

SỬ DỤNG KỸ THUẬT RAPD-PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI *CALOTHRIX* (CYANOBACTERIA) PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ ĐẤT TRỒNG CỦA TỈNH ĐẮC LẮC

HỒ SỸ HẠNH

Trường cao đẳng Sư phạm Đắc Lắc

VÕ HÀNH

Trường đại học Vinh

ĐẶNG ĐIỂM HỒNG

Viện Công nghệ sinh học

Chi *Calothrix* thuộc ngành vi khuẩn lam (Cyanobacteria) có số lượng loài và dưới loài khá lớn, phân bố rộng trên toàn cầu. Theo Gollerbach, *Calothrix* có 47 taxa [3], còn theo Desikachary-39 taxa [2]. Ở Việt Nam, cho đến nay, mới định danh được 14 taxa [11, 12]. Một số loài trong chúng có khả năng cố định nitơ từ khí quyển [10].

Từ các năm 2002-2003, chúng tôi đã tiến hành thu mẫu vi khuẩn lam (VKL) trong đất trồng của tỉnh Đắc Lắc và phân lập được 5 loài thuộc chi *Calothrix* thuần khiết. Việc phân loại VKL hiện chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái. Tuy nhiên, trong tự nhiên, nhiều loài sinh vật giống nhau về hình thái và chúng dễ thay đổi theo sự biến đổi của môi trường. Các kỹ thuật phân tích DNA ngày càng được áp dụng rộng rãi, góp phần xây dựng cây phân loại và phân tích tính đa dạng di truyền giữa các loài cũng như các cá thể trong loài [1, 4, 5, 6, 7, 9]. Nhằm có những dẫn liệu khoa học bổ sung cho phương pháp phân loại kinh điển, chúng tôi bước đầu sử dụng phương pháp RAPD-PCR để tìm hiểu mối quan hệ di truyền của 5 loài thuộc chi *Calothrix* phân lập được từ đất trồng của tỉnh Đắc Lắc.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu VKL được phân lập từ các mẫu đất trồng lúa và đất trồng bông của tỉnh Đắc Lắc trong các năm 2002-2003. Môi trường nuôi cấy để phân lập là BG-11 có 10% thạch đã tiệt trùng. Để thu được các loài VKL thuần khiết

(sạch tảo và vi khuẩn khác), chúng tôi sử dụng phương pháp cấy truyền nhiều lần. Chiếu ánh sáng cực tím qua mẫu VKL thuần khiết với thời gian 10-15 phút, chúng tôi thu được mẫu VKL sạch. Độ sạch khuẩn của chúng được kiểm tra trên kính hiển vi quang học hai mắt có độ phóng đại 600-1000 lần, sau đó chuyển mẫu vào bình cầu dung tích 100 ml có chứa 50 ml môi trường BG-11 lỏng để tạo sinh khối nhằm sử dụng cho phản ứng RAPD-PCR.

DNA genom của các mẫu VKL được tách chiết theo phương pháp của Y. K. Hong có cải tiến cho phù hợp với điều kiện của Việt Nam (Trần Hữu Quang và cs., 1999) [8].

Ba môi ngẫu nhiên đặc trưng cho VKL đã được sử dụng có trình tự như sau: **OPA4-AATCGGGCTG**, **OPA10-GTGATCGCAG** và **OPL12-GGGCGGTACT**.

PCR được thực hiện trên máy PTC-100TM-Programmable Thermal Controller MJ Research.

Phản ứng được bắt đầu bằng giai đoạn biến tính DNA khuôn ở 94°C trong 3 phút và tiếp đến là 45 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm các bước thay đổi nhiệt độ như sau: 94°C-30 giây; 32°C-1 phút 30 giây; 72°C-2 phút. Giai đoạn tổng hợp cuối cùng được thực hiện ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 1,2% cùng mắckơ 1 Kb, sau đó được nhuộm bằng EtBr và được chụp ảnh.

Hệ số đồng dạng di truyền giữa các loài VKL được tính theo công thức của Nei và Li (1979) [5]:

$$S = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

Trong đó, N_{ij} : số băng có cả ở hai loài i và j ;
 N_i : số băng có ở loài i ; N_j : số băng có ở loài j .

