

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY DẦU RÁI (*DIPTEROCARPUS ALATUS* ROXB.)

BẢNG KỸ THUẬT RAPD

Nguyễn Thị Hải Hồng, Trần Nhật Nam, Nguyễn Thị Lệ Hà

Phân viện Nghiên cứu Khoa học Lâm nghiệp Nam Bộ

TÓM TẮT

Đánh giá đa dạng di truyền 41 mẫu lá Dầu rái (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) thu thập từ 10 tỉnh thuộc 3 vùng sinh thái lâm nghiệp tại Việt Nam bằng chỉ thị RAPD với 18 môi ngẫu nhiên cho thấy các mẫu Dầu rái có đa dạng di truyền khá cao. Hệ số tương đồng dao động trong khoảng 43 - 100%. Các mẫu Dầu rái được chia thành 5 nhóm. Nhóm I gồm các mẫu D-CT-1-4 (Tân Phú, Đồng Nai), D-DMC-1-5 (Dương Minh Châu, Tây Ninh), D-TP-5,6,11 (Định Quán, Đồng Nai) có khác biệt di truyền 18, 21, 47 và 57 % với nhóm II, III, IV và V; Nhóm II gồm các mẫu D-CP-1-5 (Chư Prông, Gia Lai), D-ES-2,3,5 (Easup, Đắc Lắc) và mẫu D-TP-1 (Định Quán, Đồng Nai); Nhóm III gồm các mẫu D-BS-1-5 (Hoài Nhơn, Bình Định), D-HTB-1-5 (Hàm Thuận Bắc, Bình Thuận); Nhóm IV gồm các mẫu D-DT-4 và D-DT-5 (Đắc Tô, Kom Tum); và Nhóm V gồm các mẫu còn lại D-HCM-2,4,5,6 (Tp. Hồ Chí Minh) và D-TB-2,5,6,7 (Tân Biên, Tây Ninh).

Từ khóa: Dầu rái (*Dipterocarpus alatus* Roxb.), Đa dạng di truyền, RAPD

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dầu rái (*Dipterocarpus alatus* Roxb.), thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae), là loài cây bản địa gỗ lớn thường xanh, có giá trị kinh tế cao, chiếm ưu thế trong rừng mưa nhiệt đới. Phân bố tự nhiên tại Bangladesh, Campuchia, Lào, Myanma, Ấn Độ, Philippin, Thái Lan và Việt Nam; Gỗ tốt, thích hợp dùng trong xây dựng và đóng tàu thuyền; Nhựa dầu của cây có thể được dùng để vô trùng các vết thương. Dầu còn được dùng để đốt đuốc, chống thấm nước, mực in trên đá hoặc làm chất đánh bóng (Appanah và Turnbull, 1998). Năm 2005, Bộ NN & PTNN quyết định đưa loài cây Dầu rái vào danh mục các loài cây chủ yếu tiên phong cho trồng rừng sản xuất, rừng phòng hộ đầu nguồn và trồng rừng cảnh quan đô thị và khu công nghiệp tại ba vùng sinh thái lâm nghiệp Đông Nam Bộ, Tây Nguyên và Nam Trung Bộ.

Các thông tin về đa dạng di truyền là rất quan trọng đối với các chương trình bảo tồn gen, chọn giống và phát triển các loài cây rừng. Tại Việt Nam, chỉ thị RAPD là một trong những chỉ thị được sử dụng khá phổ biến để đánh giá đa dạng di truyền ở nhiều loài cây lâm nghiệp như một số loài cây họ Dầu (Nguyễn Hoàng Nghĩa và cộng sự, 2005), Sao lá hình tim (Nguyễn Hoàng Nghĩa và cộng sự, 2006), Lim xanh (Quách Thị Liên và cộng sự, 2004), Tràm cajuputy (Trần Quốc Trọng và cộng sự, 2005), Cóc hành (Nguyễn Việt Cường, Phạm Đức Tuấn, 2007) và Gỗ đỏ (Nguyễn Hoàng Nghĩa và cộng sự, 2007). Trong nghiên cứu này, chỉ thị RAPD được sử dụng để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các cây trội Dầu rái ở các vùng sinh thái nhằm có định hướng cho việc nghiên cứu chọn giống và phát triển cây Dầu rái phục vụ trồng rừng trong tương lai.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Vật liệu là 41 mẫu lá thu thập từ cây Dầu rái trưởng thành tại 10 tỉnh/thành phố đại diện cho 3 vùng sinh thái Đông Nam Bộ, Tây Nguyên và Nam Trung Bộ; và 18 môi RAPD được sử dụng.

