

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ SÂM NGỌC LINH 4 VÀ 5 TUỔI TRỒNG TẠI TRẠI SÂM TẮK NGO CỦA XÃ TRÀ LINH, HUYỆN NAM TRÀ MY, TỈNH QUẢNG NAM BẰNG CHỈ THỊ RAPD

Trương Thị Hồng Hải*, Đặng Thanh Long, Nguyễn Thị Kim Cúc, Nguyễn Văn Hoan

Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Đối với các loài cây thuốc, một trong những yêu cầu hàng đầu hiện nay của nền công nghiệp dược phẩm dựa trên dược liệu tự nhiên là yêu cầu tiêu chuẩn hóa nguồn nguyên liệu ban đầu. Việc lựa chọn được nguồn gen có chất lượng phục vụ công tác chọn tạo giống các loài cây thuốc có vai trò hết sức quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị phân tử phân tích DNA đa hình nhân bản ngẫu nhiên (Random amplification of polymorphic DNA - RAPD) nhằm đánh giá đa dạng di truyền của 100 cây sâm Ngọc Linh 4 và 5 tuổi trồng tại trại sâm Tắc Ngo của xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Kết quả cho thấy sự đa dạng di truyền của các cá thể trong quần thể sâm nghiên cứu khá cao. Với 7 mẫu ngẫu nhiên qua PCR thu được 132 băng DNA, trong đó mỗi UBC#316 thể hiện sự đa dạng cao nhất với giá trị H_o đạt trung bình 0,484, tiếp đến là mỗi UBC#347 ($H_o = 0,446$). Sự đa dạng thấp nhất là ở mỗi UBC#304 ($H_o = 0,350$). UBC#315 là mỗi tạo ra nhiều băng đa hình nhất (27/27 băng), hệ số đa dạng trong từng mẫu ngẫu nhiên dao động từ khoảng 0,350 đến 0,484, trung bình là 0,410. Mỗi UBC#304 cho sự đa hình các băng khuếch đại ít nhất (13/16 băng DNA). Biến dị di truyền trong quần thể sâm Ngọc Linh là ngẫu nhiên. Sự sai khác trong di truyền có thể là do ảnh hưởng chủ yếu bởi điều kiện sinh sản và nguồn gốc hạt giống khác nhau. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu sâm Ngọc Linh biến động từ 0,000-0,950 và chia thành hai nhóm chính ở hệ số tương đồng di truyền 0.700.

Từ khóa: Chỉ thị DNA, RAPD, đa dạng di truyền sâm Ngọc Linh, Tắc Ngo Quảng Nam.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với các loài cây thuốc, một trong những yêu cầu hàng đầu hiện nay của nền công nghiệp dược phẩm dựa trên dược liệu tự nhiên là yêu cầu tiêu chuẩn hóa nguồn nguyên liệu ban đầu. Việc lựa chọn được nguồn gen có chất lượng phục vụ công tác chọn tạo giống các loài cây thuốc có vai trò hết sức quan trọng. Trong quá trình đó, việc phân tích các chỉ thị DNA cho phép đánh giá một cách chính xác mức độ đa dạng di truyền của một loài cây thuốc nhằm định hướng bảo tồn, chọn, tạo và nhân giống phù hợp, đáp ứng yêu cầu của quá trình phát triển một nền công nghiệp chế biến dược liệu bền vững. Hiện nay việc sử dụng các chỉ thị DNA (RAPD-PCR, RFLP-PCR, AFLP, SSR,...) ngày càng được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu phân loại, phân tích đa dạng sinh học, xác định khoảng cách di truyền và đặc trưng ở các cá thể và quần thể thực vật nhằm mục đích bảo tồn và chọn giống (Phạm Thanh Huyền, Đình Đoàn Long, 2017).

