

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG BẢO TỒN TÀI NGUYÊN DI TRUYỀN THỰC VẬT NÔNG NGHIỆP Ở VIỆT NAM

PGS. TS. Lã Tuấn Nghĩa¹ và ThS. Hoàng Thị Huệ²

I. Đặt vấn đề

Tài nguyên di truyền thực vật nông nghiệp đóng vai trò rất quan trọng đối với đời sống con người trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Tài nguyên sinh học nói chung và tài nguyên thực vật nói riêng là nguồn cung cấp thực phẩm, vật liệu cho con người và sản xuất phát triển nông nghiệp, công nghiệp đồng thời cũng là nhân tố quan trọng trong hệ sinh thái (Lã Tuấn Nghĩa và cs. 2011).

Hiện nay đã có nhiều phương pháp tiếp cận được sử dụng trong việc bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật ở Việt Nam, trong đó việc ứng dụng công nghệ sinh học được xem là một trong những quan tâm hàng đầu.

Ứng dụng công nghệ sinh học tiên tiến như sử dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào, sinh học phân tử đang được xem là một trong những công cụ chính của bảo tồn tài nguyên thực vật. Thông qua việc ứng dụng công nghệ sinh học, các loài cây trồng sinh sản vô tính, cây trồng có hạt dạng “khó tính” (recalcitrant) được lưu giữ hiệu quả hơn trong điều kiện *in vitro*. Ngoài ra, công nghệ sinh học đã giúp đỡ đắc lực trong việc sàng lọc nguồn gen, nghiên cứu đa dạng di truyền và giải quyết các vấn đề liên quan đến phân loại thực vật. Mặt khác; công nghệ sinh học còn mở rộng phạm vi nghiên cứu chức năng gen và sử dụng tài nguyên di truyền thực vật.

Nhận thức vai trò quan trọng của TNDTTV và công nghệ sinh học trong bảo tồn và quản lý TNDTTV nêu trên, trong bài viết này chúng tôi sẽ đề cập đến tầm quan trọng của ứng dụng công nghệ sinh học trong bảo tồn TNDTTV nông nghiệp ở Việt Nam.

II. Ứng dụng công nghệ sinh học trong bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật nông nghiệp

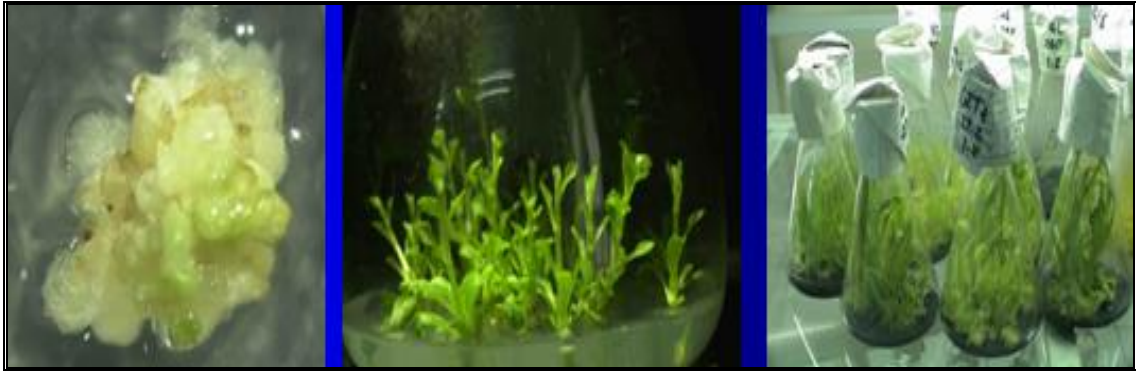
2.1. Ứng dụng công nghệ tế bào trong bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật nông nghiệp

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào được sử dụng để bảo tồn nhiều loại cây trồng sinh sản vô tính khác nhau như: khoai môn sọ, sắn, hoa, chuối, củ ngọt.v.v (Ashmore S.,1997; Banerjee N., De Langhe E., 1985; Bunn và cs., 2007; Keller và cs., 2006; Razdan và cs., 2008; Roca và cs., 1984). Hiện nay tại ngân hàng gen *in vitro* ở Trung tâm Tài nguyên thực vật đang lưu giữ khoảng 500 mẫu nguồn gen các loại cây trồng sinh sản vô tính, trong đó cây khoai môn sọ là tập đoàn nguồn gen chính.