Bảng 1: Danh sách mẫu Dầu rái và địa điểm lấy mẫu

TT	Kí hiệu mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Ghi chú
1-4	D-CT-1-4	Tân Phú, Đồng Nai	Rừng tự nhiên
5-9	D-CP-1-5	Chư Prông, Gia Lai	Rừng tự nhiên
10-11	D-DT-4-5	Đắc Tô, Kom Tum	Rừng tự nhiên
12-16	D-DMC-1-5	Dương Minh Châu, Tây Ninh	Rừng trồng
17-20	D-TP-1,5,6,11	Định Quán, Đồng Nai	Rừng tự nhiên
21-25	D-BS-1-5	Hoài Nhơn, Bình Định	Rừng tự nhiên
26-29	D-HCM-2,4,5,6	Tp. Hồ Chí Minh	Cây đường phố
30-32	D-ES-2,3,5	Easup, Đắc Lắc	Rừng tự nhiên
33-36	D-TB-2,5,6,7	Tân Biên, Tây Ninh	Rừng tự nhiên
37-41	D-HTB-1-5	Hàm Thuận Bắc, Bình Thuận	Rừng tự nhiên

Bảng 2: Danh sách các môi ngẫu nhiên RAPD sử dụng

TT	Tên môi	Trình tự	TT	Tên môi	Trình tự
1	OPB6	5'- TGC TCT GCC C-3'	10	OPC11	5'- AAA GCT GCG G-3'

2	OPB8	5'- GTC CAC ACG G-3'	11	OPC12	5'-TGT CAT CCC C-3'
3	OPB11	5'- GTA GAC CCG T-3'	12	OPC20	5'- ACT TCG CCA C-3'
4	OPB12	5'- CCT TGA CGC A-3'	13	OPD2	5'-GGA CCC AAC C-3'
5	OPB13	5'- TTC CCC CGC T-3'	14	OPU4	5'-ACC TTC GGA C-3'
6	OPB14	5'- TCC GCT CTG G -3'	15	OPU5	5'-TTG GCG GCC T-3'
7	OPB15	5'- GGA GGG TGT T-3'	16	OPU9	5'-CCA CAT CGG T-3'
8	OPC8	5'- TGG ACC GGT G-3'	17	OPU14	5'-TGG GTC CCT C-3'
9	OPC9	5'- CTC ACC GTC C-3'	18	OPU15	5'-ACG GGC CAG T-3'

2. Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số của các cây Dầu rái được tách chiết từ mẫu lá non theo phương pháp của Doyle and Doyle và cộng sự (1987) có cải tiến. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,8%. Kỹ thuật PCR với các môi RAPD được tiến hành với các thành phần phản ứng: ADN khuôn (300ng), dNTPs (0,5mM), MgCl₂ (3,0mM), primer (0,8uM), enzyme Taq polymerase (0,5 đơn vị) và đệm thích hợp cho enzyme. Chu kỳ luân nhiệt bao gồm các bước: 95⁰C - 2 phút; 95⁰C - 1 phút, 37⁰C - 3 phút, 72⁰C - 2 phút; lặp lại 37 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 72⁰C - 10 phút; giữ nhiệt độ ở 4⁰C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,8%, quan sát dưới đèn cực tím và chụp ảnh bằng hệ thống Thermal Imaging System FTI-500 (Pharmacia Biotech).