Cây phân loại giữa 5 loài VKL được xây dựng bằng phần mềm máy tính NTSYS pc version 2.0 (Applied Biostatistic Inc, USA, 1998).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả phân loại theo phương pháp kinh điển

Sau khi thu được 5 mẫu VKL sạch, chúng tôi đánh số ký hiệu như sau: 1, 20, 201, 202 và 203. Căn cứ theo các tiêu chuẩn hình thái, các mẫu VKL được xếp vào các loài và dưới loài sau đây:

a. Mẫu số 1 (M1)

Sợi đơn độc, có màu khác nhau (màu lam tái đến ôliu); bao không phân lớp. Sợi có sự giảm dần từ gốc đến đỉnh. Trichom rộng 5,1-6 μm , hơi eo thắt ở vách ngăn ngang, cuối thon lại. Heterocyst hình trứng rộng 4-5,1 μm , dài 4,8-6 μm . Bào tử đơn độc hoặc từng cặp, rộng 8,5-9 μm , dài 6-10 μm (hình 1).

Mẫu số 1 được xếp vào loài *Calothrix javanica* De Wilde.



Hình 1. *Calothrix javanica* De Wilde. ($\times 600$)

b. Mẫu số 20 (M20)

Tảo có màu lam sáng. Sợi dài; bao mỏng.

Trichom hơi thắt hẹp ở vách ngăn ngang giữa các tế bào. Khi còn non tế bào hình vuông đến hình chữ nhật; khi trưởng thành, tế bào có chiều dài ngắn hơn rộng. Tế bào đỉnh có mặt tự do hình nêm, không tạo lông.

Gốc sợi rộng 13,6 μm , đỉnh rộng 6,8 μm . Trichom có phần gốc rộng 10,2 μm . Tế bào dài 5,1 μm . Heterocyst đơn độc ở gốc sợi hình cầu, có đường kính 11,9 μm .

Khi trưởng thành, tế bào phân chia nhanh làm cho trichom uốn cong gấp khúc dồn trong bao, sau đó mỗi khúc hình thành tảo đoạn (hình 2).

Mẫu số 20 được xếp vào loài *Calothrix* sp1.



Hình 2. *Calothrix* sp1. ($\times 600$)

c. Mẫu số 201 (M201)

Tảo như những mảnh nhỏ, có màu lam nâu. Sợi rất dài, kích thước của sợi tương đối đồng đều, hơi thuôn nhẹ về phía đỉnh. Sợi rộng 8,5-13,6 μm ; bao mỏng, vững chắc. Trichom rộng 8,5-11,9 μm , eo thắt ở vách ngăn ngang giữa các tế bào, kết thúc sợi không có lông. Tế bào tận cùng tròn lại; tế bào có chiều dài dài hơn chiều rộng hoặc có chiều dài ngắn hơn rộng. Heterocyst đơn độc ở gốc, hình bán cầu hoặc hơi cầu, rộng 8,5 μm , dài 5,1 μm (hình 3).

Mẫu số 201 được xếp vào loài *Calothrix marchica* var. *crassa* Rao, C. B.



a



b

Hình 3. *Calothrix marchica* var. *crassa* Rao, C. B.

a. phần gốc của sợi ($\times 600$); b. sợi ($\times 120$)

d. *Mẫu số 202 (M202)*

Tảo có màu lam tối hoặc lam nâu. Sợi dài tới 250 μm , chúng hợp lại thành búi; sợi phình ở gốc có chiều rộng 6-9 μm , trung bình 5,1 μm ; bao mỏng không phân lớp, mở ở đỉnh. Trichom ở gốc rộng 5,1-6,8 μm ; đỉnh rộng 3,4 μm , đỉnh không có dạng lông. Tế bào hình vuông hoặc chiều dài ngắn hơn rộng. Heterocyst ở gốc, đơn độc, rộng 4,1-6,8 μm (hình 4).

Mẫu 202 được xếp vào loài *Calothrix elenkinii* Kosinsk.



Hình 4. *Calothrix elenkinii* Kosinsk. ($\times 600$)

e. *Mẫu số 203 (M203)*

Tảo như những lông tơ xanh lam sáng, cấu tạo bởi những sợi dài (trên 620 μm). Gốc sợi phình ra, rộng 11,9 μm và giảm dần về phía đỉnh, rộng 5,1-68 μm ; tận cùng không bằng lông; bao mỏng. Trichom hơi eo thắt, rộng 5,1-70

10,2 μm , dài 3,4-5,5 μm . Tế bào đỉnh có mặt tự do tù. Heterocyst ở đáy đơn độc, hình bán cầu, có đường kính 10,2 μm . Tảo đoạn hình thành ở cuối sợi (hình 5).

