

ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ TÁCH CHIẾT ĐẾN CHẤT LƯỢNG ADN TỔNG SỐ CỦA LOÀI BÁCH VÀNG (*Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & N.T.Hiep) PHỤC VỤ CÔNG TÁC NGHIÊN CỨU BẢO TỒN VÀ PHÁT TRIỂN NGUỒN GEN

Hà Thị Huyền Ngọc¹, Nguyễn Thị Huyền¹, Trần Thị Thu Hà¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹,
Lê Thị Thủy¹, Bùi Trọng Thủy², Nguyễn Công Phương², Lê Sơn¹

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp

² Trung tâm Khoa học Lâm nghiệp Đông Bắc Bộ

TÓM TẮT

Loài Bách vàng (*Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & N.T.Hiep) thuộc chi Bách vàng (*Xanthocyparis*), họ Hoàng đàn (Cupressaceae). Đây là loài cây gỗ quý, có giá trị kinh tế cao nhưng khả năng tái sinh kém với mật độ tái sinh chỉ khoảng 0,65 cây tái sinh/gốc cây mẹ nên chúng đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng do tình trạng khai thác quá mức. Với mục tiêu xác định được phương pháp tối ưu cho quá trình tách chiết ADN của Bách vàng để hạn chế lượng mẫu và giảm tác động đến quần thể loài trước khi tiến hành nghiên cứu di truyền, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp phù hợp nhất để tách chiết ADN cho loài này. Trong nghiên cứu này, sử dụng 6 mẫu Bách vàng bao gồm cành và lá thu được tại 3 quần thể khác nhau của ba tỉnh Hà Giang, Tuyên Quang và Cao Bằng (2 mẫu/quần thể) để tiến hành 2 quy trình tách chiết ADN với 4 công thức thí nghiệm khác nhau nhằm tìm ra phương pháp tối ưu nhất. Kết quả cho thấy sử dụng quy trình tách chiết ADN bằng CTAB 4% (20mM EDTA pH8, 1,5M NaCl, 100mM Tris HCl pH8, 4% CTAB, 2% PVP và 0,2% β-mercaptoethanol) để tách ADN tổng số từ mẫu cành (cả tươi và khô) của cây Bách vàng là hiệu quả nhất. Trong đó, nồng độ và chất lượng của ADN thu được từ mẫu cành khô tốt hơn hẳn so với các vật liệu còn lại.

Từ khóa: Tách chiết ADN, Bách vàng, điện di

The effects of sampling method and extraction method on DNA quality of *Xanthocyparis vietnamensis* for genetic source conservation of precious and rare forest vegetation

Keywords: DNA extraction, *Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & N.T.Hiep, electrophoresis, population

Xanthocyparis vietnamensis Farjon & N.T.Hiep, an endemic plant in Vietnam, has important ecological and commercial values. However their regeneration density were about 0.65 seedling/mother tree, this species has been threatened by rapid habitat destruction and overexploitation of the forest for timber. It has been classified as a category "Critically Endangered (CR) species". Prior to conducting genetic studies on this critically endangered species, it is desirable to optimise DNA extraction to limit destructive sampling and reduce impacts on populations. In this study, a total of 6 individuals of *Callitropsis vietnamensis* were sampled from 3

populations: Ha Giang province, Tuyen Quang province and Cao Bang province (2 samples/population, including branch and leaf). Two DNA extraction processes with four different formulas were conducted to find out the most suitable methods. Results showed that Total genomic DNA that was extracted using CTAB 4% (20 ml EDTA pH8, 1.5M NaCl, 100mM Tris HCl pH8, 4% CTAB, 2% PVP and 0,2% β -mercaptoethanol) is most effective method for branch samples of *Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & N.T.Hiep.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bách vàng hay Hoàng đàn vàng (*Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & N.T.Hiep) thuộc chi Bách vàng (*Xanthocyparis*), họ Hoàng đàn (Cupressaceae). Bách vàng được tìm thấy lần đầu tiên tại huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang nên còn được gọi là Trắc bách Quản Bạ. Là loài cây bản địa đặc hữu, có giá trị kinh tế rất cao và là một trong những loài gỗ lớn quý hiếm. Gỗ Bách vàng rất bền, khó bị mối mọt, ít cong vênh, có vân đẹp, màu sắc bắt mắt, cứng chắc và độ bền lớn, nên thường được sử dụng trong các công trình xây dựng như đền, chùa, nhà cửa, miếu mạo, làm quan tài quý, đồ mỹ nghệ cao cấp... Ngoài ra gỗ Bách vàng có mùi thơm rất đặc trưng có thể tận dụng làm hương liệu rất tốt (Farjon A. *et al.*, 2002).

