

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ NHẬN DẠNG NGUỒN GEN CÂY ƯƠI (*Scaphium macropodum* (Miq)) BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Trần Thị Thu Hà^{1*}, Phạm Đình Sâm², Hà Thị Huyền Ngọc¹, Nguyễn Thị Huyền¹
Lê Thị Thủy¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹, Mai Thị Phương Thúy¹, Nguyễn Hữu Thịnh²
Hoàng Thị Nhung², Hồ Trung Lương², Lê Sơn¹

¹Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Lâm sinh - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

Từ khóa: Cây Ươi, chỉ
thị ITS, đa dạng di
truyền, nguồn gen

Keywords: Genetic
diversity, gene resources,
ITS (Internal Transcribed
Spacer) marker, *Scaphium
macropodum*

TÓM TẮT

Cây Ươi (*Scaphium macropodum* (Miq)) là loài cây đa tác dụng, sinh trưởng nhanh và rất có giá trị ở Việt Nam. Tuy nhiên, việc khai thác cây Ươi bằng hình thức chặt cành đang phổ biến hiện nay khiến cho loài này đứng trước nguy cơ bị đe dọa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị ITS để đánh giá đa dạng di truyền của 25 cây trội Ươi được thu thập từ các tỉnh Quảng Nam, Quảng Ngãi và Thừa Thiên Huế. Kết quả cho thấy trình tự nucleotide gen ITS của các mẫu nghiên cứu có sự tương đồng cao từ 94,01% đến 94,46% khi so với mẫu tham chiếu *Scaphium lychnophorum* AY083663.1. Mức độ tương đồng di truyền về trình tự nucleotide gen ITS của các mẫu Ươi nghiên cứu rất cao từ 97,96% đến 99,85%. Dựa vào cây quan hệ phát sinh, 25 cây trội Ươi trong nghiên cứu và mẫu tham chiếu được chia làm hai nhóm chính. Kết quả nghiên cứu này cung cấp thêm cơ sở khoa học cho việc khai thác hợp lý đồng thời gắn với việc bảo tồn nguồn gen loài cây bản địa quan trọng này.

Genetic diversity assessment and genetic resources identification of (*Scaphium macropodum* (Miq)) using molecular markers

Scaphium macropodum is a multi-purpose species that grows fast and is very valuable in Vietnam. However, the exploitation of this species by cutting branches is popular at present, triggering this species for being in danger of being threatened. Therefore, in this study, we have used the ITS marker to sequencing and have identified 25 sequence segments of 25 leaf samples of *S. macropodum* collected from Quang Nam, Quang Ngai and Thua Thien Hue provinces that have similarities in the range from 94.01% to 94.46% with reference sample AY083663.1 *Scaphium lychnophorum*. At the same time, research results have also determined that the genetic similarity of the nucleotide sequence of the samples is very high (ranging from 97.96 - 99.85%). Based on the phylogenetic tree, 25 *S. macropodum* samples in the study and the reference sample were divided into two main groups. The results of this study are very important for the proper exploitation and the conservation of the genetic resources of this important indigenous plant species as well.

STT	Số hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu
10	BTB 48	Xã Hương Lộc, huyện Nam Đông, Thừa Thiên Huế
11	BTB 51	Xã Hương Lộc, huyện Nam Đông, Thừa Thiên Huế
12	NTB 02	Xã Trà Giác, huyện Bắc Trà My, Quảng Nam
13	NTB 08	Xã Trà Giác, huyện Bắc Trà My, Quảng Nam
14	NTB 09	Xã Trà Giác, huyện Bắc Trà My, Quảng Nam
15	NTB 28	Xã Trà Giác, huyện Bắc Trà My, Quảng Nam
16	NTB 40	Xã Sơn Lập, huyện Sơn Tây, Quảng Ngãi
17	NTB 42	Xã Sơn Lập, huyện Sơn Tây, Quảng Ngãi
18	NTB 50	Xã Sơn Lập, huyện Sơn Tây, Quảng Ngãi
19	NTB 60	Xã Sơn Kỳ, huyện Sơn Hà, Quảng Ngãi
20	NTB 63	Xã Sơn Kỳ, huyện Sơn Hà, Quảng Ngãi
21	NTB 64	Xã Sơn Kỳ, huyện Sơn Hà, Quảng Ngãi
22	NTB 73	Xã Hành Tín Đông, huyện Nghĩa Hành, Quảng Ngãi
23	NTB 79	Xã Hành Tín Đông, huyện Nghĩa Hành, Quảng Ngãi
24	NTB 84	Xã Hành Tín Đông, huyện Nghĩa Hành, Quảng Ngãi
25	TN27	Xã Sơn Lang, huyện KBang, Gia Lai