Mẫu số 203 được xếp vào loài *Calothrix* sp2.

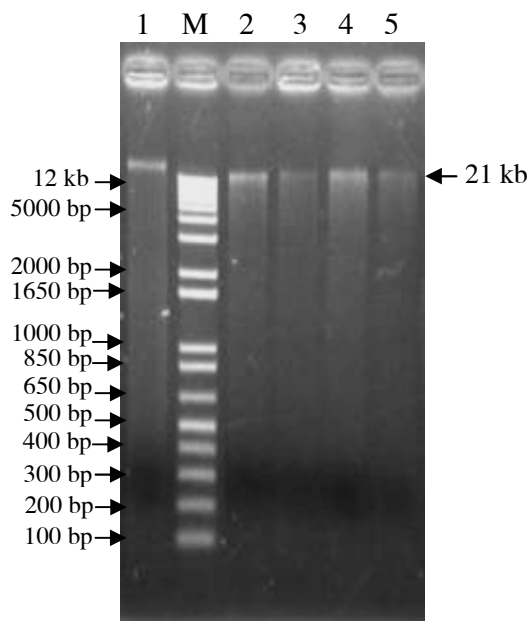


Hình 5. *Calothrix* sp2. ($\times 600$)

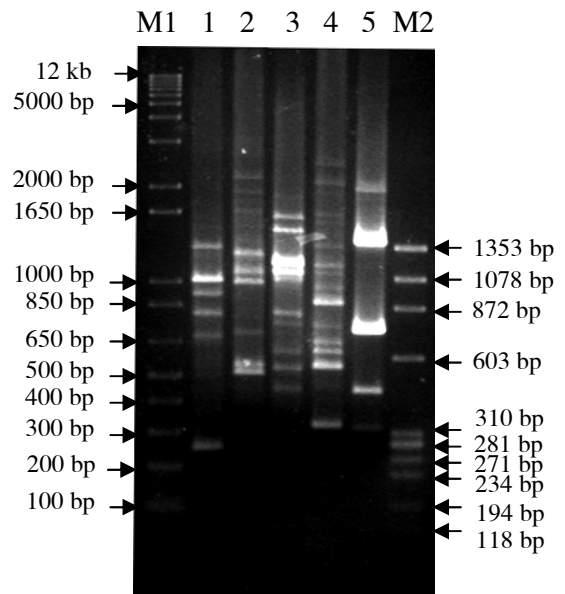
2. Sử dụng kỹ thuật RAPD-PCR để nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa 5 loài thuộc chi *Calothrix*

a. *Tách chiết DNA tổng số của 5 loài VKL thuộc chi Calothrix*

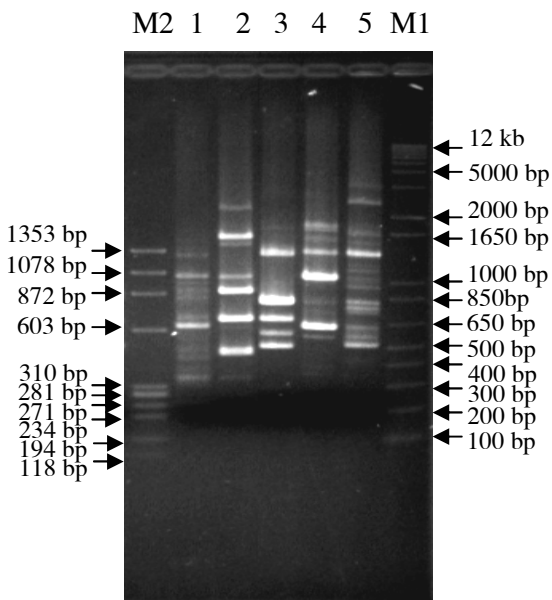
Từ sinh khối của các mẫu *Calothrix* sạch, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Y. K. Hong có cải tiến cho phù hợp với điều kiện của Việt Nam [5]. Kết quả được chỉ ra ở hình 6, cho thấy DNA tách chiết được đảm bảo nồng độ và độ tinh sạch để làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.



