

## SỬ DỤNG CHỈ THỊ ISSR TRONG VIỆC ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN Ở QUẦN THỂ BA KÍCH TẠI QUẢNG NINH

Hoàng Đăng Hiếu<sup>1</sup>, Chu Thị Thu Hà<sup>1,2</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>1</sup>,  
Lâm Đại Nhân<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Thúy Hương<sup>1</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, \*nhan@ibt.ac.vn

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

**TÓM TẮT:** Cây Ba kích (*Morinda officinalis* F. C. How) là loại cây dược liệu quý có tác dụng trong việc tăng sức đề kháng cơ thể, đặc biệt với tác dụng bổ thận tráng dương tăng cường sinh lí ở nam giới đã khiến cho nhu cầu của con người với loài cây này ngày càng lớn. Do môi trường sống trong tự nhiên ngày càng thu hẹp và sự khai thác quá mức của con người đã ảnh hưởng đến tính đa dạng cây ba kích tự nhiên. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng 10 mồi ISSR để đánh giá mức độ đa dạng của 39 mẫu cây ba kích thu tại Quảng Ninh. Kết quả cho thấy, trong 10 mồi nghiên cứu có 6 mồi có thể sử dụng để đánh giá sự đa dạng ở quần thể cây ba kích, trong 46 phân đoạn DNA thu được có 45 phân đoạn đa hình. Cây phân loại được xây dựng bằng phần mềm NTSYS PC 2.1 dựa trên hệ số tương đồng Jaccard, thuật toán UPGMA cho thấy, 39 mẫu ba kích nghiên cứu được chia thành 2 nhóm lớn với hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng 0,31 đến 0,88. Hệ số sai khác di truyền quần thể Nei  $G_{st} = 0,3281$  và hệ số trao đổi gen quần thể (gene flow)  $Nm = 1,0240$ . Điều này có thể khẳng định trong quần thể ba kích tự nhiên chúng tôi nghiên cứu có sự đa dạng lớn ở mức độ phân tử. Kết quả này bước đầu tạo cơ sở cho quá trình chọn tạo mẫu cây ba kích.

*Từ khóa:* Ba kích, đa hình,  $G_{st}$ , hệ số tương đồng di truyền, ISSR, trao đổi gen.

### MỞ ĐẦU

Cây Ba kích, *Morinda officinalis* F. C. How, là một loài cây thảo dược quý, trong tự nhiên loài cây này có nhiều ở các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam và tỉnh Quảng Tây của Trung Quốc. Củ của cây ba kích được sử dụng rộng rãi như một loại dược liệu có tác dụng bổ thận âm, bổ thận dương, tăng cường gân cốt, tăng sức đề kháng, sức dẻo dai và khử phong thấp [6]. Dịch chiết từ củ ba kích có tác dụng giảm huyết áp, tác dụng nhanh với các tuyến cơ năng, bổ trí não giúp ăn và ngủ ngon [14]. Ở Việt Nam, nghiên cứu của Trần Mỹ Tiên và nk. (2012) [10] khi thử nghiệm trên chuột, đã chứng minh dịch chiết của rễ cây ba kích có ảnh hưởng đến tính sinh dục nam.

Quảng Ninh là một tỉnh nằm ở phía Bắc Việt Nam, một trong những địa phương có số lượng ba kích tự nhiên nhiều nhất Việt Nam. Trong những năm gần đây, nhu cầu của người dân về loài cây này ngày càng lớn, cùng với sự thu mua của thương lái Trung Quốc đã dẫn tới sự khai thác của người dân tăng lên dẫn đến nguồn cây ba kích ngày càng cạn kiệt, số lượng và chất lượng bị sụt giảm nghiêm trọng và có nguy cơ đe dọa tuyệt chủng ngoài tự nhiên.

Hiện nay, việc áp dụng các chỉ thị phân tử vào việc phân tích đa dạng đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới. Trong các loại chỉ thị phân tử thường được sử dụng như: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) và SSR (Simple Sequence Repeat) trong đó ISSR được sử dụng rộng rãi hơn cả để đánh giá sự sai khác di truyền ở thực vật. Chỉ thị ISSR có ưu điểm không cần phải biết trước thông tin về trình tự gen nhân để thiết kế mồi. Ngoài ra, phương pháp ISSR chỉ cần sử dụng một lượng nhỏ DNA cũng có thể tiến hành [4, 13]. Vì vậy, phương pháp này yêu cầu kỹ thuật đơn giản, nhanh hơn và tiết kiệm chi phí so với các phương pháp khác.