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA từ lá cây Ươi được tách chiết và tinh sạch bằng bộ kit GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số sau khi tách chiết, tinh sạch được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% có bổ sung thuốc nhuộm RedSafe (Intron, Hàn Quốc) và quan sát bằng máy soi gel sử dụng tia UV. Nồng độ DNA tổng số được xác định bằng máy đo quang phổ hấp thụ (Nanodrop). Các mẫu có nồng độ ≥ 50 ng/ μ l và chỉ số $OD_{260/280} = 1,8 - 2,0$ được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR)

DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (). Thành phần của mỗi phản ứng PCR bao

gồm: Dream Taq PCR Master Mix (2X) 10 μ l, mồi ITS1 (nồng độ 10 μ M) 1 μ l, mồi ITS4 (nồng độ 10 μ M) 1 μ l, DNA khuôn (nồng độ 50 ng/ μ l) 3 μ l và nước dH₂O 5 μ l. Phản ứng PCR được thực hiện với chu kỳ nhiệt: Bước 1: Biến tính ở 94°C trong 5 phút, bước 2: Biến tính ở 94°C trong 60 giây, bước 3: Gắn mồi ở 57°C trong 45 giây, bước 4: Kéo dài chuỗi ở 72°C trong 50 giây, bước 5: Hoàn tất kéo dài ở 72°C trong 7 phút; từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 40 chu kỳ.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,8% bổ sung dung dịch nhuộm RedSafe (Intron, Hàn Quốc), sau đó được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.3. Giải trình tự gen

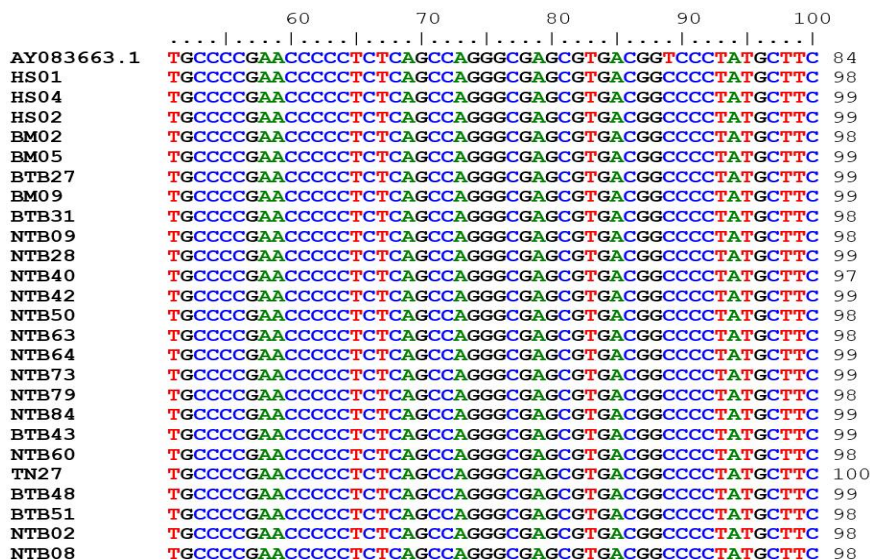
Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được tiến hành giải trình tự gen bằng máy giải trình tự ABI 3130 (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự nucleotide của mỗi mẫu được xác định theo 2

