

ĐA DẠNG DI TRUYỀN 19 MẪU GIỎI BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ DNA LỤC LẠP

Đinh Thị Phòng^{1,3}, Đỗ Tiến Phát¹, Nguyễn Văn Phương¹, Phí Hồng Hải²

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trung tâm Nghiên cứu Giống cây rừng

³Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

TÓM TẮT

Để làm cơ sở cho công tác xây dựng phương án bảo tồn loài cây giổi xanh, 15 mẫu ngẫu nhiên và 7 cặp mẫu lục lạp (cpDNA) đã được sử dụng để phân tích tính đa dạng di truyền của 19 mẫu cây giổi xanh được thu thập ở các địa phương khác nhau. Các mẫu ngẫu nhiên sử dụng đều cho tính đa hình về các phân đoạn DNA được nhân bản. Trong phạm vi vùng phân tích, có 134 phân đoạn được nhân bản trong đó có 104 phân đoạn đa hình. Hệ số tương đồng giữa các mẫu phân tích dao động từ 0,568 (mẫu CP2 và SG8) đến 0,950 (mẫu PT2 và PT3). Biểu đồ hình cây về hệ số tương đồng của 19 mẫu giổi xanh nghiên cứu được chia làm hai nhánh, nhánh I chỉ chứa mẫu SG8, nhánh II bao gồm 18 mẫu còn lại và chia làm 6 nhóm phụ. Kết quả phân tích PCR-RAPD cũng chỉ ra phần lớn các mẫu có cùng nguồn gốc địa lý được xếp vào các nhóm nhỏ. Trong số 7 cặp mẫu cpSSR dùng trong nghiên cứu, có 4 cặp mẫu nhân bản được sản phẩm, kích thước sản phẩm dao động từ 1 - 1,25 kb. Tuy nhiên, kết quả cắt hạn chế sản phẩm PCR đã không cho tính đa hình. Tổng số 14 enzyme cắt hạn chế đã được dùng để đánh giá đa hình sản phẩm PCR nhưng chỉ có 6 enzyme cắt thành công sản phẩm PCR. Kết quả nhận được cho phép khẳng định 19 mẫu giổi xanh nghiên cứu là của loài *Mechilia mediocris*.

Từ khóa: Cặp mẫu lục lạp, Đa hình DNA, enzyme cắt hạn chế, RAPD, *Mechilia mediocris*

MỞ ĐẦU

Giổi xanh (*Michilia mediocris* Dandy) là cây thân gỗ có hoa điển hình ở các nước Đông Nam Á và Nam Á. Ở Việt Nam, giổi xanh phân bố trong rừng tự nhiên ở hầu khắp các tỉnh phía Bắc cho tới các tỉnh Tây Nguyên như: Lào Cai, Phú Thọ, Sơn La, Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Kon Tum, Gia Lai, Lâm Đồng... Đây là loài cây sinh trưởng nhanh, có giá trị kinh tế cao. Do nạn phá rừng hoành hành nên diện tích các loại cây rừng ngày càng giảm xuống, một số loài cây quý hiếm đang có nguy cơ tuyệt chủng, trong đó có cây giổi xanh. Hiện nay, Trung Tâm nghiên cứu Giống cây rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đang từng bước nghiên cứu điều tra khảo sát tình trạng của giống nhằm có kế hoạch xây dựng phương án bảo tồn, tạo giống và khai thác nguồn vật liệu cho các loài cây này. Vì thế, việc nghiên cứu mức độ đa dạng di truyền của các loài cây này cần được tiến hành sớm.

Phương pháp phân tích đa dạng DNA bằng các chỉ thị AFLP, RFLP, SSR, RAPD... không phụ thuộc vào điều kiện môi trường mà cho kết quả chính xác (Mace *et al.*, 1996). Trong đó, chỉ thị RAPD được sử dụng tương đối phổ biến trên nhiều loại đối tượng sinh vật (Buso *et al.*, 2001; Ravinsanka *et al.*, 2000; Đinh Thị Phòng *et al.*,

2004; Nguyễn Thị Tâm *et al.*, 2003; Bùi Văn Thắng *et al.*, 2003, Trương Quang Vinh *et al.*, 2008). Hiện nay, các cặp mẫu lục lạp (chloroplast DNA) đang được sử dụng để nhận dạng cho từng loài do DNA lục lạp có tính bảo thủ di truyền rất cao (Devos *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2004; McMillan, Sun., 2004; Nguyễn Thúy Hạnh, 2005).

Xuất phát từ thực tiễn trên, công trình này đề cập đến kết quả "Phân tích đa dạng di truyền 19 mẫu (*Michelia mediocris* Dandy) bằng chỉ thị RAPD và DNA lục lạp" nhằm cung cấp thêm thông tin giúp định hướng cho công tác bảo tồn đa dạng nguồn gen cây giổi xanh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Bao gồm 19 mẫu lá giổi xanh do Trung Tâm nghiên cứu giống cây rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp có ký hiệu và nơi thu thập như bảng 1.