Trong nghiên cứu này chúng tôi xác định đa dạng di truyền của quần thể ba kích thu tại Quảng Ninh bằng chỉ thị ISSR, từ đó có thể cung cấp những thông tin về nguồn gen của loài cây này, làm cơ sở cho việc chọn và tạo mẫu bảo tồn nguồn gen của cây ba kích.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu lá non của 39 cây ba kích đã được thu

tại Quảng Ninh. Các mẫu này được làm khô và bảo quản trong silicagel ở điều kiện 4°C cho đến khi sử dụng (bảng 1). Ba chín mẫu này thuộc 3 quần thể: quần thể QN bao gồm các mẫu được đánh số 1 đến mẫu 13 thu thập tại vườn bảo tồn và sưu tập mẫu tại Hợp tác xã Toàn Dân, Thanh Lâm, Quảng Ninh. Các mẫu này chủ yếu được đi thực từ nhiều nơi trong rừng tự nhiên tại Ba Chẽ, Quảng Ninh. Quần thể ĐT bao gồm các mẫu đánh số từ 17 đến mẫu 39 là các mẫu được thu thập tại nhiều khu rừng địa phương tại Đạp Thanh, Quảng Ninh và quần thể PT gồm 3 mẫu từ mẫu 14 đến 16 có nguồn gốc từ Phú Thọ

được đưa về trồng tại Quảng Ninh được sử dụng để làm đối chứng so sánh với các mẫu thu tại Quảng Ninh

Tách chiết DNA: Các mẫu lá sau khi thu thập được tiến hành tách chiết theo phương pháp CTAB [1]. Sau đó được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1% và đo hàm lượng, độ tinh sạch bằng máy Nanodrop (Thermo Scientific). DNA của các mẫu này được pha loãng đưa về cùng một nồng độ 20 ng/μl và giữ ở -20°C để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Thông tin và kí hiệu 39 mẫu ba kích tại Quảng Ninh

STT	Kí hiệu	Tọa độ thu thập mẫu	STT	Kí hiệu	Tọa độ thu thập mẫu
1	Bk 1	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	21	Bk 21	21° 33' 57.63" N 107° 09' 32.63" E
2	Bk 2	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	22	Bk 22	21° 33' 57.63" N 107° 09' 32.63" E
3	Bk 3	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	23	Bk 23	21° 31' 60.14" N 107° 05' 32.71" E
4	Bk 4	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	24	Bk 24	21° 31' 60.14" N 107° 05' 32.71" E
5	Bk 5	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	25	Bk 25	21° 31' 60.14" N 107° 05' 32.71" E
6	Bk 6	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	26	Bk 26	21° 31' 60.14" N 107° 05' 32.71" E
7	Bk 7	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	27	Bk 27	21° 31' 60.14" N 107° 05' 32.71" E
8	Bk 8	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	28	Bk 28	21° 32' 25.12" N 107° 08' 96.47" E
9	Bk 9	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	29	Bk 29	21° 32' 25.12" N 107° 08' 96.47" E
10	Bk 10	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	30	Bk 30	21° 32' 25.12" N 107° 08' 96.47" E
11	Bk 11	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	31	Bk 31	21° 32' 25.12" N 107° 08' 96.47" E
12	Bk 12	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	32	Bk 32	21° 34' 51.51" N 107° 10' 19.16" E
13	Bk 13	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	33	Bk 33	21° 34' 51.51" N 107° 10' 19.16" E
14	Bk 14	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	34	Bk 34	21° 34' 51.51" N 107° 10' 19.16" E
15	Bk 15	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	35	Bk 35	21° 34' 51.51" N 107° 10' 19.16" E
16	Bk 16	21° 27' 37.29" N 107° 29' 29.74" E	36	Bk 36	21° 34' 55.54" N 107° 06' 45.30" E

17	Bk 17	21° 32' 47.70" N 107° 08' 17.63"E	37	Bk 37	21° 34' 55.54" N 107° 06' 45.30"E
18	Bk 18	21° 32' 47.70" N 107° 08' 17.63"E	38	Bk 38	21° 34' 55.54" N 107° 06' 45.30"E
19	Bk 19	21° 33' 57.63" N 107° 09' 32.63"E	39	Bk 39	21° 34' 55.54" N 107° 06' 45.30"E
20	Bk 20	21° 33' 57.63" N 107° 09' 32.63"E			

Phản ứng PCR với mỗi ISSR: Phản ứng ISSR được thực hiện với 10 mỗi ISSR được tham khảo theo nghiên cứu của Wang et al. (2007) [12]. Các mỗi này được tổng hợp tại Invitrogen (Shanghai Invitrogen Biotechnology Co.Ltd.). Danh sách các mỗi được liệt kê tại bảng 2.