Các nghiên cứu về bảo tồn cũng được tiến hành như xây dựng quy trình lưu giữ sinh trưởng chậm trong ngân hàng gen *in vitro* (hình 1) và vi nhân giống nguồn gen tiềm năng phục vụ sản xuất như một số loài phong lan bản địa *Orchidaceae* của Việt Nam.

¹ Giám đốc Trung tâm Tài nguyên thực vật

² Phó trưởng phụ trách BM đa dạng sinh học, Trung tâm TNTV



Hình 1. Bảo tồn *in vitro* nguồn gen cây hoa

2.2. Ứng dụng công nghệ gen trong bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật nông nghiệp

Ứng dụng công nghệ gen, một trong những công nghệ quan trọng trong bảo tồn TNDTTV nông nghiệp với mục tiêu nhằm đánh giá các đặc tính nông học như kháng sâu bệnh, chống chịu các điều kiện bất lợi, đa dạng di truyền; lập bản đồ gen và phân lập gen (Cai H., Morishima H., 2002; Garris và cs., 2005).

2.2.1. Đánh giá các đặc tính chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất thuận

Ứng dụng các kỹ thuật PCR, RT-PCR và kỹ thuật ELISA để chuẩn đoán bệnh virus trên một số loài cây trồng đã thu được kết quả chính xác và tin cậy. Điển hình như một số nghiên cứu về khả năng kháng *Begomovirus* ở nguồn gen cà chua (*Solanum lycopersicum*), ớt (*Capsicum* sp.) và đậu đũa. Kết quả tại Trung tâm TNTV đã đánh giá được tính kháng bệnh khảm vàng lá gây ra bởi *Begomovirus* trên hơn 150 nguồn gen đậu đũa (gồm đậu xanh *V. radita*, đậu xanh 6 tháng *V. glabrescens* và gen đậu nho nhe *V. umbrelata*).

60 nguồn gen lúa tẻ nương đã được đánh giá khả năng bệnh bạc lá gây ra bởi một số dòng vi khuẩn phổ biến có độc tính cao, bản chất di truyền tính kháng của hơn 20 nguồn gen có tính kháng cao đã được xác nhận bằng các chỉ thị SSR liên kết với các gen kháng bạc lá chính.

Bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo và sử dụng các chỉ thị phân tử liên kết với gene/QTL quy định các đặc tính chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất thuận, Trung tâm TNTV đã khảo sát 300 giống lúa địa phương của Việt Nam và xác định được 73 nguồn gen có khả năng chống chịu điều kiện bất thuận và 57 nguồn gen có tính kháng sâu bệnh cao.

2.2.2. Đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen

Thông qua việc sử dụng các chỉ thị phân tử như RFLP, SSR, AFLP.v.v (Guarino và cs., 2009; Jalaluddin và cs., 2007; Mohammadi và cs., 2003), việc phân tích đa dạng di truyền của các loại cây trồng khác nhau trong ngân hàng gen như nhóm cây ngũ cốc, rau, đậu, cây ăn quả, cây công nghiệp.v.v. đã được tiến hành. Dưới đây là một số kết quả nghiên cứu điển hình đã thực hiện tại Trung tâm Tài nguyên thực vật:

Kết quả ban đầu về đa dạng di truyền của các giống mướp (*Luffa* sp) ở Việt Nam sử dụng 16 môi ngẫu nhiên để xác định đa dạng của 25 giống mướp nghiên cứu; kết quả cho thấy 25 giống mướp được phân loại thành 2 nhóm chính là: *Luff acutangula* và

L.cylindrica.

Chỉ thị phân tử SSR cũng được ứng dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền của 45 giống lúa nếp địa phương Việt Nam. Kết quả nghiên cứu các giống lúa có sự đa dạng di truyền cao; nghiên cứu còn cho thấy 43 giống lúa có kiểu gen thuộc nhóm lúa *Japonica* và chỉ có 2 thuộc nhóm *Indica*

Đa dạng di truyền của 45 nguồn gen đậu nho nhe (*Vigna umbellata*) nguồn gốc ở 12 tỉnh khác nhau của Việt Nam đã được phân tích sử dụng 40 mồi RAPD. Kết quả nghiên cứu cho thấy các giống đậu nho nhe địa phương khá đa dạng với chỉ số tương đồng từ 0,60 đến 0,90. Tại mức chỉ số tương đồng 0,60; 45 giống đậu nho nhe nghiên cứu chia thành 3 nhóm chính.