Nhân sâm thuộc chi *Panax*, họ Araliaceae phân bố khắp thế giới từ Đông Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản) đến Bắc Mỹ (Mỹ, Canada). Có 12 loài thuộc chi *Panax* nhưng chỉ có 5 loài là *P. ginseng*, *P. quinquefolius*, *P. notoginseng*, *P. japonicus* và *P. vietnamensis* thường được sử dụng như thuốc thảo dược nhờ hàm lượng saponin cao trong rễ củ (Choi *et al.*, 2009).

Panax vietnamensis Ha et Grushv. (sâm Ngọc Linh) còn được gọi với những tên khác như sâm Việt Nam, Sâm khu năm (sâm K5),... là giống của Việt Nam (Pua, 2007). Chúng chỉ được phát hiện ở độ cao 1.200 m trở lên, đạt mật độ cao nhất ở khoảng từ 1.700 - 2.000 m dưới tán rừng già. Cho đến nay, chỉ có núi Ngọc Linh ở hai tỉnh Kon Tum và Quảng nam là có nhân sâm này.

Kỹ thuật phân tích DNA đa hình nhân bản ngẫu nhiên (Random amplification of polymorphic DNA - RAPD) đã được bắt đầu sử dụng từ năm 1997 để nghiên cứu trên chi *Panax* nhằm phân biệt rễ *P. ginseng* khô thu thập từ 4 vùng sinh thái khác nhau tại Trung Quốc và Hàn Quốc (Um *et al.*, 2001). Với mục tiêu phân tích đa dạng di truyền hỗ trợ công tác chọn tạo giống, một số lượng lớn chỉ thị RAPD đã được sử dụng để đánh giá các quần thể sâm *P. quinquefolius* tại Canada (Bai *et al.*, 1997) và Trung Quốc (Shao *et al.*, 2004). Cho đến nay, rất nhiều quần thể *P. ginseng* từ nhiều khu vực khác nhau đã được thu thập để đánh giá đa dạng di truyền và sự khác biệt giữa các giống bằng chỉ thị RAPD (Bang *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị RAPD nhằm phân tích đánh giá đa dạng di truyền của quần thể 100 cá thể sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) ở huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam là rất cần thiết góp phần vào công tác tuyển chọn các cá thể sâm

gốc làm nguồn nguyên liệu cho những nghiên cứu sau này và sản xuất cây giống chất lượng cao đáp ứng tốt nhu cầu sản xuất của thực tế của địa phương.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) 4 và 5 tuổi (100 mẫu) được thu tại trại sâm Tắc Ngo của xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Danh sách các mẫu sâm Ngọc Linh nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Mẫu lá sâm Ngọc Linh sau khi thu được ghi số ký hiệu mẫu và bảo quản trong tủ lạnh -20°C. DNA tổng số được chiết tách từ lá sâm Ngọc Linh bằng phương pháp CTAB theo mô tả của Doyle và Doyle (1990) cải tiến (Doyle và Doyle, 1990): 200 mg lá được cắt thành từng mảnh nhỏ và nghiền với 500 µL đệm chiết CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA và 1,4 M NaCl, pH 8,0), bổ sung 2% β-mercaptoethanol, 1% polyvinylpyrrolidone và ủ ở 60°C trong 60 phút. Mẫu DNA được tinh sạch qua hai giai đoạn: **Giai đoạn 1.** Mẫu được chiết 2 lần với cùng thể tích hỗn hợp chloroform:isoamylalcohol (24:1) và kết tủa bằng 2/3 thể tích isopropanol ở -20°C. Kết tủa DNA sẽ được thu bằng cách ly tâm nhẹ 3.000 vòng/phút trong 10 phút và sau đó tái huyền phù trong 100 µl đệm TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM Na₂EDTA). Loại bỏ RNA với 100 µg/µl RNase A ở 37°C trong 60 phút; **Giai đoạn 2.** Dung dịch có chứa DNA sẽ được tiến hành tinh sạch lần 2 với 1/2 thể tích phenol + 3/4 thể tích chloroform:isoamylalcohol (24:1) (tiến hành 2 lần). Dung dịch thu được sẽ được kết tủa DNA với 1/10 thể sodium acetate and 2.5 thể ethanol -20°C trong 60 phút, sau đó ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút thu kết tủa để khô ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, tiêu thể DNA được tái hòa tan trong đệm TE. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được xác định bằng phương pháp quang phổ trên máy NanoDrop ND-1000 (Thermo, Mỹ) và điện di trên gel agarose 1%. Dung dịch DNA được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các phản ứng PCR-RAPD.

