

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN CÂY HÚNG, XÁC ĐỊNH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN GIỮA HÚNG LÁNG VỚI CÁC GIỐNG/LOÀI HÚNG KHÁC NHAU BẰNG KỸ THUẬT PCR-RAPD

TRẦN DUY CƯỜNG

Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Hà Nội

MAI NINH HƯƠNG, KHUẤT HỮU TRUNG

Viện Di truyền Nông nghiệp

Cây húng (*Mentha aquatica*) trong nghiên cứu này thuộc họ hoa môi (Labiatae). Sử dụng 15 môi ngẫu nhiên RAPD, thu được tổng cộng 2.435 băng, thuộc 106 loại băng có kích cỡ khác nhau, trong đó có 47 loại băng đa hình (44,3%) và 59 loại băng đơn hình (55,7%). Hệ số tương đồng di truyền trong số 32 giống nghiên cứu dao động từ 0,72 đến 1. Trong đó, 11 giống húng Láng được thu thập tại các địa điểm khác nhau có các biến thể di truyền gần nhau (dao động từ 0,00 đến 0,11). Tại hệ số tương đồng di truyền 80%, có 32 giống đã được chia thành 5 nhóm khác nhau. Dựa trên kết quả của các phân nhóm di truyền, 11 giống húng Láng đã được lựa chọn giải trình tự gen để xác định các marker phân tử nhận dạng và đăng ký trên ngân hàng gen thế giới nhằm mục đích nghiên cứu, đánh giá đa dạng về di truyền nguồn gen cây húng phục vụ công tác bảo tồn, khai thác và sử dụng bền vững nguồn gen cây rau bản địa quý này.

Từ khóa: ADN, húng Láng, đa dạng di truyền, RAPD.

Mở đầu

Cây húng (*Mentha Aquatica*) thuộc họ hoa môi (Labiatae) đã được người châu Á và châu Âu trồng cách đây 3.000 năm. Cây húng được sử dụng rộng rãi để làm gia vị, nguyên liệu chưng cất tinh dầu và làm thuốc, sắc uống chữa sốt, chữa đau dạ dày, ăn uống không tiêu, một số hợp chất trong húng quế ngọt có thể có tác dụng bảo vệ gan. Tinh dầu trong rau húng đã được thử nghiệm có thể hòa tan trong nước và có lợi cho các hoạt động sinh học bên trong cơ thể. Bên cạnh đó, còn có tác dụng như: lợi phế, trừ đờm, giải cảm, làm thông hơi, giải độc, kích thích tiêu hoá, chữa đau bụng, đầy bụng, chữa ho, thổ huyết, chảy máu cam... (Elwakil, 2006).

Việt Nam có rất nhiều loại húng được gieo trồng và phát triển ở hầu khắp các địa phương từ Bắc vào Nam. Cây húng được dùng làm gia vị mang lại nét đặc trưng riêng cho món ăn Việt. Cây húng còn được trồng để cất tinh dầu và chế menthol dùng để sản xuất dầu cao sa

vàng, làm chất thơm cho các sản phẩm thực phẩm như bánh kẹo, thuốc đánh răng, và trong một số ngành kỹ nghệ khác (Nguyễn Thị Thanh Bình, 2004). Trước tình hình các nguồn gen húng, đặc biệt là nguồn gen húng Láng (Hà Nội) đang bị cạn kiệt do diện tích đất nông nghiệp bị thu hẹp, giá trị kinh tế trồng húng Láng không cao, chúng tôi đã thực hiện đề tài “Đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây húng, xác định mối quan hệ di truyền giữa húng Láng với các giống/loài húng khác bằng kỹ thuật PCR-RAPD” nhằm mục đích nghiên cứu sưu tập, đánh giá đa dạng về di truyền nguồn gen cây húng phục vụ công tác bảo tồn, khai thác và sử dụng bền vững nguồn gen cây rau bản địa quý này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu được sử dụng trong các thí nghiệm là 32 mẫu giống bao gồm các mẫu giống/loài húng Láng điển hình, các mẫu giống/loài cùng chi húng Láng (*Mentha aquatica*)

A RESEARCH ON GENETIC DIVERSITY OF BASIL, IDENTIFICATION OF HEREDITARY RELATION BETWEEN LANG BASIL AND OTHER BASIL VARIETIES/ SPECIES USING PCR - RAPD TECHNIQUE

Summary

Basil (*Mentha aquatica*) belonging to the family Labiateae has a diverse native genetic resource in Vietnam. Using 15 random RAPD primers, a total of 2,435 bands have been obtained, which are classified into 47 polymorphic band types (44.3%) and 59 monomorphic band types (55.7%). The coefficient of genetic similarity among 32 studied varieties has ranged from 0.72 to 1. Among them, 11 Lang basil varieties collected in different locations have close genetic variation ranging from 0,00 to 0.11. At the 80% genetic similarity, 32 varieties have been divided into 5 different groups. Based on the results of isolated genetic groups, 11 Lang basil varieties have been selected for gene sequencing (with high conservation) in order to identify molecular markers, document genetic resource of endemic Lang basil and register on the world gene banks.

