

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

HỒ MẠNH TƯỜNG

**ỨNG DỤNG KỸ THUẬT METAGENOMICS TRONG NGHIÊN CỨU HỆ
VI SINH VẬT VÙNG RỄ CÂY DÓ BÀU TẠI MỘT SỐ TỈNH CỦA VIỆT
NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC
(Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm)

HÀ NỘI, 2015

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

HỒ MẠNH TƯỜNG

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC
(Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm)

Mã số: 60 42 01 14

Người hướng dẫn: **PGS.TS. LÊ VĂN SƠN**

Đơn vị: Viện Công nghệ sinh học

Hà Nội, 2015

MỞ ĐẦU

Metagenomics là một ngành nghiên cứu mới, độc đáo và có thể áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực Sinh học và Công nghệ sinh học. Công nghệ metagenomics kết hợp với kỹ thuật gen, kỹ thuật protein sẽ cung cấp các hiểu biết sâu sắc về các vấn đề trong tiến hóa gen hoặc thông tin về các sinh vật mà hiện nay vẫn đang là bí ẩn vì chúng khó có thể được nuôi cấy trong các phòng thí nghiệm.

Môi trường đất rất phức tạp khi nghiên cứu số lượng và sự đa dạng các loài trong hệ vi sinh vật. Dựa trên việc phân lập DNA từ một vài mẫu đất khác nhau, số lượng các sinh vật nhân sơ được xác định từ khoảng 2000 đến 18000 bộ gen trên một gram đất. Số lượng này là rất thấp bởi vì các bộ gen của các loài hiếm và chưa được biết đến đã bị loại ra trong quá trình phân tích. Do đó, số lượng và sự đa dạng của các sinh vật nhân sơ trong 1 gram đất phải lớn hơn rất nhiều. Trong khi đó, phương pháp nuôi cấy trực tiếp hoặc không trực tiếp để khám phá và khai thác sự đa dạng của hệ vi sinh vật có trong đất. Nuôi cấy và phân lập DNA của vi sinh vật là phương pháp phổ biến nhưng chỉ được từ 0,1 đến 1% vi sinh vật là có thể được nuôi cấy sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn, vì vậy sự đa dạng của hệ vi sinh vật vẫn chưa được khám phá hết.

Cây dó bầu (*Aquilaria spp.*) thuộc chi Trâm họ Trâm, bộ Bông là lớp Cây gỗ lớn thuộc ngành Mộc Lan. Chi Trâm có tất cả 25 loài khác nhau phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới từ Ấn Độ đến Đông Nam Á và miền Nam Trung Quốc.

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

Tại Việt Nam, dó bầu phân bố rải rác trong rừng rậm nhiệt đới thường xanh, rừng ẩm nguyên sinh. Trâm hương được sử dụng để chữa một số bệnh hiểm nghèo, có tác dụng kháng khuẩn, có tính kháng sinh. Giá trị quan trọng nhất của cây dó bầu là nguồn vật liệu sinh trâm hương. Trâm hương được coi là một loại lâm sản ngoài gỗ có giá trị thương mại quốc tế nhất. Trên thế giới, Trâm hương được sử dụng để chưng cất tinh dầu trâm, một chất quan trọng cho ngành công nghiệp mỹ phẩm cao cấp. Tinh dầu trâm có giá trị đặc biệt, được dùng trong công nghệ chế biến các loại chất thơm, các loại nước hoa cao cấp, giá trị.

Hệ vi sinh vật vùng rễ đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của cây dó bầu. Tuy nhiên, vai trò của chúng chưa được nghiên cứu kỹ cũng như chưa có một nghiên cứu nào về sự tác động của hệ vi sinh vật đến khả năng tạo trâm. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào sử dụng kỹ thuật mới metagenomic để nghiên cứu hệ vi sinh vật vùng rễ cây dó bầu để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Mục tiêu nghiên cứu

- Xác định được thành phần giới, họ, chi, loài của các mẫu nghiên cứu
- So sánh sự giống và khác nhau của các mẫu nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu

- Phân lập DNA tổng số từ đất của các mẫu nghiên cứu
- Gắn adapter với mỗi mẫu nghiên cứu
- Xác định trình tự 16S của các mẫu nghiên cứu
- Xác định độ đa dạng của các mẫu nghiên cứu
- Xác định thành phần giới, họ, chi của các mẫu nghiên cứu
- So sánh thành phần giới, họ, chi của các mẫu nghiên cứu.