Bảng 2. Tên và trình tự các mỗi ISSR sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mỗi	Trình tự mỗi
1	ISSR46	(AG)8T
2	ISSR50	TT(CA)8
3	ISSR51	(GA)8A
4	ISSR52	(CT)8G
5	ISSR53	(CA)8A
6	ISSR54	(TC)8G
7	ISSR56	(AC)8G
8	ISSR58	(CT)8T
9	ISSR59	(GA)8CT
10	ISSR64	ACA(GT)7

Hỗn hợp phản ứng có thể tích 20 µl bao gồm: 7 µl nước khử ion vô trùng, 2 µl DNA khuôn (20 ng/µl), 1 µl primer (10 pmol), 10 µl PCR master mix. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt 94°C - 5 phút; 35 chu kỳ với 94°C, 45 giây; 50°C, 1 phút, và 72°C, 1 phút; 72°C, 10 phút. Phản ứng PCR được lặp lại ít nhất 2 lần với mỗi mẫu DNA. Sau đó, sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn UV.

Phân tích kết quả: Số liệu của nghiên cứu được ghi nhận dưới dạng nhị phân trong đó: (1) - phân đoạn DNA xuất hiện và (0) - sự vắng mặt của các phân đoạn DNA. Sau đó, các số liệu này sẽ được phân tích dựa trên phần mềm POPGENE 1.32 [15] để xác định các chỉ số đa dạng di truyền như phần trăm các phân đoạn đa hình (PPB), số alen quan sát được (Na), số alen

có ý nghĩa (Ne), hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các loài, hệ số đa dạng Shannon (I) (Nei, 1973), chỉ số sai khác di truyền giữa các quần thể (Gst) và chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể (Nm). Chỉ số Nm giữa các quần thể được tính toán theo công thức  $Nm=0,5(1-Gst)/Gst$  [9]. Phân nhóm dựa trên hệ số tương đồng Jaccard, kiểu phân nhóm UPGMA trên phần mềm NTSYSpc 2.10 [8].

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả phân tích sự đa hình chỉ thị ISSR

DNA tinh sạch được pha loãng để làm khuôn cho phản ứng ISSR. Trong 10 chỉ thị chúng tôi sử dụng thì chỉ có 6 chỉ thị là ISSR46, ISSR50, ISSR51, ISSR52, ISSR53 và ISSR56 cho kết quả đa hình với 39 mẫu nghiên cứu, 4 chỉ thị còn lại sản phẩm PCR quá ít nên chúng tôi không thể ghi nhận được sự xuất hiện của các băng vạch. Sau đó, 6 chỉ thị này được sử dụng để đánh giá đa dạng 39 mẫu của quần thể ba kích tại 2 khu vực khác nhau tại Quảng Ninh và 3 mẫu nguồn gốc từ Phú Thọ.

Kết quả kiểm tra thu được tổng số 46 phân đoạn được nhân lên, trong đó 45 phân đoạn đa hình chiếm tỷ lệ 97,40% (bảng 3). Các phân đoạn được nhân lên có kích thước từ 300 bp đến 2300 bp, số phân đoạn trên mỗi chỉ thị đạt từ 7 đến 9 với trung bình đạt 7,7. Trong số 6 chỉ thị, ISSR51 và ISSR56 cho nhiều phân đoạn nhất với 9 phân đoạn, các chỉ thị còn lại đều cho 7 phân đoạn. Trong đó, chỉ thị ISSR56 cho số phân đoạn đa hình cao nhất đạt 9 phân đoạn, chỉ thị ISSR51 cho 8 phân đoạn đa hình. Các chỉ thị còn lại đều có 7 phân đoạn đa hình. Số lượng phân đoạn chúng tôi thu nhận được khi phân tích bằng chỉ thị ISSR ở các quần thể Ba kích ít hơn với những nghiên cứu khác như Trần Thị Việt Thanh và nnk. (2013) [11] trên cây dầu đọt

tím tại Quảng Nam, Ibrahim et al. (2012) [2] trên cây dầu mè tại Malaysia, hay Zhang et al. (2010) [17] trên cây xuyên bối mẫu tại Trung Quốc. Tuy nhiên, tỷ lệ đa hình với từng chỉ thị

