

## ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA LOÀI SAO MẠNG (*HOPEA RETICULATE TARDICU*) DỰA TRÊN PHÂN TÍCH MỘT SỐ CHUỖI DNA LỤC LẠP VÀ CHỈ THỊ RAPD

Nguyễn Đức Thành<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Phượng<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Nghĩa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học

<sup>2</sup>Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

### TÓM TẮT

Việc sử dụng các chỉ thị phân tử để đánh giá tính đa dạng di truyền của sinh vật có ý nghĩa quan trọng trong chọn tạo giống mới và bảo tồn nguồn gen. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã dùng kỹ thuật RAPD và một số chỉ thị DNA lục lạp để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 30 mẫu Sao mạng thu từ vùng rừng còi rụng lá thuộc núi Cà Ná, Phan Rang. Kết quả phân tích với gen 16S lục lạp, gen *trnL* và một số vùng nằm giữa các gen *trnD-trnT*, *psbC-trnS*, *atpB-rbcLn* bằng các cặp mồi tương ứng cho thấy chỉ có sự đa hình trong vùng nằm giữa gen *trnD* và *trnT*. Khi phân tích các mẫu Sao mạng với 17 mồi RAPD chỉ có 7 mồi (OPB6, OPB8, OPB20, OPC6, OPC9, OPC12, và OPC17) cho đa hình ở hệ gen nhân của 30 mẫu nghiên cứu. Với 7 mồi RAPD cho đa hình, đã nhận được 1463 phân đoạn DNA, trong đó có 59 phân đoạn đa hình, chiếm 4,03%. Biểu đồ quan hệ di truyền xây dựng trên số liệu phân tích RAPD chỉ ra rằng các mẫu Sao mạng được chia thành 3 nhóm chính. Nhóm 1 bao gồm 4 mẫu (S1.6, S1.9, S3.4 và S4.2), nhóm 2 gồm 10 mẫu là S11, S12, S13, S21, S22, S23, S24, S25, S26 và S41, nhóm thứ 3 là 16 mẫu còn lại. Mức độ tương đồng di truyền cao nhất trong 16 mẫu này thuộc về 2 mẫu S53 và S55 với giá trị khoảng 91%. Kết quả nghiên cứu nhận được cho thấy mức độ đa dạng di truyền của loài Sao mạng khá thấp, chúng tỏ mức độ thoái hóa cao. Vì vậy, cần có chiến lược bảo tồn và phát triển loài cây quý hiếm này.

**Từ khóa:** Cây Sao mạng Cà Ná, chỉ thị RAPD, enzyme hạn chế, hệ gen lục lạp, quan hệ di truyền

### MỞ ĐẦU

Rừng là nguồn tài nguyên vô cùng quan trọng đối với con người. Rừng cung cấp nguồn lâm sản, điều tiết và bảo vệ nguồn nước, cân bằng không khí, cải tạo đất và là môi trường sống của động, thực vật. Thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng đang phải đối mặt với nguy cơ giảm thiểu diện tích rừng do khai thác bừa bãi và nạn cháy rừng. Diện tích rừng bị thu hẹp kéo theo tính đa dạng sinh học rừng cũng bị giảm. Nhiều loại cây quý hiếm ở rừng Việt Nam như các loài cây thuộc các họ như họ Dầu - Dipterocarpaceae (Kim giao, Vên vên, Dầu cát, Sao lá hình tim, Sao mạng, ...) và họ Đậu - Leguminosae (Gỗ đỏ, Lim xanh, Cẩm lai, Sến mật, ...) đã và đang có nguy cơ tuyệt chủng. Sao mạng Cà Ná là loài cây bụi thuộc chi Sao (*Hopea*), họ Dầu (Dipterocarpaceae). Loài này được thấy có phân bố tự nhiên tại một vùng duy nhất là vùng rừng còi rụng lá ở núi Cà Ná (Phan Rang) trên độ cao khoảng 200 - 300 m so với mực nước biển (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2005). Đây là vùng có điều kiện tự nhiên hết sức khắc nghiệt với 6 tháng mùa khô và lượng mưa rất thấp. Hiện nay, các cá thể của loài này còn lại rất ít, chỉ không quá 200 cây (Nguyễn Hoàng Nghĩa,

2005). Vì vậy đây là loài cây được xếp vào hạng rất nguy cấp theo mức độ phân hạng của IUCN (2001).