Trong những năm gần đây, tình trạng khai thác trái phép loài cây này diễn ra rất nghiêm trọng ở khắp các vùng phân bố của Bách vàng nên rất khó tìm thấy những quần thể Bách vàng rộng lớn trong tự nhiên. Trên thực tế, Bách vàng có ra nón và kết hạt nhưng sinh trưởng chậm và khả năng tái sinh kém. Tuy có thể nhân giống bằng phương pháp sinh dưỡng từ hom nhưng tỷ lệ ra rễ không cao, chỉ đạt từ 20 - 30%. (Trần Huy Thái *et al.*, 2007). Kết quả điều tra tại tỉnh Cao Bằng phát hiện 29 cây Bách vàng trưởng thành có chiều cao từ 5 - 12m tập trung chủ yếu trên đỉnh núi và 33 cây Bách vàng tái sinh chủ yếu từ hạt có chất lượng tái sinh kém và trung bình với chiều cao dưới 0,5m. Ngoài ra, loài này còn có khả năng tái sinh từ cành rơi rụng (một cây

tái sinh từ cành rơi rụng). Mật độ cây tái sinh rất thấp, trung bình 0,65 cây tái sinh/gốc cây mẹ (mật độ tái sinh theo gốc cây mẹ) (Trần Quang Diệu *et al.*, 2013). Trên thực tế, Bách vàng đã được khoanh vùng và quy hoạch để bảo vệ tốt hơn nhưng vẫn có nguy cơ bị tuyệt chủng. Theo Sách Đỏ do tổ chức IUCN công bố, Bách vàng được xếp vào cấp CR (cực kỳ nguy cấp) và đang đứng trước nguy cơ bị đe dọa, cần được bảo tồn và phát triển nguồn gen (Iucnredlist, 2013).

Hiện nay, việc nghiên cứu về đa dạng di truyền nguồn gen cây Bách vàng là cần thiết và rất quan trọng cho việc bảo tồn, phát triển và khai thác nguồn gen loài cây này. Để có thông tin về tính đa dạng di truyền của loài Bách vàng, thì bước đầu rất quan trọng là tách chiết và tinh sạch được ADN tổng số từ tế bào thực vật một cách hiệu quả nhất. Ngày nay, có nhiều phương pháp và nhiều bộ kit dùng để tách chiết ADN tổng số từ thực vật được sử dụng nhưng chưa tối ưu hóa được quy trình tách chiết ADN tổng số loài cây Bách vàng này. Mặt khác, số lượng cây còn lại không nhiều, chủ yếu phân bố ở những nơi có địa hình hiểm trở không thuận tiện cho việc thu mẫu và việc bảo quản mẫu còn gặp nhiều khó khăn.

Vì vậy, việc tối ưu hóa quy trình tách chiết ADN cho Bách vàng là việc làm cần thiết trong công tác nghiên cứu khai thác, phát triển và bảo tồn nguồn gen loài cây này. Mục tiêu nghiên cứu là đánh giá hiệu quả quá trình tách chiết ADN tổng số khi sử dụng các

quy trình khác nhau. Đồng thời, bước đầu xây dựng cơ sở để tiến hành nghiên cứu sâu hơn về đa dạng sinh học cũng như cấu trúc quần thể loài Bách vàng. Từ đó, đề xuất những giải pháp hợp lý phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen quý hiếm đang có nguy cơ tuyệt chủng ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 6 mẫu cây Bách vàng (*Xanthocyparis vietnamensis* Farjon & N.T.Hiep) được thu ngẫu nhiên tại 3 quần thể khác nhau của ba tỉnh Hà Giang, Tuyên Quang và Cao Bằng (2 mẫu/quần thể). Các mẫu được thu là mẫu bánh tẻ bao gồm lá và cành nhánh nhỏ, bảo quản mẫu tươi bằng đá lạnh và bảo quản mẫu khô bằng silicagel, sau đó vận chuyển mẫu về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết ADN.