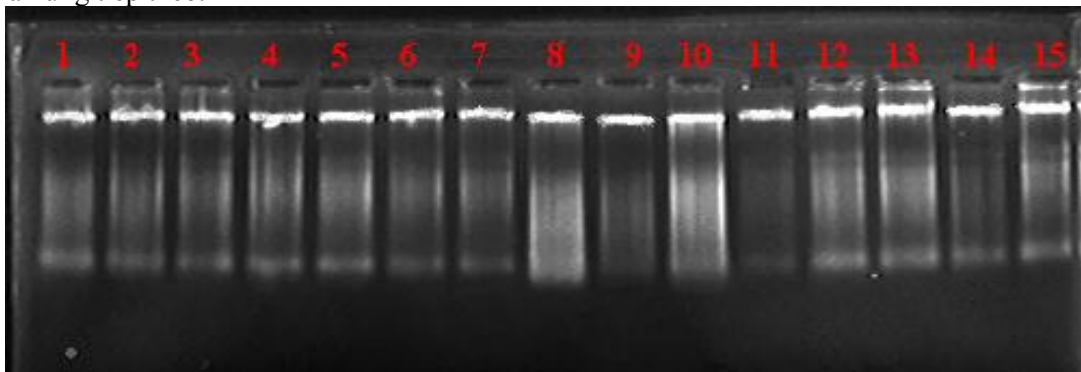
3. Phân tích số liệu

Dựa vào hình ảnh điện di sản phẩm RAPD, sự xuất hiện các băng điện di được ước lượng kích thước và thống kê các băng điện di với từng môi ở từng mẫu nghiên cứu. Sự xuất hiện hay không xuất hiện các băng điện di được tập hợp để phân tích số liệu theo nguyên tắc: số 1 - xuất hiện phân đoạn ADN và số 0- không xuất hiện phân đoạn ADN. Số liệu được xử lý bằng chương trình NTSYS pc 2.1 để xác định mức độ đa dạng di truyền trong các mẫu nghiên cứu sử dụng hệ số tương đồng Jacard (Jaccard similarity coefficient). Độ tương đồng di truyền được xác định trên bảng về ma trận và được sơ đồ hóa mức quan hệ di truyền hình cây của các mẫu Dầu rái nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả tách chiết ADN tổng số

Kết quả định lượng ADN bằng quang phổ kế cho thấy ADN của 41 mẫu Dầu rái được chọn có độ tinh sạch tương đối cao với tỉ lệ OD260 nm/OD280 nm nằm trong khoảng 1,6 đến 2,2 và lượng ADN có trong mỗi mẫu đều lớn hơn 400 ng/μl. Kiểm tra chất lượng tách chiết ADN bằng phương pháp điện di trên gel agarose cho thấy các băng ADN thu được là 1 vệt duy nhất, tập trung, chứng tỏ độ tinh sạch, độ nguyên vẹn ở các mẫu tương đối cao, không lẫn protein và ARN. Nồng độ ADN này làm khuôn cho các phản ứng tiếp theo.

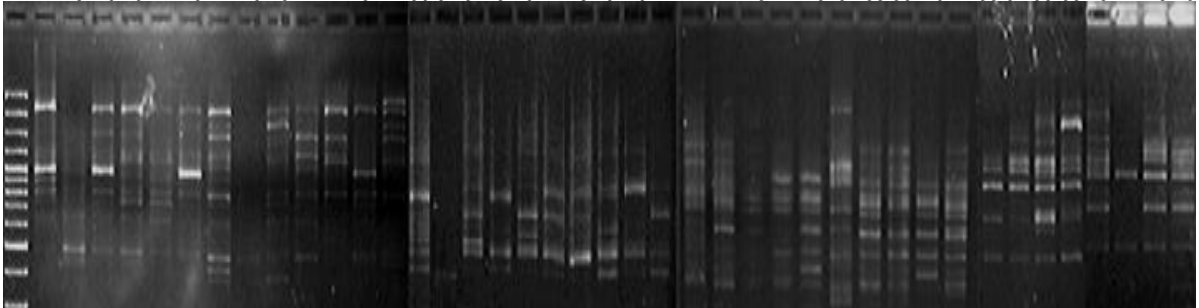


Hình 1: ADN tổng số tách từ một số mẫu Dầu rái

2. Kết quả phân tích ADN bằng kỹ thuật RAPD và mối quan hệ di truyền

Kết quả thu được từ 18 môi trên 41 mẫu Dầu rái cho thấy số băng ADN được khuếch đại là 281 băng trung bình 16 băng/môi. Mỗi có số băng được khuếch đại cao nhất là OPB12 và OPC9 với 20 băng được khuếch đại. Mỗi có số băng được khuếch đại thấp nhất là OPU4, OPU14 và OPC12. Trong đó băng đa hình chiếm tỷ lệ 99% (279 băng), chỉ có 2 băng đồng hình chiếm tỷ lệ 1%. Kích thước các phân đoạn ADN được khuếch đại nằm trong khoảng 300 - 1500 bp.