Keywords: ADN, Lang basil, genetic diversity, RAPD.

và các mẫu giống/loài thuộc họ *Labiatae* được thu thập từ nhiều địa phương, vùng sinh thái khác nhau ở Việt Nam (bảng 1).

Bảng 1: tên, ký hiệu và địa điểm thu thập các mẫu giống

Ký hiệu	Tên mẫu giống	Địa điểm thu thập	Ký hiệu	Tên mẫu giống	Địa điểm thu thập
K1	Hương nhu tía Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K17	Cây râu mèo - Hà Nội	Viện Dược liệu - Hà Nội
K2	Húng chanh Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K18	Húng Láng Hoài Đức	Hoài Đức - Hà Nội
K3	Bạc hà Âu Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K19	Húng Láng Thái Bình	Thái Thụy - Thái Bình
K4	Hương nhu trắng Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K20	Húng chó Thái Bình	Thái Thụy - Thái Bình
K5	Bạc hà Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K21	Húng chó lá nhỏ Hà Nội	TP. Hà Nội
K6	Húng quế Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K22	Tía tô Cổ Nhuế Hà Nội	Bắc Từ Liêm - Hà Nội
K7	Húng lũi Đà Lạt	TP. Đà Lạt	K23	Bạc hà lá nhỏ có nhũ Hà Nội	TP. Hà Nội
K8	Húng Láng lá to Hưng Yên	Văn Giang - Hưng Yên	K24	Húng chó Cổ Nhuế	Bắc Từ Liêm - Hà Nội
K9	Húng Láng lá nhỏ Hưng Yên	Văn Giang - Hưng Yên	K25	Húng Láng Cổ Nhuế	Bắc Từ Liêm - Hà Nội

K10	Húng quế Hà Nội	TP. Hà Nội	K26	Kính giới Cổ Nhuế	Bắc Từ Liêm - Hà Nội
K11	Hương nhu tía Hưng Yên	Văn Giang - Hưng Yên	K27	Húng bạc hà lá to Cổ Nhuế	Bắc Từ Liêm - Hà Nội
K12	Húng bạc hà Láng Hà Nội	Đống Đa - Hà Nội	K28	Ích mẫu - Hà Nội	Viện Dược liệu - Hà Nội
K13	Húng Láng BS1 làng Láng	Đống Đa - Hà Nội	K29	Húng Láng Phú Xuyên	Phú Xuyên - Hà Nội
K14	Húng chanh Thái Nguyên	Sông Công - Thái Nguyên	K30	Húng Láng Thanh Trì	Thanh Trì - Hoàng Mai - Hà Nội
K15	Húng Láng OL làng Láng	Đống Đa - Hà Nội	K31	Húng Láng Yên Sở	Yên Sở - Hoàng Mai - Hà Nội
K16	Húng Láng BS2 làng Láng	Đống Đa - Hà Nội	K32	Húng Láng Ngọc Hà	Ba Đình - Hà Nội

Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp sử dụng CTAB (Obara O.P. and S. Kako, 1998) có một số cải tiến nhỏ để tiến hành tách chiết ADN từ 32 mẫu nghiên cứu.

Thành phần phản ứng PCR-RAPD và chu trình nhiệt: tổng thể tích phản ứng PCR là 15 µl bao gồm: nước cất hai lần khử ion: 9,9 µl, Buffer Mg⁺ 25 Mm: 1,5 µl, dNTPs 10 Mm: 0,3 µl, Taq ADN polymerase 5 U/µl: 0,8 µl, Mối 10 µM: 1,5 µl, ADN: 1 µl.

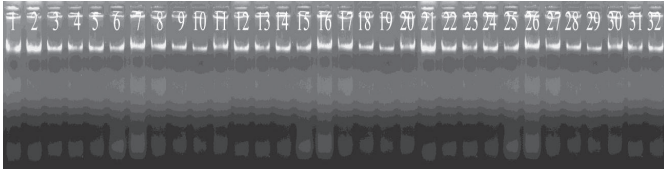
Các phản ứng PCR được tiến hành trong ống eppendorf 0,2 ml và thực hiện trên máy Mastercycler epgradient S theo chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 40-45 chu kỳ [94°C (1 phút); 33-36°C (30 s), 72°C (2 phút)] và kết thúc ở 72°C (5 phút); sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1-1,2%.