Để đảm bảo và thực hiện tốt các chương trình bảo tồn, chọn tạo và phát triển các loài cây rừng, việc điều tra và nghiên cứu về mức độ đa dạng di truyền hay nguồn gốc xuất xứ của chúng là hết sức cần thiết. Theo các phương pháp truyền thống người ta đánh giá sự biến đổi di truyền ở các loài theo các đặc điểm hình thái hoặc đo đếm thực tế. Hiện nay, với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học và sinh học phân tử, các phương pháp phân tích phân tử được sử dụng để đánh giá một cách chính xác hơn về tính đa dạng di truyền ở sinh vật.

Hệ gen lục lạp có tính bảo thủ cao đã và đang được sử dụng cho các nghiên cứu về quan hệ di truyền, tiến hóa, sinh thái và phát sinh chủng loài ở thực vật (Provan *et al.*, 1997; Kajita *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2004; Plunkett *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2004; Magni *et al.*, 2005; Nguyễn Đức Thành *et al.*, 2007). Đa hình DNA nhân bản ngẫu nhiên (Williams *et al.*, 1990) là kỹ thuật đơn giản nhưng cho các thông tin về số lượng lớn các locus, đặc biệt phù hợp với các đối tượng mới được nghiên cứu. Kết quả đánh giá đa

dạng di truyền bằng RAPD có thể so sánh với các kết quả sử dụng kỹ thuật đa hình các phân đoạn cắt hạn chế (RFLP) (Wu *et al.*, 1999).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng chỉ thị RAPD và một số chỉ thị hệ gen lục lạp để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 30 mẫu Sao mạng thu từ vùng rừng còi rụng lá thuộc núi Cà Ná, Phan Rang. Đây là một trong số các loài cây lâm nghiệp ở Việt Nam đang bị đe dọa tuyệt chủng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu nghiên cứu

Ba mươi mẫu Sao mạng được thu từ các địa điểm khác nhau (30 xuất xứ) do Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu. Các mẫu Sao mạng được thu thập tại một số điểm thuộc vùng rừng còi rụng lá ở núi Cà Ná, Phan Rang được cho vào túi nilon với silica gel để hút ẩm và làm khô. Sau đó, các mẫu được bảo quản trong tủ lạnh hoặc điều kiện bình thường.

Các môi RAPD được mua từ hãng Operon (Mỹ).

Các cặp mồi đặc hiệu đối với hệ gen lục lạp được sử dụng trong nghiên cứu này là: *16SLF-16SLR1*, *trnD-trnT*; *psbC-trnS*; *atpB-rbcL*; *trnLe-trnLf*; *trnLc-trnL* được mua từ các hãng IDT (Mỹ) và Fermentas (Đức). Các enzyme hạn chế dùng để cắt sản phẩm PCR của các cặp mồi lục lạp được dùng là: *BamHI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI* và *TaqI* do hãng BioLab (Anh) cung cấp.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp tách chiết và tinh sạch DNA từ lá Sao mạng

DNA genome Sao mạng được tách chiết theo phương pháp CTAB của Sanghai Maroof và đồng tác giả (1994) có cải tiến. Lá Sao mạng được nghiền trong nitrogen lỏng thành bột mịn. Bổ sung 5 - 7 ml hỗn hợp CTAB đã pha sẵn và được ủ nóng đến 50°C vào ống Falcol (15 ml) chứa 200 - 300 mg bột lá mịn. Lắc đều và ủ ở 65°C trong 60 - 90 phút, theo chu kỳ 5 phút/lần lắc nhẹ hỗn hợp trong ống để việc tách có hiệu quả. Chiết 2 lần bằng dung dịch 24:1 (chloroform: isoamylalcohol). Dùng isopropanol hoặc cồn tuyệt đối lạnh để tạo tủa DNA, thu tủa DNA, làm sạch và pha loãng trong TE. DNA thu được được kiểm tra trên gel agarose 1%.

