

Sử dụng chỉ thị ADN (RAPD-PCR) trong nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen Đàng sâm góp phần định hướng công tác bảo tồn và phát triển ở Việt Nam

Phạm Thanh Huyền^{1,*}, Đinh Đoàn Long²

¹*Viện Dược liệu, Bộ Y tế, 3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội*

²*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội*

Nhận ngày 10 tháng 2 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 4 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 14 tháng 6 năm 2017

Tóm tắt: Nhằm mục đích bảo tồn và chọn, tạo giống loài cây thuốc Đàng sâm trong tương lai ở Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhằm đánh giá mức độ đa dạng di truyền của một số quần thể Đàng sâm phân bố tự nhiên và trồng trọt ở một số tỉnh miền núi Tây Bắc (Lào Cai, Hà Giang, Sơn La) và Tây Nguyên (Lâm Đồng, Kon Tum). Tổng cộng 15 mẫu quần thể Đàng sâm, trong đó có 3 mẫu từ Lào Cai, 1 mẫu từ Hà Giang, 1 mẫu từ Sơn La, 4 mẫu từ Lâm Đồng và 6 mẫu từ Kon Tum đã được thu thập để tách chiết ADN và phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị RAPD-PCR sử dụng 12 mồi có trình tự 10 nucleotit ngẫu nhiên. Kết quả phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 cho thấy trong tổng cộng 106 băng RAPD-PCR thu được có 88 băng đa hình (83%) và 18 băng đồng hình (17%). 15 mẫu quần thể chia làm 2 nhóm lớn, tách biệt rõ rệt giữa nhóm mẫu thu ở Tây Bắc và nhóm mẫu thu ở Tây Nguyên. Các mẫu thu thập ở vị trí địa lý gần nhau có khác biệt di truyền nhỏ hơn cho thấy nhiều khả năng chúng có nguồn gốc chung. Sự khác biệt di truyền cao giữa các quần thể cách xa về địa lý cho thấy những nguồn gen này cần được bảo tồn độc lập phục vụ cho công tác chọn lọc và tạo giống trong tương lai.

Từ khóa: *Condonopsis javanica*, RAPD-PCR, đa dạng di truyền, khoảng cách địa lý.

1. 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 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 ADN 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, (2004). Hiện nay việc sử dụng các chỉ thị ADN (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.

Đàng sâm (*Condonopsis javanica* (Blume) Hook f.) là một cây thuốc quý được lưu truyền từ lâu đời với các tác dụng bổ tỳ, ích khí, sinh tân chỉ khát. Đàng Sâm được sử dụng để bổ bổ sức khỏe, cơ thể bị suy nhược, hoặc dùng như

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-4-39363377.

Email: huyenptnimm@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4068>

một loại thuốc bổ. Ở Việt Nam, Đảng sâm được tìm thấy phân bố khá rộng từ miền núi phía bắc tới các tỉnh Nam trung bộ như Kon Tum, Lâm Đồng. Tuy nhiên, do khai thác quá mức và nạn chặt phá rừng nên trữ lượng của loài cây thuốc bị suy giảm. Từ nhiều năm nay, Đảng sâm đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam, danh lục Đỏ cây thuốc Việt Nam và là đối tượng được ưu tiên bảo tồn [1-3].

Hiện nay nhu cầu sử dụng Đảng sâm ở Việt Nam là rất lớn. Vấn đề đặt ra là làm thế nào để khai thác và phát triển bền vững loài cây thuốc này đáp ứng nhu cầu thị trường trong nước. Để có cơ sở cho công tác bảo tồn và chọn lọc nguồn nguyên liệu làm giống để phát triển nguồn nguyên liệu làm thuốc thì việc đánh giá mức độ đa dạng nguồn gen Đảng sâm là thực sự cần thiết.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Tổng cộng 15 mẫu thực vật được thu thập ở một số khu vực thuộc các tỉnh Lào Cai, Sơn La, Hà Giang, Lâm Đồng, Kon Tum đã được sử dụng trong nghiên cứu. Dựa vào vị trí phân bố của chúng mà chúng tôi chia các mẫu Đảng sâm thành năm nhóm (N1 – N5). Mỗi mẫu được kí hiệu bắt đầu bằng chữ Cj (viết tắt của *Condonopsis javanica*) theo sau là số thứ tự từ 1 đến 15 (xem Bảng 1).