Các mẫu và enzyme sử dụng trong nghiên cứu

Bao gồm 15 mẫu ngẫu nhiên, 7 cặp mẫu lục lạp và 14 enzyme (của hãng Fermentas) đã được sử dụng

để phân tích 19 mẫu giới. Trình tự nucleotide của các mẫu RAPD và các cặp mỗi lục lạp với kích thước lý thuyết của các phân đoạn DNA nhân được như trong

bảng 2a và 2b dựa theo trình tự đã được công bố của Nicolosi và đồng tác giả (2000), Shinozaki và đồng tác giả (1986).

Bảng 1. Nguồn gốc và ký hiệu các mẫu giới xanh dùng trong nghiên cứu.

STT	Ký hiệu mẫu	Nguồn gốc	STT	Ký hiệu mẫu	Nguồn gốc
1	PT1	Phú Thọ 1	11	CP6	Cúc Phương 6
2	PT2	Phú Thọ 2	12	SG1	Sài Gòn 1
3	PT3	Phú Thọ 3	13	SG3	Sài Gòn 3
4	PT4	Phú Thọ 4	14	SG4	Sài Gòn 4
5	PT5	Phú Thọ 5	15	SG5	Sài Gòn 5
6	CP1	Cúc Phương 1	16	SG6	Sài Gòn 6
7	CP2	Cúc Phương 2	17	SG7	Sài Gòn 7
8	CP3	Cúc Phương 3	18	SG8	Sài Gòn 8
9	CP4	Cúc Phương 4	19	VQ1	Vườn Quốc gia Cúc Phương
10	CP5	Cúc Phương 5			

Bảng 2a. Trình tự nucleotide của 15 mẫu RAPD sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Mẫu	Trình tự nucleotide	TT	Mẫu	Trình tự nucleotide
1	OPA04	5' AATCGGGCTG 3'	9	RA142	5' CAATCGCCGT 3'
2	OPB10	5' CTGCTGGGAC 3'	10	RA159	5' GTCCACACGG 3'
3	OPB18	5' CCACAGCAGT 3'	11	RA40	5' GGCGGACTGT 3'
4	OPF10	5' GGAAGCTTGG 3'	12	RA46	5' CCAGACCCTG 3'
5	OPH04	5' GGAAGTCGCC 3'	13	RA50	5' GCTGTGCCAG 3'
6	OPH08	5' GAAACACCCC 3'	14	UBC23	5' CCCGCCTTCC 3'
7	OPP15	5' GGAAGCCAAC 3'	15	UBC346	5' TAGGCGAACG 3'
8	OPQ05	5' CCGCGTCTTG 3'			

Bảng 2b. Trình tự các nucleotide của 07 cặp mỗi lục lạp sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Tên mẫu	Trình tự nucleotide	Kích thước lý thuyết của đoạn gen (bp)
1	<i>psbC2-F</i> <i>trnS-R</i>	5' GGTCTGTACCAAGAAACCAC 3' 5' GGTTCAATCCCTCTCTCTC 3'	1611
2	<i>trnS-F</i> <i>trnM-R</i>	5' GAGAGAGAGGGATTGGAACC 3' 5' CATAACCTTGAGTCACGG G 3'	1254
3	<i>psaA-F</i> <i>trnS-R</i>	5' ACTTCTGGTTCGGCGAACGAA 3' 5' AACCACTCGGCCATCTCTCCTA 3'	3681
4	<i>rbcl1-F</i> <i>rbcl2-R</i>	5' ATGTACCAACAACAGAACTAAAGCAAGT 3' 5' CTTCAAGCAGCAGCTAGTTCAAGGACTCC 3'	1381
5	<i>trnH-F</i> <i>trnK-R</i>	5' ACGGGAATTGAACCCGCGCA 3' 5' CCGACTAGTTCGGGTTCTGA 3'	1831
6	<i>nad4-F</i> <i>nad4-R</i>	5' CAGTGGGTTGGTCTGGTATG 3' 5' TCATATGGGCTACTGAGGAG 3'	2100
7	<i>rps14-F</i> <i>cob-R</i>	5' CACGGGTCGCCCTCGTTCCG 3' 5' GTG TGG AGG ATA TAG GTT GT 3'	1396

Phương pháp nghiên cứu

Phản ứng PCR - RAPD

Một phản ứng PCR có thể tích 25 μ l bao gồm: 1X dịch đệm PCR; 2,5 mM $MgCl_2$; 2 mM dNTPs; 200 nM đoạn mồi; 0,125 đơn vị *Taq* polymerase và 10 ng DNA khuôn. Phản ứng PCR - RAPD thực hiện trong máy PCR - Thermal Cycler PTC 100 theo chu kỳ nhiệt: 94°C/3 phút; (92°C/1 phút; 35°C/1 phút; 72°C/1 phút) 45 chu kỳ; 72°C/10 phút; giữ ở 4°C.