Nghiên cứu đa dạng di truyền 96 giống đậu xanh được thu thập ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam dựa trên 20 chỉ thị SSR đã thu được tổng số 60 alen (dao động từ 3-6 alen), 3 locut (VR040, VR169 và VR226) xuất hiện các alen di hợp tử và đã xác định được mức tương đồng di truyền dao động từ 0,52 đến 0,98. Phát hiện được 3 locut (VR040, VR078, VR357) cho nhận dạng đặc biệt (unique allele) ở nguồn gen Xanh 6 tháng Cao Lạng – Cao Bằng (SDK: 3198) là nguồn gen phân tách thành một nhóm riêng biệt so với 95 nguồn gen đậu xanh còn lại tại mức tương đồng di truyền 0,52.

Chỉ thị RAPD được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền các giống lúa vùng Tây Bắc và Tây Nam nước ta cho thấy hầu hết các giống lúa ở vùng Tây Bắc thuộc loài phụ *Japonica*, còn các giống lúa nước ở Tây Nam nước ta thuộc loài phụ *Indica*

Sử dụng 20 chỉ thị SSR để phân tích đa hình trên 65 giống đậu tương Việt Nam. Tổng số alen thu được là 163, số alen trung bình trên 1 locus là 8,2. Hệ số tương đồng di truyền biến động từ 0,47 đến 1,00.

Kỹ thuật DNA fingerprinting đã được áp dụng để nhận dạng và phân biệt giống ở lúa (*Oryza sativa* L.), đậu tương, chè, chuối (*Prunus salicina*), xoài (*Mangifera indica* L.), nhãn (*Dimocarpus longan*), vải (*Litchi chinensis*), bưởi (*C. maxima*) và hồ tiêu (*Piper nigrum*). Các DNA barcode dựa trên trình tự đặc trưng trên hệ gen lục lạp (*matK*, *rbcl*) và hệ gen nhân (vùng *trnH-psbA* thuộc ITS ribosome) và một số bộ tiêu bản DNA cũng đã được thiết lập bằng chỉ thị SSR và ScoT.

Nghiên cứu đa dạng di truyền tập đoàn 840 giống lúa địa phương Việt Nam bằng 20 chỉ thị SSR đã cho thấy tổng số alen thu được là 175 alen, dao động là 4 (RM277) đến 14 alen (RM271) (trung bình đạt 8,75 alen/locut). Có 4 chỉ thị cho nhận dạng đặc biệt (unique allele) là RM154 (SDK12984), RM452 (SDK12995), RM271 (SDK12595), RM536 (SDK12577). Tần số alen phổ biến dao động từ 15,33 % đến 45,07%, trung bình 29,78 %. Hệ số đa hình di truyền PIC thu được tại các locut SSR biến động từ 0,68 đến 0,89, trung bình đạt 0,8 cho thấy mức độ đa dạng gen tồn tại trong lúa địa phương ở mức khá đa dạng.

Ứng dụng các chỉ thị phân tử liên kết với một số gen kháng chính (gen kháng bạc lá, rầy nâu, mặn, hạn, đạo ôn, v.v..) để nghiên cứu đa dạng di truyền liên quan đến khả năng chống chịu sâu bệnh và điều kiện bất thuận đã được tiến hành tại Trung tâm.

20 chỉ thị SSR liên kết với gen/QTL chống chịu mặn được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của 110 giống lúa địa phương mang alen chống chịu mặn. Kết quả thu được 122 alen đa hình, hệ số PIC dao động từ 0,66 đến 0,88, trung bình đạt 0,81. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,68 đến 0,92.

Nghiên cứu đa dạng di truyền 84 giống lúa địa phương mang alen chống chịu hạn bằng 20 chỉ thị SSR liên kết với gen/QTL chống chịu hạn đã thu được tổng số 116 alen, hệ số đa hình di truyền (PIC) biến động từ 0,63 đến 0,95, trung bình đạt 0,77. Đồng thời, phân tích UPGMA bằng phần mềm NTSYS 2.1 đã xác định mức độ tương đồng của 84 giống nghiên cứu và 2 giống đối chứng dao động từ 0,72 đến 0,94.