### Kỹ thuật phân tích RAPD

Mười bảy mồi ngẫu nhiên có chiều dài 10 nucleotide, được sử dụng cho việc phân tích tính đa dạng di truyền của 30 loài Sao mạng. Tổng thể tích mỗi phản ứng RAPD là 25  $\mu$ l/mẫu, gồm những thành phần sau: DNA genome (40 ng); môi RAPD (20 ng); dNTP (200  $\mu$ M mỗi loại);  $MgCl_2$  (1,5 mM); enzyme *Taq* polymerase (0,5 đơn vị) và đệm 1x PCR thích hợp. Tiến hành phản ứng RAPD trong máy PTC - 100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc, Mỹ) theo chế độ nhiệt: 1: 94°C - 4 phút; 2: 94°C - 1 phút; 3: 34°C - 1 phút; 4: 72°C - 5 phút; 5: lặp lại 45 chu kỳ từ 2 đến 4; bước 6: 72°C - 10 phút; 7: Lưu giữ ở 10°C.

### Kỹ thuật phân tích với các cặp mồi lục lạp và enzyme cắt hạn chế

Phản ứng PCR với các cặp mồi lục lạp với thể tích 25  $\mu$ l bao gồm DNA genome (20 ng); môi (20 ng); dNTP (200  $\mu$ M mỗi loại);  $MgCl_2$  (2 mM); enzyme *Taq* polymerase (0,5 đơn vị) và đệm 1x PCR thích hợp. Phản ứng được thực hiện theo chu trình 1: 94°C - 4 phút; 2: 94°C - 1 phút; 3: 50°C - 60°C - 1 phút; 4: 72°C - 5 phút; 5: lặp lại 35 chu kỳ từ 2 đến 4; bước 6: 72°C - 10 phút; 7: Lưu giữ ở 10°C.

Sản phẩm PCR của các môi RAPD và lục lạp được điện di trên gel agarose 1%.

Phản ứng cắt sản phẩm PCR của các cặp mồi lục lạp bằng các enzyme cắt hạn chế được thực hiện theo hướng dẫn của các nhà sản xuất. Sản phẩm cắt enzyme được điện di trên gel agarose 1,5%.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tối ưu hóa nhiệt độ bắt mồi của các cặp mồi lục lạp

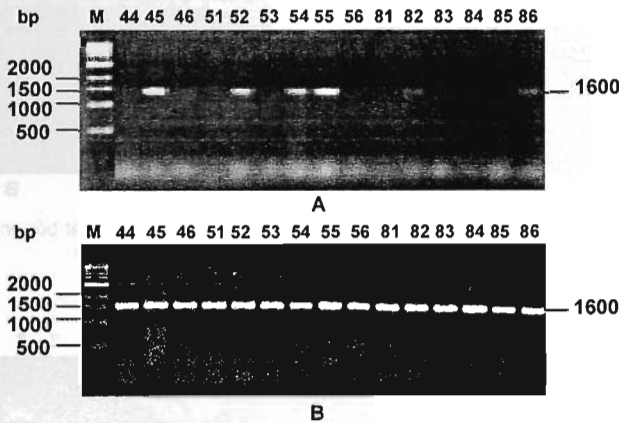
Chúng tôi sử dụng 6 cặp mồi lục lạp *16SLF-16SLR1*, *trnD-trnT*, *atpB-rbcL*, *psbC-trnS*, *trnLe-trnLf*, *trnLc-trnL* để phân tích sự đa dạng hệ gen lục lạp của các mẫu Sao mạng Cà Ná. Trong quá trình chạy PCR chúng tôi đã khảo sát nhiệt độ bắt mồi tối ưu cho từng cặp mồi đối với loài Sao mạng (Bảng 1). Với các cặp mồi *trnD-trnT*, *atpB-rbcL* và *trnLe-trnLf* thì nhiệt độ bắt mồi tốt nhất là ở 54°C, với cặp mồi *psbC-trnS* và cặp *16S-LF - 16S-LR1* là 56°C còn với cặp *trnLc-trnL* là 52°C. Khi thực hiện phản ứng PCR ở nhiệt độ bắt mồi tối ưu tương ứng với từng cặp mồi, sản phẩm chúng tôi nhận được với kích thước như mong đợi và rõ nét. Tuy nhiên, với các loài thực vật khác nhau thì nhiệt độ này có thể

thay đổi. Do đó, khi nghiên cứu, cần phải khảo sát để chọn ra được nhiệt độ bắt mồi thích hợp đối với từng loài cây lâm nghiệp. Tuy nhiên, có thể sử dụng

