

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN THỊ LIỄU

**“NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG NGUỒN GEN DI TRUYỀN QUẦN
THỂ THÔNG LÁ DỆT (*Pinus krempfii* Lecomte) Ở TÂY
NGUYÊN – LOÀI ĐẶC HỮU CỦA VIỆT NAM”**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - NĂM 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN THỊ LIỄU

Đề tài :

**“NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG NGUỒN GEN DI TRUYỀN QUẦN
THỂ THÔNG LÁ ĐỆT (*Pinus krempfii* Lecomte) Ở TÂY
NGUYÊN – LOÀI ĐẶC HỮU CỦA VIỆT NAM”**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn: PGS. TS. Đinh Thị Phòng

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

MỞ ĐẦU

Tây Nguyên là một trong những vùng giàu loài lá kim nhất Việt Nam. Hầu hết những loài lá kim ở Tây Nguyên đều là những loài có giá trị khoa học và kinh tế cao. Nhiều loài đang đứng trước nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng, trong đó có loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) hay còn gọi là Thông hai lá dẹt, Thông Sri, Thông Sré, là loài đặc hữu hẹp của Việt Nam [4]. Đây là nguồn gen quý và độc đáo của với lá hình dải mác không hình kim như các loài Thông khác [32], [33]. Gỗ Thông lá dẹt mềm, ít nhựa, màu từ trắng đến vàng nhạt, nhẹ, có nhiều đặc tính kỹ thuật tốt. Hiện nay các rừng Thông lá dẹt đang bị đe dọa nghiêm trọng do tình trạng phá rừng làm nương rẫy, nhiều cây bị mất môi trường sinh sống tối ưu nên chết rụi, một số cây quá già cũng tự đổ gãy dẫn đến suy giảm số lượng loài nghiêm trọng. Tái sinh tự nhiên hầu như chỉ hạn chế ở giai đoạn cây mầm, lại gặp chủ yếu ở nơi có khoảng trống, ven đường. Mặt khác lại thiếu vắng các cây tái sinh ở tuổi trung gian, nên khó đủ sức thay thế những cánh rừng Thông lá dẹt cổ thụ đang tồn tại [5], [6]. Theo Quy Bảo tồn Thiên nhiên quốc tế (IUCN) 2013 Thông lá dẹt được xếp vào bậc sắp bị tuyệt chủng VU A2c, B1ab (iii) [65]. Vì vậy, việc bảo tồn hiệu quả nguồn gen Thông lá dẹt là nhiệm vụ cấp bách đặt ra cho các nhà nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây mới chỉ tập trung vào việc phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và nơi phân bố, còn các nghiên cứu về đa dạng di truyền nguồn gen vẫn rất hạn chế và mới chỉ tập trung cho một số loài [7], [8], [46]. Đặc biệt các dẫn liệu về đa dạng nguồn gen di truyền, các trình tự nucleotide đặc trưng cho loài Thông lá dẹt hầu như chưa được nghiên cứu.

Với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học hiện đại, nhiều loại chỉ thị phân tử đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen làm cơ sở cho nghiên cứu bảo tồn và tái tạo nguồn gen ở đối tượng sinh vật nói chung và ở các loài cây lá kim nói riêng [7], [10], [29], [34], [56], [68]. Trong các loại chỉ thị thì chỉ thị ISSR (Internal Sequence Simple Repeat) và SSR (Sequence Simple Repeat) đang được ứng dụng rộng rãi và có hiệu quả trong việc đánh giá đa dạng di truyền ở cả mức độ quần thể và loài. Hơn nữa, phân tích phân tử và nhận dạng vùng gen đặc