Phân tích bằng chỉ thị RAPD

Kỹ thuật đa hình các đoạn khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD) được sử dụng để nghiên cứu mức độ đa dạng di truyền của sâm Ngọc Linh (Williams *et al.*, 1990). Mẫu sâm Ngọc Linh được lựa chọn trên cơ sở nguồn gốc không trùng nhau của chúng, tổng số mẫu phân tích là 100 mẫu được trình bày ở bảng 1. Số lượng mẫu sử dụng trong nghiên cứu đa dạng là 7 (bảng 2).

Bảng 1. Các mẫu sâm Ngọc Linh sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu mẫu	STT	Ký hiệu mẫu	STT	Ký hiệu mẫu	STT	Ký hiệu mẫu	STT	Ký hiệu mẫu	STT	Ký hiệu mẫu	STT	Ký hiệu mẫu
1	NL012	16	NL149	31	NL435	45	NL068	59	NL480	73	NL495	87	NL160
2	NL025	17	NL183	32	NL443	46	NL052	60	NL464	74	NL459	88	NL140
3	NL033	18	NL187	33	NL445	47	NL135	61	NL471	75	NL457	89	NL120
4	NL053	19	NL206	34	NL461	48	NL141	62	NL472	76	NL440	90	NL115
5	NL064	20	NL260	35	NL462	49	NL261	63	NL482	77	NL451	91	NL109
6	NL091	21	NL284	36	NL467	50	NL266	64	NL486	78	NL463	92	NL215
7	NL101	22	NL314	37	NL473	51	NL278	65	NL492	79	NL452	93	NL182
8	NL102	23	NL322	38	NL481	52	NL281	66	NL382	80	NL460	94	NL189
9	NL105	24	NL347	39	NL483	53	NL249	67	NL388	81	NL455	95	NL195
10	NL111	25	NL394	40	NL493	54	NL250	68	NL432	82	NL016	96	NL207
11	NL126	26	NL404	41	NL069	55	NL332	69	NL438	83	NL075	97	NL181
12	NL128	27	NL420	42	NL074	56	NL343	70	NL441	84	NL077	98	NL173
13	NL131	28	NL423	43	NL097	57	NL380	71	NL389	85	NL103	99	NL178
14	NL139	29	NL425	44	NL107	58	NL476	72	NL497	86	NL166	100	NL287
15	NL142	30	NL433										

Bảng 2. Trình tự các mồi dùng trong PCR-RAPD

STT	Mồi	Trình tự 5'-3'
1	UBC#301	CGGTGGCGAA
2	UBC#302	CGGCCACGT
3	UBC#304	AGTCCTCGCC
4	UBC#315	GGTCTCCTAG
5	UBC#316	CCTCACCTGT
6	UBC#343	TGTTAGGCTC
7	UBC#347	TTGCTTGCGC

Phản ứng PCR-RAPD được thực hiện theo phương pháp mô tả của Coletta-Filho và cộng sự (1998) với các mồi ngẫu nhiên (Operon Technologies, CA) (bảng 2), trên máy luân nhiệt Thermocycler (SimpliAmp, ThermoFisher Scientific, USA). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 10 pmol mồi; 1 µl (25 mM MgCl₂); 0,5 µL (10 mM dNTP hỗn hợp); 0,2µl (5 unit/µl Taq DNA polymerase (PCR Master Mix 2×, Fermentas, Đức)); 30 ng DNA khuôn mẫu với tổng thể tích phản ứng là 25 µl với chu trình nhiệt bao gồm: biến tính 95°C/2 phút; 42 chu kỳ: 94°C/1 phút, 37°C/1 phút, 72°C/2 phút; và cuối cùng là 72°C/7 phút. Sản phẩm PCR-RAPD được điện di trên agarose gel 2% và nhuộm bằng ethidium bromide. Hình ảnh điện di được thu nhận bằng hệ thống Gel Documentation và phân tích bằng chương trình Quantity One (Bio-rad, Mỹ) (Coletta-Filho *et al.*, 1998).