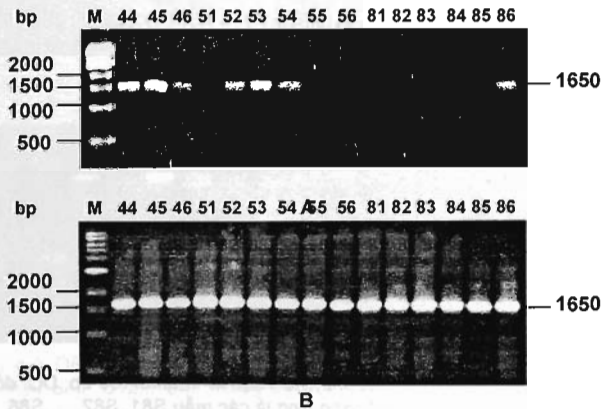
nhệt độ bắt mồi đối với mỗi cặp mồi tương ứng trong nghiên cứu này làm cơ sở để từ đó khảo sát cho loài được nghiên cứu.

Bảng 1. Nhiệt độ bắt mồi của các mồi lục lạp và sản phẩm PCR thu được.

Số TT	Cặp mồi	Nhiệt độ bắt mồi (°C)	Số phản ứng	Số phản ứng cho sản phẩm
1	16S-LF -16S-LR1	55	30	19
2	<i>tmD</i> - <i>tmT</i>	52	30	30
		54	30	21
3	<i>psbC</i> - <i>tmS</i>	55	30	18
		56	30	30
4	<i>atpB</i> - <i>rbcL</i>	54	30	26
5	<i>tmLe</i> - <i>tmLf</i>	54	30	30
6	<i>tmLc</i> - <i>tmL</i>	52	30	30



Hình 1. Sản phẩm PCR với cặp mồi *tmD*-*tmT* ở nhiệt độ bắt mồi 52°C (A) và 54°C (B). M. Thang DNA 1 kb; các số 44, 45, ..., 86 tương ứng là các mẫu S44, S45,... S86.

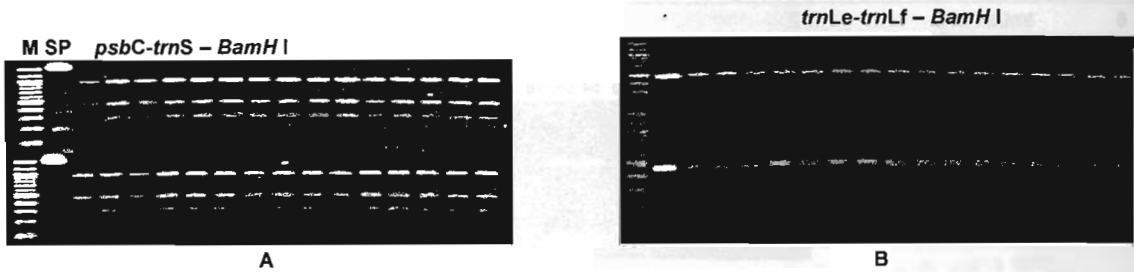


Hình 2. Sản phẩm PCR với cặp mồi *psbC*-*tmS* ở nhiệt độ bắt mồi 55°C (A) và 56°C (B). M. Thang DNA 1 kb; các số 44, 45, ..., 86 tương ứng là các mẫu S44, S45,... S86.

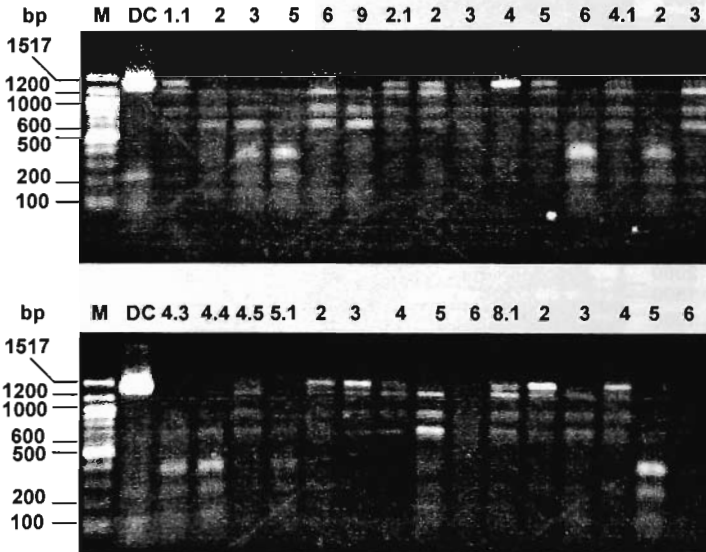
Hình 1 và hình 2 là điện di đồ sản phẩm PCR của một số mẫu Sao mạng với cặp mồi *trnD-trnT* và cặp *psbC-trnS* ở nhiệt độ khác nhau.