M 17 18 19 20 12 13 14 15 16 1 2 3 4 30 31 32 5 6 7 8 9 10 11 21 22 23 24 25 37 38 39 40 41 33 34 35 36 26 27 28 29



Hình 2: Sản phẩm PCR của các mẫu Dầu rái với mỗi OPC9

Dựa vào biểu đồ quan hệ biểu thị mối tương quan di truyền (hình 3) cho thấy các mẫu Dầu rái có mức đa dạng di truyền cao. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 43 đến 100%. Theo kết quả nghiên cứu quan hệ di truyền của 17 loài thuộc 6 chi họ Dầu (Dipterocarpaceae) ở Việt Nam (Nguyễn Hoàng Nghĩa và cộng sự, 2005) cho thấy có sự khác biệt lớn về mặt di truyền, hệ số tương đồng di truyền dao động từ 18% đến 58%. Và Dầu rái được xếp chung nhóm với Dầu trà beng (*D. oblusifolius* Teysm), Dầu song nàng (*D. dyeri* Pierre), và Dầu đọt tím (*D. grandiflorus* Blco) với hệ số tương đồng di truyền giao động từ 27% đến 35%. Trong khi đó, nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây Dầu rái tại Thái Lan bằng chỉ thị Isozyme (Changtragoon, 2001) cho thấy sự khác biệt di truyền của loài này là khoảng 13%. Trước đó, Changtragoon and Boontawee (1999) nghiên cứu đa dạng di truyền 2 quần thể tự nhiên và 2 quần thể rừng trồng thì lại cho thấy sự khác biệt di truyền cao hơn (18%).

So sánh mức độ đa dạng di truyền với một số loài cây cùng họ Dầu tại Việt Nam thì Dầu rái có độ đa dạng khá cao. Ví dụ, Sao lá hình tim (*Hopea cordata* Vidal) (Nguyễn Hoàng Nghĩa và cộng sự, 2006) và Sao đen (*Hopea odorata* Robx.) (Nguyễn Thị Hải Hồng và cộng sự, 2010) đều có mức độ đa dạng di truyền thấp hơn, hệ số tương đồng dao động từ 67% đến 100%.

Dựa vào biểu đồ quan hệ di truyền (hình 3) có thể được chia các mẫu Dầu rái nghiên cứu thành 5 nhóm chính:

Nhóm I: D-CT-1-4 (Tân Phú, Đồng Nai), D-DMC-1-5 (Dương Minh Châu, Tây Ninh), D-TP-5,6,11 (Định Quán, Đồng Nai).

Nhóm II: D-CP-1-5 (Chư Prông, Gia Lai), D-ES-2,3,5 (Easup, Đắc Lắc) và mẫu D-TP-1 (Định Quán, Đồng Nai).