Sử dụng 20 chỉ thị SSR liên kết với gen kháng bạc lá để đánh giá đa dạng di truyền liên quan đến khả năng kháng bạc lá của 113 giống lúa mang alen kháng bạc lá cho thấy, số alen đa hình trung bình đạt 6,65 alen/locut, hệ số PIC thu được tại các locut rất cao, từ 0,65 đến 0,88, trung bình đạt 0,82. Hệ số tương đồng giữa các giống lúa nghiên cứu từ 0,75 đến 0,94.

101 giống lúa địa phương mang alen kháng đạo ôn được phân tích đa hình bằng 20 chỉ thị SSR liên kết với gen kháng đạo ôn cho thấy kích thước các băng ADN dao động trong khoảng 76 – 345 bp, số alen đa hình thu được là 126 alen, trung bình đạt 6,3 alen/locut. Hệ số tương đồng di truyền của 101 nguồn gen nghiên cứu và 2 nguồn gen đối chứng dao động từ 0,68 đến 0,92

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền liên quan đến khả năng kháng rầy nâu của 103 giống lúa mang alen kháng rầy nâu bằng 20 chỉ thị SSR liên kết với gen kháng rầy nâu cho thấy mức độ tương đồng di truyền giữa các giống dao động từ 0,72 đến 0,94. Thống kê trên 20 locut SSR, sản phẩm PCR có kích thước 98 – 247, số alen trung bình đạt 6,25 alen/locut, hệ số PIC thu được tại các locut SSR biến động từ 0,63 đến 0,86, trung bình đạt 0,81.

2.2.3. Lập bản đồ gen

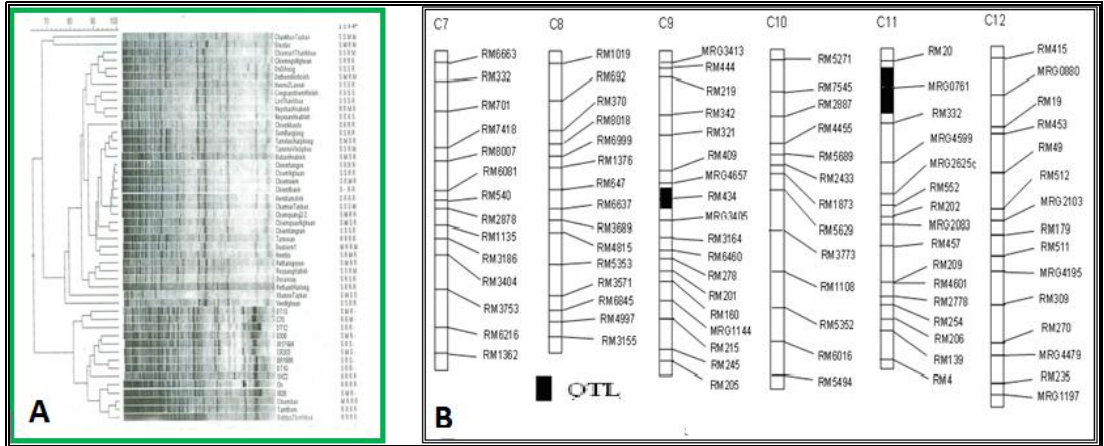
Những gen thực vật có giá trị cần được đánh giá và lập bản đồ để phục vụ mục đích sử dụng dễ dàng hơn. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng sử dụng môi STS để phát hiện các gen kháng bệnh bạc lá gồm: *Xa-4*, *Xa-5*, *Xa-7*, *Xa-21* đã phát hiện 4 mẫu nguồn gen lúa mang gen kháng bạc lá trên tổng số 22 mẫu nguồn gen lúa nếp được nghiên cứu (McCouch và cs., 2002).

Một nghiên cứu khác chỉ ra rằng 4 QTL được phát hiện liên quan với tính kháng bạc lá ở lúa. Những QTL này nằm trên các nhiễm sắc thể số: 3, 9 và 11 có tên là: qBLASTI-3a-TXC; qBLASTI-3b-TXC; qBLASTI-9-TXC; qBLASTI-11-TXC. QTL qBLASTI-11-TXC có chỉ số LOD lớn nhất liên quan đến thay đổi kiểu hình.

Nghiên cứu về lập bản đồ gen lúa chịu hạn được tiến hành sử dụng quần thể F2 có nguồn gốc từ tổ hợp lai giữa giống lúa LC93-1 và Khang dân 18. 12 QTL đã được phát hiện, trong số đó 5 QTL liên kết với LDS được phát hiện trên các nhiễm sắc thể số: 1,3,8,9,10 (hình 2).