Phân tích và xử lý số liệu: các số liệu thu thập được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên nền Excel version 5.0. Các băng ADN được ghi nhận dựa trên sự có mặt hay vắng mặt của chúng ở các mẫu nghiên cứu theo thang ADN chuẩn (ADN marker), xuất hiện băng là "1", không xuất hiện băng là "0". Các số liệu này được đưa vào xử lý theo chương trình NTSYSpC 2.1 (Rohlf, 2003) để tính ma trận tương đồng giữa các cặp mẫu.

Kết quả và thảo luận

Kết quả tách chiết ADN tổng số

Qua kết quả điện di trên gel agarose 1% (hình 1) cho thấy, các băng ADN thu được của các mẫu húng khá gọn và đồng đều chứng tỏ chất lượng ADN của các mẫu là khá tốt, không bị lẫn tạp chất. Mặt khác, không thấy xuất hiện vệt sáng ARN phía dưới, điều đó chứng tỏ ARN cũng đã được loại bỏ khỏi dịch chiết ADN. Kết quả điện di cũng cho thấy ADN có nồng độ tương đối cao, chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: ảnh điện di ADN tổng số của 32 mẫu giống

Kết quả phân tích đa dạng di truyền, xác định mối quan hệ di truyền giữa các mẫu húng và các mẫu giống cùng chi với húng Láng

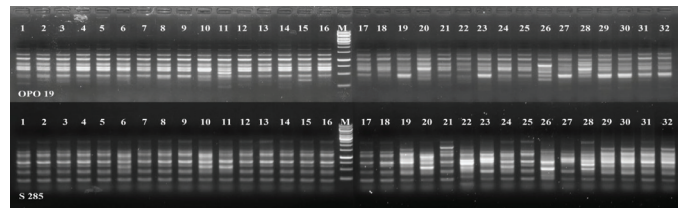
Để tiến hành phân tích và đánh giá mức độ đa hình di truyền của 32 mẫu giống nghiên cứu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%. Kết quả phân tích PCR- RAPD với tổng số 30 mỗi thuộc các nhóm UBC, OPA, OPC, BIO, OPO, OPN, OPE và nhóm S cho thấy có 15 mỗi cho đa hình rõ rệt là các môi: OPA4, OPA12, OPE15, OPN10, OPN14, OPN15, OPN16, OPO4, OPO10, OPO19, S216, S239, S256, S285 và S300. Các môi còn lại cho kết quả đơn hình. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: thống kê số băng ADN thu được của 32 mẫu húng nghiên cứu với 15 mỗi RAPD

Số Mẫu	Số băng ADN thu được trên từng môi														Tổng	
	OPA4	OPA12	OPE15	OPN10	OPN14	OPN15	OPN16	OPO4	OPO10	OPO19	S216	S239	S256	S285		S300
1	4	4	3	6	5	5	6	3	5	8	7	4	5	6	4	75
2	4	4	3	5	5	4	6	3	5	8	7	4	5	6	4	73
3	4	4	3	5	5	4	6	3	5	8	7	4	5	6	4	73
4	4	4	3	6	5	5	6	3	5	8	7	4	5	6	4	75
5	4	4	3	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	6	4	73
6	4	4	5	6	5	4	6	3	5	7	7	4	5	6	4	75
7	4	4	3	5	5	4	6	3	5	7	7	4	5	6	4	72
8	4	4	3	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	6	4	73
9	4	4	3	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	6	4	73
10	4	4	5	6	5	5	6	3	5	8	7	4	5	6	4	77
11	4	4	4	6	5	5	6	3	5	9	7	4	5	6	5	78
12	4	4	3	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	6	4	73
13	4	4	4	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	6	4	74
14	4	4	4	5	5	5	6	3	5	8	7	4	5	6	4	75
15	4	4	3	5	5	5	6	3	5	8	7	4	5	6	4	74
16	4	4	4	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	6	4	74
17	4	5	3	5	5	5	6	2	5	7	7	4	5	6	4	73
18	4	5	4	5	5	5	6	2	5	7	7	4	5	6	4	74
19	4	5	5	7	5	6	7	3	5	7	6	4	5	5	6	80
20	5	5	4	6	5	6	6	3	5	7	7	5	5	6	6	81
21	3	5	3	5	5	5	6	3	5	7	7	4	5	7	4	74