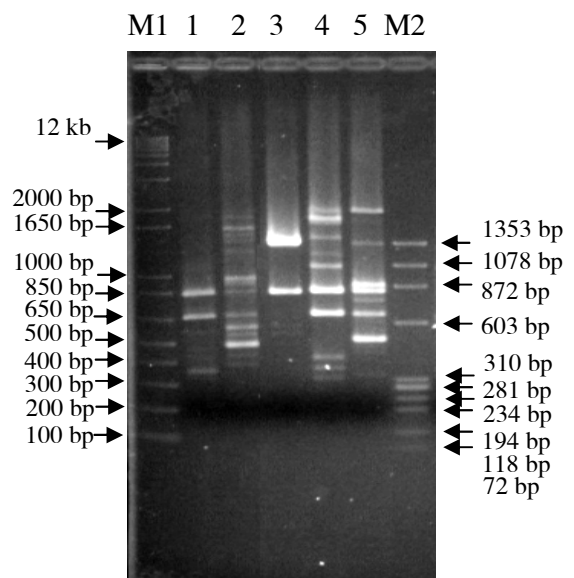
Hình 6. Kết quả tách chiết DNA tổng số của 5 loài VKL thuộc chi *Calothrix*
 Các giếng 1-5. lần lượt là các mẫu 1, 20, 201, 202 và 203; giếng M. 1 kb Plus DNA Ladder.



Hình 7. Kết quả chạy điện di sản phẩm RAPD-PCR của 5 loài VKL với mỗi OPA4
 M1, M2. 1Kb Plus DNA Ladder và phi X 174 -*Hae* III digest; các giếng 1-5 lần lượt là các mẫu 1, 20, 201, 202 và 203.



Hình 8. Kết quả chạy điện di sản phẩm RAPD-PCR của 5 loài VKL với mỗi OPA10
 M1, M2. 1Kb Plus DNA Ladder và phi X 174 -*Hae* III digest; các giếng 1-5 lần lượt là các mẫu 1, 20, 201, 202 và 203.



Hình 9. Kết quả chạy điện di sản phẩm RAPD-PCR của 5 loài VKL với mỗi OPL12
 M1, M2. 1Kb Plus DNA Ladder và phi X 174 -*Hae* III digest; các giếng 1-5 lần lượt là các mẫu 1, 20, 201, 202 và 203.

Các đoạn DNA được nhân bằng RAPD-PCR với các môi OPA4, OPA10 và OPL12 của 5 loài VKL thuộc chi *Calothrix*

Kích thước của băng DNA	1	20	201	202	203	Kích thước của băng DNA	1	20	201	202	203
4100 (OPA4)	0	0	0	1	0	1300	0	0	0	1	0
2300	0	1	0	0	0	1078	0	0	0	1	0
2100	0	0	0	1	0	995	0	1	0	0	0
1850	0	1	0	0	1	900	0	0	0	0	1
1650	0	1	0	1	0	850	1	1	1	1	1
1600	0	0	1	0	0	700	0	0	0	0	1
1550	0	0	0	1	0	650	1	1	0	1	1
1450	0	0	1	0	0	590	0	1	1	0	0
1400	0	0	0	0	1	550	0	1	1	0	0
1353	1	0	0	1	0	500	0	0	0	0	1
1250	0	1	0	0	0	480	0	1	0	0	0
1180	0	0	1	1	0	420	0	1	0	0	0
1110	0	1	1	1	0	400	0	0	0	1	0
1000	1	0	1	0	0	350	1	0	0	1	0
995	0	1	0	0	0	320	1	0	0	0	1
950	0	0	0	1	0	3000 (OPL12)	0	0	0	0	1
900	1	0	0	0	0	2600	0	0	0	0	1
850	0	0	0	1	0	2500	0	1	0	0	0
800	1	0	1	0	0	1800	0	0	0	1	0
765	0	0	1	1	0	1650	0	1	0	0	1
700	0	1	0	0	1	1600	0	0	0	1	0
680	1	0	0	0	0	1500	0	1	0	0	1
650	0	0	0	1	0	1300	1	0	1	1	1
600	0	0	1	1	0	1150	0	0	0	0	1
560	0	1	0	1	0	1078	0	0	0	0	1
545	0	0	1	0	0	1000	1	1	0	1	0
510	0	1	0	0	0	950	0	0	0	0	1
420	0	0	1	0	1	872	0	1	0	0	0
340	0	0	0	1	0	860	1	0	0	0	0
310	0	0	0	0	1	800	0	0	1	1	1
250	1	0	0	0	0	750	0	0	0	0	1
1900 (OPA10)	0	0	0	1	1	700	0	1	1	0	0
1850	0	1	0	0	0	600	1	0	0	1	0
1700	0	0	0	1	0	570	0	0	1	0	0
1600	0	1	0	0	0	530	0	0	0	1	1
1550	0	1	0	0	0	500	0	0	1	0	1
1500	0	1	0	1	0	485	0	1	0	0	0
1450	0	0	1	0	1	310	1	1	0	0	0

b. *Phân tích tính đa dạng di truyền của 5 loài thuộc chi Calothrix bằng kỹ thuật RAPD*