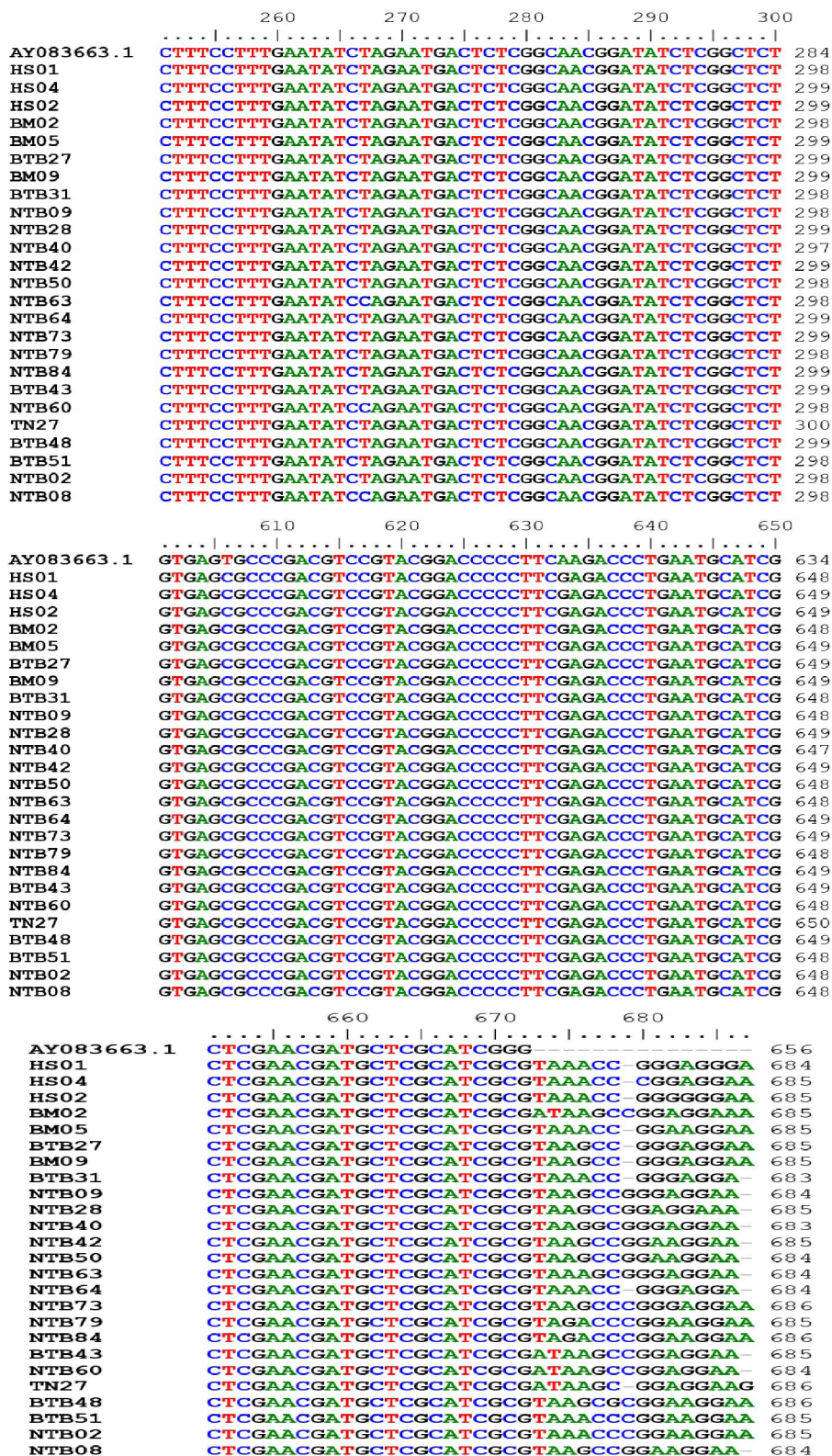
Bảng 2. Độ dài trình tự vùng gen ITS của 25 mẫu Ớoi nghiên cứu

STT	Số hiệu mẫu	Chiều dài vùng gen ITS (bp)	STT	Số hiệu mẫu	Chiều dài vùng gen ITS (bp)
1	HS 01	684	14	NTB 09	684
2	HS 02	685	15	NTB 28	685
3	HS 04	685	16	NTB 40	683
4	BM 02	685	17	NTB 42	685
5	BM 05	685	18	NTB 50	684
6	BM 09	685	19	NTB 60	684
7	BTB 27	685	20	NTB 63	684
8	BTB 31	683	21	NTB 64	684
9	BTB 43	685	22	NTB 73	686
10	BTB 48	686	23	NTB 79	685
11	BTB 51	685	24	NTB 84	686
12	NTB 02	685	25	NT27	686
13	NTB 08	684			

Các trình tự gen ITS của 25 mẫu nghiên cứu được so sánh với nhau và so với trình tự gen ITS tham chiếu của loài Ớoi *Scaphium lychnophorum* đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI với mã số AY083663.1 thông qua phần mềm MEGA 6.06. Kết quả cho thấy, ở vị trí nucleotide 10 và 14, các mẫu HS01, BM02, BTB31, NTB09, NTB40, NTB50, NTB63, NTB79, NTB60,

BTB51, NTB02 và NTB08 đều mất nucleotide C và A so với các mẫu còn lại. Ở vị trí nucleotide 231, các mẫu BM05, BTB27, BTB43, TN27 và NTB02 có sự biến đổi T thành C so với các mẫu còn lại. Tương tự, ở vị trí nucleotide 267 các mẫu NTB63, NTB60 và NTB08 có sự biến đổi T thành C so với các mẫu còn lại (hình 3).





