

Đánh giá đa dạng di truyền các loài quế Thanh Hóa bằng chỉ thị RAPD

Khuất Hữu Trung^{1*}, Kiều Thị Dung¹, Lưu Cảnh Trung², Nguyễn Huy Hoàng², Hồ Trung Lương²

¹*Viện Di truyền nông nghiệp*

²*Viện Nghiên cứu lâm sinh*

Ngày nhận bài 18/12/2015, ngày chuyển phản biện 5/1/2016, ngày nhận phản biện 7/3/2016, ngày chấp nhận đăng 29/4/2016

Nghiên cứu phân loại các loài quế ở Việt Nam chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái và chịu ảnh hưởng nhiều bởi yếu tố môi trường. Chỉ thị phân tử RAPD là một phương pháp đáng tin cậy để xác định các loài quế một cách chính xác. Trong nghiên cứu này, phân tích RAPD-PCR gồm 22 mẫu ngẫu nhiên đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền 32 mẫu giống quế Thanh Hóa. Kết quả phân tích PCR nhận được 3.137 băng bao gồm 126 loại băng với kích cỡ khác nhau. Trong đó có 61 băng cho đa hình (chiếm 48,41%) và 65 băng đơn hình (chiếm 51,59%). Số băng nhận được ở mỗi mẫu dao động từ 3 đến 11 loại băng, trung bình 5,8 băng/mẫu. Hệ số tương đồng di truyền của 32 mẫu giống quế dao động từ 0,67 đến 0,97. Dựa vào hệ số tương đồng di truyền, có thể chia 32 mẫu giống nghiên cứu thành 6 nhóm lớn. Kết quả nghiên cứu cũng đã xác định được 2 băng cá biệt xuất hiện ở 2 mẫu có thể sử dụng làm marker nhận dạng chính xác 2 nguồn gen khác nhau. Mẫu OPN20 và UBC728 có thể nhận biết được mẫu giống tương ứng là TT02 và XC24.

Từ khoá: chỉ thị RAPD, *Cinnamomum*, đa dạng di truyền, quế.

Chỉ số phân loại 4.6

Đặt vấn đề

Chi Quế (*Cinnamomum*) thuộc họ *Lauraceae*, gồm khoảng 250 loài có hương thơm. Các loài trong họ này có đặc trưng là vỏ dầu thơm, cay nồng, dùng làm hương liệu, gia vị trong thực phẩm hay làm thuốc kháng viêm, chống tiểu đường và chống oxy hóa [1]. Ở Việt Nam có 3 loài quế chính là quế Thanh Hóa, Nghệ An (*Cinnamomum obtusifolium* Ness var *Loureirii*. Perot Ebernh); quế đơn, quế bì (*Cinnamomum cassia* Blume) và quế quan (*Cinnamomum zeylanicum* Ness).

Quế Thanh Hóa (quế Thanh) là loài cây bản địa, đa tác dụng. Sản phẩm chính của quế Thanh là tinh dầu dùng làm dược liệu và hương liệu trong công nghiệp thực phẩm. Vỏ quế thường được mài ra cho vào nước đun sôi để nguội để uống. Ngoài ra, vỏ quế cũng thường được dùng trong các bài thuốc để chữa một số bệnh về đường tiêu hóa, đường hô hấp, kích thích sự tuần hoàn của máu, lưu thông huyết mạch, làm cho cơ thể ấm lên, chống lại giá lạnh và làm chất sát trùng. Trong đông y, quế được xếp vào 4 loại thuốc quý: sâm, nhung, quế, phụ. Quế Thanh, theo như người dân Thanh Hóa gọi là “Ngọc quế châu thường”. Quế có vị thơm, cay và ngọt, có thể khử bớt được mùi tanh nên được sử dụng nhiều để làm gia vị, kích thích tiêu hóa. Hương liệu quế là

sản phẩm rất phổ biến và được nhiều người ưa chuộng khi sử dụng cho các loại bánh kẹo, rượu... Gỗ quế với vân thớ mịn, dễ gia công và có mùi thơm thường được sử dụng làm đồ thủ công mỹ nghệ cao cấp.