22	3	6	4	6	5	6	6	4	5	6	7	4	5	5	4	76
23	3	5	6	7	5	5	6	4	5	7	6	5	5	7	4	80
24	4	5	4	6	5	4	6	4	5	7	7	4	5	6	4	76
25	4	5	3	5	5	5	6	2	5	7	7	4	5	6	4	73
26	5	6	4	8	5	6	6	2	5	7	7	5	5	5	4	80
27	3	5	6	7	5	5	6	3	5	7	6	5	5	7	4	79
28	5	5	4	6	5	5	6	3	5	8	7	4	5	5	5	78
29	5	5	4	7	5	4	7	3	5	7	7	5	5	6	6	81
30	5	5	4	7	5	4	7	3	5	7	7	4	5	6	6	80
31	3	5	4	7	5	5	7	3	5	7	7	4	5	6	6	79
32	5	5	5	7	5	6	7	3	5	7	7	5	5	6	6	84
Tổng	129	146	123	186	160	158	197	95	160	233	221	134	160	191	142	2.435

Số liệu thu được ở bảng 2 cho thấy: với 480 phản ứng PCR nhân lên được tổng số 2.435 băng thuộc 106 loại băng có kích cỡ khác nhau. Trong đó 47 băng cho đa hình, chiếm 44,3%; 59 băng đơn hình, chiếm 55,7%. Kích thước băng có chiều dài nhỏ nhất khoảng 250 bp và băng có kích thước lớn nhất khoảng 2.500 bp. Xuất hiện 4 băng cá biệt (băng chỉ xuất hiện duy nhất ở một mẫu và khuyết ở 31 mẫu còn lại).

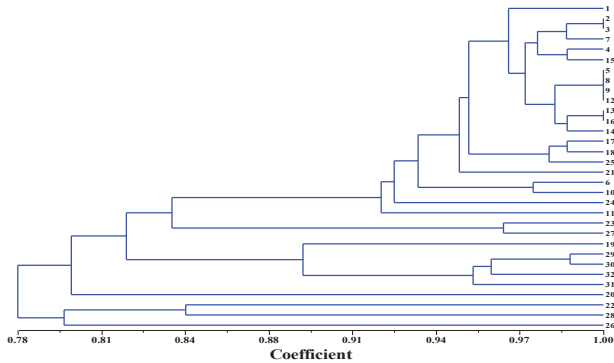


Hình 2: kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR của 32 mẫu giống nghiên cứu với mỗi OPO19 và S285 (M: marker 1 kb)

Mỗi OPO19 nhân lên được tổng số băng nhiều nhất là 233 băng và ở mẫu 28 (ích mẫu) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 950 bp. Mỗi S285 nhân được 191 băng và ở mẫu 21 (húng chó lá nhỏ) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 1.600 bp. Mỗi OPA12 nhân được 146 băng, ở mẫu 22 (tía tô) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp và ở mẫu 26 (kinh giới) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 370 bp. Mỗi OPO4 nhân lên được số băng ít nhất là 95 băng.

Qua kết quả thu được sau khi xử lý số liệu trên phần mềm NTSYSpc 2.1 cho thấy, hệ số tương đồng di truyền của 32 mẫu giống nghiên cứu dao động trong khoảng 0,72-1. Ba cặp mẫu giống (húng chó Thái Bình - kinh giới Cổ Nhuế, tía tô Cổ Nhuế - húng Láng Phú Xuyên và kinh giới Cổ Nhuế - húng Láng Thanh Trì) có mức sai khác di truyền lớn nhất (hệ số tương đồng di truyền nhỏ nhất là 0,72).

Các mẫu bạc hà Đà Lạt, húng Láng lá to Hưng Yên, húng Láng lá nhỏ Hưng Yên, húng bạc hà Láng có hệ số tương đồng với nhau là 1. Hai cặp mẫu (húng chanh Đà Lạt - bạc hà Âu Đà Lạt) và (húng Láng BS1 làng Láng và húng Láng BS2 làng Láng) có hệ số tương đồng với nhau là 1.



Hình 3: sơ đồ mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu

Từ sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu húng nghiên cứu (hình 3) cho thấy, ở mức tương đồng khoảng 80% có thể chia 32 mẫu giống nghiên cứu thành 5 nhóm lớn:

- Nhóm I: gồm 21 mẫu được chia làm 4 nhóm phụ:

Nhóm phụ 1.1 gồm 17 mẫu được chia làm 3 phân nhóm phụ:

- Phân nhóm phụ 1.1.1 gồm 13 mẫu: hương nhu tía Đà Lạt, húng chanh Đà Lạt, bạc hà Âu Đà Lạt, húng lũi Đà Lạt, hương nhu trắng Đà Lạt, húng Láng OL, bạc hà Đà Lạt, húng Láng lá to Hưng yên, húng Láng lá nhỏ Hưng Yên, húng bạc hà Láng, húng Láng BS1, húng Láng BS2 2 và húng chanh Thái Nguyên. Nhóm này có hệ số tương đồng với nhau dao động từ 0,95 đến 1.