Phản ứng PCR với các cặp mồi lục lạp

Một phản ứng PCR mỗi lục lạp có tổng thể tích là 25 μ l chứa: 1X dung dịch đệm PCR, 50 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs, 10 ng mỗi lục lạp, 0,5 đơn vị *Taq* polymerase và 50 ng DNA genome. Chu trình nhiệt của các phản ứng bao gồm các bước: 94°C/2 phút; (94°C/1 phút, 65°C/1 phút; 72°C/1 phút) 34 chu kỳ; 72°C/10 phút; giữ sản phẩm ở 4°C.

Phản ứng cắt enzyme hạn chế

Sản phẩm PCR của mỗi lục lạp được cắt bằng các enzyme hạn chế với thành phần như sau: 10 μ l sản phẩm PCR, 2 μ l 10X buffer, 2 μ l enzyme và 6 μ l ddH₂O. Phản ứng cắt được thực hiện ở các nhiệt độ tối ưu với các mồi trong thời gian 16 h.

Phân tích số liệu

Phân tích số liệu theo quy ước: 1 = phân đoạn DNA xuất hiện và 0 = phân đoạn DNA không xuất hiện, khi điện di sản phẩm RAPD với các mồi ngẫu nhiên. Xác định hệ số di truyền giống nhau theo phương pháp của Nei và Li (1979).

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Trong đó:

S_{ij}: hệ số giống nhau giữa hai cá thể *i* và *j*.

a: Số phân đoạn DNA xuất hiện ở cả cá thể *i* và *j*.

b: Số phân đoạn DNA xuất hiện ở *i* và không xuất hiện ở *j*.

c: Số phân đoạn DNA xuất hiện ở *j* và không xuất hiện ở *i*.

Lập biểu đồ hình cây trong chương trình NTSYSpc 2.0. Hàm lượng thông tin tính đa hình (Polymorphism information content = PIC) của mỗi mồi xác định theo công thức $PIC = 1 - \sum P_i^2$, trong đó

P_i là tần số của allele thứ *i* của kiểu gen được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa hình DNA của 19 mẫu giỗ xanh bằng chỉ thị RAPD

Số phân đoạn và tần số xuất hiện các phân đoạn DNA

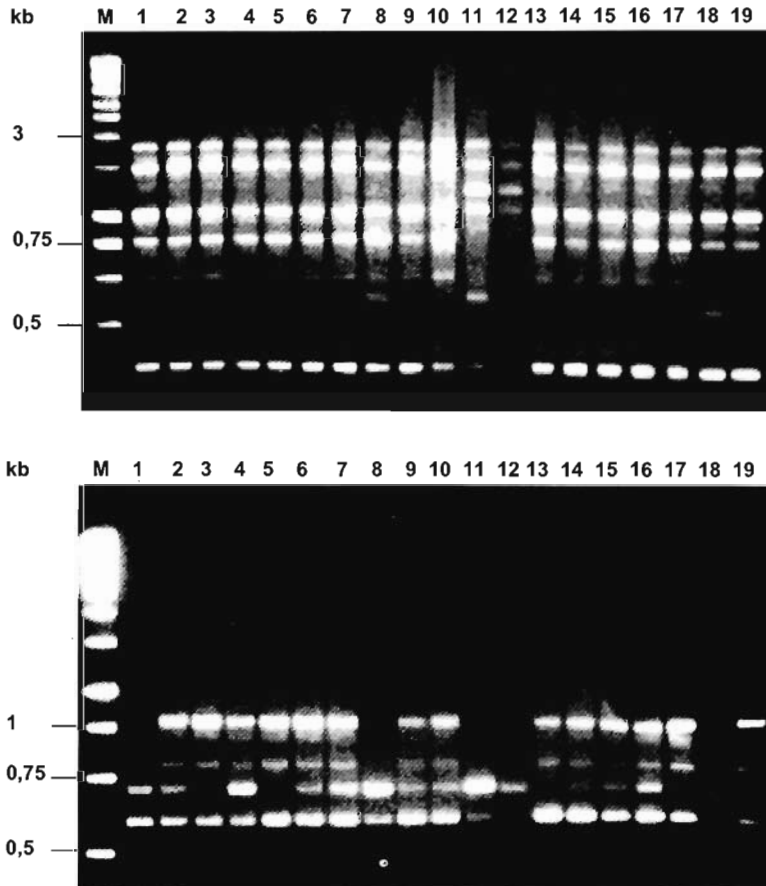
Sản phẩm PCR-RAPD với các mồi khác nhau được điện di trên gel agarose 1,8% để phân tích tính đa hình DNA của 19 mẫu giỗ xanh. Kết quả là tất cả 15 mồi đều cho tính đa hình. Số lượng các phân đoạn DNA nhân bản với mỗi mồi dao động từ 2 - 11 phân đoạn. Kích thước các phân đoạn DNA được nhân bản trong khoảng từ 250 - 2000 bp. Số phân đoạn DNA nhân bản được của 19 mẫu giỗ với 15 mồi RAPD là 1380. Số phân đoạn DNA nhân bản được với mỗi mồi ngẫu nhiên dao động từ 62 - 80 phân đoạn, trong đó mồi OPA04 có số phân đoạn DNA nhân bản là nhiều nhất (136 phân đoạn DNA) và ít nhất là mồi RA46 (59 phân đoạn).