Các mẫu thực vật sau khi đưa về phòng thí nghiệm được làm sạch bằng nước cất và còn, phân tách lấy phần lá, thân. Các phần mô dập nát hoặc có biểu hiện nhiễm bệnh bị cắt bỏ, sau đó mẫu được nghiền trong nito lỏng bằng chày và cối đã khử trùng từ trước thành dạng bột mịn có kích thước hạt nhỏ hơn 1mm. Mẫu nghiền được chia ra bảo quản trong các ống Falcon 15 mL, rồi bảo quản ở -80°C để làm nguyên liệu tách chiết ADN tổng số.

Bảng 1. Danh sách các mẫu đảng sâm Việt Nam (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook f.) được sử dụng trong nghiên cứu

Nhóm mẫu (theo Tỉnh)	Địa điểm (huyện/T. xã)	Số lượng	Tọa độ GPS	SHTB tại BT	Kí hiệu mẫu ADN
N1 (Lào Cai)	Sa Pả, Sapa	1	22.3311°, 103.8500°	9722	Cj1
	Tả Phìn, Sapa	1	22.4020°, 103.8262°	9711	Cj2
	Bản Khoang, Sapa	1	22.4265°, 103.8051°	9714	Cj3
N2 (Hà Giang)	Phó Bảng, Đồng Văn	1	22.2322°, 105.1870°	9715	Cj4
N3 (Sơn La)	Xã Loong He, Thuận Châu	1	21.1560°, 103.3227°	9719	Cj5
N4 (Lâm Đồng)	Đa Sal, Lạc Dương	2	12.1735°, 108.6693°	9712	Cj6
	Đa Sal, Lạc Dương	2	12.1735°, 108.6693°	9716	Cj7
			12.1742°, 108.6675°	-	Cj8
			12.1742°, 108.6675°	-	Cj9
N5 (Kon Tum)	Thôn 1, Xã Hòa Bình, Tp Kon Tum	2	14.2511°, 107.9878°	9708	Cj10
			14.2511°, 107.9879°	9709	Cj11
	Huyện Hòa Bình	2	14.1710°, 107.5842°	9748	Cj12
			14.1710°, 107.5843°	9750	Cj13
			Đăk Hà, Tu Mơ Rông	1	14.4811°, 107.5760°
Huyện Kon Plong	1	14.3725°, 108.1850°	9707	Cj15	

Các môi RAPD thuộc 2 nhóm OPA và OPC được cung cấp từ hãng Fermentas (Lithuania).

Bảng 2. Danh sách các môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

Môi	Trình tự môi	Môi	Trình tự môi
OPA1	5'- CAGGCCCTTC -3'	OPA19	5'- CAACGTCGGT -3'
OPA7	5'-GAAACGGGTC -3'	OPA20	5'- GTTGCATCC -3'
OPA12	5'- TCGGCGATAG -3'	OPC1	5'-TTCGAGCCAG -3'
OPA13	5'- CAGCACCCAC -3'	OPC3	5'- GGGGGTCTTT -3'
OPA15	5'- TTCCGAACCC -3'	OPC12	5'- TGTCATCCCC -3'
OPA17	5'- GACCGCTTGT -3'	OPC20	5'- TTCCCCCAG -3'

Các thang chuẩn kích thước ADN: marker 1kb của hãng Fermentas (Mỹ)

Các hóa chất khác được dùng trong tách chiết ADN và phản ứng RAPD-PCR đảm bảo chất lượng và độ tinh sạch gồm đệm CTAB, chloroform, isoamyl alcohol, EDTA, ethanol, agarose, các thành phần PCR ($MgCl_2$, đệm và enzyme Taq DNA polymerase, dNTPs), thuốc nhuộm ethidium bromide (EtBr), được cung cấp bởi những hãng uy tín như Sigma (Mỹ), Merk (Đức), Fluka (Thụy Sĩ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Tách chiết ADN tổng số