I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Cây dó bầu và khả năng tạo trầm

1.1.1. Nguồn gốc, phân bố

Cây dó bầu (*Aquilaria spp.*) thuộc chi Trâm (*Aquilaria*), họ Trâm (*Thymelaeaceae*), bộ Bông (*Malvales*), lớp Cây gỗ lớn thuộc ngành Mộc Lan. Chi Trâm có tất cả 25 loài khác nhau, tuy nhiên chỉ có 15 loài có khả năng cho trầm hương gồm: *Aquilaria crassna*; *A.baillonii*; *A.sinensis* hoặc *A.chinesis*; *A.borneensis* ; *A.malaccensis* ; *A.gollocha* ; *A.hirta*; *A.rostrata*; *A.beccariana*; *A.cummingiana*; *A.filaria*; *A.khasiana*; *A.microcarpa*; *A.grandiflora*; *A.bancana*; *A.rugosa*, trong đó loài *A.rugosa* được Kiet và cộng sự phát hiện năm 2005 (Kiet *et al.*, 2005).

Chi Trâm phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới từ Ấn Độ đến Đông Nam Á và miền Nam Trung Quốc. Tại Việt Nam, dó bầu phân bố rải rác trong rừng rậm nhiệt đới thường xanh, rừng ẩm nguyên sinh thuộc các tỉnh Tuyên Quang, Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh, đặc biệt là từ Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng, Quảng Ngãi, Bình Định, Ninh Thuận, Bình Thuận đến Tây Nguyên, An Giang, Kiên Giang và đảo Phú Quốc (Hình 1, Danh lục các loài thực vật Việt Nam). Trâm hương phân bố tại Việt nam có 4 loài là:

Sơ hòa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

Trâm hương (*A. crassna* Pierre ex Lecomte); dó baillon (*A. baillonii* Pierre ex Lecomte), dó bana (*A. banaensae*.Phamhoang.) (Phạm Hoàng Hộ 1992) và dó quả nhăn (*A. rugosa* L.C. Kiet & Krbler) (Lê Công Kiệt *et al.*, 2005). Trong đó, cây dó bầu *A. crassna* là loài được trồng phổ biến nhất vì khả năng loại trâm tốt nhất thế giới (Hoàng Cảnh 2006). Các loài dó baillon (*A. baillon*), dó bana (*A. banaensae*) và dó quả nhăn (*A. rugosa*) đều là đặc hữu có thể bắt gặp tại một vài địa điểm thuộc Quảng Trị, Thừa Thiên Huế và Quảng Nam. Trong kho đó, dó quả nhăn (*A. rugosa*) là loài mới được phát hiện tại Kon Tum.



Hình 1.1. Phân bố dó bầu tại Việt Nam

Hiện nay, các cá thể trưởng thành của trâm hương cơ bản bị tuyệt diệt trong tự nhiên. Vùng trọng điểm gây trồng cây dó trâm hiện nay ở nước ta là Bán Trung Bộ, Nam Trung Bộ, Tây Nguyên, Đông Nam Bộ, và Tây Nam Bộ. Trong đó, vùng Bắc Trung Bộ tập trung chủ yếu tại Hà Tĩnh, vùng Nam Trung Bộ tập trung chủ yếu tại Quảng Nam, vùng Tây Nguyên chủ yếu tập trung tại Kon Tum, Đông Nam Bộ tập trung chủ yếu tại Bình Phước, Tây Nam Bộ tập trung chủ yếu tại Kiên Giang và An Giang.

1.1.2. Giá trị kinh tế, dược liệu và sinh thái

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

Giá trị kinh tế: Giá trị quan trọng nhất của cây dó bầu là nguồn vật liệu sinh trầm hương. Trầm hương được coi là một loại lâm sản ngoài gỗ có giá trị thương mại quốc tế nhất. Trên thế giới, Trầm hương được sử dụng để chưng cất tinh dầu trầm, một chất quan trọng cho ngành công nghiệp mỹ phẩm cao cấp. Tinh dầu trầm có giá trị đặc biệt, được dùng trong công nghệ chế biến các loại chất thơm, các loại nước hoa cao cấp, giá trị. Theo công ước về buôn bán quốc tế những loài động thực vật hoang dã nguy cấp, khối lượng mua bán trầm hương trên thị trường thế giới thời kỳ 1995 – 1997 khoảng 1.350 tấn. Giá mua bán Trầm hương được tính theo kg tùy thuộc vào chất lượng. Giá bán Trầm tại thị trường Dubai (Arabia Saudi) vào năm 1993 dao động từ 27 đô la Mỹ/kg (loại thấp nhất) đến 10.000 đô la Mỹ/kg (loại tốt nhất) (Barden *et al.*, 2000).