Kết quả ở bảng 3 chỉ ra, tổng số phân đoạn DNA trong phạm vi phân tích của 19 mẫu cây khi phân tích 15 mồi ngẫu nhiên là 134 phân đoạn. Trong đó có 106 phân đoạn là đa hình (chiếm 79,1%) và không đa hình là 28 phân đoạn (chiếm 20,9%). Hai mồi OPB18 và RA159 có tính đa hình hoàn toàn (100%) và mồi RA142 cho tính đa hình thấp nhất (25%). Trong đó, có 13/15 mồi có số phân đoạn đa hình trên 50%, hai mồi OPH04 và RA142 có số phân đoạn đa hình dưới 50%. Kết quả này cũng phù hợp khi phân tích hàm lượng thông tin đa hình thể hiện ở giá trị PIC (Polymorphism Information Content). Cụ thể, giá trị PIC của mồi RA142 là 0,03 (đa hình thấp nhất) và giá trị PIC của mồi RA159 là 0,84 (đa hình cao nhất). Trong đó, 9/15 mồi cho giá trị PIC $\geq 0,5$. Kết quả này một lần nữa khẳng định tính đa hình DNA của 19 mẫu giỗ xanh.

Tính đa hình thể hiện ở sự xuất hiện hay không xuất hiện phân đoạn DNA khi so sánh giữa các giống khi phân tích với mỗi mồi RAPD. Chẳng hạn, tại vị trí khoảng 0,7 kb tại giếng 8 (CP3), 11 (CP6) và 18 (SG8) đã xuất hiện phân đoạn DNA mới khi phân tích với mồi OPA04, hay tại vị trí khoảng 1 kb giếng 1 (PT1), 8 (CP3), 11 (CP6), 12 (SG1) và 18 (SG8) phân đoạn DNA không xuất hiện khi phân tích với mồi OPB18 (Hình 1).

Bảng 3. Tỷ lệ phân đoạn đa hình và giá trị PIC của các mẫu nghiên cứu.

STT	Môi	PIC	Tổng số phân đoạn	% phân đoạn đa hình	STT	Môi	PIC	Tổng số phân đoạn	% phân đoạn đa hình
1	OPA04	0,26	9	55,56	9	RA142	0,03	4	25,00
2	OPB10	0,50	10	90,00	10	RA159	0,84	19	100,00
3	OPB18	0,49	6	100,00	11	RA40	0,74	12	91,67
4	OPF10	0,76	9	88,89	12	RA46	0,29	4	75,00
5	OPH04	0,22	5	40,00	13	RA50	0,73	12	75,00
6	OPH08	0,48	8	87,50	14	UBC23	0,66	13	76,92
7	OPP15	0,31	7	57,14	15	UBC346	0,46	6	66,67
8	OPQ05	0,46	10	80,00	Tổng			134	79,10

**Hình 1.** Điện di sản phẩm PCR - RAPD trên gel agarose 1,8% của hai môi OPA04 và OPB18. M. Thang chuẩn DNA kích thước 1 kb; 1 - 19. Tên của các mẫu giỗ theo thứ tự trong bảng 1.

Mối quan hệ di truyền của 19 mẫu giỗ dựa trên phân tích với 15 mỗi RAPD

Để có bức tranh tổng quát về quan hệ giữa các mẫu nghiên cứu ở mức độ phân tử, sự đa dạng di truyền thể hiện trên sơ đồ hình cây (Hình 2) của 19 mẫu giỗ đã phân ra làm 2 nhánh rõ ràng (nhánh I và nhánh II) và không có giống nào giống nhau 100%. Hệ số tương đồng di truyền của 19 mẫu giỗ dao động từ 0,62 đến 0,98 và được phân làm 2 nhánh chính sau:

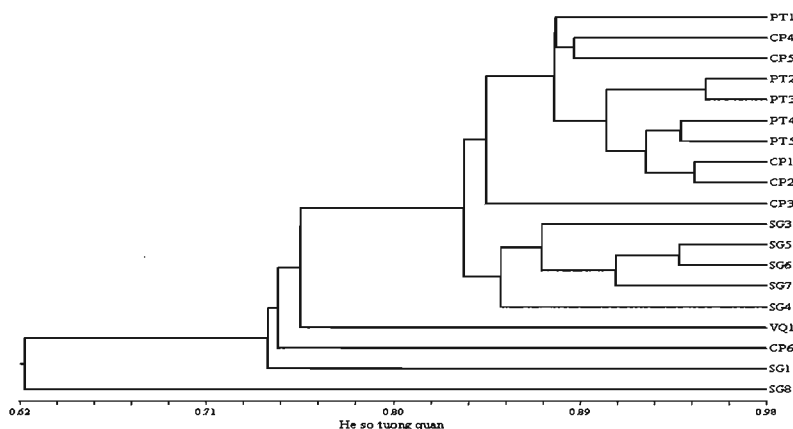
- Nhánh I chỉ có 1 giống SG8, có mức độ tương đồng di truyền với 18 giống còn lại khoảng 0,62.