ISSR trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với những nghiên cứu trên. Điều này chứng tỏ chỉ thị ISSR rất có hiệu quả trong phân tích đa dạng ở quần thể cây ba kích.

**Bảng 3.** Kết quả phân tích sự đa hình các phân đoạn DNA của 6 chỉ thị ISSR

STT	Tên môi	Trình tự 5'-3'	Khoảng kích thước nhân lên	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình (NPB)	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (PPB)	$h + SD$	$I + SD$
1	ISSR46	(AG) <sub>8</sub> T	400-2200	7	7	100	0,2900+0,1714	0,4471+0,2128
2	ISSR50	TT(CA) <sub>8</sub>	600-1800	7	7	100	0,1901+0,1541	0,3184+ 0,2031
3	ISSR51	(GA) <sub>8</sub> A	400-2200	9	8	88,89	0,2060+0,1446	0,3374+0,3374
4	ISSR52	(GA) <sub>8</sub> A	500-2300	7	7	100	0,2904+0,1628	0,4474+0,2106
5	ISSR53	(CT) <sub>8</sub> G	300-1600	7	7	100	0,3652+0,1595	0,5361+0,2032
6	ISSR56	(CA) <sub>8</sub> A	400-2000	9	9	100	0,3942+0,1058	0,5781+0,1211
Tổng quần thể				46	45		0,2903+0,1604	0,4453+0,2067
Trung bình				7,7	7,5	97,40		

$h$ . hệ số đa dạng di truyền Nei dựa theo các môi nghiên cứu;  $I$ . hệ số Shannon thể hiện mức độ đa dạng loài trong quần thể; SD. độ lệch chuẩn.

#### Kết quả đánh giá đa dạng di truyền của hai quần thể ba kích Quảng Ninh và các mẫu ba kích Phú Thọ

Hệ số đa dạng gen giữa các mẫu nghiên cứu Nei và Shannon cao nhất ở chỉ thị ISSR56 với  $h=0,3942$  và  $I=0,5781$ . Ngược lại, chỉ thị ISSR50 cho các hệ số đa dạng thấp nhất với hệ số đa dạng Nei đạt 0,1901 và hệ số Shannon đạt 0,3184 (bảng 3).

Với số phân đoạn đa hình (PPB) giữa các quần thể đạt từ 9 phân đoạn ở quần thể PT, 32 phân đoạn thuộc quần thể QN đến 41 phân đoạn thuộc quần thể ĐT. Trong đó, tỷ lệ phân đoạn đa hình lần lượt là 19,57%, 69,57% và 89,13%.

Điều này chứng tỏ sự đa hình của các phân đoạn thuộc ở 2 quần thể QN và ĐT khá cao, tuy nhiên, ở 3 mẫu Phú Thọ sự đa hình lại rất thấp.

**Bảng 4.** Các chỉ số đa dạng của 2 quần thể ba kích Quảng Ninh và các mẫu ba kích Phú Thọ

Tên quần thể	NPB	PPB (%)	Na+SD	Ne+SD	$h+SD$	$I+SD$
QN	27	58,70%	1,5870+0,4978	1,2757+0,3218	0,1729+0,1782	0,2695+0,2597
ĐT	41	89,13 %	1,8913+0,3147	1,3695+0,3546	0,2241+0,1829	0,3498+0,2467
PT	9	19,57%	1,1957+0,4011	1,1408+0,3114	0,0791+0,1675	0,1155+0,2411

Na. Số alen quan sát được; Ne. số alen có ý nghĩa;  $h$ . hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các mẫu;  $I$ . hệ số Shannon; SD. độ lệch chuẩn.