Phương pháp xử lý số liệu

Phổ điện di sản phẩm PCR-RAPD của các mẫu với các mồi được phân tích theo nguyên tắc dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng, đánh số “1” nếu có xuất hiện băng và số “0” nếu không xuất hiện băng. Hệ số đa dạng di truyền được tính theo các công thức sau (Verma *et al.*, 2007).

Mức độ đa dạng di truyền ở mỗi vùng nghiên cứu (Shannon’s index):

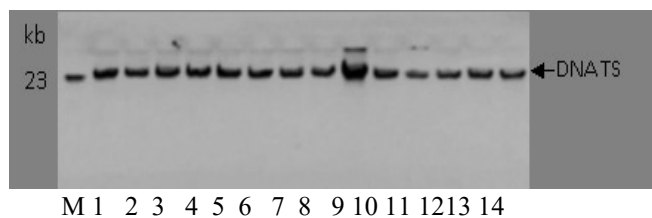
$H_o = -\sum p_i \log_2 p_i$ (trong đó p_i là tần số xuất hiện của sản phẩm PCR-RAPD thứ i trong quần thể) bằng phần mềm PopGen 3.2.

Xây dựng giản đồ phả hệ theo thuật toán UPGMA của 100 cây sâm Ngọc Linh nghiên cứu được thực hiện bằng chương trình NTSYS 2.1 (Exeter Software, Mỹ) dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard (1908) (Jaccard, 1908).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết DNA tổng số

Mẫu lá của 100 cá thể sâm Ngọc Linh được sử dụng để tách chiết DNA bằng phương pháp CTAB theo mô tả của Doyle và Doyle (1990) cải tiến. DNA tổng số sau khi tách chiết được điện di trên agarose gel 1%. Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy DNA tổng số thu được đại diện của các mẫu nghiên cứu cho một băng duy nhất, sạch, không đứt gãy, rõ nét. Chất lượng DNA tổng số đảm bảo để làm nguyên liệu cho những thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Kết quả tách chiết DNA tổng số
 M: Khối lượng thang chuẩn DNA (Marker DNA 23 kb ladder, Bionline);
 1-14: các mẫu DNA tổng số tách từ lá Sâm Ngọc Linh đại diện cho 100 mẫu nghiên cứu

Phân tích đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị PCR-RAPD

Chúng tôi sử dụng 100 mồi ngẫu nhiên (RAPD) để tiến hành sàng lọc trên 3 mẫu sâm Ngọc Linh được chọn ngẫu nhiên trong 100 mẫu nghiên cứu nhằm tìm kiếm những mồi RAPD cho tỷ lệ băng đa hình cao. Kết quả chúng tôi chọn được 7 mồi ngẫu nhiên RAPD để tiến hành phân tích mối quan hệ di truyền của 100 mẫu sâm nghiên cứu (hình 2).

Phân tích mối quan hệ di truyền của 100 mẫu sâm Ngọc Linh trồng tại trại sâm Tắc Ngo của xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam bằng 7 mồi ngẫu nhiên RAPD (hình 2) cho thấy tất cả các mồi đều cho đa hình.

