves G., and Chase M. W. (2001). Phylogenetic analysis of *Phyllis L.* with an emphasis on island species: evidence from plastid *trnL-F DNA* and nuclear internal transcribed spacer (ribosomal DNA) sequences. *Taxon* (50), pp. 405-427.

21. Rohlf E. J., 2000. NTSYSpc- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1). Exeter Software, Setauket, New York.

22. Sharma S. K., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., and Rao S. R. (2012). Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA. *Gen*, 495(1), pp.10-15

23. Symonds E. L., Konczak I., Fenech M. (2012). The Australian fruit illawarra plum (*Podocarpus elatus* Endl., Podocarpaceae) inhibits telomerase, increases histone deacetylase activity and decreases

proliferation of colon cancer cells. *British Journal of Nutrition* 15: 1-9.

24. Wang F., Wang L. J., Zhou. Y., and Sun. H. (2011). Genetic Diversity of the Selected 64 Potato Germplasm Revealed by AFLP Markers. *Mol Plant Breeding*, 2 (4), pp. 22-29.

25. Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey. S. V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic ADN markers. *Meth Enzymol* 218: 705-740.

26. Zhang, K. Y. B., Leung H. W., Yeung H. W, and Wong R. N. S. (2001). Differentiation of Lycium Species using Random Amplified Polymorphic DNA. *Planta Med.* (67), pp. 379-381.

27. Zhang, K. Y. B., Ngan F. N., Wang Z. T., But P. P. H., Shaw P. C., and Wang J. (1999). Random primed polymerase chain reaction differentiates *Codonopsis pilosula* from different localities. *Planta Med.* (65), pp. 157-160.

GENETIC DIVERSITY AND IDENTIFICATION OF *Podocarpus macrophyllus* IN CO TO ISLAND, QUANG NINH PROVINCE BY USING RAPD MOLECULAR MARKER

Tran Van Tam, Dang Van Dong, Dang Van Lam,

Tran Duy Duong, Tran Dang Khanh

Summary

The use of molecular markers to evaluate the genetic diversity between samples of Tung La Han (*Podocarpus macrophyllus*) in CoTo Island, Quang Ninh province will contribute to the collection and distribution the plant. Genotyping, evaluation and conservation of genetic resources as well as providing information on genetic relationships between Tung La Han varieties as a basis for breeding programs. PCR-RAPD reactions of 32 random primers belonging to OPA, OPB, OPC, OPD, and OPN groups used to study genetic diversity in 12 samples and each primer have polymorphism. With 384 PCR-RAPD reactions, it has multiplied a total of 1692 bands of 504 different sized. The average of each primer was 52.87 bands and each sample was 4.82 bands. Base on the phylogenetic trees, 12 samples of Tung La Han were divided in two main groups and have genetic similarity coefficient ranging from 62 - 99.9% and the number 3 and number 4 samples have the highest homology which have 99.9% of coefficient.

Keywords: *Podocarpus macrophyllus*, genetic marker, primer.

Người phản biện: PGS.TS. Hà Văn Hoàn

Ngày nhận bài: 28/11/2018

Ngày thông qua phản biện: 28/12/2018

Ngày duyệt đăng: 7/01/2019