Trên thế giới, các nghiên cứu ứng dụng chỉ thị RAPD để phân tích đa dạng di truyền đã được thực hiện. Năm 2007, Govinden và cs đã sử dụng 11 mẫu RAPD để đánh giá sự khác biệt giữa 2 loài *Cinnamomum camphora* và *Cinnamomum verum* [2]. Kết quả phân tích 11 mẫu RAPD thu được các băng ADN dao động từ 400 tới 3.800 bp. Số băng thu được ở mỗi mẫu dao động từ 1 tới 14 băng, trung bình 8 băng/mẫu. Tất cả mẫu được sử dụng đều cho số băng đa hình cao, điều này cho thấy sự khác biệt giữa 2 loài. Như vậy, chỉ thị RAPD là một kỹ thuật nhanh để phân biệt các kiểu gen và đánh giá đa dạng di truyền 2 loài *Cinnamomum camphora* và *Cinnamomum verum*. Năm 2010, Miss Jittra Jansote đã thu thập 73 mẫu giống quế thuộc 17 loài (trong đó có 8 loài đã biết và 9 loài chưa xác định) được chọn lọc từ 6 tỉnh ở miền Nam Thái Lan [3]. Tác giả đã sàng lọc 50 mẫu RAPD và 10 mẫu cho kết quả đa hình thu được 78 băng ADN, trong đó có 75 băng đa hình (chiếm 96,15%). Sử dụng phần mềm NTSYS version 2.1 để phân tích hệ số tương đồng di truyền và cây phân loại.

*Tác giả liên hệ: Email: khuathuutrong@yahoo.com

Genetic diversity of *Cinnamomum* samples in Thanh Hoa based on RAPD markers

Summary

The classification of *Cinnamomum* species is still based on morphological characters which are influenced by environmental factors. Therefore, molecular markers such as randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) were employed in order to find a more reliable approach for identifying *Cinnamomum* samples correctly. RAPD-PCR analysis involving the 22 random primers was used to assess the genetic diversity of 32 *Cinnamomum* sp. samples that have been originated from Thanh Hoa province. The results showed that a total of 3137 bands were detected, with 126 type bands at different sizes. Out of which, 61 polymorphic bands (48.41%) and 65 monomorphic bands (51.59%) were amplified. The number of polymorphic bands detected by each RAPD marker ranged from 3 to 11, with a mean of 5.8 bands per locus. Genetic similarity coefficients of 32 *Cinnamomum* samples ranged from 0.67 to 0.97. Based on genetic similarity coefficient, 32 *Cinnamomum* samples were divided into six major groups. Identification of 2 unique bands observed in 2 primers that can be used to identify exactly 2 different genetic resources. The OPN20 and UBC728 primers can be used to identify TT02 and XC24 varieties, respectively. The obtained results are useful for classification and exact identification of some genetic resources that will be provided for the conservation and breeding.

Keywords: *Cinnamomum* sp., genetic diversity, RAPD marker.

Classification number 4.6

Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống quế dao động từ 0,397 đến 0,987, trung bình 0,641. 73 mẫu giống quế được chia làm 5 nhóm. Hai nhóm loài *C. porrectum* và *C. ilicioides* có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất, hệ số tương đồng di truyền trung bình cao nhất là 0,843. Hai nhóm loài *C. porrectum* và *C. mollissimum* hệ số tương đồng di truyền trung bình nhỏ nhất là 0,522. Tác giả A.M. Sandigawad và cs (2011) [4] đã sử dụng 40 marker RAPD để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa 8 loài thuộc chi *Cinnamomum* ở Nam Ấn Độ. Kết quả thu được 111 băng ADN, trong đó có 98% đa hình. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,17 (giữa *C. zeylanicum* và *C. travancoricum*) đến 0,81 (giữa *C. macrocarpum* và *C. travancoricum*). Dựa vào sơ đồ hình cây, 8 loài thuộc chi *Cinnamomum* được chia thành 2 nhóm. Như vậy, chỉ thị RAPD được sử dụng thành công trong việc phân loại và nghiên cứu phát sinh loài ở các loài thuộc chi *Cinnamomum*.