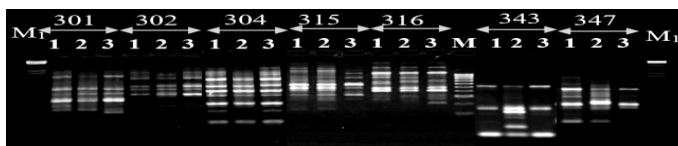
Kết quả nghiên cứu ở bảng 4 cho thấy có 132 băng DNA được khuếch đại từ 7 mồi ngẫu nhiên, tất cả đều là

băng đa hình (số băng đa hình trên mỗi trung bình là 18,43), kích thước băng dao động từ 150 - 3.500 bp. Trong đó, các môi UBC#304, UBC#315, UBC#316, UBC#343, UBC#347 có số mẫu được khuếch đại nhiều nhất (100 %) với số băng lần lượt là 16, 27, 19, 22 và 20 băng DNA được tạo thành (hình 3), tiếp đến là UBC#301 và UBC#302 (99 %) với số băng DNA tạo thành lần lượt là 13 và 15 băng. Tỷ lệ băng đa hình trên mỗi trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao dao động từ 81,25 đến 100 % (bảng 3).

Bảng 3. Số cây và số băng khuếch đại của từng môi

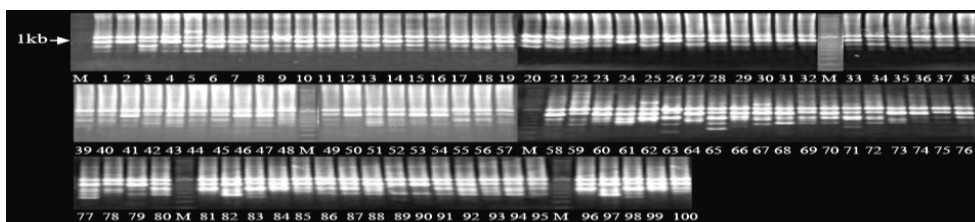
STT	Môi	% cây khuếch đại	Tổng số băng khuếch đại nhiều nhất/môi RAPD	Số băng đa hình	Phạm vi kích thước băng DNA (bp)	Tỷ lệ đa hình (%)
1	UBC#301	99	15	15	280-1900	100
2	UBC#302	99	13	13	480-1900	100
3	UBC#304	100	16	13	230-2100	81,25
4	UBC#315	100	27	27	150-3500	100
5	UBC#316	100	19	19	200-2800	100
6	UBC#343	100	22	22	300-2500	100
7	UBC#347	100	20	20	200-2450	100
8	Tổng cộng	99,71	132	129		97,32

Theo Nei và cộng sự (1978), số lượng băng DNA được khuếch đại càng nhiều thì khả năng phân biệt các mẫu trên cây phả hệ càng lớn, trong đó số băng đa hình tối thiểu là 50 mới có thể xây dựng cây phả hệ chính xác (Nei, 1978). Với 7 môi sử dụng, chúng tôi đã thu được 132 băng DNA đa hình từ 100 cây sâm Ngọc Linh khác nhau để phục vụ cho nghiên cứu đa dạng di truyền và xây dựng cây phả hệ. Vì vậy, số liệu thu được sau khi phân tích 7 môi RAPD là đủ cho nghiên cứu



Hình 2. Kết quả sàng lọc môi PCR-RAPD.

M. khối lượng thang chuẩn DNA (Lambda DNA/HindIII Marker, Biotools)



Hình 3. Hình ảnh điện di PCR-RAPD với môi UBC#343

M: Khối lượng thang chuẩn DNA (Marker DNA 100 bp ladder, Biotools);

1-100: sản phẩm PCR-RAPD các mẫu sâm Ngọc Linh từ 1-100.

Phân tích sự đa dạng của các cá thể trong quần thể (H_o) cho thấy có sự đa dạng lớn trong các mẫu nghiên cứu (Bảng 5). Trong 7 môi ngẫu nhiên được sử dụng nghiên cứu cho thấy UBC#316 thể hiện sự đa dạng cao nhất với giá trị H_o đạt trung bình 0,484, tiếp đến là môi UBC#347 ($H_o = 0,446$). Sự đa dạng thấp nhất là ở môi UBC#304 ($H_o = 0,350$). UBC#315 là môi tạo ra nhiều băng đa hình nhất (27/27 băng), hệ số đa dạng trong từng môi ngẫu nhiên dao động từ khoảng 0,350 đến 0,484, trung bình là 0,410. Môi UBC#304 cho sự đa hình các băng khuếch đại ít nhất (13/16 băng DNA) (bảng 4).