Các mẫu nghiên cứu bao gồm:

Bảng 1. Danh sách các mẫu nghiên cứu

Quần thể	Lá		Cành	
	Khô	Tươi	Khô	Tươi
Cao Bằng				
Hà Giang				
Tuyên Quang				

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu nghiên cứu được nghiền lạnh bằng nitơ lỏng (-196°C) với chày và cối sứ, thu được mẫu dạng bột mịn. Sử dụng quy trình tách chiết ADN tổng số dựa theo phương pháp CTAB của Doyle JJ. và Doyle JL. (1987) có cải tiến một số bước về điều kiện ngâm ủ mẫu và kết tủa mẫu. Bốn công thức thí nghiệm có một số thành phần đệm chiết khác nhau được đưa ra để chọn lọc công thức tối ưu nhất đối với mẫu thí nghiệm (bảng 2).

Bảng 2. Các công thức thí nghiệm thành phần đệm chiết

CT	CTAB	EDTA pH8	NaCl	Tris HCl pH8	β -mecaptoethanol	PVP
CT1	2%	20mM	1,5M	100mM	0,2%	1%
CT2	2%	20mM	1,5M	100mM	0,2%	2%
CT3	4%	20mM	1,5M	100mM	0,2%	1%
CT4	4%	20mM	1,5M	100mM	0,2%	2%

Các bước tách chiết ADN được tiến hành lần lượt như sau: Nghiền 100mg mẫu cành/lá bằng chày cối sứ với nitơ lỏng thành dạng bột mịn và chuyển nhanh sang ống eppendorf 2ml. Bổ sung 800 μ l đệm chiết theo từng công thức, đảo đều bằng máy trộn Vortex cho tới khi mẫu thành hỗn hợp đồng nhất. Ủ hỗn hợp mẫu ở 65°C trong 90 phút, đảo đều mẫu sau mỗi 10 phút. Ly tâm với tốc độ 20.000 vòng/phút trong 15 phút, hút dịch nổi cho sang ống eppendorf 2ml mới và loại bỏ cặn bã đi. Tiếp tục bổ sung 40 μ l Rnase (10mg/ml) rồi ủ ở 37°C trong 30 phút và để nguội 5 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung tiếp 800 μ l dung dịch Chloroform: Isoamylalcohol

(tỷ lệ thể tích 24:1) lắc đều và ly tâm 20.000 vòng/phút trong 15 phút, dùng pipet hút phần dịch nổi và chuyển sang ống eppendorf 2ml mới. Tiếp tục bổ sung thêm 800 μ l dung dịch Chloroform : Isoamylalcohol (tỷ lệ thể tích 24:1), đảo đều mẫu và cho vào ly tâm tốc độ 20.000 vòng/phút trong 10 phút, hút dịch nổi rồi đưa vào ống eppendorf 1,5ml mới. Sau đó bổ sung Isopropanol lạnh vào mẫu để với tỷ lệ thể tích 1:1 ($V_{\text{isopropanol}} : V_{\text{mẫu}}$), đảo đều và ủ lạnh -20°C trong ít nhất 60 phút (có thể để ủ qua đêm). Ly tâm 20.000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch và thu tủa. Rửa tủa bằng cách bổ sung 600 μ l Ethanol 70° lạnh vào đảo đều và ly tâm 20.000 vòng/phút trong 10 phút,

thu tủa. Lặp lại bước trên 2 lần để làm sạch tủa, làm khô tủa ADN và hòa tan bằng 100µl đệm TE 1X, bảo quản ADN ở tủ -20°C.