Với 6 cặp mồi lục lạp được sử dụng: *16SLF-16SLR1*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS*, *atpB-rbcLn*, *trnLe-trnLf* và *trnLc-trnL* chúng tôi đã nhận được các đoạn DNA nằm giữa các gen tương ứng với độ dài tương ứng khoảng 1400, 1600, 1650, 900, 500 và 700 bp. Các kết quả này tương tự như các kết quả đã được công bố bởi Pardo và đồng tác giả (2004) và Nicolosi và đồng tác giả (2000) khi họ dùng các cặp mồi này để nghiên cứu nguồn gốc và phát sinh loài ở các loài thuộc họ cam quýt và cũng tương tự như kết quả được chúng tôi công bố trước đây (Nguyễn Đức Thành *et al.*, 2007) khi dùng các cặp mồi này để

khảo sát trên một số loài cây thuộc họ Dầu. Sản phẩm của mỗi cặp mồi đều có độ dài tương tự nhau ở tất cả 30 mẫu nghiên cứu. Như vậy, về kích thước sản phẩm PCR của các mồi lục lạp không cho thấy sự đa hình giữa các xuất xứ. Vì vậy, chúng tôi đã dùng một số enzyme cắt hạn chế *Bam*HI, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I và *Taq*I để cắt các sản phẩm nhận được sau khi nhân bản các vùng DNA lục lạp bằng các cặp mồi tương ứng. Nếu ở các mẫu có sự khác nhau về trình tự nucleotide thì sẽ dẫn đến thay đổi vị trí cắt của các enzyme. Bằng phương pháp này có thể nhận được sự đa hình trong DNA lục lạp ở các mẫu. Đây là một trong những phương pháp đã được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về đa dạng di truyền và phát sinh loài dựa vào hệ gen lục lạp.



Hình 3. *trnLe-trnLf - Bam*HI là sản phẩm PCR của cặp mồi lục lạp *trnLe-trnLf* được cắt bởi enzyme *Bam*HI. Các cặp mồi khác cũng được ký hiệu theo cách tương tự. M. Marker; SP. Sản phẩm chưa cắt enzyme.



Hình 4. Kết quả cắt sản phẩm của cặp mồi *trnD-trnT* bởi enzyme *Taq*I. M- marker 100 bp; DC. đối chứng; các số 1.1, 2,...,9. tương ứng là các mẫu S11, S12,...,S19,..., 8.1, 2,...,6 tương ứng là các mẫu S81, S82,..., S86.

Trong số enzyme sử dụng, chỉ có *TaqI* cắt sản phẩm của cặp mỗi *trnD-trnT* là cho đa hình (Hình 4) còn lại, hoặc là cắt được một số băng nhưng không có băng đa hình (Hình 3A), hoặc là đoạn DNA được nhân lên bởi mỗi lục lạp không có điểm cắt cho các enzyme đã dùng (Hình 3B). Vì vậy, trừ locus *trnD-trnT*, 30 mẫu Sao mạng không có sự đa hình ở các locus được nghiên cứu trong hệ gen lục lạp. Điều này cũng có thể cho phép chúng tôi đi đến một kết luận sơ bộ là hệ gen lục lạp ở loài Sao mạng nghiên cứu có tính bảo thủ rất cao và các mẫu nghiên cứu có thể có cùng một nguồn gốc. Kết quả này phản ánh đúng thực tế là các mẫu Sao mạng được thu từ vùng rừng còn lại loài cây này. Theo thống kê của Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam thì chỉ còn gần 200 cá thể phân bố ở một khu vực địa lý duy nhất. Để nghiên cứu sâu hơn, và để đánh giá mức độ sai khác về mặt di truyền giữa các mẫu Sao mạng chúng tôi tiến hành phân tích hệ gen nhân bằng chỉ thị RAPD.