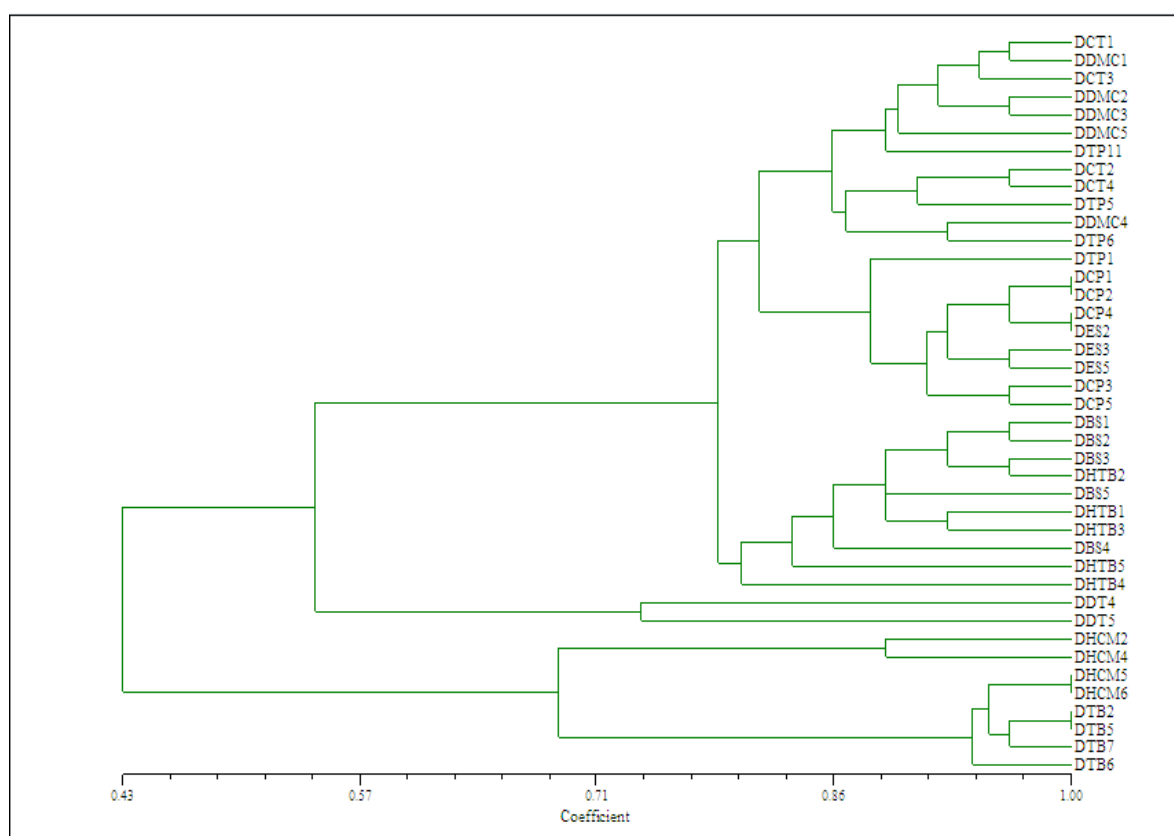
Nhóm III: D-BS-1-5 (Hoài Nhơn, Bình Định), D-HTB-1-5 (Hàm Thuận Bắc, Bình Thuận).

Nhóm IV: D-DT-4 và D-DT-5 (Đắc Tô, Kom Tum).

Nhóm V: D-HCM-2,4,5,6 (Tp. Hồ Chí Minh) và D-TB-2,5,6,7 (Tân Biên, Tây Ninh).

Sự khác biệt giữa nhóm I với các nhóm II, III, IV và V lần lượt là 18%, 21%, 47% và 57%. Sự khác biệt giữa nhóm I, II và III với nhóm IV và V là 47% và 57%. Sự khác biệt giữa nhóm IV và V là 57%.

Các mẫu trong từng nhóm cũng có sự khác biệt tuy nhiên sự khác biệt này là không lớn. Sự khác biệt giữa các mẫu trong nhóm I, II, III, IV, V lần lượt là 3 – 14%, 0 – 12%, 3 – 20%, 36%, 4 – 31%. Trong nhóm II có hai cặp không có sự khác biệt là D-CP-1 và D-CP-2, D-CP-1 và D-CP-2 đều được thu thập tại rừng tự nhiên thuộc huyện Chư Prông tỉnh Gia Lai. Điều này cho thấy các cặp mẫu này có thể được thu thập tại hai cây có cùng một cây mẹ. Trường hợp này cũng xảy ra với hai cặp: D-HCM-5 và D-HCM-6, D-TB-2 và D-TB-5. Riêng trường hợp D-CP-4 và D-ES-2 thì chưa thể giải thích được.



Hình 3: Biểu đồ quan hệ di truyền của Dầu rái

Các mẫu D-DT, D-CP và D-ES đều có nguồn gốc từ vùng sinh thái Tây Nguyên tuy nhiên lại có sự khác biệt lớn giữa D-DT với D-CP và D-ES. Điều này cho thấy có thể các mẫu Dầu rái có xuất xứ từ Kom Tum mang những đặc tính di truyền khác biệt so với các mẫu có cùng một vùng sinh thái.