ADN tổng số sau khi tách chiết được tiến hành kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và đo nồng độ của mẫu ADN trên máy quang phổ hấp phụ Nano drop ở bước sóng 260/280nm. Nếu kết quả điện di cho thấy mẫu ADN tập trung trên một băng chính, hình ảnh rõ nét, không bị đứt gãy và nồng độ ADN $\geq 20\text{ng}/\mu\text{l}$, $\text{OD}_{260/280} = 1,8 - 2,0$ thì ADN tổng số thu được đạt yêu cầu để sử dụng cho các thí nghiệm sinh học phân tử tiếp theo.

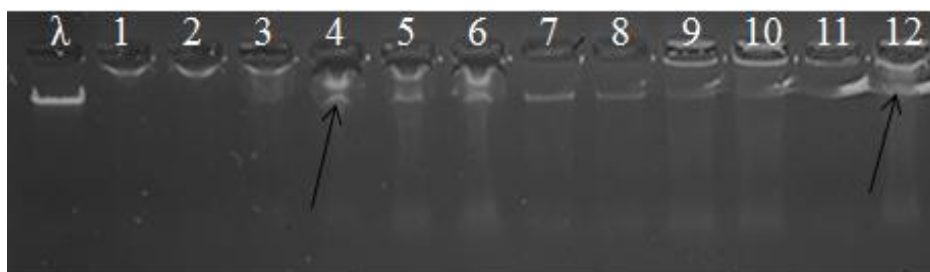
Để so sánh nồng độ và chất lượng AND tách chiết được từ các loại vật liệu khác nhau phương pháp phân tích thống kê theo tiêu chuẩn Chi bình phương (chi-square) đã được sử dụng với ($\alpha = 0,05$). Ở đó, nếu $P_{\text{tính}} > 0,05$ thì sự sai khác giữa các biến không có ý nghĩa về mặt thống kê (chấp nhận giả thuyết H_0 : không có sự khác nhau giữa các loại vật liệu và phương pháp tách chiết).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN của các mẫu Bách vàng tươi

Sau khi tách chiết ADN theo bốn công thức trên, tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%, kết quả thu được mô tả và nhận xét chi tiết đối với từng công thức thí nghiệm với mẫu tươi ở cả 3 quần thể nghiên cứu.

Ở công thức CT1, băng ADN tổng số của các mẫu cành tươi thu được sáng hơn so với các mẫu lá tươi. Mẫu cành tươi ở Cao Bằng có băng ADN tổng số lên tương đối sắc nét, rõ ràng và có thể thu được ADN có chất lượng khá tốt; mẫu ở Hà Giang và Tuyên Quang lên băng không rõ, trên giếng load mẫu còn đọng vệt sáng, có thể ADN bị lẫn nhiều tạp chất (mùi tên) và có hiện tượng đứt gãy xảy ra. Quan sát các mẫu lá tươi, mẫu ở Hà Giang và Tuyên Quang có băng ADN thể hiện trên bản điện di không rõ ràng, không sắc nét, ADN có thể bị đứt gãy nhiều và lẫn tạp chất (mùi tên). Đối với mẫu lá tươi của Cao Bằng thì hoàn toàn không thấy xuất hiện băng ADN (hình 1).

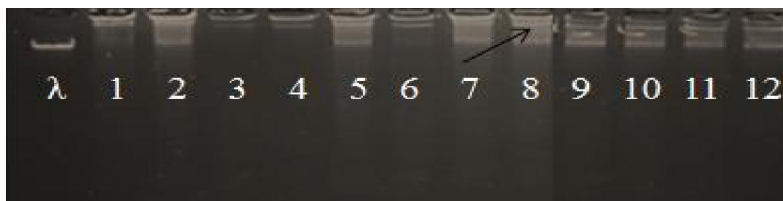


Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu tươi tách bằng CT1

Lá tươi: Cao Bằng (1 - 2), Hà Giang (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6);
Cành tươi: Cao Bằng (7 - 8), Hà Giang (9 - 10), Tuyên Quang (11 - 12)

Với công thức CT2, kết quả điện di cho thấy mẫu lá tươi có lượng ADN tổng số thu được không rõ nét so với mẫu cành tươi. Băng ADN tổng số của 6 mẫu cành tươi thể hiện trên bản điện di tương đối rõ ràng, tuy nhiên vẫn có hiện tượng đứt gãy ADN. Đối với mẫu lá tươi

thuộc quần thể Hà Giang không thấy xuất hiện băng ADN, còn các mẫu thuộc quần thể Cao Bằng và Tuyên Quang thì băng ADN hiện trên bản điện di không rõ ràng, có thể do ADN bị đứt gãy (hình 2).