Trong quá trình chạy RAPD-PCR, chúng tôi tiến hành tối ưu điều kiện của PCR cho phù hợp với đặc trưng của mẫu. Kết quả phản ứng RAPD-PCR với 3 môi OPA4, OPA10 và OPL12 được trình bày ở các hình 7, 8 và 9. Kết quả này cho thấy có 75 băng DNA rõ nét được nhân lên với 3 môi. Trong đó, mỗi OPA4 nhân được 31 băng, OPA10-22 băng và OPL12-22 băng. Trung bình, mỗi môi nhân được 25 băng trên 5 mẫu. Chiều dài của các băng nằm trong khoảng 250 bp đến 4100 bp. Trong 75 băng nhân được, có 74 băng

đa hình (chiếm 98,66%); chỉ có duy nhất 1 băng có kích thước 850 bp là chung cho cả 5 loài thuộc chi *Calothrix* được nghiên cứu ở môi OPA10.

Băng chung này có thể được xem là máckơ đặc trưng chung cho 5 loài thuộc chi *Calothrix*. Số lượng các băng được nhân bản với từng môi và chiều dài của chúng được trình bày ở bảng 1.

Dựa trên sự có mặt của các băng DNA nhân ngẫu nhiên với 3 môi OPA4, OPA10 và OPL12 (bảng 1), hệ số đồng dạng giữa 5 loài được so sánh với nhau dựa vào công thức của Nei và Li (phân phương pháp nghiên cứu). Kết quả được chỉ ra ở bảng 2.

Bảng 2

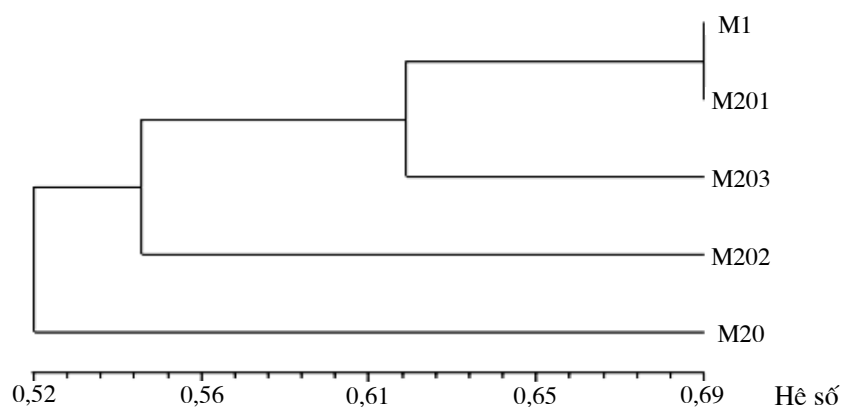
Hệ số đồng dạng di truyền của 5 loài thuộc chi *Calothrix*

	M1	M20	M201	M202	M203
M1	1,0000				
M20	0,5783	1,0000			
M201	0,6867	0,5542	1,0000		
M202	0,6144	0,4578	0,5662	1,0000	
M203	0,6144	0,5060	0,6144	0,4698	1,0000

Mối quan hệ giữa các loài được thể hiện bằng hệ số đồng dạng di truyền giữa chúng. Các loài càng giống nhau về mặt di truyền thì hệ số đồng dạng di truyền càng lớn và ngược lại. Hệ số đồng dạng di truyền lớn nhất giữa M1 và M201 là 0,6867 và thấp nhất giữa M202 và M20 là 0,4578. Hệ số sai khác giữa 5 loài này thay đổi từ giá trị 0,3133 (1-0,6867) đến 0,5422 (1-

0,4578). Như vậy, sự khác nhau giữa 5 loài thuộc chi *Calothrix* được nghiên cứu ở mức độ phân tử DNA có thể phát hiện được nhờ kỹ thuật RAPD-PCR.

Cây phân loại của 5 loài thuộc chi *Calothrix* được thiết lập dựa trên chương trình NTSYSpc 2.0, được thể hiện ở hình 10.



Hình 10. Cây phân loại của 5 loài VKL thuộc chi *Calothrix*

Trên cây phân loại (hình 10), 5 loài thuộc chi *Calothrix* được chia làm 2 nhóm chính.