- Nhánh II gồm 18 giống giỗ (PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, SG1, SG2, SG3, SG4, SG5, SG6, SG7 và VQ1) có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,74 đến 0,96 và được phân làm 6 nhóm phụ.

Trong nhánh II có hai giống PT2 và PT3 (có nguồn gốc từ Phú Thọ) cùng nằm trong nhóm phụ và có mức độ tương đồng di truyền cao nhất (khoảng 0,96).

Điều đáng quan tâm ở đây là hầu hết các giống có cùng nơi thu mẫu lập thành một nhóm nhỏ trên cây phân loại. Điều hình 5 mẫu SG3, S4, SG5, SG6 và SG7 thu từ Sài Gòn lập thành một nhóm phụ.

Như vậy, từ kết quả phân tích DNA genome của 19 mẫu giỗ với 15 mỗi RAPD cho thấy sự đa dạng di truyền của các mẫu giỗ thu từ các địa điểm khác nhau không cao.



Đa hình DNA của 19 mẫu giỗ bằng việc sử dụng các mỗi lục lập

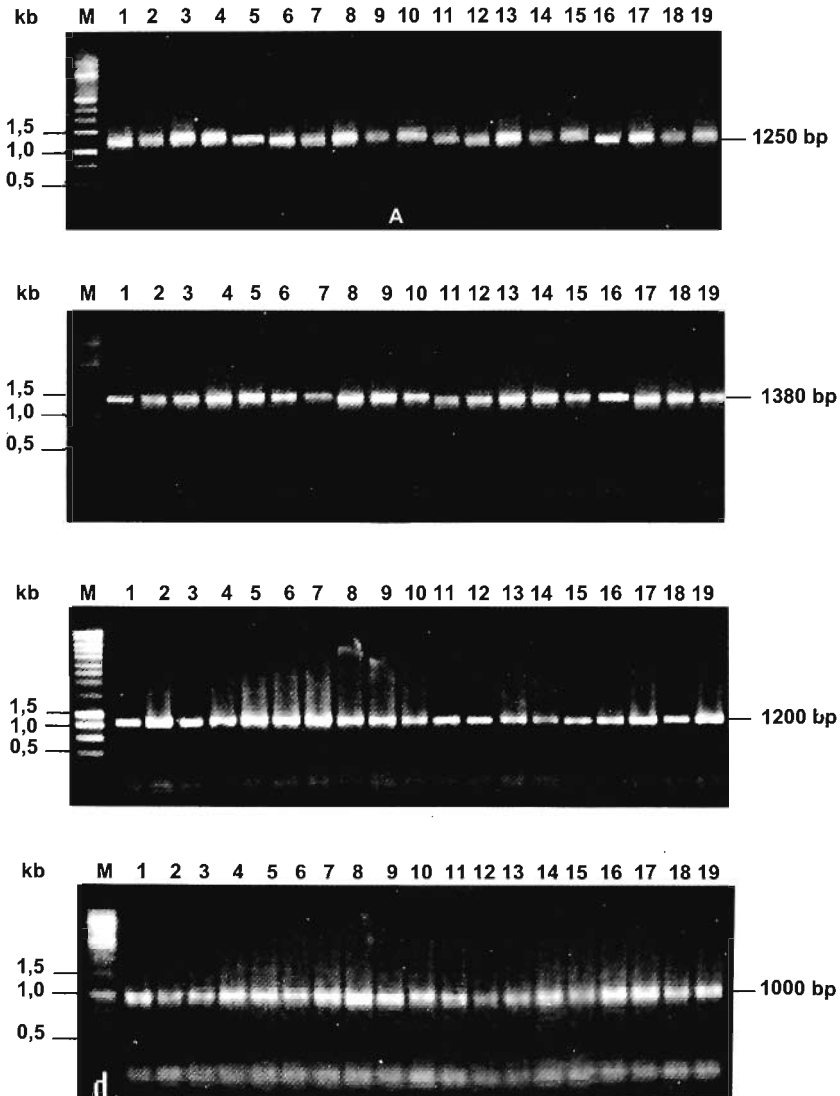
Cùng với việc đánh giá đa dạng genome nhân bằng các chỉ thị RAPD, trong nghiên cứu này, các cặp mỗi lục lập (cpDNA) cũng được sử dụng để đánh giá sự đa dạng di truyền. Thường các hệ gen lục lập của từng loài có tính bảo thủ cao và tần số đột biến thấp hơn so với DNA nhân (Provan *et al.*, 1997, Mohanty *et al.*, 2001, Pardo *et al.*, 2004, Navacues *et al.*, 2005). Để có thể tìm hiểu một cách tương đối toàn diện tính đa dạng DNA của các mẫu giỗ thu thập ở các địa phương khác nhau, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng thử sử dụng các cặp mỗi lục lập để đánh giá tính đa hình DNA lục lập của 19 mẫu giỗ.

