

ĐÁNH GIÁ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CÂY THẢO QUẢ (*Amomum aromaticum* Roxb.) TẠI MỘT SỐ QUẦN THỂ THUỘC CÁC TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC

Phan Văn Thắng¹, Nguyễn Thị Hiền¹, Phùng Nhuệ Giang¹, Võ Đại Hải², Trần Hồ Quang³

¹Trung tâm Nghiên cứu Lâm sản ngoài gỗ - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

²Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

³Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Thảo quả (*Amomum aromaticum* Roxb.) là một trong những loài cây lâm sản ngoài gỗ có giá trị, sản phẩm thu hoạch chính là quả và tinh dầu từ quả. Thảo quả được coi là cây xóa đói giảm nghèo của đồng bào dân tộc thiểu số ở vùng cao của các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, nên Thảo quả là một trong những loài cây trồng đang rất được quan tâm ở nhiều địa phương. Tuy nhiên, gần đây, do tác động của biến đổi khí hậu, năng suất và chất lượng quả ngày càng suy giảm, vì chưa có giống tốt để phục sản xuất, nên việc nghiên cứu đa dạng di truyền cây Thảo quả làm cơ sở khoa học quan trọng phục vụ cho công tác nghiên cứu chọn tạo giống và bảo tồn nguồn gen Thảo quả là cần thiết. Nghiên cứu tiến hành khảo sát và thu 36 mẫu ở 6 quần thể tại các tỉnh Việt Nam bao gồm: Mù Cang Chải - Yên Bái; Văn Bàn, Sa Pa - Lào Cai; Mường Tè, Tam Đường, Tân Uyên - Lai Châu. Ứng dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử để đánh giá đa dạng di truyền Thảo quả tại 6 quần thể, kết quả nghiên cứu đã tách chiết thành công tách chiết ADN tổng số một số mẫu nghiên cứu đại diện trên gel Agarose 1%, từ đó xác định được 5 cặp mồi SSR có mức độ đa hình cao để phân tích đa dạng di truyền loài Thảo quả. Đồng thời đã xác định đa dạng di truyền của các giống Thảo quả nghiên cứu trong khoảng từ 46 - 100%. Do hầu hết các cá thể Thảo quả nghiên cứu có mối quan hệ tương đối thân thiết nên khả năng để tạo ưu thế lai giữa các cá thể này là rất khó. Vì vậy, để cải thiện giống cây Thảo quả một cách hiệu quả trong tương lai, cần có phương án thu thập, đánh giá, lưu giữ, bảo tồn và quản lý nguồn gen cây Thảo quả một cách hợp lý, hệ thống, khoa học.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, lâm sản ngoài gỗ, SSR, Thảo quả.

EVALUATION OF THE GENETIC RELATIONS OF *Amomum aromaticum* ROXB. TREES COLLECTED AT POPULATIONS IN PROVINCES OF NORTHERN MOUNTAIN AREA

Phan Van Thang¹, Nguyen Thi Hien¹, Phung Nhue Giang¹, Vo Dai Hai², Tran Ho Quang³

¹Non-Timber Forest Products Research Centre

²Vietnamese Academy of Forest Sciences

³Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Cardamom (*Amomum aromaticum* Roxb.) is one of the valuable non timber forest products, the main products are fruits and essential oils from the fruit. Cardamom is considered as a poverty alleviation plant of ethnic minorities in the highlands of the mountainous provinces of Vietnam. Cardamom is one of the plants that are very interested in many provinces. However, recently, due to the impact of climate change, the yield and quality of fruit are increasingly declining. Because there is no good cultivar to restore production. So the study of genetic diversity of Cardamom as a basis important science for research, breeding and conservation of Cardamom genetic resources is necessary. The study conducted a survey and collected 36 samples in 6 typical populations in Vietnam's provinces, including: Mu Cang Chai - Yen Bai; Van Ban, Sa Pa - Lao Cai; Muong Te, Tam Duong, Tan Uyen - Lai Chau. Applying modern genetic diversity analysis technology at the Institute

of Biotechnology, the research results have successfully isolated and extracted the total DNA of a number of representative research samples on 1% agarose gel, thereby determining 5 pairs of SSR primers capable of analyzing genetic diversity of Cardamom species. At the same time, the genetic diversity of the studied varieties of Cardamom was determined in the range of 46 - 100%. Since most of the Cardamom individuals studied have a relatively close relationship, the ability to create a hybrid advantage between these individuals is very difficult. Therefore, in order to effectively improve the cardamom variety in the future, it is necessary to have a plan to collect, evaluate, store, preserve and manage the cardamomium gene resources in a rational, systematic and scientific manner.