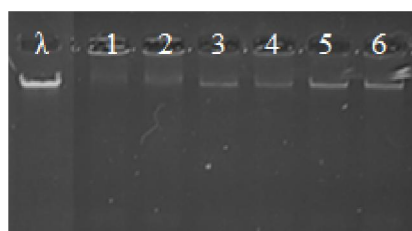


Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu tươi tách bằng CT2

Lá tươi: Cao Bằng (1 - 2), Hà Giang (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6);
Cành tươi: Cao Bằng (7 - 8), Hà Giang (9 - 10), Tuyên Quang (11 - 12)

Kết quả điện di trên gel agarose của các mẫu ADN tách chiết theo công thức CT3 điện di cho thấy 6 mẫu cành tươi đều xuất hiện băng ADN cho dù độ sáng của 6 mẫu là khác nhau, trong đó băng ADN của mẫu thuộc quần thể Tuyên Quang là sáng nhất, băng ADN của mẫu thuộc quần thể Hà Giang sáng hơn so với băng ADN của mẫu ở quần thể Cao Bằng (hình 3A). Độ sắc nét của băng ADN cho thấy chất lượng ADN thu được khá tốt, không bị đứt gãy ở mẫu cành tươi

thuộc quần thể Tuyên Quang và Hà Giang, còn băng ADN của mẫu cành tươi ở Cao Bằng thì không rõ ràng, không sắc nét. Đối với mẫu lá tươi tách chiết bằng CT3, kết quả điện di cho thấy mẫu lá tươi có xuất hiện băng ADN, tuy nhiên độ sắc nét của băng không rõ ràng, bị đứt gãy nhiều ở tất cả 6 mẫu thuộc 3 quần thể (hình 3B). Như vậy, với công thức CT3 thì sử dụng mẫu cành tươi để tách chiết ADN cho kết quả tốt hơn so với sử dụng mẫu lá tươi.



A. Mẫu cành tươi



B. Mẫu lá tươi

Hình 3. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu tươi tách bằng CT3

Cao Bằng (1 - 2), Hà Giang (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6)

Điện di trên gel agarose ADN tổng số mẫu tươi tách bằng CT4, cho thấy cả 6 mẫu cành tươi thu được ADN tổng số đẹp hơn so với 6 mẫu lá tươi. Băng ADN tổng số ở các mẫu cành tươi thể hiện rõ ràng, độ sắc nét cao, chứng tỏ chất lượng ADN thu được tốt, không

bị đứt gãy và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Trong khi đó, băng ADN tổng số của mẫu lá tươi ở cả ba địa điểm đều không rõ nét, mẫu ADN thu được bị nhợt và có thể bị đứt gãy do chứa nhiều polysaccharide và lẫn tạp chất (hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu tươi tách bằng CT4

Cành tươi: Hà Giang (1 - 2), Cao Bằng (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6);
Lá tươi: Cao Bằng (7 - 8), Hà Giang (9 - 10), Tuyên Quang (11 - 12).

ADN tổng số sau khi tách chiết theo các công thức, được tiến hành đo trên máy quang phổ hấp thụ Nano drop để kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch, kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đo nồng độ ADN của mẫu lá tươi và mẫu cành tươi