Bây cặp mỗi lục lập đã được sử dụng, nhưng chỉ có 4/7 cặp mỗi lục lập là nhân được sản phẩm. Trong đó hai cặp mỗi lục lập *trnS - trnFM* và *rbcL1 - rbcL2* đã nhân bản được phân đoạn DNA có độ dài khoảng 1250 bp (Hình 3A) và 1380 bp (Hình 3B), tương ứng. Hai cặp mỗi lục lập *nad4 - nad4* và *rpS14 - cob* cũng đã nhân bản được phân đoạn DNA có độ dài khoảng 1,2 kb và 1 kb (Hình 3C, 3D, tương ứng), tuy nhiên kích thước này lại không đúng với lý thuyết (2,1 kb và 1,36 kb, tương ứng). Điều này cũng có thể giải thích rằng, các cặp mỗi lục lập đang sử dụng là của Shinozaki và đồng tác giả (1986) đã thực hiện việc nhân dòng và đọc trình tự trên đối tượng cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.), vì thế đôi khi kích thước nhân bản nhận được sẽ không giống nhau mặc vậy cần phải tối ưu phản ứng hơn nữa để có

chính xác hơn. Tuy nhiên, điều đáng quan tâm ở đây là sản phẩm PCR của 4 cặp mỗi lục lạp khi phân tích với 19 mẫu giòi xanh đã không cho sự đa hình (các mẫu giòi xanh đều nhận được các phân đoạn DNA có kích thước như nhau).

Vì vậy, để xem xét tính đa hình DNA lục lạp của 19 mẫu giòi xanh, chúng tôi đã sử dụng 14 enzyme hạn chế để cắt sản phẩm PCR mỗi lục lạp của tất cả các mẫu giòi khi phân tích với 4 cặp mỗi nêu trên.

Nếu ở các mẫu có sự khác nhau về trình tự nucleotide sẽ dẫn đến thay đổi vị trí cắt của các enzyme. Bằng phương pháp này có thể nhận biết được sự đa hình của các vùng cpDNA ở các mẫu nghiên cứu. Phương pháp này đã được nhiều tác giả sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền và đánh giá sự tiến hóa của loài (Mason-Gamer *et al.*, 1995; Nicolosi *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2001; Devos *et al.*, 2003; McMillan, Sun, 2004; Nguyễn Đức Thành *et al.*, 2007).



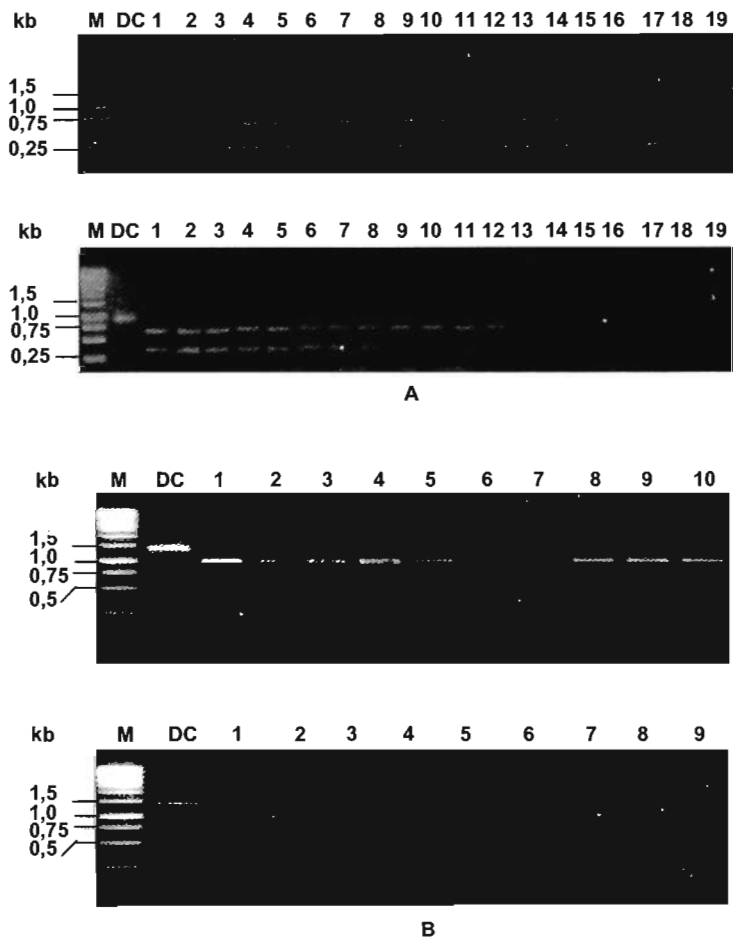
Hình 3. Điện di sản phẩm PCR của các cặp mỗi lục lạp *trnS* - *trnM* (A), *rbcl1* - *rbcl2* (B) *nad4* - *nad4* (C) và *rpS14* - *cob* (D). M. Thang phân tử chuẩn 1 kb; 1 - 19: Thứ tự sắp xếp của các mẫu giòi như trong bảng 1.