Keywords: *Amomum aromaticum* Roxb., Cardamom, genetic diversity, non timber forest products, SSR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thảo quả (*Amomum aromaticum* Roxb.) thuộc chi *Amomum*, họ *Zingiberaceae* là một trong những loài cây lâm sản ngoài gỗ có giá trị kinh tế cao. Quả Thảo quả có tinh dầu thơm nhẹ, mát. Hạt Thảo quả chứa khoảng 3% tinh dầu. Trong đó, thành phần chính của tinh dầu Thảo quả là 1,8-cineol chiếm từ 65 - 80%. Hàm lượng terpinyl acetate thấp (nhỏ hơn 5%). Hàm lượng hydrocarbon monoterpene từ 5 - 17% trong đó lamonen, sabinene, terpinenes và pinenes là thành phần quan trọng. Terpinols chứa khoảng 5 - 7% dầu. Các cineole cao làm cho mùi hương nồng hơn so với loài khác. Do đó, quả Thảo quả là một loại dược liệu quan trọng trong y học dân tộc cổ truyền và y học hiện đại, có tác dụng chữa trị một số bệnh thường gặp như: đau bụng, trướng bụng đầy hơi, tiêu chảy, giải cảm, viêm đường hô hấp gây ho, viêm lợi,... Ngoài ra, quả Thảo quả là một trong những loại gia vị giàu dinh dưỡng không thể thiếu trong nghệ thuật ẩm thực, công nghiệp thực phẩm được nhiều quốc gia trên thế giới ưa chuộng sử dụng. Tinh dầu Thảo quả cũng được dùng làm hương liệu trong công nghệ mỹ phẩm cao cấp, nên nhu cầu sử dụng rất lớn (Phan Văn Thắng, 2014). Thảo quả có khả năng giữ nước tốt, có tác dụng bảo vệ đất, chống xói mòn, điều hòa, làm sạch không khí nên được lựa chọn để trồng dưới tán rừng, mang lại thu nhập cho người sản xuất và bảo vệ môi trường. Trên thế giới, chi *Amomum* có

khoảng 150 loài phân bố chủ yếu ở châu Á và châu Úc. Trong đó, riêng ở Trung Quốc, Thảo quả có phân bố tự nhiên và được gây trồng nhiều ở các tỉnh Vân Nam, Quảng Tây và Quý Châu, có một số loài có hình thái tương đối giống nhau, kích thước quả cũng lớn hơn so với các loài khác như: *Amomum hongtsaoko* C. F. Liang; *A. aromaticum* Roxb.; *A. subulatum*; *A. scarltinum* H.T.Tsai; *A. paratsao-ko* S.Q. (Madhusoodanan K. J. and Saideswara Rao Y., 2001; Wu Delin, Kai Larsen, 2000). Trong đó, loài *Amomum aromaticum* Roxb. phân bố chủ yếu và tập trung ở Nam Trung Quốc (Vân Nam) (Anon,1999). Ở Việt Nam, Thảo quả có phân bố tự nhiên và được gây trồng nhiều ở một số tỉnh biên giới phía Bắc giáp Trung Quốc và có tới 7 loài Thảo quả gồm: *A. aromaticum* Roxb.; *A. scarltinum* H.T.Tsai; *A. hongtsao-ko* C.F. Liang; *A. paratsao-ko* S.Q. Tong et Y.M. Xia; *A. sp1*; *A. sp2*; *A. sp3*, trong đó, loài *Amomum aromaticum* Roxb có tên khoa học khác là *Amomum tsao-ko* được trồng phổ biến ở nước ta (Hoàng Văn Lâm, 2004). Hiện nay, loài này có 4 nhóm khác nhau chủ yếu được phân biệt dựa trên hình dạng, kích thước và đặc điểm của quả (Phan Văn Thắng, 2008; 2014).