Các mẫu D-DMC và D-TB đều được thu thập tại Tây Ninh tuy nhiên lại có sự khác biệt lớn. Điều này có thể được giải thích những mẫu D-DMC được lấy mẫu trong rừng trồng tại Dương Minh Châu có nguồn gốc giống từ nơi khác. Theo cây di truyền, các mẫu D-DMC có độ tương quan cao đối với các mẫu D-CT và D-TP. Như vậy có thể rừng trồng tại Dương Minh Châu là có nguồn gốc từ các cây tự nhiên tại Đồng Nai.

Các mẫu D-HCM có độ tương đồng cao đối với các mẫu D-TB. Điều này cho thấy có thể các cây trội được chọn để lấy mẫu tại thành phố Hồ Chí Minh có nguồn gốc từ Vườn quốc gia Lò Gò - Xa Mát thuộc tỉnh Tây Ninh.

IV. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật RAPD với việc sử dụng 18 mồi ngẫu nhiên trên 41 mẫu Dầu rái đã thu được 281 phân đoạn ADN. Mỗi có số băng được khuếch đại cao nhất là OPB12 và OPC9 với 20 băng được khuếch đại. Kích thước các phân đoạn ADN được khuếch đại nằm trong khoảng 300 - 1500 bp.

Các mẫu Dầu rái được sử dụng trong nghiên cứu có đa dạng di truyền khá cao, hệ số tương đồng dao động trong khoảng 43-100%. Dầu rái ở Việt Nam có thể chia thành 5 nhóm chính. Nhóm I gồm các mẫu D-CT-1-4 (Tân Phú, Đồng Nai), D-DMC-1-5 (Dương Minh Châu, Tây Ninh), D-TP-5,6,11 (Định Quán, Đồng Nai) có khác biệt di truyền 18, 21, 47 và 57% với nhóm II, III, IV và V; Nhóm II gồm các mẫu D-CP-1-5 (Chư Prông, Gia Lai), D-ES-2,3,5 (Easup, Đắc Lắc) và mẫu D-TP-1 (Định Quán, Đồng Nai); Nhóm III gồm các mẫu D-BS-1-5 (Hoài Nhơn, Bình Định), D-HTB-1-5 (Hàm Thuận Bắc, Bình Thuận); Nhóm IV gồm các mẫu D-DT-4 và D-DT-5 (Đắc Tô, Kom Tum); và Nhóm V gồm các mẫu còn lại D-HCM-2,4,5,6 (Tp. Hồ Chí Minh) và D-TB-2,5,6,7 (Tân Biên, Tây Ninh).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Việt Cường, Phạm Đức Tuấn, 2007. Ứng dụng của chỉ thị phân tử (RAPD và AND lục lạp) trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xây dựng vườn giống cây Cóc Hành (*Azadirachta excelsa*). Tạp chí NN & PTNT số 19/2007, 69-75.
2. Nguyễn Thị Hải Hồng, Trần Nhật Nam, Nguyễn Thị Lệ Hà, Nguyễn Lê Huyền Thanh, 2010. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống cây Sao đen. Báo cáo sơ kết đề tài “Nghiên cứu chọn, nhân giống và kỹ thuật gây trồng Dầu rái và Sao đen” 2008 – 2012.
3. Quách Thị Liên, Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2004. Sử dụng các chỉ thị RAPD và ADN lục lạp trong nghiên cứu quan hệ di truyền của một số xuất xứ cây Lim xanh (*Erythrophleum fordii* Oliv). Kỷ yếu Hội nghị toàn quốc “Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống”, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2004, 464-468.
4. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Đức Thành, Trần Thuỳ Linh, 2007. Kết quả phân tích đa dạng di truyền loài Gõ đỏ (*Azadirachta xylocarpa* (Kurz) Craib.) bằng chỉ thị phân tử RAPD. Tạp chí Nông nghiệp & PTNT, 14/2007, 44-48.
5. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Thuý Hạnh, Nguyễn Đức Thành, 2006. Kết quả phân tích đa dạng di truyền loài sao lá hình tim (*Hopea cordata* Vidal) thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae) bằng chỉ thị phân tử. Tạp chí NN & PTNT, 10/2006, 75-77.
6. Trần Quốc Trọng, Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Việt Cường, 2005. Sử dụng chỉ thị RAPD và ADN lục lạp trong nghiên cứu quan hệ di truyền của một số xuất xứ Tràm (*Melaleuca cajuputy*) từ các vùng khác nhau của Việt Nam. Kỷ yếu Hội thảo Quốc gia lần thứ nhất về Sinh thái và tài nguyên sinh vật. Hà Nội, 2005, 259-265.
7. Bộ Khoa học và Công nghệ VN – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách đỏ Việt Nam. Phần II. Thực vật. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
8. Bộ NN & PTNT, 2004. Chọn loài cây ưu tiên cho các chương trình trồng rừng tại Việt Nam - Cẩm nang ngành lâm nghiệp.
9. Bộ NN & PTNT, 2005. Danh mục các loài cây chủ yếu cho trồng rừng sản xuất theo 9 vùng sinh thái lâm nghiệp, ban hành kèm theo quyết định số 16/2005/QĐ-BNN ngày 15/3/2005.
10. Appanah S. and Turnbull J. M., 1998. A Review of Taxonomy, ecology and silviculture Dipterocarps. Center for International Forestry Research, Bogor, Indonesia
11. Changtragoon, S., 2001. Evaluating Genetic Diversity of *Dipterocarpus alatus* Genetic Resources in Thailand Using Isozyme Gene Markers. In situ and Ex situ Conservation of Commercial Tropical Trees, pp. 349-354.