#### Phân tích tính đa hình DNA bằng kỹ thuật RAPD

Trong 17 mẫu RAPD được sử dụng, chỉ có 7 mẫu nhân được các băng đa hình, là các mẫu: OPB6, OPB8, OPB20, OPC6, OPC9 OPC12 và OPC17. Phân tích kết quả điện di sản phẩm RAPD của 7 mẫu đa hình, thu được 1463 phân đoạn khuếch đại ngẫu nhiên, trong đó có 59 phân đoạn đa hình, chiếm 4,03%. Như vậy, kết quả phân tích hệ gen nhân cũng cho thấy mức độ đa dạng giữa các mẫu sao mạng cũng rất thấp. Kết quả điện di sản phẩm RAPD của các mẫu đặc trưng nhất được

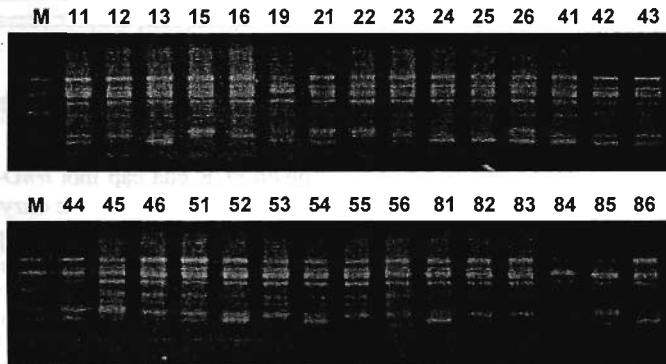
thể hiện trên các hình 5 và 6.

#### Mối quan hệ di truyền giữa các loài Sao mạng dựa trên phân tích kết quả RAPD

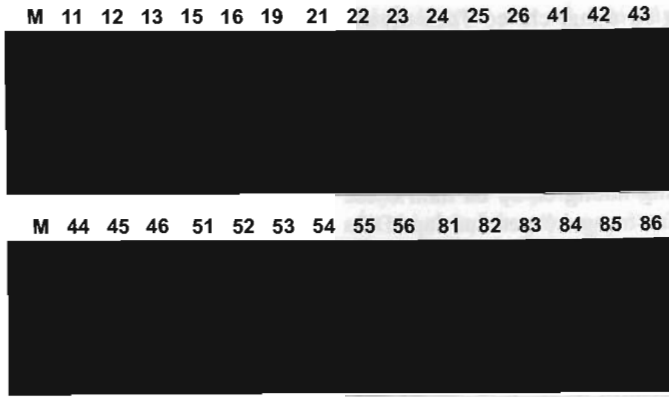
Kết quả phân tích với 7 mẫu ngẫu nhiên ở 30 mẫu Sao mạng cho thấy hệ số tương đồng di truyền của từng cặp dao động trong khoảng từ 57 đến 92%. Trong đó hệ số tương đồng giữa hai mẫu S19 và S42 là thấp nhất (61%). Hệ số tương đồng di truyền cao nhất có được khi so sánh hai mẫu S53 và S55 (0,91%)

Mức độ khác nhau được biểu hiện bằng hệ số sai khác di truyền khi so sánh giữa các xuất xứ Sao mạng. Theo biểu đồ hình cây (Hình 7) ta thấy, các mẫu S16, S84, S19, S42 có thể ghép thành 1 nhóm có mức độ tương đồng về mặt di truyền so với các mẫu còn lại khoảng 72%. Hai mươi sáu mẫu Sao mạng còn lại được chia thành 2 nhóm. Mức độ tương đồng di truyền giữa 2 nhóm này cũng khá cao, khoảng 73%. Nhóm thứ nhất bao gồm 10 mẫu là S11, S12, S13, S21, S22, S23, S24, S25, S26 và S41. Nhóm thứ 2 gồm 16 mẫu còn lại. Mức độ tương đồng di truyền cao nhất trong 16 mẫu này thuộc về 2 mẫu S53 và S55 với giá trị khoảng 91%. Mức độ sai khác về mặt di truyền giữa 30 mẫu sao mạng cao nhất là khoảng 28%, đó là mức sai khác giữa mẫu S42 so với 29 mẫu còn lại.