trung cũng được sử dụng rộng rãi trên thế giới và cả ở Việt Nam để đánh giá các mô hình đa dạng di truyền ở thực vật và kỹ thuật này có lợi thế tiềm năng cho việc điều tra thực vật quý hiếm. Vì thế đến nay đã có một số công trình nghiên cứu công bố về hiệu quả cao của phân tích phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xác định trình tự nucleotide vùng gen đặc trưng cho một số loài lá kim của Việt Nam [2], [3], [7]. Điển hình là công bố của Vũ Đình Duy và cộng sự (2010) về việc sử dụng chỉ thị ISSR và SSR đánh giá đa dạng di truyền của 4 loài lá kim là Pơ mu (*Fokienia hodginsii*), Sa mộc dầu (*Cunninghamia lanceolata* var. *konishii*), Hoàng đàn hữu liên (*Cupressus tonkinensis*) Thủy tùng (*Glytostrobus pensilis*) và giải mã trình tự vùng gen 18S đã chỉ ra hai loài Pơ mu và Sa mộc dầu có mức độ suy giảm cao hơn loài Thủy tùng và Hoàng đàn hữu liên. Kết quả giải mã trình tự vùng gen 18S còn cho phép giải quyết vấn đề tồn tại về taxon của Sa mộc dầu (*Cunninghamia lanceolata* var. *konishii*). Tương tự, Đinh Thị Phòng và cộng sự (2009), Vũ Thị Thu Hiền và cộng sự (2009) cũng đã sử dụng chỉ thị RAPD, ISSR và cpSSR để nghiên cứu mối quan hệ di truyền loài Pơ mu, Bách xanh phục vụ cho công tác bảo tồn. Hiện nay trong ngân hàng Genbank (2014) đã lưu giữ trên 884.000 trình tự nucleotide cho các loài lá kim (conifers), tập trung vào hai vùng gen chính là nhân (*ITS*) và vùng gen lục lạp (cpDNA), làm cơ sở cho xác định trình tự nucleotide đặc trưng cho loài Thông lá dẹt.

Xuất phát từ các cơ sở khoa học trên đây, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu đa dạng nguồn gen di truyền quần thể Thông lá dẹt tự nhiên (*Pinus krempfii* Lecomte) ở Tây Nguyên - loài đặc hữu của Việt Nam**” với các mục tiêu và nội dung nghiên cứu sau:

- Xác định mức độ đa dạng nguồn gen di truyền cho 4 quần thể Thông lá dẹt tự nhiên thu tại các tỉnh ở Tây Nguyên bằng chỉ thị SSR và ISSR.
- Xác định trình tự nucleotide đặc trưng tại 3 vùng gen (2 vùng gen lục lạp và 1 vùng gen nhân) cho loài Thông lá dẹt ở Tây Nguyên.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu tổng quát về loài Thông lá dẹt

1.1.1. Vị trí phân loại

Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) còn gọi là Thông hai lá dẹt hay Thông Sri, Thông Sré, là loài đặc hữu của Việt Nam, phân bố ở các tỉnh Khánh Hòa, Lâm Đồng, Đắk Lắk và Ninh Thuận. Theo phân loại khoa học, Thông lá dẹt thuộc:

Giới (*regnum*): Plantae

Ngành (*phylum*): Pinophyta

Lớp (*class*): Pinopsida

Bộ (*order*): Pinales

Họ (*familia*): Pinaceae

Chi (*genus*): *Pinus*

1.1.2. Một số đặc điểm sinh học chính và giá trị bảo tồn loài Thông lá dẹt

Theo đánh giá của các nhà khoa học trong và ngoài nước, Thông lá dẹt là loài cổ sinh vật hiếm hoi còn sót lại cho đến ngày nay, với chiều cao lên đến 30 m, đường kính có thể đạt 1,5 - 1,6 m, đôi khi tới 2 m [47]. Tán của cây thường khá rộng, dày, sẫm màu và có hình rẻ quạt. Đoạn thân dưới cành lớn, hầu như không có cành nhánh, tròn đều và mọc thẳng lên (Hình 1.1). Nón xuất hiện vào tháng 4 - 5 và tồn tại trên cây trong một thời gian dài. Hạt chín vào tháng 7- 10, màu nâu nhạt và có cánh trắng. Khi chín, hạt có thể phát tán trong một phạm vi tương đối rộng. Cây mầm thường có khoảng 10 - 13 lá mầm đầu tiên có hình xoắn cong về một hướng như lưỡi liềm, lá dài khoảng 2 - 3 cm, sau đến là các lá nhỏ mọc quanh thân, dài 1,5 - 2,5 cm. Khi cây còn non, lá dài và rộng bản (dài 10 - 15 cm) xếp như hai lưỡi kéo ở phần đầu cành. Khi cây trưởng thành, lá nhỏ và ngắn lại (dài 4 - 5 cm), màu sẫm, mọc tập trung ở đầu cành, làm cho tán cây thông già trở nên dày và sẫm màu hơn. Đặc điểm đặc trưng nhất là lá hình dải mác nhọn đầu, dẹt [32], [33].