Mẫu thí nghiệm		CT1		CT2		CT3		CT4		
		ng/μl	OD _{260/280}	ng/μl	OD _{260/280}	ng/μl	OD _{260/280}	ng/μl	OD _{260/280}	
Lá tươi	Cao Bằng	1	38,13	1,452	40,15	1,112	42,36	1,685	57,23	1,652
		2	38,74	1,435	39,45	1,325	40,18	1,665	59,52	1,663
	Hà Giang	1	38,75	1,348	43,74	1,006	33,18	1,495	48,56	1,525
		2	35,89	1,352	34,75	1,053	35,45	1,512	59,65	1,565
	Tuyên Quang	1	21,13	1,315	29,49	1,425	68,95	1,713	113,7	1,854
		2	19,49	1,295	31,18	1,441	65,71	1,725	115,34	1,845
Cành tươi	Cao Bằng	1	31,56	1,587	30,17	1,619	79,65	1,785	139,35	1,887
		2	30,42	1,558	29,84	1,625	81,56	1,791	125,78	1,879
	Hà Giang	1	28,4	1,524	32,16	1,598	86,98	1,812	149,37	1,856
		2	25,49	1,565	30,25	1,638	82,56	1,835	132,33	1,895
	Tuyên Quang	1	29,18	1,380	36,94	1,596	96,45	1,851	156,28	1,927
		2	25,16	1,406	38,52	1,625	85,17	1,865	161,49	1,902
<i>P_{tính}</i>		<0,05		<0,05		<0,05		<0,05		

Dựa vào kết quả đo nồng độ ADN và kết quả điện di trên gel agarose, nhận thấy với công thức CT4 thì việc tách chiết ADN tổng số cho hiệu quả hơn cả so với các công thức khác ($P < 0,05$). Công thức CT4 phù hợp nhất cho việc tách chiết ADN tổng số ở mẫu tươi, trong đó mẫu cành tươi cho lượng ADN cao hơn mẫu lá tươi với nồng độ và độ tinh sạch đạt, đồng thời cũng tương đối ổn định ở cả 3 quần thể nghiên cứu. Như vậy, công thức CT4 là tối ưu cho quy trình tách chiết ADN cây Bách vàng với mẫu được sử dụng là cành tươi. Đồng thời, kết quả thống kê cho thấy nồng độ thu được ở các mẫu lá tươi và cành tươi ở mỗi công thức thí nghiệm là hoàn toàn độc lập.

3.2. Kết quả tách chiết ADN của các mẫu Bách vàng khô.

Kết quả kiểm tra chất lượng ADN sau khi điện di trên gel agarose 0,8% được mô tả và nhận xét cụ thể đối với từng công thức thí nghiệm đối với từng vật liệu khô ở các quần thể được sử dụng.

Trong thí nghiệm với CT1, sử dụng CTAB 2% có bổ sung 0,2% β-mecaptoethanol, 1% PVP thì cả mẫu lá khô và cành khô đều không xuất hiện băng ADN khi chạy điện di kiểm tra (hình 5). Như vậy, mẫu khô tách ADN theo công thức này không thu được kết quả.



Hình 5. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu khô tách bằng CT1

Lá khô: Cao Bằng (1 - 2), Hà Giang (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6);
Cành khô: Cao Bằng (7 - 8), Hà Giang (9 - 10), Tuyên Quang (11 - 12)

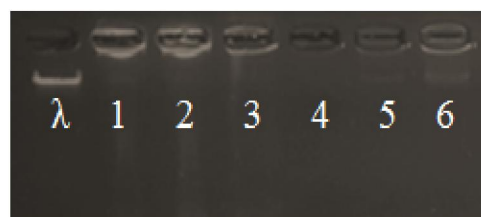
Ở CT2 với CTAB 2% bổ sung 0,2% β -mecaptoethanol và 2% PVP, sau khi điện di kiểm tra trên gel agarose cũng cho kết quả tương tự ở CT1 là không xuất hiện băng ADN, không thu được ADN tổng số sau khi tách ở cả mẫu lá khô và cành khô.

Ở thí nghiệm với CT3, tăng nồng độ CTAB lên 4% và bổ sung 0,2% β -mecaptoethanol cùng với 1% PVP, mẫu cành khô thu được ở Cao Bằng và Hà Giang không quan sát được vạch sáng nhưng trên các giếng lại sáng rõ hơn hẳn (mũi tên), có thể do mẫu ADN bị lẫn

nhiều tạp chất. Trong khi đó, mẫu tách chiết thuộc quần thể Tuyên Quang có lên băng nhưng lại không rõ nét, cho thấy khả năng thu được ADN tổng số tương đối thấp (hình 6A). Với mẫu lá khô của Cao Bằng và Hà Giang không thấy xuất hiện băng ADN, còn mẫu ở Tuyên Quang thì băng ADN tổng số lên mờ và không được rõ nét (hình 6B). Như vậy, sử dụng công thức tách chiết CT3 không thu được ADN tổng số có chất lượng tốt đối với cả mẫu lá khô và cành khô ($P_{\text{tính}} < 0,05$).