Nhóm thứ nhất chỉ gồm loài M20. Nhóm thứ hai gồm 4 loài còn lại, được chia thành 2 nhánh

nhỏ. Nhánh nhỏ thứ nhất gồm loài M202. Nhánh nhỏ thứ hai gồm 3 loài M203, M201 và M1. Hệ số đồng dạng di truyền giữa loài M20 và loài M202 là 0,4578, giữa loài M20 và loài M203-0,5060; giữa loài M202 và loài M203-0,4698; giữa loài M203 và loài M201 là 0,6144. Các hệ số này không cao, cho phép phân biệt chúng là các loài tách biệt. Loài M201 và loài M1 có hệ số đồng dạng di truyền cao nhất: 0,6867, cho thấy 2 loài này có quan hệ gần nhau hơn so với 3 loài còn lại (M20, M202 và M203).

Như vậy, bằng kỹ thuật RAPD-PCR, có thể xác định được sự sai khác về mặt di truyền giữa các loài VKL thuộc chi *Calothrix*.

III. KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất trồng ở tỉnh Đắk Lắk, chúng tôi đã phân lập được 5 loài thuộc chi *Calothrix* sạch và định loại chúng theo phương pháp kinh điển. Sử dụng kỹ thuật RAPD-PCR để nghiên cứu tính đa dạng di truyền của 5 loài trên, chúng tôi có kết luận sau:

- Trong tổng số 75 băng DNA được nhân lên với 3 môi có 74 băng đa hình (chiếm 98,66%). Xác định được 1 máckơ chung đặc trưng cho cả 5 loài VKL thuộc chi *Calothrix* được nghiên cứu ở môi OPA10.

- Bằng kỹ thuật RAPD-PCR đã cho thấy sự khác biệt về mặt di truyền của 5 loài thuộc chi *Calothrix* được phân lập từ đất trồng của tỉnh Đắk Lắk.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Trần Dụ Chi** và cs., 2001: Tạp chí Sinh

học, 23(3a): 170-177. Hà Nội.

2. **Desikachary T. V.**, 1959: Cyanophyta, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.

3. **Gollerbakh M. M., Kosinskaia E. K., Poljanski B. N.**, 1953: Opređitel presnovodnukh vodoroslei SSSR, Vupusk 2: Sinejilionue vodoroslei.

4. **Hoàng Thị Minh Hiền, Đặng Diễm Hồng, Võ Thương Lan**, 2000: Tạp chí Sinh học, 22(2): 24-28. Hà Nội.

5. **Đặng Diễm Hồng** và cs., 2002: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 40(số đặc biệt): 161-167. Hà Nội.

6. **Raeid M. M. Abed et al.**, 2003: J. Phycol., 39(5): 862-873.

7. **Renhui Li, Wayne W. Casmichael and Paulo Pereira**, 2003: J. Phycol., 39(4): 814-818.

8. **Trần Hữu Quang** và cs., 1999: Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học: 170-177. Hà Nội.

9. **Sean Turner, Tan-Chi Huang and Shu-Miaw Chaw**, 2001: Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 181-186.

10. **Dương Đức Tiến**, 1994: Vi khuẩn lam cố định nitơ trong ruộng lúa. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.

11. **Dương Đức Tiến**, 1996: Phân loại vi khuẩn lam ở Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.

12. **Trung tâm nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường-ĐHQG HN**, 2001: Danh lục các loài thực vật Việt Nam, 1: 1-50, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.

USING THE RAPD-PCR TECHNIQUE TO IDENTIFY THE GENETIC RELATIONSHIP OF SOME *CALOTHRIX* SPECIES ISOLATED FROM CULTURAL SOIL OF THE DACLAC PROVINCE

HO SY HANH, VO HANH, DANG DIEM HONG

SUMMARY

Five pure species of the genus *Calothrix* have been isolated from soil samples in the Daclac province and classified by the classical method. We have used the RAPD-PCR technique to explore the genetic relationship of these 5 *Calothrix* species. The results showed that 75 bands were multiplied by 3 random primers OPA4, OPA10 and OPL12; each of which on average had 25 bands for these *Calothrix* species. There were 74 polymorphic bands and one band was common marker for these species. The RAPD-PCR technique showed the genetic difference among these 5 species. The findings by using the RAPD-PCR technique were consistent with the results of classical methods.

Ngày nhận bài: 29-06-2005