Hình 1.1. Hình ảnh cây Thông lá dẹt ở Lâm Đồng (A: cây trưởng thành; B: nón quả; C: cây tái sinh) (ảnh Nguyễn Tiến Hiệp)

Gỗ Thông lá dẹt mềm, ít nhựa, màu từ trắng đến vàng nhạt, nhẹ, có nhiều đặc tính kỹ thuật tốt có thể sử dụng trong công nghiệp và xây dựng. Theo IUCN (2013), Thông lá dẹt được đánh giá mức sắp bị tuyệt chủng (VU A2c B1ab (iii)). Hiện nay, các rừng Thông lá dẹt đang bị đe dọa nghiêm trọng do tình trạng phá rừng làm nương rẫy, nhiều cây bị mất môi trường sống tối ưu nên chết rụi, một số cây quá già cũng tự đổ gãy. Tái sinh tự nhiên hầu như chỉ hạn chế ở giai đoạn cây mầm, lại gặp chủ yếu ở nơi có khoảng trống, ven đường. Mặt khác lại thiếu vắng các cây tái sinh ở tuổi trung gian, nên khó đủ sức thay thế những cánh rừng Thông lá dẹt cổ thụ đang tồn tại [5], [6].

1.1.3. Tình hình phân bố Thông lá dẹt ở Tây Nguyên

Phân bố trong nước: Loài đặc hữu hẹp của tiểu vùng địa lý thực vật Nam Trường Sơn, phân bố chủ yếu tại tỉnh Lâm Đồng và một số vùng giáp ranh thuộc các tỉnh lân cận như Đắk Lắk, Khánh Hòa và Ninh Thuận.

Phân bố thế giới: không gặp bất kỳ nơi nào trên thế giới ngoài Việt Nam.

Thông lá dẹt thường mọc ở độ cao từ 1000 đến 2000 m so với mực nước biển, trong những khu rừng khép tán thường xanh, xen với những cây họ Đậu và họ Long não. Loài thường mọc trên đỉnh hoặc sườn núi nơi có lớp đất ẩm và tầng mùn dày [4], [36]. Căn cứ vào các dẫn liệu thu thập được qua khảo sát, nghiên cứu ở các điểm còn rừng nguyên sinh ở hầu khắp nước ta và đối chiếu với tiêu chuẩn của các thứ hạng trong Danh lục đỏ của IUCN, thoạt đầu thấy vài tiêu chuẩn loài chưa đến mức bị đe dọa tuyệt chủng (sự suy giảm quần thể trong quá khứ, hiện tại nhiều nhất < 30%, EOO < 5.000 km², AOO < 500 km², số lượng tiểu quần thể ≤ 10, và hầu hết các tiểu quần thể đều nằm trong các Khu bảo tồn thiên nhiên, Khu du lịch sinh thái hay ở các vùng núi xa xôi chưa bị lâm tặc vào chặt trộm). Tuy nhiên trong khoảng 5 năm gần đây ở hai tiểu quần thể quan trọng nhất đều thuộc VQG Bi Đúp - Núi Bà gồm các cây gỗ to lớn ở dọc đường giao thông mới xây dựng từ Khánh Hòa đi lên Đà Lạt qua VQG Bi Đúp - Núi Bà và đường giao thông đang xây dựng ở Đông Trường Sơn (từ Đà Lạt ra Quảng Nam) xuất hiện nguy cơ bị lâm tặc chặt hạ và vận xuất nên ở thời điểm hiện tại việc xếp loài vào thứ hạng sẽ nguy cấp **VU A2a,c,d, A3a,c,d, B2a,c, C1** là hợp lý nhất [4].

1.2. Đa dạng di truyền quần thể thực vật

1.2.1. Khái niệm về quần thể thực vật

Quần thể được định nghĩa là tập hợp một nhóm cá thể của một loài trong một nơi sống cụ thể, chúng độc lập với các quần thể khác về quan hệ sinh sản [1]. Di truyền quần thể được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác, và bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như kích thước quần thể, sức sinh sản, khả năng sống sót, phương thức sinh sản, trao đổi và đột biến di truyền. Kích thước quần thể là kết quả của sự tương tác phức tạp liên quan đến các điều kiện môi trường sống và các đặc tính quần thể của loài. Kích thước quần thể đóng vai trò quan trọng liên quan đến phương thức sinh sản, di truyền và tiến hoá. Nguồn gốc tiến hoá thường liên quan đến cá thể lai (thế hệ tiếp theo) trong quần thể và loài. Thụ phấn chéo có thể sản sinh những cá thể lai đa dạng. Cấu trúc di truyền của những cá thể này đóng góp vào tính đa dạng trong

quần thể và duy trì khả năng thích nghi cao của quần thể trong nhiều môi trường sống.