Số alen quan sát được (Na) của quần thể ĐT cao nhất đạt 1,8913 trong khi quần thể QN có số alen quan sát được là 1,5870 và thấp nhất là quần thể PT, đạt 1,1957. Ngoài ra, số alen có ý nghĩa (Ne) nằm từ 1,3695 (quần thể ĐT) đến 1,2757 (quần thể QN) và thấp nhất là quần thể

PT là 1,1408.

Trong nghiên cứu này, giá trị Na và Ne của quần thể ĐT quan sát luôn lớn hơn và quần thể PT có giá trị nhỏ nhất. Điều này chứng tỏ quần thể ĐT có sự đa dạng lớn hơn quần thể QN và

quần thể PT có mức độ đa dạng kém nhất. Chỉ số Na và Ne trong phân tích ở nghiên cứu này có giá trị nhỏ hơn so với nghiên cứu của Ibrahim et al. (2013) [2]. Tuy nhiên, hai chỉ số này có giá trị cao hơn so với nhiều nghiên cứu khác của Yu et al. (2011) [16] và Huang et al. (2011) [2] (với quần thể QN và ĐT) còn với quần thể PT, chỉ số này nhỏ hơn so với hầu hết các nghiên cứu khác. Điều này cho thấy, 2 quần thể QN, ĐT có sự đa dạng tương đối tốt tuy nhiên 3 mẫu ba kích tại Phú Thọ lại có mức độ đa dạng rất thấp.

Hệ số đa dạng di truyền Nei của ba quần thể trong khoảng từ 0,2241 đến 0,0791. Hệ số Shannon trong khoảng từ 0,3498 đến 0,1155. Chỉ số sai khác di truyền  $G_{st}$  giữa các quần thể được tính toán sử dụng phần mềm POPGENE cho kết quả chỉ số  $G_{st}$  đạt 0,3281, chỉ ra mức độ sai khác thấp giữa các quần thể ba kích. Chỉ số  $G_{st} < 0,5$  là kết quả của hầu hết các nghiên cứu ở các loài thực vật trong phân tích ISSR [7, 16, 17]. Dựa trên giá trị  $G_{st}$ , giá trị Nm được tính toán và đạt 1,0240 cho thấy tần số trao đổi gen thấp giữa các quần thể (bảng 5).

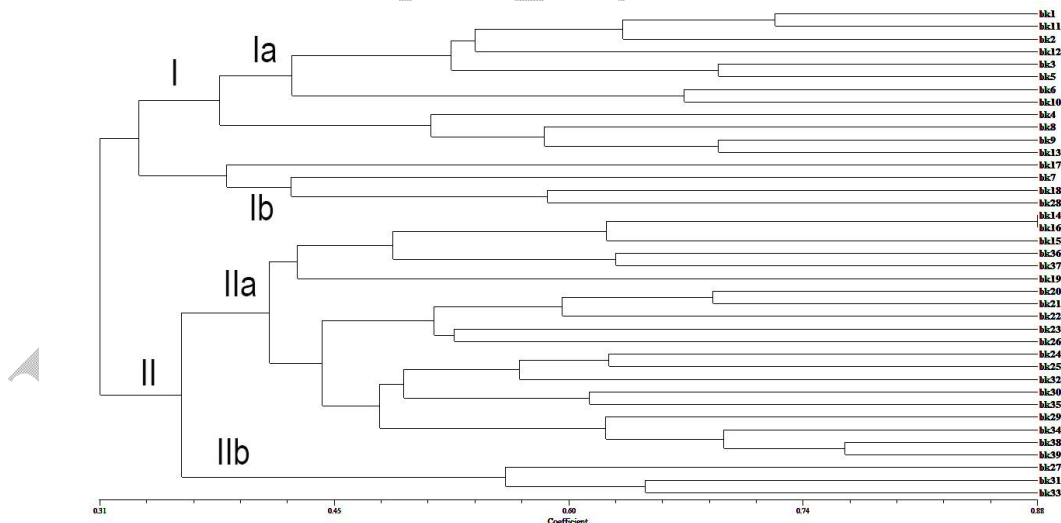
Bảng 5. Các chỉ số đa dạng của các quần thể ba kích

Các thông số	Mean $\pm$ SD
Số lượng mẫu	39
$H_T$	0,2362 $\pm$ 0,0283
$H_S$	0,1587 $\pm$ 0,0124
$G_{ST}$	0,3281
Nm	1,0240

$H_T$ . Chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các quần thể;  $H_S$ . Chỉ số đa dạng gen trung bình trong quần thể;  $G_{ST}$ . Chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các quần thể; Nm. Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể.