12. Changtragoon, S. & Boontawee, B. 1999. The study of genetic diversity of *Dipterocarpus alatus* by isoenzyme gene markers In: Seminars on *Dipterocarpus alatus* and Dipterocarpaceae. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 17-18 November 1999. pp. 107-114.
13. Choong C. Y., R Wickneswari, M Norwati, R J Abbott, 2008. Phylogeny of *Hopea* (Dipterocarpaceae) inferred from chloroplast ADN and nuclear PgiC sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 1238-1243.
14. Doyle J. J. and J. L. Doyle, 1987. Preservation of plant sample for ADN retriCTION endonuclease analysis. *Taxon* 36: 715-722.
15. Nguyen Hoang Nghia, Nguyen Duc Thanh, Nguyen Thuy Hanh, 2005. Genetic relationship of some dipterocarp species in Vietnam based on RAPD and cpADN analyses. 8th Round-table coference on Dipterocarps, 15-17 November 2005, Ho Chi Minh city, Vietnam.
16. Priyadarshini Rath, G. Rajaseger, Chong Jin Goh and Prakash P. Kumar, 1998. Phylogenetic Analysis of Dipterocarps Using Random Amplified Polymorphic ADN Markers. *Annals of Botany* 82: 61-65.

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF *DIPTEROCARPUS ALATUS* ROXB. BY USING RAPD MARKERS

Nguyen Thi Hai Hong, Tran Nhat Nam, Nguyen Thi Le Ha

Forest Science Sub-Institute of South Vietnam

SUMMARY

Assessment of genetic diversity for 41 leaf samples *Dipterocarpus alatus* Roxb. that were collected from 10 provinces of 3 forest ecological regions in Vietnam by using RAPD markers with 18 random primers showed that these samples were highly genetic diversity. Genetic similarity coefficients varied from 43% to 100% and could be divided into 5 main groups: Group I that included the samples, D-CT-1-4 (Tan Phu, Dong Nai), D-DMC-1-5 (Duong Minh Chau, Tay Ninh), D-TP-5,6,11 (Dinh Quan, Dong Nai), showed differences in genetic coefficient being 18, 21, 47 and 57 %, respectively compared with the groups II, III, IV and V. Of which group II consisted of D-CP-1-5 (Chu Prong, Gia Lai), D-ES-2,3,5 (Easup, Dac Lac) and D-TP-1 (Dinh Quan, Dong Nai); Group III was D-BS-1-5 (Hoai Nhon, Binh Dinh), D-HTB-1-5 (Ham Thuan Bac, Binh Thuan); Group IV was D-DT-4 and D-DT-5 (Dac To, Kom Tum); and Group V was the remaining samples: D-HCM-2,4,5,6 (Ho Chi Minh) and D-TB-2,5,6,7 (Tan Bien, Tay Ninh).

Keywords: *Dipterocarpus alatus* Roxb., genetic diversity, RAPD

Người thẩm định: GS.TS. Lê Đình Khả