Giá trị dược liệu: Trong y học, trầm hương còn được sử dụng để chữa một số bệnh hiểm nghèo, chữa các bệnh đau bụng, đau ngực, nôn mửa, hen suyễn, lợi tiểu, giảm đau, trấn tĩnh, hạ sốt, cầm máu, thổ huyết, khó thở, kích dục... Trầm hương có tác dụng kháng khuẩn, đặc biệt là với các loại khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* và *Shigella flexneri*, có tính kháng sinh, tạo kháng thể mạnh (diệt khuẩn, làm lành vết thương), có tác dụng chữa một số bệnh như bệnh về tim mạch (suy tim, đau ngực), bệnh về hô hấp (hen suyễn), bệnh về thần kinh (an thần, mất ngủ, giảm đau, trấn tĩnh...), bệnh về tiêu hoá (đau bụng, buồn nôn, tiêu chảy), bệnh về tiết niệu (bí tiểu tiện). Đặc biệt có thể dùng trầm hương để chữa ung thư tuyến giáp.

Giá trị sinh thái: Đối với môi trường sinh thái và phát triển bền vững, việc đưa dó bầu (*Aquilaria sp.*) vào cơ cấu cây rừng với mục tiêu 5 triệu hecta rừng tại tỉnh Hà Tĩnh nói riêng và trong cả nước nói chung đã góp phần thúc đẩy tăng độ che phủ của rừng, chống xói mòn đất và bảo vệ môi trường. Cây dó bầu góp phần bảo tồn và phát triển loài cây đặc hữu, quý hiếm, có giá trị về khoa học và

kinh tế của nước ta, đây còn là giải pháp phù hợp với quy luật sản xuất đi đôi với bảo vệ môi trường, kết hợp lợi ích trước mắt với lợi ích lâu dài, làm giàu trên cơ sở khai thác và tái tạo lợi thế đặc hữu, ưu việt của tài nguyên quốc gia. Hơn nữa, cây dó bầu còn có ý nghĩa tạo công ăn việc làm cho người lao động, mở ra hướng phát triển kinh tế bền vững cho nông thôn, vùng sâu vùng xa (Thái Thành Lượm 2009).

1.1.3. Khả năng sinh trâm của dó bầu

Sự tạo trâm trong tự nhiên của cây dó bầu là sự biến đổi của các phân tử gỗ do tác động bệnh lý bởi vết nứt gãy, sự xâm nhập của các loài nấm... Có 3 giả thuyết tồn tại đến sự tạo trâm liên quan đến các tác nhân bệnh lý, thương tích bệnh lý hoặc thương tích không bệnh lý (Ng et al., 1997). Kết quả của nghiên cứu không cung cấp được bằng chứng thuyết phục là tác nhân nào trong số 3 tác nhân trên tác động đến sự tạo trâm của cây. Ngoài ra, nghiên cứu của Oldfield et al. (1998) cho rằng quá trình tạo trâm có liên quan đến sự đáp ứng của cây với nấm. Hơn nữa, Heuveling và Phillips (1999) cho rằng nó liên quan đến đáp ứng với thương tích. Nghiên cứu cho rằng sự xâm nhiễm của nấm có thể làm tăng sự tạo trâm cũng như sự đáp ứng của tế bào chủ với vết sự phát triển của nấm xâm nhiễm. Dó bầu có thể được xâm nhiễm tự nhiên bởi một vài các loại nấm như: *Aspergillus* spp, *Botryodiplodia* spp, *Diplodia* spp, *Fusarium bulbiferum*, *F. laterium*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium* spp, and *Pythium* spp. (Anon 1998; Soehartono and Mardiasuti 1997; Wiriadinata 1995). Sự tương tác giữa tế bào chủ với nấm hay các tác nhân khác để tạo thành trâm vẫn chưa được nghiên cứu kỹ. Sự tương tác này xảy ra một cách tự nhiên năm này sang năm khác. Căn cứ vào sự hóa nhựa nhiều hay ít mà có những sản phẩm như: Tóc, Trâm hương và Kỳ nam. Thực tế cho thấy những cây dó bầu sau khi chết rục thì lượng Kỳ nam hoặc Trâm hương thường được phát hiện ở phần gốc rễ, nơi thường tiếp

xúc với hệ sinh vật đất. Đây cũng có thể là tác nhân sinh học gây bệnh tạo trầm hương.