Những tiến bộ gần đây trong lĩnh vực sinh học phân tử đã cung cấp những công cụ mới áp dụng vào việc làm rõ và hỗ trợ cho các nghiên cứu về tiến hóa, hình thái học và phân loại học. Những chỉ thị phân tử ADN có nhiều ưu điểm

so với các chỉ thị hình thái vì chúng gắn liền với vật chất di truyền, tương đối dễ phân tích trong phòng thí nghiệm và ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. Ứng dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử ADN để đánh giá đa dạng di truyền Thảo quả góp phần cung cấp thông tin về mức độ đa dạng di truyền hiện có, mối quan hệ giữa các quần thể nghiên cứu cũng như làm cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen Thảo quả ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá của các mẫu Thảo quả được thu từ các cây thuộc 6 quần thể Thảo quả điển hình tại các tỉnh Việt Nam (Mù Cang Chải - Yên Bái; Văn Bàn, Sa Pa - Lào Cai; Mường Tè, Tam Đường, Tân Uyên - Lai Châu), trong đó có tổng số 36 mẫu được thu (mỗi quần thể gồm 2 - 8 mẫu). Các mẫu lá Thảo quả thu thập là lá bánh tẻ được thu thập tại vị trí thứ 3 tính từ phía trong ra ngoài (trên xuống dưới). Tất cả các mẫu lá được làm khô trong silicagel và để mát ở 4°C.

Bảng 1. Thông tin mẫu Thảo quả thu tại 6 quần thể khu vực miền núi phía Bắc

TT	Ký hiệu	Địa điểm	Số lượng mẫu giống
1	TQ1 - 6	Sa Pa - Lào Cai	6
2	TQ7 - 8	Văn Bàn - Lào Cai	2
3	TQ9 - 15	Mù Cang Chải - Yên Bái	7
4	TQ16 - 28	Mường Tè - Lai Châu	13
5	TQ29 - 32	Tam Đường - Lai Châu	4
6	TQ33 - 36	Tân Uyên - Lai Châu	4

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Tách chiết ADN tổng số:* ADN của các mẫu Thảo quả được tách chiết theo phương pháp phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (1990).

Chất lượng DNA được xác định trên agarose 1% và độ sạch được xác định trên máy Powerpac 300 (Bio-Rad, Mỹ). Sau đó, DNA pha loãng và giữ ở -20°C. Hàm lượng DNA được đo bằng máy Nanodrio Lite (Thermo Scientific).

- *Phản ứng PCR:* Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ) với tổng thể tích là 25 μ l/mẫu trong đó chứa các thành phần và nồng độ của các chất tham gia phản ứng như: *GoTaq Green Master Mix 2X* 12,5 μ l, *mồi xuôi* 1 μ l, *mồi ngược* 1 μ l có nồng độ 10 mM, *mẫu DNA* 50 - 100 ng, *bổ sung nước vừa đủ* 25 μ l. PCR được thực hiện với chu trình nhiệt 94°C - 5 phút; 35 chu kỳ với 94°C - 0,45 phút; Ta - 0,3 phút; 72°C - 1 phút; 72°C - 5 phút và kết thúc phản ứng ở nhiệt độ 16 °C. Phản ứng PCR được lặp lại ít nhất 2 lần với mỗi mẫu DNA. Sau đó sản phẩm PCR được điện di trên agarose bằng máy ATTA Compact PAGE - Twin và các phân đoạn được hiển thị nhờ ethidium bromide dưới điều kiện UV.

- *Phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật SSR:* Dựa trên nghiên cứu của Ma và đồng tác giả (2017), lựa chọn 5 cặp mồi phù hợp nhất để tiến hành phân tích đa dạng di truyền nhằm nhân các đoạn lặp lại đơn giản (microsatellite-SSR) trong hệ gen cây Thảo quả cho 36 mẫu nghiên cứu thuộc 6 quần thể nghiên cứu.

Số liệu thu được từ tiêu bản điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide của các mẫu Thảo quả với 5 cặp mồi SSR (bảng 1) được thống kê trên nguyên tắc có hay không xuất hiện băng trên gel điện di và được phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1, từ đó xác định được hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các giống Thảo quả bằng thuật toán UPGMA dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard.