Hiện nay, các nghiên cứu trên đối tượng cây quế ở nước ta chủ yếu tập trung vào mô tả đặc điểm hình thái, phân bố, đặc điểm sinh lý, sinh thái, giá trị sử dụng. Ngoài ra cũng có một số nghiên cứu về kỹ thuật nhân giống, chọn tạo giống mới có năng suất cao, kỹ thuật gây trồng, sơ chế và tách chiết tinh dầu quế. Trong khi ở nước ta có một số xuất xứ quế cho năng suất chất lượng dầu cao, điển hình như quế Thanh Hóa, có thể phát triển theo hướng sản xuất hàng hóa, nhưng cho đến nay, việc xác định giá trị nguồn gen và khai thác, phát triển nguồn gen của xuất xứ quế này vẫn chưa được quan tâm đúng mức. Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là xác định nguồn gốc và đánh giá mối quan hệ di truyền của 32 nguồn gen quế được thu thập ở Thanh Hóa, Nghệ An và Yên Bái, từ đó tìm ra giải pháp nâng cao năng suất, chất lượng tinh dầu và khai thác tối ưu tiềm năng của rừng quế, góp phần bảo tồn nguồn gen cây rừng và phát triển kinh tế - xã hội.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu là cây trội dự tuyển và cây được chọn (sau đây gọi là cây được chọn). Trong đó có 28 cây được chọn ở Thanh Hóa, 4 cây được chọn ở Nghệ An và Yên Bái (bảng 1).

Bảng 1: danh sách 32 cây trội dự tuyển và cây được chọn

STT	Ký hiệu	Ghi chú	Xã	Huyện	Tỉnh
1	XC11	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
2	XC01	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
3	XL03	Cây trội dự tuyển	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
4	XC02	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
5	XC07	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
6	XC18	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
7	XC14	Cây trội dự tuyển	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
8	XC24	Cây trội dự tuyển, cây có nguồn gốc từ rừng tự nhiên	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
9	XC25	Không phải cây trội	Xuân Cao	Thường Xuân	Thanh Hóa
10	XL01	Cây trội dự tuyển, cây có nguồn gốc từ rừng tự nhiên	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
11	XL04	Cây trội dự tuyển	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
12	XL07	Cây trội dự tuyển	Xuân Lệ	Thường Xuân	Thanh Hóa
13	TX01	Cây trội dự tuyển	Thường Xuân	Thường Xuân	Thanh Hóa
14	NP01	Không phải cây trội	Ngọc Phụng	Thường Xuân	Thanh Hóa
15	XCM07	Cây trội dự tuyển	Xuân Cẩm	Thường Xuân	Thanh Hóa
16	YN6	Cây trội dự tuyển, cây có nguồn gốc từ rừng tự nhiên	Yên Nhân	Thường Xuân	Thanh Hóa
17	VX12	Cây trội dự tuyển	Vạn Xuân	Thường Xuân	Thanh Hóa
18	XCH20	Cây trội dự tuyển	Xuân Chính	Thường Xuân	Thanh Hóa
19	YB01	Không phải cây trội	Nghĩa Lộ	Vân Chấn	Yên Bái
20	YB02	Không phải cây trội	Nghĩa Lộ	Vân Chấn	Yên Bái
21	NA01	Không phải cây trội	Châu Kim	Quê Phong	Nghệ An
22	NA02	Không phải cây trội	Tiền Phong	Quê Phong	Nghệ An
23	LC 02	Không phải cây trội	Giao An	Lạng Chánh	Thanh Hóa
24	NL02	Không phải cây trội	Kiên Thọ	Ngọc Lặc	Thanh Hóa
25	NL01	Không phải cây trội	Nguyệt Án	Ngọc Lặc	Thanh Hóa
26	NX01	Không phải cây trội	Thuận Ninh	Như Xuân	Thanh Hóa
27	CT02	Không phải cây trội	Cẩm Liên	Cẩm Thủy	Thanh Hóa
28	BT01	Không phải cây trội	Điện Quang	Bá Thước	Thanh Hóa
29	TT02	Cây trội dự tuyển	Tân Thành	Thường Xuân	Thanh Hóa
30	LC 021	Không phải cây trội	Quang Hiến	Lạng Chánh	Thanh Hóa
31	NX03	Không phải cây trội	Thuận Ninh	Như Xuân	Thanh Hóa
32	TT01	Cây trội dự tuyển	Tân Thành	Thường Xuân	Thanh Hóa

Hóa chất

Một số hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merck... CTAB, Tris base, Boric acid, NaCl, dNTPs, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq Polymeraza, Ethanol, 2-propanol, Acetic acid glacial, Phenol, Chloroform, isoamylalcohol, Ribonuclease A, Agarose, các môi RAPD (bảng 2).