Trên cơ chế hình thành trầm trong tự nhiên, 3 kỹ thuật cấy tạo trầm nhân tạo phổ biến được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu là: phương pháp vật lý (gây vết thương cơ giới); phương pháp hóa học (xúc tác hóa chất); phương pháp sinh học (xử lý với men vi sinh). Ngoài ra, một số cách tạo trầm khác như: kết hợp một số phương pháp trên với nhau. Kết quả mỗi phương pháp tạo trầm hương khác nhau về số lượng, chất lượng, thời gian và chi phí, nhưng hiệu quả tạo trầm chưa cao, như kỳ vọng của các nhà sản xuất. Hiệu quả tạo trầm thấp là do cơ chế và sự tương tác các tác nhân (đặc biệt tác nhân sinh học) của việc sinh tạo trầm trong tự nhiên vẫn chưa được làm rõ. Hơn nữa, trong những năm gần đây các nghiên cứu tạo các chromone *in vitro* (thành phần chính trong tinh dầu trầm) từ nuôi cấy huyền phù tế bào của dó bầu đã thu được các kết quả khả quan ban đầu (Qi *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2005).

1.2. Ứng dụng Công nghệ metagenomics trong nghiên cứu hệ vi sinh vật

1.2.1. Vai trò của hệ vi sinh vật đối với môi trường và cây trồng

Các vi sinh vật đóng vai trò to lớn đối với các sinh vật sống trên trái đất. Sự đa dạng của hệ vi sinh vật phản ánh sự phong phú về chức năng, cung cấp các thành phần cần thiết cho tất cả các dạng sống tồn tại. Các vi sinh vật tham gia vào hầu hết các chu trình sinh, hóa học trên tái đất từ xử lý rác thải tới thúc đẩy sự tăng trưởng và sinh sản của thực vật, động vật. Hơn nữa, vi sinh vật cung cấp cho con người các sản phẩm như: thuốc, các loại sản phẩm lên men và góp phần vào việc duy trì sức khỏe. Chỉ gần đây các nhà vi sinh vật học mới đánh giá chính xác sự đa dạng trong hệ vi sinh vật do nhiều vi sinh vật không thể được nuôi cấy trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả dẫn đến các nhà vi

sinh vật rất khó để tìm hiểu về các hệ vi sinh vật không thể phát hiện bằng các phương pháp truyền thống này. Vai trò của các vi sinh vật có thể được khái quát như sau:

Microbial services: Các vi sinh vật là các sinh vật rất quan trọng trên trái đất nhưng vai trò của chúng ít được biết đến do chúng không thể được phát hiện bằng mắt thường. Vi sinh vật cung cấp cho con người không khí, thức ăn và thực hiện hầu hết các chức năng của cơ thể, trong khi đó rất ít người biết về vai trò của chúng với cuộc sống. Có rất nhiều các ví dụ điển hình cho việc cung cấp các thành phần thiết yếu của vi sinh vật cho các sinh vật khác (Madigan and Martinko 2005).

Sự tạo thành oxi: Một bước quan trọng trong lịch sử sống trên trái đất là sự chuyển từ hô hấp kỵ khí sang hiếu khí được tạo ra bởi vi sinh vật tự dưỡng. Khi sự sống trên trái đất bắt đầu, môi trường sống là hô hấp kỵ khí hoặc không cần oxi. Khoảng 1 tỷ năm trước đây, một vài vi sinh vật ngoài đại dương tiến hóa khả năng sử dụng năng lượng mặt trời để tham gia vào các phản ứng mà kết quả là giải phóng oxi. Oxi trên trái đất tích tụ lại tạo thành khí quyển cho đến khi lượng của chúng đủ để hình thành và nuôi dưỡng các sinh vật hiếu khí. Trong đó một dạng oxi phân tử cao được hình thành là O₃ do các phân tử O₂ va chạm với nhau. Ozone là một phân tử rất đặc biệt, không giống như oxi, nó có thể hấp thụ tia UV. Do đó, sự sống trên bề mặt trái đất có thể phát triển vì tầng ozone đã lọc hết các tia UV và bảo vệ trái đất khỏi phóng xạ có thể phá hủy DNA và tế bào. Ngay sau khi hình thành oxi và tầng ozone ở tầng bình lưu, sự sống bắt đầu bùng nổ. Tầng oxi và ozone được hình thành đầu tiên hoàn toàn do vi sinh vật và ngày nay được duy trì bởi các vi khuẩn tự dưỡng và thực vật (Handelsman 2007).