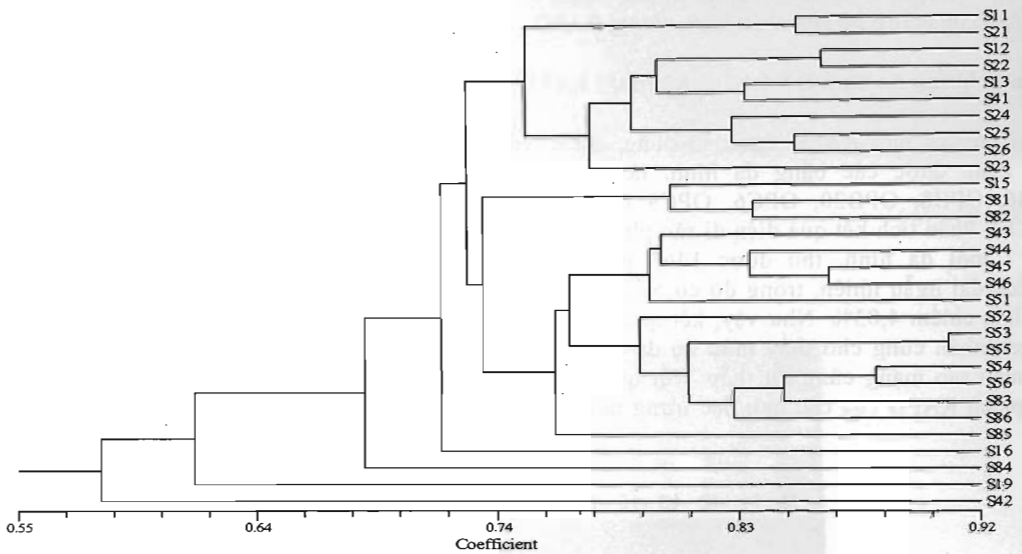
Từ kết quả phân tích này có thể thấy rằng sự tương đồng di truyền giữa 30 mẫu Sao mạng được nghiên cứu là tương đối cao (từ 57 đến 92%). Như vậy 30 mẫu Sao mạng có nguồn gốc tương đối gần và có mức độ đa dạng di truyền thấp.



Hình 5. Sản phẩm PCR của mỗi OPC6 với DNA genome của 30 mẫu Sao mạng. Hàng trên, M: thang DNA 1 kb. Các số 11, 12,...43 tương ứng là các mẫu S11, S12,...S43. Hàng dưới, M: thang DNA 100 bp; các số 44, 45,...86 tương ứng là các mẫu S44, S45, . S86.



Hình 6. Sản phẩm PCR của mỗi OPB8 với DNA genome của 30 mẫu Sao mạng. Hàng trên, M: thang DNA 1 kb. Các số 11, 12,...43 tương ứng là các mẫu S11, S12,...S43. Hàng dưới, M: thang DNA 100 bp; các số 44, 45,...86 tương ứng là các mẫu S44, S45...S86.



Hình 7. Biểu đồ quan hệ di truyền của 30 mẫu Sao mạng dựa trên số liệu phân tích với 7 mỗi RAPD.

**KẾT LUẬN**

Từ những kết quả nhận được trong nghiên cứu này chúng tôi đi đến một số kết luận sau:

Nhiệt độ bắt mồi tối ưu cho một số cặp mồi lục lập đối với loài Sao mạng đã được xác định: với các cặp mồi *trnD-trnT*, *atpB-rbcL* và *trnLe-trnLf*, nhiệt độ bắt mồi tốt nhất là ở 54°C, với cặp mồi *psbC-trnS* và cặp 16S-LF - 16S-LR1 là 56°C còn với cặp *trnLc-trnL* là 52°C.

Ở loài Sao mạng được nghiên cứu, chỉ có sản

phẩm PCR của cặp mồi *trnD-trnT* cắt bằng enzyme *TaqI* là cho đa hình. Các enzyme *TaqI*, *HinfI*, *HaeIII* và *BamHI* cắt được các sản phẩm của các cặp mồi *trnD-trnT*, *trnLe-trnLf* và *psbC-trnS* nhưng không cho đa hình.

Trong số 17 mồi RAPD sử dụng, chỉ có 7 mồi cho đa hình rõ rệt và thu được 1463 phân đoạn DNA đa hình, chiếm 4,03%. Hệ số tương đồng di truyền của các mẫu nghiên cứu là từ 57 đến 92%.