Bảng 2: trình tự các môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự	STT	Tên môi	Trình tự
1	UBC728	GTGGGTGGTG	12	OPN10	ACAACGTGGG
2	OPC10	TGTCTGGGTG	13	OPN20	GGTGTCCGT
3	OP015	TGGCGTCTT	14	UBC701	CCCACAACCC
4	UBC706	GGTGGTGGG	15	OPM12	GGGACGTGG
5	OPC2	GTGAGGCGTG	16	OPL7	AGGCGGAAC
6	OPA12	TCGCGGATAC	17	OPA19	CAAACGTCCG
7	S201	GGGCCACTCA	18	OPA9	GGGTAACGCC
8	OP014	AGCATGGCTC	19	OPB10	CTGCTGGGAC
9	BIO24	CTGGCGGCTG	20	OPC1	TTCGAGCCAG
10	OPN4	GACCGACCCA	21	OPC5	GATGACGCC
11	OPN6	GAGACGCACA	22	OPB17	AGGGAACGAG

Phương pháp nghiên cứu

* Tách chiết ADN tổng số: trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp tách CTAB có cải tiến của Asif và Cannon (2005) [5] để tiến hành tách chiết ADN từ 32 mẫu giống quế nghiên cứu.

Quy trình:

- Chuẩn bị sẵn dung dịch đệm chiết CTAB ở 60°C (100 mM Tris HCl, pH = 8,0; 20 mM EDTA, pH = 8,0; 3 M NaCl; 2% CTAB; 1% PVP).

- Cân 0,3 g mẫu lá quế đã làm khô và nghiền trong nitor lỏng đến khi thành dạng bột mịn (mẫu quế, chày, cối được giữ trước ở -80°C).

- Hoà tan mẫu đã nghiền nhỏ trong 800 ml CTAB buffer và 60 ml SDS 10%. Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn nhiệt, thời gian 60 phút.

- Bổ sung chloroform:isoamyl alcohol (24:1), lắc nhẹ cho tới khi thành dạng nhũ sữa. Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C.

- Hút dung dịch phía trên chuyển sang ống mới và bổ sung 1/3 thể tích 3 M sodium acetate (pH = 5,2) và 2/3 thể tích chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 15 phút thu được dịch chiết chứa ADN.

- Tủa ADN bằng isopropanol đã làm lạnh. Để ở -20°C trong 1 giờ.

- Ly tâm thu tủa 11.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Rửa tủa bằng ethanol 70%, ly tâm thu tủa, làm khô và hoà tan trong đệm TE.

* Chạy PCR: các phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 35-37 chu kỳ [94°C (1 phút), 32-36°C (1 phút 10 s), 72°C (1 phút 50 s)] và kết thúc ở 72°C (5 phút).

* Phân tích và xử lý số liệu: kết quả được thống kê dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng ADN (các allele) theo thang ADN chuẩn (ADN marker). Số liệu được xử lý, phân tích bằng chương trình Exel version 5.0 và phần mềm NTSYSpc 2.1 của F.J. Rohlf (2000) để tính ma trận tương đồng giữa các cặp mẫu giống [6].

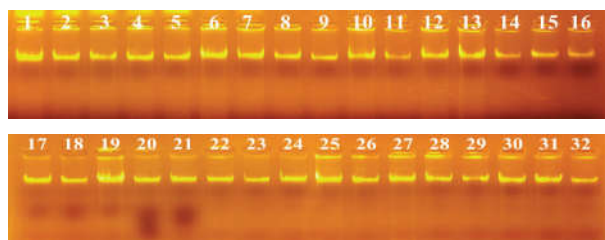
Kết quả và thảo luận

Kết quả tách chiết ADN tổng số

Tách chiết axit nucleic là công việc đầu tiên đóng vai trò quan trọng cho các nghiên cứu phân tử tiếp theo. Tuy

nhien, lá quế tươi chứa nhiều tinh dầu, polysaccharide, polyphenol làm ức chế quá trình thu tủa ADN. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng các kit tách chiết thương mại của Thermo, Qiagen nhưng không thu được kết quả mong muốn. Vì vậy, chúng tôi đã làm khô lá và sử dụng phương pháp CTAB có cải tiến của Asif và Cannon (2005) [5] bằng cách bổ sung sodium acetate 3 M trong quá trình chiết chloroform:isoamylalcohol để giúp loại bỏ các polysaccharide và protein. Kết quả tách chiết ADN tổng số của 32 cây được chọn được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% [5, 7].

Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy, các băng ADN thu được của các mẫu quế khá gọn và đồng đều chứng tỏ chất lượng ADN của các mẫu là khá tốt, không bị lẫn tạp chất. Kết quả điện di cũng cho thấy, ADN có nồng độ tương đối cao, chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1: ảnh điện di ADN tổng số của 32 mẫu quế được chọn

Kết quả phân tích đa dạng di truyền, xác định mối quan hệ di truyền giữa 32 mẫu giống quế

Để tiến hành phân tích và đánh giá mức độ đa hình di truyền của 32 cây được chọn nghiên cứu, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%. Kết quả phân tích PCR-RAPD với tổng số 22 mẫu thuộc các nhóm OPA, OPC, OPM, OPB, OPL, BIO, UBC, OPN, OPO và nhóm S cho kết quả đa hình là các mẫu: OPA9, OPA12, OPA19, OPB10, OPB17, OPC1, OPC2, OPC5, OPC10, OPM12, OPN4, OPN6, OPN20, OPO10, OPO14, OPO15, BIO24, UBC701, UBC706, UBC728, OPL7 và S201.

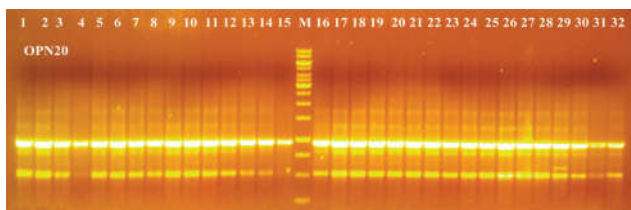
Kết quả phân tích tính đa hình bằng kỹ thuật PCR-RAPD với 22 mẫu được trình bày ở bảng 2 cho thấy, với 704 phản ứng PCR nhận lên được tổng số 3.137 băng thuộc 126 loại băng có kích cỡ khác nhau. Trong đó 61 băng cho đa hình (chiếm 48,41%) và 65 băng đơn hình (chiếm 51,59%). Kích thước băng có chiều dài nhỏ nhất khoảng 250 bp và băng có kích thước lớn nhất khoảng 3.500 bp. Xuất hiện 2 băng cá biệt, trong

đó mỗi OPN20 nhận lên được 86 băng và ở mẫu cây được chọn TT02 (mẫu 29) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp. Mỗi UBC728 nhận lên được 186 băng và ở mẫu cây được chọn XC24 (mẫu 8) khuyết băng ở vị trí khoảng 2.500 bp. Mỗi UBC701 nhận lên được tổng số băng nhiều nhất là 236 băng. Mỗi OPO14 nhận lên được số băng ít nhất là 79 băng. Số băng nhận lên trung bình cho cả 22 mẫu là 142,59 băng/mẫu.

Bảng 3: số băng thu được trên từng mẫu

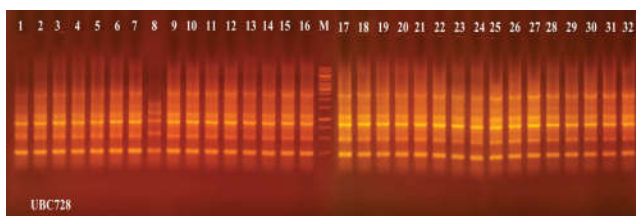
STT	Tên mẫu	Kích thước băng	Loại băng	Số băng đơn hình	Số băng đa hình	Tổng số băng
1	UBC728	250-2500	6	3	3	186
2	OPC10	700-1500	4	2	2	98
3	OPO15	400-1500	4	3	1	97
4	UBC706	600-1600	3	2	1	94
5	OPC2	300-1200	7	4	3	195
6	OPA12	400-2000	7	5	2	168
7	S201	300-2500	7	2	5	163
8	OPO14	400-2200	4	2	2	79
9	BIO24	750-1800	4	2	2	104
10	OPN4	250-2000	5	2	3	83
11	OPN6	500-1500	5	2	3	111
12	OPN10	500-1400	6	4	2	137
13	OPN20	500-1700	6	4	2	150
14	UBC701	270-2000	11	2	9	236
15	OPM12	700-1700	5	3	2	137
16	OPL7	350-2250	8	7	1	228
17	OPA19	280-1250	5	3	2	147
18	OPA9	700-3500	8	4	4	213
19	OPB10	400-1400	6	4	2	172
20	OPC1	250-1600	7	3	4	175
21	OPC5	300-1500	4	3	1	101
22	OPB17	250-1700	6	1	5	127
Tổng			126	65	61	3.137