A. Mẫu cành khô



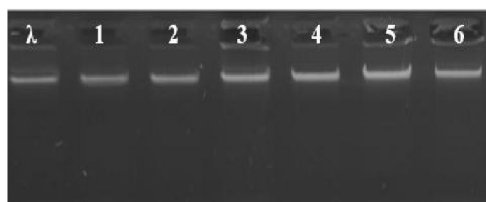
B. Mẫu lá khô

Hình 6. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu khô tách bằng CT3

Cao Bằng (1 - 2), Hà Giang (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6)

Đối với CT4, kết quả cho thấy các mẫu cành khô có vạch ADN rõ và ADN thu được có chất lượng khá tốt, trong đó mẫu cành khô ở Cao Bằng lên kém và mờ hơn so với mẫu ở Hà Giang và Tuyên Quang (hình 7A). Vạch ADN mẫu cành khô Tuyên Quang lên rõ nét và gọn hơn so với mẫu ở 2 quần thể còn lại và cho chất lượng ADN tốt hơn. Ở mẫu lá khô thì

vạch ADN tổng số ở cả 3 quần thể lên, nhưng mẫu lá ở Cao Bằng và Tuyên Quang lên vạch rõ nét, có thể thu được ADN tổng số có chất lượng khá tốt. Vạch ADN mẫu lá khô ở Hà Giang lên nhưng không gọn, có thể xảy ra hiện tượng bị đứt gãy ADN và có chất lượng không đạt (hình 7B).



A. Mẫu cành khô



B. Mẫu lá khô

Hình 7. Kết quả điện di trên gel agarose của ADN mẫu cành khô tách bằng CT4

Cao Bằng (1 - 2), Hà Giang (3 - 4), Tuyên Quang (5 - 6)

Dựa vào kết quả điện di, nhận thấy khi sử dụng công thức CT4 để tách chiết ADN cây Bách vàng cho hiệu quả hơn với các công thức

còn lại, ADN tổng số thu được có thể được dùng cho các thí nghiệm sinh học phân tử tiếp theo. Trong đó, với mẫu cành khô tách bằng

CT4 thì cho băng ADN hiện lên tập trung trên một băng chính, rất rõ ràng và sắc nét.

Sau khi chạy điện di kiểm tra ADN trên gel agarose, tiến hành kiểm tra chất lượng ADN

thu được trên máy đo quang phổ. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch ADN của mẫu lá khô, cành khô ở 3 quần thể được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đo nồng độ ADN của mẫu lá khô và cành khô ở 3 quần thể

Mẫu thí nghiệm			CT1		CT2		CT3		CT4	
			ng/ μ l	OD _{260/280}	ng/ μ l	OD _{260/280}	ng/ μ l	OD _{260/280}	ng/ μ l	OD _{260/280}
Lá khô	Cao Bằng	1	36,47	1,152	38,56	1,038	34,56	1,455	34,28	1,596
		2	34,52	1,212	36,36	1,103	36,7	1,468	37,56	1,598
	Hà Giang	1	30,95	1,213	32,21	1,234	28,19	1,452	32,18	1,495
		2	31,25	1,238	31,18	1,315	27,75	1,463	36,59	1,521
	Tuyên Quang	1	30,95	1,285	38,52	1,452	36,94	1,553	43,74	1,598
		2	32,61	1,278	36,94	1,448	34,35	1,589	34,75	1,585
Cành khô	Cao Bằng	1	23,15	1,352	26,87	1,115	65,18	1,665	102,11	1,852
		2	19,56	1,295	24,15	1,214	39,58	1,663	105,25	1,849
	Hà Giang	1	20,32	1,225	26,52	1,325	57,35	1,584	112,08	1,815
		2	19,2	1,192	25,18	1,358	49,58	1,532	104,13	1,825
	Tuyên Quang	1	21,13	1,315	29,49	1,425	68,95	1,713	113,7	1,854
		2	19,49	1,295	31,18	1,441	65,71	1,725	115,34	1,845
<i>P_{tính}</i>			<0,05		<0,05		<0,05		<0,05	

Kết quả thu được cho thấy, sử dụng công thức CT1 và CT2 thì ADN thu được ở cả mẫu lá khô và cành khô có độ tinh sạch không cao, lượng ADN thấp và hình ảnh điện di kém, không sắc nét và bị đứt gãy nhiều. Như vậy, công thức CT1 và CT2 không phù hợp cho tách chiết ADN cây Bách vàng.