- Phân nhóm phụ 1.1.2 gồm 3 mẫu: cây râu mèo, húng Láng Hoài Đức và húng Láng Cổ Nhuế có hệ số tương đồng dao động từ 0,97 (cây râu mèo - húng Láng Cổ Nhuế) đến 0,99 giữa mẫu (cây râu mèo - húng Láng Hoài Đức) và (húng Láng Hoài Đức - húng Láng Cổ Nhuế).

- Phân nhóm phụ 1.1.3 gồm duy nhất mẫu húng chó lá nhỏ Hà Nội.

Nhóm phụ 1.2 gồm 2 mẫu húng quế Đà Lạt và húng quế Hà Nội có hệ số tương đồng với nhau là 0,97.

Nhóm phụ 1.3 gồm duy nhất mẫu húng chó Cổ Nhuế.

Nhóm phụ 1.4 gồm duy nhất mẫu hương nhu tía Hưng Yên.

- Nhóm II: gồm 2 mẫu bạc hà lá nhỏ có nhũ và húng bạc hà lá to Cổ Nhuế có hệ số tương đồng với nhau là 0,96.

- Nhóm III: gồm 5 mẫu húng Láng Thái Bình, húng Láng Phú Xuyên, húng Láng Thanh Trì, húng Láng Ngọc Hà và húng Láng Yên Sở. Nhóm này có hệ số tương đồng dao động từ 0,87 (húng Láng Thái Bình - húng Láng Phú Xuyên) đến 0,99 (húng Láng Phú Xuyên - húng Láng Thanh Trì).

- Nhóm IV: gồm duy nhất mẫu húng chó Thái Bình.

- Nhóm V: gồm 3 mẫu tía tô Cổ Nhuế, ích mẫu Hà Nội và kinh giới Cổ Nhuế có hệ số tương đồng dao động từ 0,78 (tía tô Cổ Nhuế - kinh giới Cổ Nhuế) đến 0,85 (tía tô Cổ Nhuế - ích mẫu Hà Nội).

Kết luận

Nguồn gen cây húng bản địa của Việt Nam khá đa dạng. Kết quả thực hiện 480 phản ứng PCR - RAPD với 15 mỗi ngẫu nhiên trên tập đoàn 32 mẫu giống thu được tổng số 2.435 băng, thuộc 106 loại băng có kích cỡ khác nhau, trong đó có 47 băng đa hình (chiếm 44,3%), 59 băng đơn hình (chiếm 55,7%). Hệ số tương đồng di truyền giữa 32 mẫu giống nghiên cứu, dao động từ 0,72 đến 1. Trong đó 11 mẫu giống húng Láng thu thập tại các địa phương khác nhau có sự sai khác di truyền với mức độ tương đồng dao động từ 0,89 đến 1 (khác biệt di truyền từ 0,00 đến 0,11). 11 mẫu húng Láng [húng Láng lá to (Hưng Yên), húng Láng lá nhỏ (Hưng Yên), húng Láng (Thái Bình), húng Láng (Cổ Nhuế), húng Láng (Phú Xuyên), húng Láng (Yên Sở), húng Láng OL (làng Láng), húng Láng BS1 (làng Láng), húng Láng (Hoài Đức), húng Láng (Thanh Trì) và húng Láng (Ngọc Hà)] được tuyển chọn để giải mã trình tự các đoạn gen có tính bảo thủ cao, nhằm xác định các dấu chuẩn phân tử, lập hồ sơ về nguồn gen húng Láng đặc hữu và đăng ký trên ngân hàng gen thể giới.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Thanh Bình, 2004. Kỹ thuật chăm sóc và chế biến cây chữa bệnh - Nhà xuất bản Văn hóa dân tộc.
2. Elwakil M.A, 2006. Basil and human health. *Information Technology Center, Mansoura University.*
3. Obara O.P. and S. Kako, 1998. Genetic diversity and identification of cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic ADN (RAPD) markers. *Euphytica*, 99, pp. 95-1001.
4. Rohlf F.J, 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Publication, New York, USA.
5. <http://thuocdongduoc.vn/cay-thuoc-vi-thuoc/278-cay-thuoc-vi-thuoc/1025-huong-nhu-trang.html>.