Kết quả phân tích với mẫu OPN20: kết quả điện di sản phẩm PCR của 32 mẫu quế nghiên cứu với mẫu OPN20 thu được tổng số 6 loại băng với các kích thước khác nhau, trong đó 2 băng đa hình và 4 băng đơn hình. Kích thước băng dao động từ 500 bp đến khoảng 1.700 bp và ở mẫu giống TT02 (mẫu 29) xuất hiện một băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp. Mỗi OPN20 thu được tổng số 150 băng, các băng xuất hiện rất tách biệt, rõ ràng và đậm nét.



Hình 2: kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR của 32 mẫu giống nghiên cứu với đoạn mồi OPN20; (M: marker 1 kb)

Kết quả phân tích với mồi UBC728: kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi UBC728 thu được tổng số 186 băng, thuộc 6 loại băng, trong đó có 3 băng cho đa hình và 3 băng đơn hình. Kích thước băng dao động từ 250 bp đến khoảng 2.500 bp và ở mẫu giống XC24 (mẫu 8) khuyết băng ở vị trí khoảng 2.500 bp. Các mẫu xuất hiện băng khá đậm và tách biệt rõ ràng.



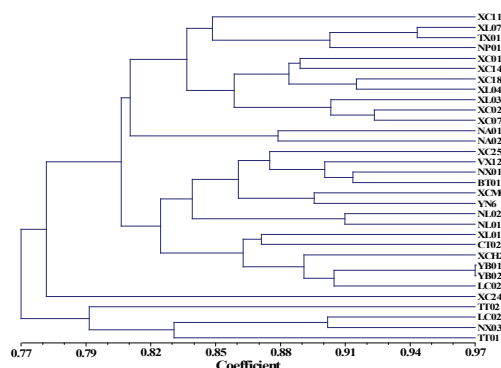
Hình 3: kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR của 32 mẫu giống nghiên cứu với đoạn mồi UBC728; (M: marker 1kb)

Hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu giống phản ánh mức độ sai khác di truyền của các mẫu giống với nhau. Hệ số tương đồng di truyền của 32 mẫu giống nghiên cứu là khá cao, dao động trong khoảng 0,67-0,97. Cặp mẫu giống TT01 và XC24 có mức sai khác di truyền lớn nhất (hệ số tương đồng di truyền nhỏ nhất là 0,67). Hai mẫu YB01 và YB02 có hệ số tương đồng cao nhất (gần gũi về mặt di truyền nhất) là 0,97, hai mẫu này đều được thu ở thị trấn Nghĩa Lộ - Văn Chấn - Yên Bái. Từ sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống nghiên cứu cho thấy, ở mức tương đồng khoảng 82% (hệ số tương đồng 0,82) có thể chia 32 mẫu giống nghiên cứu thành 6 nhóm lớn:

Nhóm I: gồm 11 mẫu giống được chia làm 2 nhóm phụ: 1) *Nhóm phụ 1.1:* gồm 4 mẫu giống là XC11, XL07, TX01 và NP01, trong đó có 3 mẫu giống là cây trội dự tuyển, chỉ có mẫu giống NP01 không phải là cây trội dự tuyển. Nhóm này có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,84 (giữa XC11 và XL07) đến 0,94 (giữa XL07 và TX01); 2) *Nhóm phụ 1.2:* gồm 7 mẫu giống là XC01, XC14, XC18, XL04, XL03, XC02 và XC07. Bảy mẫu giống trong nhóm này đều là cây trội dự tuyển và có hệ số tương đồng di truyền dao động từ

0,83 (giữa XL03 đến XL04) đến 0,92 giữa 2 cặp mẫu giống (XC18 - XL04) và (XC02 - XC07).

Nhóm II: gồm 2 mẫu giống NA01, NA02 được thu thập ở Quế Phong, Nghệ An. Hai mẫu này không phải là cây trội dự tuyển và có hệ số tương đồng di truyền với nhau là 0,88.