Bảng 2. Thông tin các môi SSR sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự	Đoạn lặp	Size (bp)	Ta (°C)
1	AT1 - F	GCTTCACCTCCAGTTTCC	(GA)14	202	59
2	AT1 - R	GTCCTCCTTGTCACCC			
3	AT5 - F	AATGCAAATGGTGGACG	(GA)16	216	58
4	AT5 - R	GGATAAATCAAAGAGGAGGA			
5	AT29 - F	GAGGAGGCGTGGACTTT	(GA)8	175	58
6	AT29 - R	GGGCTGCTTCTATTTCAT			
7	AT30 - F	TAACGACGAAGGAAACG	(CT)9	184	55
8	AT30 - R	TGAGTAGGAAAGAAGAAAGAA			
9	AT56 - F	AGTTTGAACCTCCCATTT	(CA)6	177	55
10	AT56 - R	ATCTTGAGCTTCGTGCC			

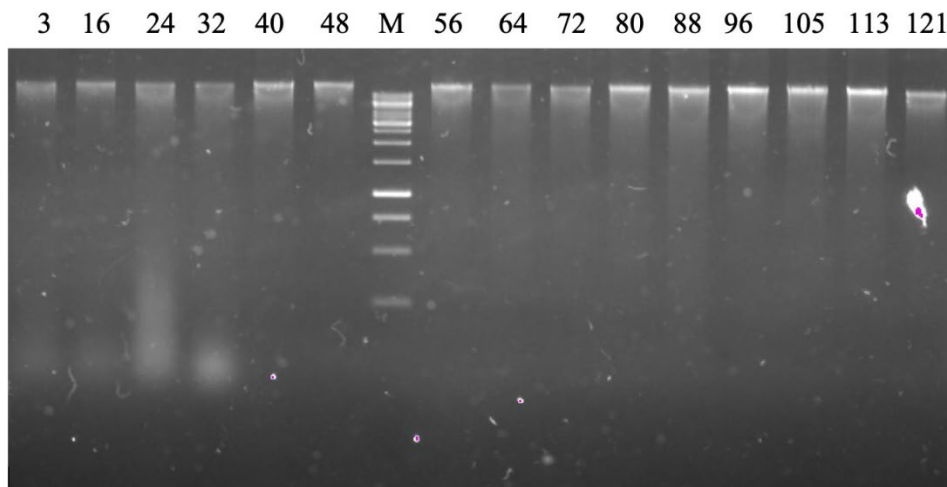
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Kết quả tách chiết DNA tổng số thành công một số mẫu nghiên cứu đại diện trên gel Agarose 1% bao gồm các mẫu 3, 16, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 105, 113 và 121 được minh họa ở hình 1. Do xuất hiện của các băng vạch lẫn tạp chất như các mẫu số 3, 16, 40, 56,

64, 72, và 80 nên được ủ RNase trong thời gian 30 phút ở 37°C.

Kết quả điện di sau khi ủ RNase cho thấy chất lượng DNA tổng số được cải thiện, các tạp chất đã được loại bỏ, hàm lượng DNA thu được là tương đối cao với chất lượng tương đối đồng đều, băng vạch sáng rõ, phù hợp để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Ảnh điện di DNA tổng số trên gel Agarose 1% sau khi ủ RNase
M. Marker DNA 1Kb; 3 - 121: ký hiệu các mẫu DNA thử nghiệm ở các vùng sinh thái nghiên cứu

3.2. Kết quả đo nồng độ DNA tổng số và kiểm tra môi SSR

Kết quả đo nồng độ DNA sau khi ủ RNase ở bảng 3 cho thấy tất các các mẫu đều cho nồng

độ DNA cao trong khoảng từ 940 - 2600 ng/μl và độ tinh sạch đều ở mức từ 1,8 - 2,0 và phù hợp để thực hiện các phản ứng PCR.

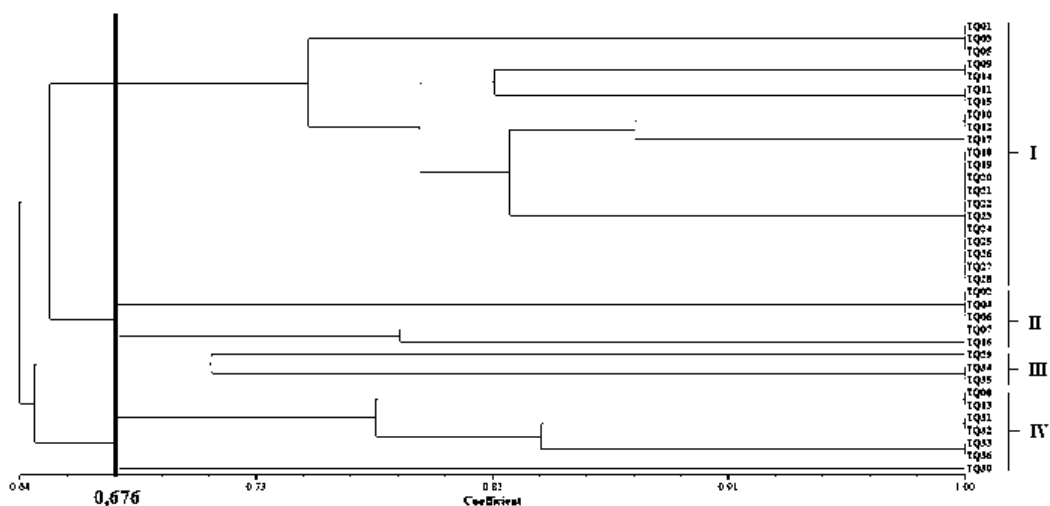
Bảng 3. Nồng độ các mẫu DNA tổng số tách chiết từ lá cây Thảo quả