Ứng dụng công nghệ GBS (Genotyping By Sequencing) đã xây dựng được bản đồ QTL tính kháng *Begomovirus* trên đậu xanh và ớt, thiết lập nền tảng di truyền cho mục tiêu chọn lọc giống kháng virus *Begomovirus* trên hai loại cây trồng này.

Qua phân tích tính chịu mặn của các giống lúa địa phương ở Việt Nam cho thấy giống Chành chịu mặn tương tự với gen Saltol 1 đã được phát hiện trên giống lúa Pokkali. Bên cạnh đó, bằng phương pháp BSA, bản đồ QTL quy định tính chịu hạn ở cây chè (*Camellia sinensis*) đã được xây dựng và xác định được 6 chỉ thị CamsinM1, CamsinM2, CamsinM4, CamsinM5, CamsinM8 và Casmsin13 liên kết với QTL chịu hạn này.

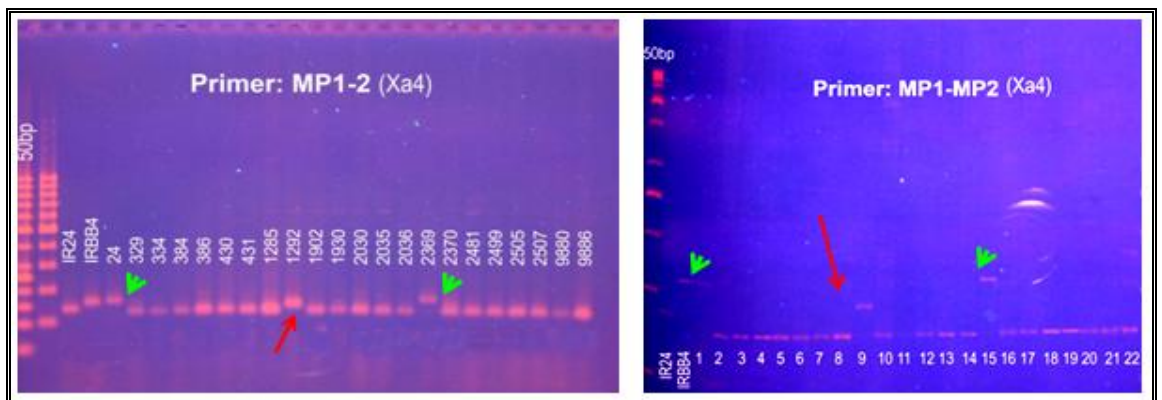


Hình 2. Phân tích đa dạng di truyền và lập bản đồ gen.

A: Phân tích đa dạng di truyền, **B:** Lập bản đồ gen

2.2.4. Phân lập gen

Nghiên cứu tại Trung tâm Tài nguyên thực vật chỉ ra rằng một số gen có giá trị cần được phân lập như gen kháng bệnh bạc lá, các gen này đang tiếp tục được nghiên cứu phân lập để sử dụng trong công tác khai thác và chọn tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá.



Hình 8. Phân lập gen lúa

III. Hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật nông nghiệp

Công nghệ sinh học vẫn sẽ là công cụ tiềm năng và hiệu quả trong bảo tồn TNDTTV nông nghiệp; trong tương lai, việc nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học trong bảo tồn quỹ gen sẽ tập trung vào:

- Mở rộng ứng dụng công nghệ bảo tồn *in vitro* cho nhiều loài cây trồng khác nhau;
- Xây dựng quy trình chuẩn cho bảo tồn *in vitro* từng loài cây trồng trong điều kiện sinh trưởng chậm đảm bảo ổn định về mặt di truyền;
- Bảo quản siêu lạnh (cryopreservation) cho một số loài cây trồng sinh sản vô tính;
- Ứng dụng sinh học phân tử trong phân tích đa dạng di truyền của nhiều loài cây trồng nông nghiệp khác;
- Nghiên cứu chức năng gen, lập bản đồ gen đặc biệt ưu tiên cây trồng địa phương và bản địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Lã Tuấn Nghĩa, Lê Thị Thu Trang, (2012). *Nghiên cứu khả năng chịu mặn và đa dạng di truyền của một số giống lúa địa phương Việt Nam*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, số 12, tr.11-26.
2. Lã Tuấn Nghĩa và CS (2004). *Cơ sở lý thuyết và ứng dụng công nghệ gen trong chọn tạo giống cây trồng*, NXB Nông Nghiệp.
3. Lã Tuấn Nghĩa, Trần Danh Sứ, Lê Khả Tường, Lưu Quang Huy, Đinh Văn Đạo, Vũ Linh Chi, Vũ Văn Tùng, Hoàng Thị Huệ (2011). *Thành tựu và định hướng bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật ở Việt Nam phục vụ mục tiêu lương thực và nông nghiệp*. Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam.
4. Nguyễn Kiến Quốc, Lã Tuấn Nghĩa (2015). *Nghiên cứu đa dạng di truyền và xác định allel kháng bệnh bạc lá ở một số giống lúa*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
5. Trần Danh Sứ và cs., (2004). *Nghiên cứu đa dạng di truyền các giống lúa do nông dân đặt tên (Oryza sativa) trên cơ sở phân tích đẳng men, bảo tồn nội vi tài nguyên cây trồng vì sự phát triển bền vững*. NXB Nông nghiệp Hà Nội, Tr. 54-60.
6. Trần Danh Sứ và CS., (2011). *Nghiên cứu đa dạng di truyền lúa nếp địa phương ở các tỉnh đồng bằng bắc bộ bằng chỉ thị SSR*. Tạp chí Công nghệ sinh học năm 2011, số 3, Tr 17-29.
7. Trần Danh Sứ và cs.,(2015). *Đánh giá đa dạng di truyền các giống lúa địa phương tỉnh Lào Cai bằng chỉ thị ADN*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
8. Lưu Ngọc Trinh (2007). *Báo cáo kết quả thực hiện đề tài "Bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật phục vụ cho mục tiêu lương thực và nông nghiệp " năm 2006*. Hà Nội, Tr 40-50.

9. Nguyễn Quốc Trung và CS.,(2014). *Đánh giá đa dạng di truyền một số giống lúa ngắn ngày*. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2014, tập 12, số 4: 461-467.

Tiếng Anh

1. Ashmore S. (1997). *Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
2. Banerjee N.; De Langhe E. (1985). *A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of Musa (banana and plantain)*. Plant Cell Rep 4: 351–354.
3. Bunn E.; Turner S. R.; Panaia M.; Dixon K. W. (2007). *The contribution of invitro technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants*. Aust J Bot 55: 345–355.
4. Cai H. and Morishima H. (2002). “*QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice*”, Theor Appl Genet. 104(8) 1270-1277.
5. Guarino L.; Rao R.; Reid R. (2009). *Collecting plant genetic diversity, technical guidelines*. CAB International, Wallingford; .
6. Hamilton K. N.; Ashmore S. E.; Pritchard H. W (1995). *Thermal analysis and cryopreservation of seeds of Australian wild Citrus species (Rutaceae): Citrus australasica, C. inodora and C. garrawayi*. CryoLetters 30: 268–279.
7. Jalaluddin M, Nakai H and Yamamoto T (2007). *Genetic diversity and DNA fingerprinting of some modern Indica and Japonica rice*. Breed and Genet, SABRAO 39 (1), pp. 43-52.
8. Keller E. R. J.; Senula A.; Leunufna S.; Grübe M. (2006). *Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm biotechnologies for conserving biodiversity maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections*. Int Refrig J 29: 411–417.
9. McCouch R.S., Teytelman L., Xu Y., Lobos B.K., Clare K., Walton M., Fu B., Maghirang R., Li Z., Xing Y., Zhang Q., Kono I., Yano M., Fjellstrom R., DeClerch G., Scheneider D., Cartinhour S., Ware D., 2 and Stein L., (2002). *Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (Oryza sativa L.)*. DNA Research, 9, pp. 199-207.
10. Razdan M. K.; Cocking E. C. (2008). *Conservation of plant genetic resources in vitro. Volume 1: general aspects*. Science, Enfield; 1997. Reed B. M. Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, Berlin.
11. Roca W. M.; Reyes R.; Beltran J. (1984). *Effect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germplasm*. In: Proc.sixth symposium of the international society for tropical rootcrops. Lima, Peru, 441 - 446, 21–26 February.
12. Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. (2003). *Analysis of genetic diversity in crop plant- Salient statistical tool and considerations*. Crop Sci, 43, 1235-1248.