Việc nghiên cứu sự đa dạng trong quần thể một loài nhất định cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu, kết quả nhiều nghiên cứu cũng cho thấy sự đa dạng rất cao của các cá thể trong quần thể. Khi nghiên cứu trên cây *Eremostachys superba*, Verma và cộng sự (2007) nhận thấy sự đa dạng trong các quần thể cũng khá cao (H_o từ 0,31-0,42) và sự đa dạng trong quần thể chiếm 83,01% sự đa dạng trong loài (Verma *et al.*, 2007). Trên cây *Salsola passerina*, sự đa dạng trong các quần thể thấp hơn (H_o từ 0,16 - 0,20) và chiếm 70,96% đa dạng loài (Gao *et al.*, 2009). Ngược lại, ở nhiều nghiên cứu cho thấy sự đa dạng của các cá thể trong quần thể thấp hơn trong khi sự khác nhau giữa các quần thể cao hơn. Mức độ đa dạng di truyền của Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis*) từ 5 vùng khác nhau của Trung Quốc đã được Li và Xia (2005) đánh giá bằng kỹ thuật ISSR, kết quả cho thấy chúng có mức độ đa dạng trong quần thể thấp (H_o từ 0,02-0,11) trong khi sự khác biệt giữa các quần thể lớn hơn (52,54%) (Li, Xia, 2005).

Bảng 4. Đa dạng di truyền quần thể sẫm Ngọc Linh

Mỗi	na*	ne*	h*	H _o *
UBC#301	2,000	1,389	0,240	0,377
UBC#302	2,000	1,413	0,240	0,367
UBC#304	1,813	1,349	0,222	0,350
UBC#315	2,000	1,447	0,274	0,425
UBC#316	2,000	1,558	0,323	0,484
UBC#343	1,955	1,401	0,247	0,385
UBC#347	2,000	1,488	0,291	0,446
Trung bình	1,970	1,440	0,266	0,410
±SE	0,172	0,343	0,171	0,226

See Nei (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* (p. 176-187)

* na = Số lượng alleles được quan sát

* ne = Số lượng alleles có hiệu quả [Kimura and Crow (1964)]

* h = Đa dạng gen Nei's (1973)

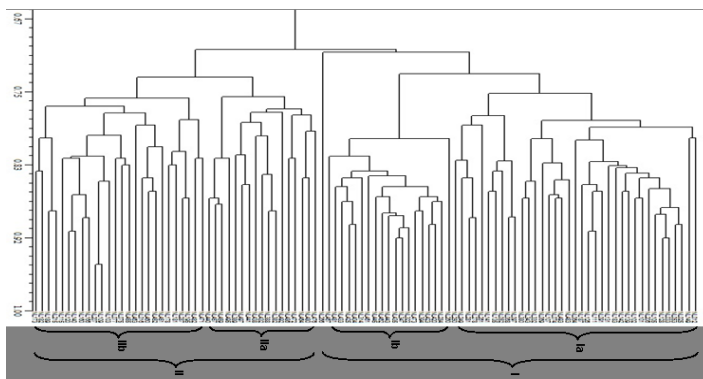
* Ho = Chỉ số đa dạng di truyền Shannon [Lewontin (1972)]

Với 7 mỗi nghiên cứu, hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu sẫm Ngọc Linh biến động từ 0,000 - 0,950. Dựa vào hệ số tương đồng di truyền Quần thể sẫm Ngọc Linh nghiên cứu chia làm 2 nhóm chính (hình 4).