Hình 4: sơ đồ mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống quế nghiên cứu

Nhóm III: gồm 14 mẫu giống được chia làm 3 nhóm phụ: 1) *Nhóm phụ 3.1:* gồm 6 mẫu giống là XC25, VX12, NX01, BT01, XCM07 và YN6 có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,83 (giữa YN6 và VX12) đến 0,91 (giữa NX01 và BT01). Hai mẫu giống XCM07, YN6 đều là cây trội dự tuyển và thuộc cùng một nhánh phụ của nhóm này; 2) *Nhóm phụ 3.2:* gồm 2 mẫu giống NL02 và NL01 không phải là cây trội, có hệ số tương đồng di truyền với nhau là 0,91; 3) *nhóm phụ 3.3:* gồm 6 mẫu giống là XL01, CT02, XCH20, YB01, YB02 và LC02 có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,83 (giữa XL01 và XCH20) đến 0,97 (giữa YB01 và YB02). YB01 và YB02 đều được thu ở huyện Văn Chấn (Yên Bái) và không phải cây trội.

Nhóm IV: gồm duy nhất mẫu giống XC24, có hệ số tương đồng di truyền với các mẫu giống nghiên cứu dao động từ 0,67 (giữa XC24 và TT01) đến 0,85 (giữa XC24 và XC14).

Nhóm V: gồm duy nhất mẫu giống TT02, có hệ số tương đồng di truyền với các mẫu giống nghiên cứu dao động từ 0,7 (giữa TT02 và NP01) đến 0,83 (giữa TT02 và VX12).

Nhóm VI: gồm 3 mẫu giống là LC021, NX03 và TT01, có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,82 (giữa NX03 và TT01) đến 0,90 (giữa LC021 và NX03).

Kết luận

Kết quả thực hiện 704 phản ứng PCR-RAPD với

22 mẫu ngẫu nhiên trên tập đoàn 32 mẫu giống quế thu được tổng số 3.137 băng, thuộc 126 loại băng có kích cỡ khác nhau, trong đó có 61 băng cho đa hình (chiếm 48,41%), 65 băng đơn hình (chiếm 51,59%). Kích thước băng có chiều dài nhỏ nhất khoảng 250 bp và kích thước băng lớn nhất khoảng 3.500 bp. Ở mức tương đồng khoảng 82%, 32 mẫu giống nghiên cứu được chia thành 6 nhóm cách biệt di truyền.

Sử dụng môi OPN20 có thể nhận biết được cây trội dự tuyển TT02 (băng cá biệt ở vị trí có kích thước khoảng 600 bp) và môi UBC728 có thể nhận biết được cây trội dự tuyển XC24 (khuyết băng ở vị trí khoảng 2.500 bp).

Tài liệu tham khảo

[1] S.C. Lee, S.J. Chiou, J.H. Yen, T.Y. Lin, K.T. Hsieh, J.C. Yang (2010), "DNA barcoding *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. based on the partial non-coding ITS2 region of ribosomal genes", *J Food Drug Anal*, **18**, pp.128-135.

[2] S.J. Govinden, V.M. Ranghoo, S.D. Seeburrun (2007), "Tissue culture and RAPD analysis of *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum verum*", *Biotechnology*, **6(2)**, pp.239-244.

[3] J.J. Miss (2010), "Genetic Diversity of *Cinnamomum* spp. In Southern Thailand Based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique", *Master thesis in Plant Science*, pp.1-4.

[4] A.M. Sandigawad, C.G. Patil (2011a), "Genetic diversity in some south-Indian *Cinnamomum* Scha. Species revealed by RAPD markers", *Indian J. Genet.*, **71(1)**, pp.87-90.

[5] M.J. Asif, H. Cannon (2005), "DNA extraction from processed wood - a case study for the identification of an endangered species", *Plant Mol Biol Rep*, **23**, pp.185-192.

[6] F.J. Rohlf (2000), "NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system", *Version 2.1. Exeter Publication*, New York, USA.

[7] P.S. Valya, A.P. Viswanath, E.S. Thotten, S. Bhaskaran (2014), "Isolation and amplification of genomic DNA from barks of *Cinnamomum* spp", *Turkish Journal of Biology*, **38**, pp.151-155.