Tác động của con người đến môi trường sống thường dẫn đến sự phá vỡ cấu trúc quần thể hình thành những quần thể nhỏ, cô lập và dẫn đến làm suy giảm khả năng thích nghi của quần thể với môi trường sống. Trong quần thể, thế hệ sau được sản sinh bằng thụ phấn cận loài sẽ dẫn đến sự khác biệt về di truyền giữa các quần thể là lớn và làm tăng tần số gen đồng hợp tử trong các quần thể nhỏ.

1.2.2. Tính đa dạng di truyền quần thể thực vật

Đa dạng sinh học thường đề cập đến mức độ khác nhau của các dạng sống bao gồm các cá thể động vật, thực vật, vi sinh vật và được biểu hiện từ mức độ phân tử đến hệ sinh thái. Công ước quốc tế về Đa dạng sinh học (1994) đã xác định đa dạng sinh học bao gồm 3 cấp: (i) đa dạng trong loài (đa dạng di truyền hay đa dạng nguồn gen), (ii) đa dạng giữa các loài (đa dạng về thành phần loài hay đa dạng loài) và (iii) đa dạng hệ sinh thái. Đa dạng sinh học là kết quả của quá trình tiến hoá tự nhiên trải qua hàng triệu năm, bao gồm cả 3 mức độ hệ sinh thái, loài và di truyền. Lý thuyết tiến hoá trên cơ sở chọn lọc tự nhiên của Darwin đã dự đoán rằng đa dạng di truyền là thành phần chính của đa dạng sinh học. Đa dạng di truyền hay còn gọi là đa dạng gen (đa dạng DNA), là tập hợp những biến đổi của các gen và các kiểu gen trong nội bộ của một loài. Đây là sự đa dạng quan trọng nhất, quyết định một loài có thể tồn tại lâu dài trong tự nhiên hay không. Tính đa dạng này, vì thế đã và đang là nguồn cung cấp vật liệu cho các chương trình chọn tạo và cải tiến giống [1]. Đa dạng di truyền cho phép các cá thể và loài xử lý trước những biến đổi bất lợi của môi trường sống và có khả năng tự phục hồi trong môi trường sống của chúng. Như vậy, đa dạng di truyền được đề cập đến như là mức độ đa hình của mỗi cá thể trong suốt thời gian sống của nó, hoặc được phản ánh bởi số alen của quần thể tại một vị trí địa lý trong một khoảng thời gian cụ thể hoặc số alen của một loài trong phạm vi phân bố địa lý và lịch sử tồn tại của nó.

1.2.3. Một số kỹ thuật sinh học phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền ở thực vật

a) Kỹ thuật isozyme

Kỹ thuật isozyme là kỹ thuật nghiên cứu sự đa hình enzyme. Phương pháp này được Hunter và Market đưa ra từ năm 1957, sau đó Harris hoàn thiện vào năm 1966 và bắt đầu được sử dụng phổ biến từ thập niên 70 đến nay. Mặc dù hiện nay có nhiều kỹ thuật phân tử phát triển nhưng kỹ thuật isozyme vẫn được sử dụng vì cách thức thực hiện tương đối nhanh, chi phí thấp, thích hợp cho các nghiên cứu xác định mức độ biến đổi di truyền ở cấp độ thấp. Ngoài ra việc kết hợp kỹ thuật isozyme với các kỹ thuật nghiên cứu đa hình DNA cho phép phân tích, so sánh những đặc tính bền vững (hoặc thay đổi) theo điều kiện khác nhau của môi trường [9].

b) Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Kỹ thuật RAPD được hai nhóm nghiên cứu của Welsh và Clelland (1991) và Williams và cộng sự (1990) đồng thời xây dựng [70], [71]. Kỹ thuật này dựa trên ứng dụng kỹ thuật PCR sử dụng các mồi đơn có trình tự ngẫu nhiên gồm khoảng 10 nucleotide. Số lượng các đoạn DNA được nhân bản phụ thuộc vào độ dài và vị trí các đoạn mồi, kích thước và cấu trúc DNA genome. Sự đa hình của kỹ thuật RAPD nói chung là do đột biến ở vị trí gắn mồi làm ngăn trở đến việc bắt cặp của mồi. Kết quả là sau khi điện di sản phẩm RAPD – PCR sẽ phát hiện được sự khác nhau trong phổ các phân đoạn DNA được nhân bản. Sự khác nhau đó gọi là tính đa hình chiều dài sản phẩm PCR.