Hình 3. So sánh trình tự nucleotide gen ITS của 25 mẫu Ươi nghiên cứu và mẫu tham chiếu (AY083663.1).

trong nhóm này với mẫu tham chiếu *S. lychnophorum* AY083663.1 dao động từ 94,01% (giữa mẫu BTB27, BTB31 với mẫu tham chiếu) đến 94,30% (giữa mẫu NTB64, NTB09 với mẫu tham chiếu).

Nhóm thứ II: gồm 16 mẫu Ươi được chia làm 2 phân nhóm phụ.

- **Phân nhóm phụ 2.1:** Gồm 4 mẫu là NTB08, NTB63, BTB48 và NTB40. Các mẫu này có hệ số tương đồng về trình tự nucleotide gen ITS dao động từ 98,98% (giữa cặp mẫu NTB63 và BTB48) đến 99,56% (giữa cặp mẫu giống NTB63 và NTB08). Bốn mẫu này có hệ số tương đồng về trình tự nucleotide gen ITS với mẫu tham chiếu *S. lychnophorum* AY083663.1 dao động từ 94,01 - 94,02%.

- **Phân nhóm phụ 2.2:** Gồm 12 mẫu Ươi là NTB02, BM05, NTB84, NTB79, BTB51, NTB50, NTB42, TN27, BTB43, NTB60, BM02 và NTB28. Các mẫu này có hệ số tương đồng về trình tự nucleotide gen ITS dao động từ 98,25% (giữa mẫu giống NTB60 - BM05; NTB60 - NTB84) đến 99,85 (giữa các cặp mẫu NTB79 - BTB51; NTB42 - NTB50). Mười hai mẫu này có hệ số tương đồng về trình tự nucleotide gen ITS với mẫu tham chiếu *Scaphium lychnophorum* AY083663.1 dao động từ 94,01% (giữa mẫu BM05 và mẫu

tham chiếu) đến 94,46% (giữa mẫu TN27 và mẫu tham chiếu).

IV. KẾT LUẬN

Phân tích trình tự vùng gen ITS của 25 cây trội Ươi được thu thập từ tỉnh Quảng Nam, Quảng Ngãi và Thừa Thiên Huế cho thấy có sự tương đồng cao giữa các mẫu nghiên cứu, hệ số tương đồng dao động từ 97,96 - 99,85%. Các mẫu trong nghiên cứu này tương đồng từ 94,01 - 94,46% với mẫu tham chiếu *S. lychnophorum* (mã số trong Ngân hàng gen NCBI là AY083663.1). Dựa vào cây phát sinh chủng loại, các mẫu Ươi nghiên cứu được chia làm 2 nhóm chính. Kết quả nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học cho việc khai thác hợp lý tài nguyên gắn với bảo tồn nguồn gen loài cây bản địa quan trọng này.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo là một phần kết quả nghiên cứu của Đề tài KH&CN cấp Quốc gia “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen cây Ươi (*Scaphium macropodum*) tại một số tỉnh miền Trung và Tây Nguyên”, mã số NVQG-2018/07, do TS. Phạm Đình Sâm làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tiến Bản, 2003. Sterculiaceae Barth. 1830 - Họ Trôm. Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập II. Trang 548. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Võ Văn Chi, 1999. Từ điển cây thuốc Việt Nam. Trang 685 - 686. NXB Y học, Hà Nội.
3. Hồ Hỷ, 2005. Ươi bay, một tiềm năng lớn chưa được phát triển ở Thừa Thiên Huế. Bản tin LSNG. Mạng lưới lâm sản ngoài gỗ Việt Nam. 2 (3): 22 - 25.
4. Bellarosa R., Simeone M. C., Papini A. and Schirone., 2005. Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp.. Plant Phyl. Evol. 34: 355 - 370.
5. Van B.C., Higgins W. E., Dressler R. L., Whitten W. M., Soto Arenas M. A., Culham A., Chase M. W., 2000. A phylogenetic analysis of *Laeliinae* (Orchidaceae) based on sequence data from nuclear internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA. *Lindleyana* 15 (2): 96 - 114.

Email tác giả liên hệ: tranthuhadc@gmail.com

Ngày nhận bài: 21/05/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 10/06/2021

Ngày duyệt đăng: 11/06/2021