Đối với công thức CT3 cho kết quả là ADN thu được ở mẫu cành khô có chất lượng cao hơn so với ADN mẫu lá khô. ADN ở mẫu cành khô có nồng độ đạt từ 39,58 đến 68,95 ng/ μ l nhưng OD_{260/280} <1,8 cho nên chất lượng ADN thu được chưa tốt. Như vậy, công thức CT3 chưa phải là công thức tối ưu cho việc tách chiết ADN cây Bách vàng.

Ở công thức CT4 cho chất lượng ADN mẫu Bách vàng là tốt hơn so với các công thức thí nghiệm khác và tương đối đồng đều ở cả 3 quần thể nghiên cứu. Sử dụng mẫu cành khô cho ADN có độ tinh sạch và nồng độ cao hơn

so với ADN tách từ mẫu lá khô ($P_{tính} < 0,05$). ADN thu được đều có nồng độ tương đối cao đạt từ 102,11 - 115,34 ng/ μ l, tỷ số OD_{260/280} >1,8 và hình ảnh điện di cho băng ADN rõ ràng, không đứt gãy. Vì vậy, có thể nhận định công thức CT4 là công thức thí nghiệm tối ưu cho việc tách chiết ADN cây Bách vàng từ mẫu cành khô.

IV. KẾT LUẬN

Trong các công thức thí nghiệm sử dụng, CT1 và CT2 cho ADN nồng độ thấp và còn nhiều tạp chất, hoàn toàn không phù hợp cho tách chiết ADN mẫu Bách vàng. CT3 cho kết quả ADN có hình ảnh điện di không rõ nét, đứt gãy nhiều. Riêng CT4 có kết quả thu được từ mẫu cành khô cho ADN có độ tinh sạch cao và nồng độ cao hơn cả so với kết quả thu được từ các mẫu còn lại. ADN thu được cho hình ảnh điện di rõ ràng và không đứt gãy.

Vì vậy, quy trình tách chiết ADN theo công thức CT4 sử dụng CTAB 4% (20mM EDTA pH8, 1,5M NaCl, 100mM Tris HCl pH8, 4% CTAB, 2% PVP và 0,2% β -mercaptoethanol) có cải tiến một số bước để tách ADN tổng số từ mẫu cành (cả tươi và khô) của cây Bách vàng là hiệu quả nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doyle JJ. and Doyle JL., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
2. Farjon A., Hiệp N. T., Harder D. K., Lộc P. K., & Averyanov, L., 2002. A new genus and species in the Cupressaceae (Coniferales) from Northern Vietnam, *Xanthocyparis vietnamensis*. *Novon* 12: 179-189.
3. <https://www.iucnredlist.org/species/44028/2991576>.
4. Trần Huy Thái, Nguyễn Tiến Hiệp, Phùng Tuyết Hồng, Đỗ Thị Minh, 2007. Thành phần hóa học của tinh dầu Bách vàng (*Xanthocyparis vietnamensis* Fajon & Hiep.) ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, số 02: 92-94.
5. Trần Quang Diệu, La Quang Độ, Đặng Kim Vui, 2013. Nghiên cứu đặc điểm tái sinh tự nhiên của loài Bách vàng (*Xanthocyparis vietnamensis* Fajon & Hiep.) tại xã Ca Thành, huyện Nguyên Bình, tỉnh Cao Bằng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 104 (04): 35-40.

Email tác giả liên hệ: hahuyenngoc10595@gmail.com

Ngày nhận bài: 04/08/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 13/08/2020

Ngày duyệt đăng: 17/08/2020