Chỉ số sai khác di truyền giữa ba quần thể  $G_{st}=0,3281$  chứng tỏ có 32,81% sự sai khác di truyền giữa các mẫu nghiên cứu. Mức độ trao đổi gen được thể hiện qua hệ số gene flow (Nm) giữa ba quần thể thấp 1,0240. Hệ số trao đổi gen thấp giữa các quần thể là một đặc điểm chung ở các quần thể quý có số lượng nhỏ. Ngược lại, với chọn tạo mẫu, sự biến động di truyền, sự đột biến, sự chọn lọc và cách ly di truyền sẽ tác động đến sự đa dạng nguồn gen.

**Kết quả tích phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu ba kích**



Hình 1. Cây phân loại 39 mẫu ba kích dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard

Cây phân loại được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard và thuật toán UPGMA, trong đó 39 mẫu ba kích phân ra làm 2 nhóm chính với hệ số tương đồng nằm trong khoảng từ 0,31 đến 0,88. Nhóm I bao gồm 16

mẫu, trong đó có 13 mẫu của quần thể QN và 3 mẫu của quần thể ĐT. Nhóm này được chia ra làm 2 phân nhóm Ia và Ib: Phân nhóm Ia có 12 mẫu thuộc quần thể QN; phân nhóm Ib bao gồm 4 mẫu trong đó 1 mẫu thuộc quần thể QN và 3

mẫu quần thể ĐT. Nhóm II bao gồm 3 mẫu của quần thể PT và 20 mẫu của quần thể ĐT. Nhóm này cũng được chia làm 2 phân nhóm: Phân nhóm IIa bao gồm 3 mẫu của quần thể PT và 17 mẫu của quần thể ĐT; phân nhóm IIb bao gồm 3 mẫu còn lại của quần thể ĐT (hình 1). Ba mẫu 14, 15, 16 có nguồn gốc từ Phú Thọ được xếp thành 1 nhánh phân loại gần gũi, đặc biệt mẫu 14 và 16 có độ tương đồng di truyền lên tới 88%. Điều này đã khẳng định mức độ đa dạng của các cá thể trong cùng một vùng địa lý thấp hơn so với các cá thể thuộc các vùng địa lý khác nhau. Ba mẫu quần thể ĐT là 17, 18 và 28 nằm chung nhóm phân loại với 13 mẫu của quần thể QN có thể giải thích bởi 3 mẫu này được thu thập tại khu vực địa lý tương đối gần với các mẫu tại vườn bảo tồn và sưu tập mẫu tại Hợp tác xã Toàn Dân, Ba Chẽ, Quảng Ninh.

#### KẾT LUẬN

Sáu chỉ thị ISSR: ISSR46, ISSR50, ISSR51, ISSR52, ISSR53 và ISSR56 có thể sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa các cá thể và quần thể cây Ba kích *Morinda officinalis*. Sự đa dạng được thể hiện qua kết quả đánh giá thu được tổng số 46 phân đoạn, trong đó có 45 phân đoạn đa hình chiếm 97,40%.