Kỹ thuật RAPD thao tác nhanh, đơn giản, giá thành thấp, dễ thực hiện do không cần biết trước trình tự bộ gen của đối tượng cần nghiên cứu, sử dụng lượng nhỏ DNA khuôn, chất lượng DNA khuôn không cần độ tinh sạch quá cao. Tuy nhiên chỉ thị RAPD là chỉ thị trội do đó những kiểu gen lặn quy định tính trạng nào đó sẽ khó phát hiện sự đa hình khi điện di sản phẩm [13], [72]. Kỹ thuật RAPD có độ chính xác không ổn định (thể hiện ở mức độ lặp lại giống nhau thấp) [9], [10].

c) Kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Đây là kỹ thuật dựa trên tính đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn, do Botstein và cộng sự (1980) xây dựng vào năm 1980 để lập bản đồ di truyền ở người [15]. Kỹ thuật này dựa trên đặc điểm của các enzyme giới hạn khác nhau, tạo nên

các đoạn cắt DNA khác nhau phân biệt được bằng điện di đồ. Số lượng các đoạn này phụ thuộc vào số điểm nhận biết của enzyme giới hạn trong hệ gen, các đoạn cắt còn được gọi là các “dấu vân tay” đặc trưng cho từng phân tử DNA. DNA của mẫu nghiên cứu sau khi được tách chiết và tinh sạch sẽ được cắt với cùng một số loại enzyme giới hạn. Tính đa hình độ dài được phát hiện nhờ đánh dấu phóng xạ các mẫu dò DNA bổ sung tạo ra từ cùng một locus. Chỉ thị RFLP thường được ứng dụng trong một số lĩnh vực như: nghiên cứu sự đa dạng của bộ genome, xây dựng bản đồ di truyền, xác định mức độ liên kết với các tính trạng nông sinh học, xác định con lai F1 trong lai hữu tính và lai tế bào trần, cũng như khả năng có chứa gen bất dục tế bào chất, bất dục đực nhân mẫn cảm với nhiệt độ và ánh sáng, tìm dãy alen tự bất hợp, gen phục hồi và gen duy trì. Tuy nhiên kỹ thuật này có nhược điểm là quy trình phức tạp, cồng kềnh, tốn kém và sử dụng chất đồng vị phóng xạ gây nguy hiểm cho người thao tác thí nghiệm.

d) Kỹ thuật AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Kỹ thuật AFLP được hiểu là sự đa dạng của các đoạn DNA được nhân lên có định hướng sau khi bị cắt bởi các enzyme giới hạn. Nguyên tắc của kỹ thuật này tương tự như kỹ thuật RAPD nhưng mỗi được sử dụng ở đây bao gồm một phần cố định dài hơn (5bp) chứa vị trí nhận biết của enzyme giới hạn và một phần thay đổi ngắn (2-4bp). Phần cố định dài tạo ra sự ổn định của sản phẩm được nhân lên, phần thay đổi ngắn sẽ tạo ra nhiều locus, có thể lên đến hơn 100 locus được nhân lên với mỗi AFLP đơn. AFLP phát hiện sự khác nhau của các đoạn DNA bởi sự nhân có chọn lọc các trình tự DNA hệ gene đã được cắt (bởi enzyme giới hạn) và được gắn với đoạn tiếp hợp (adapter). Phương pháp cho phép sàng lọc đồng thời một số lượng lớn các chỉ thị không có nghĩa. Sự đa hình được xác định bởi sự có mặt hoặc không có mặt của một phân đoạn DNA. Phương pháp AFLP kết hợp được những ưu điểm của RFLP và RAPD nên có hiệu quả trong phát hiện và phân tích đa hình một cách nhanh chóng, ổn định và đáng tin cậy. Tuy nhiên chi phí và yêu cầu chuyên môn kỹ thuật để thực hiện phân tích AFLP là rất cao nên phương pháp này ít được sử dụng để nghiên cứu phân loại học phân tử mà chủ yếu được sử dụng trong việc thiết lập bản đồ di truyền các tính trạng số lượng [72].