Kết quả cắt enzyme hạn chế

Sản phẩm PCR mỗi lục lạp nhận được từ 4 cặp mồi trên đã được cắt với 14 enzyme hạn chế *Nco*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Eam*1105I, *Nde*I, *Nhe*I, *Taq*I, *Pst*I, *Not*I, *Sac*I, *X-ba*I, *Rsa*I, *Sma*I. Kết quả nhận được bằng 5 cho thấy các enzyme *Eco*RI, *Nde*I, *Rsa*I và *Taq*I cắt được sản phẩm của cặp mồi *trnS* – *trn*fM; các enzyme *Eco*RI, *Rsa*I, *Taq*I và *Pst*I cắt được sản phẩm của cặp mồi *rbc*L1 – *rbc*L2 và *nad*4 – *nad*4; các enzyme *Eco*RI, *Rsa*I *Hind*III, *Rsa*I và *Taq*I cắt được sản phẩm của cặp mồi *rps*14

– *cob*. Tuy nhiên, sản phẩm PCR mỗi lục lạp của tất cả các mẫu giòi khi xử lý bằng các enzyme trong nghiên cứu cũng không cho các đoạn cắt đa hình (Hình 4).

Từ các kết quả nhận được khi phân tích 19 mẫu giòi xanh với các mồi lục lạp đã không cho sự đa hình. Điều này cho thấy, sự bảo thủ di truyền rất cao trong hệ gen lục lạp ở cây giòi và cho phép khẳng định rằng các mẫu giòi thu từ nhiều địa phương khác nhau nhưng vẫn là của một loài *Michelia mediocris* Dandy.



Hình 4. Sản phẩm PCR của các cặp mồi sau khi xử lý bằng các enzyme hạn chế A, B: Sản phẩm của các cặp mồi *trnS* – *trn*fM và *rbc*L1 – *rbc*L2 được cắt bằng *Eco*RI. M. Thang phân tử chuẩn 1 kb; 1 - 19. Thứ tự sắp xếp của các mẫu giòi như trong bảng 1.

Bảng 5. Kết quả cắt sản phẩm PCR mỗi lục lạp của 19 mẫu giò xanh bằng 14 enzyme hạn chế.

STT		EcoRI	BamHI	Eam1105I	HindIII	NoI	NdeI	NheI	RsaI	XbaI	SacI	TaqI	PstI	SmaI	NcoI
1	<i>trnS – trnM</i>	+	–	–	–	–	+	–	+	–	–	+	–	–	–
2	<i>rbcL1 – rbcL2</i>	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–
3	<i>nad4 – nad4</i>	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–
4	<i>rpS14 – cob</i>	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–

Ghi chú: “+”: có điểm cắt hạn chế; “–”: không có điểm cắt hạn chế.

KẾT LUẬN

Tất cả 15 mẫu ngẫu nhiên dùng để phân tích đều cho tính đa hình ở 19 mẫu giò xanh với giá trị PIC dao động từ 0,03 (RA142) đến 0,84 (RA15), trong đó 9 mẫu cho giá trị PIC $\geq 0,5$.

Hệ số tương đồng di truyền của 19 mẫu giò xanh dao động từ 0,62 đến 0,98 và được phân làm 2 nhánh chính sau: Nhánh I chỉ có 1 mẫu SG8 và có mức độ tương đồng di truyền với 18 giống còn lại khoảng 0,62. Nhánh II gồm 18 mẫu giò (PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6, SG1, SG2, SG3, SG4, SG5, SG6, SG7 và VQ1) có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,74 đến 0,96 và được phân làm 6 nhóm phụ. Sự đa dạng của các mẫu giò còn được thể hiện ngay trên cùng một vùng địa lý.

Bây cặp mỗi lục lạp sử dụng để phân tích DNA của 19 mẫu giò xanh đã không cho sự đa hình. Kết quả nhận được cho phép khẳng định thêm sự bảo thủ di truyền rất cao trong hệ gen lục lạp ở thực vật bậc cao. Các mẫu giò nghiên cứu là của cùng một loài *Michelia mediocris*.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành nhờ kinh phí của đề tài “Bảo tồn nguồn gen của Viện Khoa học và Lâm nghiệp Việt Nam” giai đoạn 2007 - 2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Văn Thắng, Trần Văn Dương, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Thắng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình (2003) Đánh giá tính đa dạng của một số giống lạc trong tập đoàn chống chịu bệnh gỉ sắt bằng kỹ thuật RAPD. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn Quốc, Hà Nội*: 805-809.

Buso GS, Rangel PH, Fereira ME (2001) Analysis of

random and specific sequences of nuclear and cytoplasmic DNA in diploid and tetraploid american wild rice species (*Oryza* spp.). *Genome* 44(3): 476-494.

Chung SM, Jack ES (2003) The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theor Appl Genet* 107: 757-767.

Devos N, Tytecta D, Raspe O, Wesselingh RA, Jacquemart AL (2003) Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 243: 85-97.

Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Nguyễn Thị Hải Hà, Lê Duy Thành, Nguyễn Văn Viết (2004) Nghiên cứu đa dạng tập đoàn giống lúa có tính kháng khác nhau với bệnh bạc lá lúa vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* bằng kỹ thuật RAPD. *Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc. Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học sự sống định hướng Nông Lâm nghiệp miền núi. Thái Nguyên 23/9/2004*: 571-574.

Heinze B (2007) A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods* 3: 4.

Mace ES, Lester RN, Gebhardt CG (1999) AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). *Theor Appl Genet* 99: 626-633.

Mason-Gamer RJ, Holsinger KE, Jansen RK (1995) Chloroplast DNA haplotype variation within and among populations of *Coreopsis grandiflora* (Asteraceae). *Mol Biol Evol* 12(3): 371-381.

McMillan E, Sun G (2004) Genetic relationships of tetraploid *Elymus* species and their genomic donor species inferred from polymerase chain reaction - restriction length polymorphism analysis of chloroplast gene regions. *Theor Appl Genet* 108: 535-542.

Mohanty A, Martin JP, Aguinalalde I (2001) Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunusavium* L. *Theor Appl Genet* 103: 112-117.

Navascues M, Emerson BC (2005) Chloroplast

microsatellites: measure of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Mol Ecol* 14: 1333-1341.

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction end nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273.

Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thủy Hạnh, Trần Quốc Trọng (2007) Kết quả sử dụng một số chuỗi gen lục lạp trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xuất xứ cây lâm nghiệp. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 77-83.

Nguyễn Thị Tâm, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình (2003) Ứng dụng kỹ thuật phân tích sự đa hình các phân đoạn DNA được nhân bản ngẫu nhiên (RAPD) vào việc đánh giá các dòng lúa chọn lọc từ mô sẹo chịu nhiệt độ cao. *Báo cáo khoa học Hội nghị toàn Quốc lần thứ hai. Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học sự sống. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội*: 1003-1007.

Nguyễn Thủy Hạnh (2005) Nghiên cứu mối quan hệ di truyền một số chi và loài cây họ dầu (Dipterocarpaceae) ở Việt Nam bằng chỉ thị RAPD và DNA lục lạp. *Luận án Thạc sĩ sinh học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*.

Nicolosi E, Deng ZN, Gentle A, Mafa SL, Continella G and Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular marker. *Theor Appl Genet* 100: 1155-1166.

Pardo C, Cubas P, Tahiri H (2004) Molecular phylogeny and systematics of Genista (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). *Plant Syst Evol* 244: 93-119.

Provan J, Corbett G, McNicol JW, Powell W (1997) Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 40: 104-110.

Ravinsanka KV, Lahitha A, Dinesh MR (2000) Assesment of genetic relatedness among mango cultivars of India using RAPD marker. *Hort Sci Biote* 3: 87-89.

Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng B.Y, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome its gene organization and expression. *EMBO J* 5(9): 2043-2049.

Trương Quang Vinh, Nguyễn Thị Tâm, Đỗ Tiến Phát, Nguyễn Thanh Danh (2008) Đánh giá sự đa hình DNA một số giống khoai tây (*Solanum tuberosum* L.) bằng kỹ thuật RAPD. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 1: 20-25.

EVALUATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF 19 *MECHILIA MEDIOCRIS* SAMPLES BY RAPD AND CHLOROPLAST DNA MARKERS

Dinh Thi Phong^{1,3,*}, Do Tien Phat¹, Nguyen Van Phuong¹, Phi Hong Hai²

¹Institute of Biotechnology

²Forest Tree Improvement Research Centre

³Vietnam National Museum of Nature

SUMMARY

To contribute to the development of an effective strategy for conservation of *Mechilia mediocris*, we used fifteen random primers and seven chloroplast primers to analyse the genetic diversity of 19 *Mechilia mediocris* samples that were collected from three different locations (Phu Tho, Cuc Phuong and Sai Gon). All of 15 RAPD primers gave DNA polymorphism. In the analysed regions of 0.25 - 3 kb, there were 134 DNA fragments amplified and 104 DNA fragments were polymorphic. Genetic similarity coefficients of 19 *Mechilia mediocris* samples ranged from 0.568 (CP2 and SG8) to 0.950 (PT2 and PT3). The phylogenetic tree of 19 *Mechilia mediocris* samples was divided into two main groups. The first group included only SG8 sample and the second consisted remained samples which were classified into six subgroups. According to the result of RAPD-PCR analyses, the samples that were collected from the same geographical region pertained to one subgroup. When we studied genetic diversity of 19 *Mechilia mediocris* samples using 7 chloroplast primer, four primer pairs generated DNA bands from 1 to 1.25 kb in length. We used 14 restriction enzymes to analyse PCR products of these primer pairs. However, only 6 restriction enzymes had cleaved PCR fragments but no polymorphism was observed. Taken together, our results proved that all 19 *Mechilia mediocris* samples belong to *Mechilia mediocris* species.

Keywords: DNA polymorphism, restricted enzyme, RAPD, chloroplast markers, *Mechilia mediocris* species