Nhóm I. gồm 57 cá thể, trong nhóm này các cá thể phân ly thành hai nhóm phụ Ia (gồm 38 cá thể) và Ib (gồm 19 cá thể) ở hệ số tương đồng di truyền là 0,730. Các cá thể còn lại có hệ số tương đồng dao động từ 0,750 đến 0,920. Trong đó cây NL033, NL128, NL347 và NL435 mặc dù ở xa nhau nhưng có cùng hệ số tương đồng di truyền là 0,920. Tương tự, các cây NL025, NL053, NL420, NL423, NL404 và NL425 (0,896); NL097, NL083 và NL443 (0,896); NL284 và NL433 (0,869); NL101, NL102, NL403, NL074, NL343 và NL380 (0,867); NL091, NL130, NL135, NL141 và NL142 (0,860).

Nhóm II gồm 43 cá thể. Ở nhóm này các cá thể sẫm cũng bị phân ly thành 2 nhóm phụ IIa (gồm 17 cá thể) và nhóm phụ IIb (gồm 26 cá thể) ở hệ số tương đồng di truyền 0,733. Trong đó cá thể có hệ số tương đồng cao nhất là NL109 và NL207 (0,950) và cá thể có hệ số tương đồng thấp nhất là NL492 (0,772). Những cá thể có cùng hệ số tương đồng di truyền là (NL181, NL178 và NL455 (0,830), tiếp đến là NL077, NL115, NL405, NL471, NL472, NL480 và NL482 (0,823).

Kết quả phân tích giải đồ phả hệ DNA cho thấy có sự đa dạng rất lớn giữa các cá thể trong cùng quần thể. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do trong quá trình sinh sản xảy ra các biến dị, dẫn đến sự khác nhau về đặc điểm di truyền giữa các cây xuất phát từ cùng một nguồn gốc.