Mức độ đa hình thấp của hệ gen nhân (phân tích bằng chỉ thị RAPD) và hệ gen lục lập (phân

tích bằng các và gen lục lạp) cho thấy 30 mẫu Sao mạng thu từ vùng núi Cà Ná đều có cùng một nguồn gốc. Mức độ đa dạng di truyền thấp chứng tỏ loài cây này đang bị suy thoái ở mức cao, vì vậy cần có phương án để bảo tồn loài cây lâm nghiệp đang bị đe dọa này.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với trợ giúp kinh phí từ đề tài 6.106.06 thuộc Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên giai đoạn 2006 - 2008.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, Tachida H, Wicckneswari R, Tsumura Y, Yoshimaru H, and Yamazaki T (1998) Molecular phylogeny of Dipetrocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matL*, *trnL* intron, and *trnL-trnF* intergenic spacer regions in chloroplast DNA. *Mol Phylogenet Evol* 10(2): 202-209.

Magni CR, Ducouso A, Caron H, Petit RJ, and Kremer A (2005) Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae. *Mol Ecol* 14: 513-524.

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

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

Nguyễn Hoàng Nghĩa (2005) *Cây họ Dầu Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Nicolosi E, Deng ZN, Gentle A, Mafa SL, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of

important species as investigated by molecular marker. *Theor Appl Genet* 100: 1155-1166.

Noguchi J, Hong DY, Grant WF (2004) The historical evolutionary development of *Hemerocallis middendorffii* (Hemerocallidaceae) revealed by non-coding regions in chloroplast DNA. *Plant Syst Evol* 247: 1-22.

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.

Plumkett GM, Wen J, Lowry II PP (2004) Intrafamilial classifications and characters in Araliaceae: Insights from the phylogenetic analysis of nuclear (ITS) and plastid (*trnL-trnF*) sequence data. *Plant Syst Evol* 245: 1-39.

Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosome location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470.

IUCN 2001. *The IUCN Programme: an assessment of progress 2001*, Eds. Jeanrenaud S, Jackson W, Hammond T. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), Rue Mauverney 28, CH-1196 Gland, Switzerland.

Williams, JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JAF, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.

Wu J, Krutovskii KV, Strauss SH (1999) Nuclear DNA diversity, population differentiation and phylogenetic relationship in the California closed-cone pines based on RAPD and Isozyme markers. *Genome* 42: 893-908.

## GENETIC DIVERSITY OF SAO MANG SPECIE (*HOPEA RETICULATE* TARDICU) BASED ON THE ANALYSES OF CHLOROPLAST DNA SEQUENCES AND RAPD MARKERS

Nguyen Duc Thanh<sup>1\*</sup>, Nguyen Van Phuong<sup>1</sup>, Nguyen Hoang Nghia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology

<sup>2</sup>Forest Science Institute of Vietnam

### SUMMARY

The application of molecular markers for assessment of genetic diversity of plant species has an

\* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37561662; E-mail: [pcg-ibt@hn.vnn.vn](mailto:pcg-ibt@hn.vnn.vn)

important impact in development of new varieties and conservation of gene sources. In this study, the level of genetic diversity of 30 samples of Sao mang specie collected from Coi Leaf Folling Forest, Ca Na mountain, Phan Rang province was evaluated using chloroplast DNA and RAPD markers. The results of the analyses of 16S chloroplast and *trnL* genes and spacers between *trnD-trnT*, *psbC-trnS*, *atpB-rbcL*n genes showed that there were variations in, only, *trnD-trnT* region. Seven (OPB6, OPB8, OPB20, OPC6, OPC9, OPC12, và OPC17) from 17 investigated RAPD primers gave low polymorphism in 30 investigated samples. With 7 polymorphic primers, 1463 DNA fragments were amplified, among them, 59 were polymorphic (4.03%). A dendrogram based on RAPD analyzed data and generated by UPGMA clustering analyses using Jaccard's coefficient divided 30 samples of Sao mang into three main groups. The first group comprises 4 samples (S1.6, S1.9, S3.4 and S4.2), the second group includes 10 samples (S11, S12, S13, S21, S22, S23, S24, S25, S26 and S41), and the third group consists of 16 remained samples. Two samples (S53 và S55) had a highest genetic similarity, the value of that was 91%. The data obtained in this study showed that the level of genetic diversity of investigated Sao mang species is low, indicating the high degeneration of this species. Therefore, an effective strategy for conservation and development of the species are, extremely, needed.

**Keywords:** Chloroplast genome, genetic diversity, *Hopea reticulata* Tardicu, RAPD, restriction enzyme