STT	Tên mẫu	Ký hiệu	Nồng độ ng/ μ l	STT	Tên mẫu	Ký hiệu	Nồng độ ng/ μ l
1	TQ01	3	2341,7	19	TQ19	74	1689,9
2	TQ02	16	1210,9	20	TQ20	75	986,9
3	TQ03	18	1484,5	21	TQ21	76	1258,3
4	TQ04	20	1854,6	22	TQ22	77	986,6
5	TQ05	21	1989,4	23	TQ23	78	2145,8
6	TQ06	23	2154,5	24	TQ24	79	1985,8
7	TQ07	24	1255,6	25	TQ25	80	946,0
8	TQ08	32	1263,4	26	TQ26	81	1250,5
9	TQ09	40	2409,3	27	TQ27	82	1585,8
10	TQ10	48	1523,4	28	TQ28	84	1345,8
11	TQ11	56	1660,8	29	TQ29	88	1394,0
12	TQ12	58	1245,6	30	TQ30	96	2596,3
13	TQ13	60	1852,9	31	TQ31	105	1168,4
14	TQ14	62	2051,9	32	TQ32	108	2154,2
15	TQ15	63	2153,6	33	TQ33	113	1847,2
16	TQ16	64	2087,7	34	TQ34	121	1794,2
17	TQ17	72	1001,5	35	TQ35	123	1859,5
18	TQ18	73	1458,5	36	TQ36	125	2356,8

Như vậy, các mẫu DNA thu được đều có nồng độ thích hợp và độ sạch đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu tiếp theo về đánh giá đa dạng di truyền các mẫu Thảo quả được thu tập tại 6 quần thể.

3.3. Mối quan hệ di truyền và đa dạng di truyền của các mẫu Thảo quả tại 6 quần thể

Mối quan hệ di truyền của 36 mẫu Thảo quả thu tại 6 địa điểm nghiên cứu đã được xây dựng bằng chương trình NTSYSpc 2.1 dựa trên phương pháp phân nhóm UPGMA. Kết quả phân tích đa dạng di truyền giữa các mẫu Thảo quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 36 mẫu Thảo quả tại 6 quần thể nghiên cứu theo hệ số di truyền Jaccard (kiểu phân nhóm UPGMA)

Hệ số tương đồng di truyền của 36 mẫu Thảo quả nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0,46 đến 1,0. Hệ số tương đồng di truyền cao nhất (1,0) là các nhóm mẫu TQ01 - Sa Pa và TQ03 - Sa Pa; TQ01 - Sa Pa và TQ05 - Sapa; TQ09 - Mường Tè và TQ14 - Mù Căng Chải; TQ11 - Mù Căng Chải và TQ15 - Mù Căng Chải; TQ10 - Mù Căng Chải và TQ12 - Mù Căng Chải; TQ02 - Sa Pa và TQ04 - Sa Pa; TQ02 - Sa Pa và TQ06 - Sa Pa; TQ34 - Tân Uyên và TQ35 - Tân Uyên; TQ08 - Văn Bàn và TQ13 - Mù Căng Chải; TQ31 - Tam Đường và TQ32 - Tam Đường; TQ33 - Tân Uyên và TQ36 - Tân Uyên. Hệ số tương đồng di truyền thấp nhất (0,46) là giữa hai giống TQ07 - Văn Bàn và TQ30 - Tam Đường.