Hình 4. Giải đồ phả hệ của các cá thể sẫm Ngọc Linh

KẾT LUẬN

Bảy mỗi khuếch đại ngẫu nhiên được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng cho 100 cá thể sẫm Ngọc Linh thu được 132 băng DNA, tất cả đều là băng đa hình (số băng đa hình trên mỗi trung bình là 18,43), kích thước băng dao động từ 150-3.500 bp. Sự đa dạng di truyền của các cá thể trong quần thể khá cao. Trong mỗi UBC#316 thể hiện sự đa dạng cao nhất với giá trị H_o đạt trung bình 0,484, tiếp đến là mỗi UBC#347 (H_o = 0,446). Sự đa dạng thấp nhất là ở mỗi UBC#304 (H_o = 0,350). UBC#315 là mỗi tạo ra nhiều băng đa hình nhất (27/27 băng), hệ số đa dạng trong từng mỗi ngẫu nhiên dao động từ khoảng 0,350 đến 0,484, trung bình là 0,410. Mỗi UBC#304 cho sự đa hình các băng khuếch đại ít nhất (13/16 băng DNA). Biến dị di truyền trong quần thể sẫm Ngọc Linh là ngẫu nhiên. Sự sai khác trong di truyền có thể là do ảnh hưởng chủ yếu bởi điều kiện sinh sản và nguồn gốc hạt giống khác nhau. Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu sẫm Ngọc Linh biến động từ 0,000-0,950 và chia thành hai nhóm chính ở hệ số tương đồng di truyền 0.700.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bai D, Brandle J, Reeleder R (1997). Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. *Genome*, 40(1): 111-115.
- Bang KH, et al. (2013). Analysis of genetic polymorphism of Korean ginseng cultivars and breeding lines using RAPD markers. *Korean J Intl Agri*, 25(2):184-193.
- Choi HW, Koo DH, Bang KH, Paek KY, Seong NS, and Bang IW (2009). FISH and GISH Analysis of the Genomic Relationships among *Panax* Species. *Genes Genomics*, 31(1): 99-105.
- Coletta Filho HD, Machado MA, Targon MLPN, Moreira MCPQDG, & Euphytica JPJr (1998). Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102, 133–139.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Gao TP, Ning GH, Zhang Y, Xu SJ, An LZ (2009). Genetic diversity of *Salsola passerina* populations in northwestern China based on inter - simple sequence repeat (ISSR). *J Lanzhou Univ (Natural Sciences)*, 45(2): 66-74.
- Jaccard A (1908). *Nouvelles recherches sur la distribution florale*
- Li F, Xia N (2005). Population structure and genetic diversity of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae). *Bot Bull Acad Sin*, 46: 155-162.
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Phạm Thanh Huyền, Đinh Đoàn Long (2017). Sử dụng chỉ thị DNA (RAPD-PCR) trong nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen Đảng sâm góp phần định hướng công tác bảo tồn và phát triển ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Y Dược*, Tập 33, Số 1: 32-39
- Pua E (2007). Transgenic Crops VI. Biotechnology in Agriculture and Forestry.
- Shao AJ, Li X, Huang LQ, Wei JH, Lin SF (2004). Genetic analysis of cultivated ginseng population with the assistance of RAPD technology. *China J Chin Mater Med*, 29(11): 1033-1036.
- Um JY, CHUNG HS, KIM MS, NA HJ, KWON HJ, KIM JJ, LEE KM, LEE SJ, LIM JP, DO KR, HWANG WJ, LYU YS, AN NH, KIM HM (2001). Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP. *Biol. Pharm. Bull.*, 24(8): 872-875.
- Verma S, Karihaloo JL, Tiwari SK, Magotra R, Koul AK (2007). Genetic diversity in *Eremostachys superba* Royle ex Benth. (Lamiaceae), an endangered Himalayan species, as assessed by RAPD. *Genet Resour Crop Evol*, 54: 221-229.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18: 6531-6535.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF 4 AND 5 YEARS OLD NGOC LINH GINSENG POPULATION GROWN IN TẮK NGO FARM (OF TRA LINH COMMUNE, NAM TRA MY DISTRICT, QUANG NAM PROVINCE) USING RAPD MARKERS

Truong Thi Hong Hai*, Dang Thanh Long, Nguyen Thi Kim Cuc, Nguyen Van Hoan

Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

For the modern pharmaceutical industry using medicinal plants, the standard uniformity of the seed materials is always the most important requirements. In order to select good seed materials the analysis of the genetic diversity of the parental plants grown in the breeding plantation will serve effectively. In this study, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses using 7 random primers were applied to clarify the DNA polymorphisms of 100 samples of 4 and 5 years old Ngoc Linh ginseng plants in grown in Tắc Ngo farm (of Tra Linh commune, Nam Tra My district, Quang Nam province). Results showed that the genetic diversity of individuals in the ginseng population is quite high. The primer UBC#316 revealed the highest diversity with an average $H_o = 0.484$, followed by UBC#347 ($H_o = 0.446$). The lowest diversity was in PCR products of primer UBC#304 ($H_o = 0.350$). UBC#315 is the primer that produces the highest number of polymorphic bands (27/27 DNA bands), the coefficient of diversity in each random primer ranges from about 0.350 to 0.484, the average is 0.410. Primer UBC#304 gives lowest polymorphism in amplified bands (13/16 DNA bands). Genetic variation in Ngoc Linh ginseng population is random. On the phylogenetic tree the 100 samples clustered into two major clusters with diverse subclusters indicating that the analyzed Ngoc Linh ginseng plant population are genetically diverse. This genetic diversity could be resulted by differences reproductive origins of the seed materials and their. The genetic similarity coefficient between Ngoc Linh ginseng samples ranges from 0.000 to 0.950 and is divided into two main groups at the genetic similarity coefficient of 0.700.

Keywords: DNA RAPD markers, genetic diversity, Ngoc Linh ginseng in Tắc Ngo Farm.

* Author for correspondence: Tel: 0961.423.419; Email: tthhai@hueuni.edu.vn