Các mẫu ba kích trong nghiên cứu có sự đa dạng lớn ở mức độ phân tử. Các mẫu thu thập từ rừng tự nhiên Đập Thanh, Quảng Ninh có mức độ đa dạng cao hơn so với các mẫu thu tại Ba Chẽ, Quảng Ninh và 3 mẫu có nguồn gốc từ Phú Thọ. Kết quả này bước đầu tạo cơ sở cho quá trình chọn tạo mẫu cây ba kích để đưa vào bảo tồn loài cây này trong tự nhiên nhằm tránh sự suy giảm đa dạng di truyền.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Doyle J. J., Doyle J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Huang W-D., Zhao X-Y., Zhao X., Zhao H-L., Wang S-K., Lian J. 2011. A combined approach using ISSR and ITS analysis for the characterization of *Artemisia halodendron* from Horqin sandy land, northern China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4-6): 346-351.
- Ibrahim W. A., Rafii M. Y., Hanafi. M. M., Mahmud M. M. T., Latif A. M., 2012. Molecular characterization of *Jatropha curcas* germplasm using inter simple sequence repeat (ISSR) markers in Peninsular Malaysia. *Australian Journal of Crop Science*, 6(12): 1666-1673.
- Liu L., Zhao L., Gong Y., Wang M., Chen L, Yang J., Wang Y., Yu E., Wang L., 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP marker. *Sci. Hortic.*, 116(3): 240-247.
- Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70(12): 3321-3323.
- Ning-Zhen Huang, Chuan-Ming Fu, Zhi-Guo Zhao, Feng-Luan Tang, Feng Li, 2007. Tissue culture and rapid proliferation of *Morinda officinalis* How. *Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin* 541006, China.
- Pillai P. P., Sajjan S. J., Menon M. K., Jayakumar P. S K., Subramoniam A., 2012. ISSR analysis reveals high intraspecific variation in *Rauvolfia serpentina* L. - A high value medicinal plant. *Biochemical Systematics and Ecology*, 40: 192-197.
- Rohlf F. J., 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1. Exeter Publishing, Setauket, NY.
- Slatkin M., Barton N. H., 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43(7): 1349-1368.
- Trần Mỹ Tiên, Nguyễn Mai Thanh Tâm, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương, 2012. Nghiên cứu tác dụng hướng sinh dục nam của Ba kích (*Morinda officinalis* How). *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, 16(1): 192-198.
- Trần Thị Việt Thanh, Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền, Đinh Thị Phòng, 2013. Đa dạng

- di truyền nguồn gen tập đoàn cây Dầu đọt tím (*Dipterocarpus grandiflorus* Blco) ở Việt Nam trên cơ sở phân tích chỉ thị ISSR và SSR: 254-259. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ V. Nxb Nông Nghiệp.
12. Wang D. X., Wang J., Ding S. X., Su Y. Q., 2007. Comparative studies on some genetic characteristics among four large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) populations. *Acta Oceanologica Sinica*, 26(4): 148-155.
13. Wang Z., Liao L., Yuan X., Guo H., Guo A., Liu J., 2013. Genetic diversity analysis of cynodon dactylon (*bermudagrass*) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.*, 46: 108-115.
14. Wei L. J., Lu P., Su W.P., 2006. Tissue culture and rapid propagation of *Morinda officinalis* How. *Plant Physiology Communication*, 42(3): 475.
15. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. B. J., Ye Z. H., Mao J. X., 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.*
16. Yu H. H., Yang L. Z., Sun B., Liu N. R., 2011. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2): 71-78.
17. Zhang Q. D., Gao M. L., Yang P. Y., 2010. Genetic diversity and structure of a traditional Chinese medicinal plant species, *Fritillaria cirrhosa* (Liliaceae) in southwest China and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(3): 236-242.

## STUDY ON GENETIC DIVERSITY IN *Morinda officinalis* F. C. How POPULATIONS IN QUANG NINH USING ISSR MARKER

Hoang Dang Hieu<sup>1</sup>, Chu Thi Thu Ha<sup>1,2</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>1</sup>,  
Lam Dai Nhan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thuy Huong<sup>1</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, VAST

<sup>2</sup>Hanoi Pedagogical University 2

### SUMMARY

*Morinda officinalis* F. C. How is a precious medicinal plant, which has been widely used for enhancing immune system and especially increasing men's physiological health. Because of various values, the demand of *M. officinalis* has increased, recently. In addition, the dwindling of living environments directly resulted in the decline of *M. officinalis* populations in the nature as the decrease of *M. officinalis*' genetic diversity.

In this research, 10 ISSR primers were used to evaluate the genetic diversity of 39 samples collected in Quang Ninh. The results showed that six among 10 primers could be use for evaluation the diversity of *Morinda officinalis* population. Forty five fragments of 46 amplified fragments were polymorphism. The phylogenetic tree constructed by NTSYS PC 2.1 based on the Jaccard's genetic coefficient using the algorithm UPGMA showed two major groups ranged from 0.31 to 0.88. The result revealed the value of Nei's genetic differentiation index ( $G_{ST}$ ) and the estimated gene flow (Nm), which were about 0,3281 and 1.0240, respectively. These results demonstrated the diversity at the molecular level of *M. officinalis* population distributing in Quang Ninh. Our results can contribute to the properly sample collection for conservation, breeding or further research on *Morinda officinalis*.

**Keywords:** *Morinda officinalis*,  $G_{ST}$ , genetic diversity, genetic similarity coefficients, ISSR.

Ngày nhận bài: 21-9-2015