Ở mức độ tương đồng di truyền 67,6%, ba mươi sáu mẫu Thảo quả nghiên cứu được chia thành 4 nhóm chính như sau:

+ Nhóm I gồm các mẫu TQ1, TQ03, TQ5 (Sa Pa), TQ09, TQ14, TQ11, TQ15, TQ10, TQ12 (Mù Căng Chải), TQ17, TQ18, TQ19, TQ20, TQ21, TQ22, TQ23, TQ24, TQ25, TQ26, TQ27, TQ28 (Mường Tè).

+ Nhóm II gồm các mẫu TQ02, TQ04, TQ06, TQ07 và TQ16 chủ yếu thuộc các quần thể Sa Pa.

+ Nhóm III gồm các mẫu TQ29, TQ34 và TQ35 chủ yếu thuộc quần thể Tân Uyên

+ Nhóm IV gồm các mẫu TQ08, TQ13, TQ30, TQ31, TQ32, TQ33 và TQ36 thuộc các quần thể Tam Đường và Tân Uyên.

Kết quả trên cho thấy, các mẫu thuộc 6 quần thể phân bố tương đối phù hợp với vị trí địa lý và theo các nhóm mẫu nghiên cứu. Các mẫu thuộc nhóm I và II có khoảng cách di truyền khá xa so với nhóm mẫu III và IV. Trong nhóm

mẫu I và II thì đa phần các mẫu thuộc nhóm mẫu I có vị trí địa lý xa với nhóm mẫu II và cũng tương ứng với vị trí địa lý thu mẫu.

Ba mươi sáu mẫu nghiên cứu có mức độ tương đồng di truyền trung bình và một số mẫu có mức độ tương đồng di truyền thấp, ví dụ như cá thể TQ07 - Văn Bàn và TQ30 - Tam Đường.

Các mẫu có mức độ tương đồng di truyền thấp có thể lý giải là do các cây thu được ở vị trí địa lý xa cách và không có sự giao phấn giữa các cây cũng như không có sự di thực giữa các cây này. Tương tự như vậy, các mẫu có mức độ tương đồng di truyền cao (cùng 1 nhóm mẫu) là do mẫu được thu có khoảng cách địa lý gần nhau và cây có sự giao phấn chéo với nhau hoặc cũng có thể do phương thức nhân giống sinh dưỡng nên từ 1 số cây mẹ ban đầu sau đó giống được nhân giống sinh dưỡng và gây trồng tại các khu vực của cùng địa phương.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

- Hệ số tương đồng di truyền của 36 mẫu Thảo quả nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0,46 đến 1,0. Ở mức độ tương đồng di truyền 67,6%, các mẫu nghiên cứu được chia thành 4 nhóm chính và phù hợp với vị trí địa lý.

- Ba mươi sáu mẫu nghiên cứu có mức độ tương đồng di truyền trung bình và một số mẫu có mức độ tương đồng di truyền thấp.

4.2. Kiến nghị

- Để có cơ sở dữ liệu tốt hơn về mối quan hệ di truyền và mức độ đa dạng di truyền của các quần thể Thảo quả, cần tiến hành thu thập thêm số lượng mẫu tại các quần thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buschmann C., 2007. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Res.*(2007) 92:261 - 271.
2. Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 - 15.
3. Duncan DB, 1995. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1 - 42.
4. Hoàng Văn Lâm, 2004. Góp phần nghiên cứu tính đa dạng và tình hình phát triển Thảo quả tại xã Bán Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai. Luận văn Thạc sĩ Dược học, Đại học Dược Hà Nội, 87 trang.
5. Peter K. V., 2001. Handbook of herb and spices. Volume 1. Chapter 10. Madhusoodanan K. J. and Saideswara Rao Y., Indian Cardamom Research Institute, Kerala, 2001. Cardamom Large. Pulished by CRC Press. Woodhead Publishing Limited, England. Page 134 - 142.
6. Phan Văn Thắng, 2008. Báo cáo nghiên cứu kỹ thuật canh tác Thảo quả bền vững vùng Tây Bắc, Việt Nam, Tổ chức Phát triển Hà Lan.
7. Phan Văn Thắng, 2014. Cẩm nang hướng dẫn kỹ thuật sản xuất Thảo quả bền vững, Tổ chức Phát triển Hà Lan.
8. Rohlf F. J., 1998. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. WH. freeman and company, San Francisco.

Email tác giả liên hệ: phanhanglsng@gmail.com

Ngày nhận bài: 10/12/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 03/01/2023

Ngày duyệt đăng: 05/12/2023