+ Quy trình tách chiết ADN tổng số được thực hiện dựa trên nguyên tắc sử dụng dung môi hữu cơ theo phương pháp Mini-CTAB được Sanghai-Marooof và cộng sự mô tả đầu tiên năm 1984 [4], sau đó được Edwards và cộng sự cải tiến (năm 1991) [5] gồm các bước cơ bản sau: Cân 50 mg mẫu thực vật đã nghiền trong nitor lỏng và chuyển vào ống eppendorf 1,5 ml. Bổ sung 900 μ L dung dịch đệm nghiền (200 mM Tris HCl, pH 7,5; 25mM EDTA, pH 7,5; 250 mM NaCl; 2% CTAB và 2% β -mecaptoethanol). Ủ mẫu ở 65°C trong 90 phút. Làm nguội về nhiệt độ phòng, bổ sung 450 μ L phenol/chloroform/ isoamylalcohol (tỷ lệ thể tích: 25/24/1), ủ trong 10 phút. Ly tâm 10.000 vòng/ phút ở 4°C trong 10 phút; rồi dùng pipet hút phần dịch nổi sang ống eppendorf 1,5ml. Bổ sung 600 μ L isopropanol. Ủ ở 4°C qua đêm. Ly tâm 10.000 vòng /phút ở

nhiệt độ phòng trong 10 phút; rồi dùng pipetman loại bỏ dịch nổi và rửa tủa ADN hai lần bằng ethanol lạnh (100%), kết hợp ly tâm. Để tủa khô tự nhiên (hoặc dùng máy cô ADN), rồi hòa tan ADN kết tủa trong 100 μ L đệm 1x TE (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA); bảo quản ở 4°C.

ADN tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0.8%. Thực hiện điện di trong môi trường đệm 1x TBE, ở hiệu điện thế 90 V trong khoảng 45 phút. Kích thước tương đối của sản phẩm ADN tổng số được xác định bằng cách so sánh với thang ADN 1kb (Fermentas).

Độ tinh sạch của ADN đồng thời được kiểm tra và định lượng bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ (OD) ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Dịch chiết được pha loãng 100 lần (10 μ L ADN tổng số + 990 μ L dd H_2O), tiến hành đo 3 lần ở mỗi mẫu, kết quả lấy trung bình của 3 lần đo. Mức độ tinh sạch của ADN (mức độ lẫn ARN và protein) phản ánh qua tỷ số OD_{260}/OD_{280} . Các mẫu được coi là tinh sạch khi có tỷ số này xấp xỉ 1,8. Nồng độ dung dịch gốc được tính dựa trên hệ số $1,0 OD_{260} = 50 \mu g/\mu l dsADN$.

* Kỹ thuật RAPD-PCR được tiến hành qua hai bước:

- Bước 1: ADN hệ gen được nhân bản (khuếch đại) bằng các môi ngẫu nhiên RAPD với thành phần phản ứng và điều kiện (chu trình nhiệt của phản ứng) PCR được mô tả ở Bảng 3 và 4.

Bảng 3. Thành phần phản ứng PCR sử dụng cho Đảng sâm Việt Nam

Thành phần phản ứng	Thể tích (μL)
H ₂ O (siêu sạch)	16,8
ADN khuôn (50 ng/ μL)	0,5
Đệm Taq ADN pol (10x)	2,5
dNTPs (2mM)	2,5
Mồi RAPD (10 μM)	2,5
Taq ADN pol (5u/ μL)	0,2
Tổng thể tích PCR: 25 μL	

Bảng 4. Chu trình nhiệt của PCR sử dụng cho Đảng sâm Việt Nam

Bước phản ứng	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian (phút)	Số chu kỳ
Biến tính bước đầu	94	5	1
Biến tính	94	1	
Gắn mồi	37	1	35
Kéo dài chuỗi	72	2	
Kéo dài bổ sung	72	7	1
Bảo quản	4	∞	

- Bước 2: Sản phẩm ADN sau PCR được phân tích trên gel điện di agarose 1,0 - 1,5% chạy ở hiệu điện thế 60 - 80 V trong 45 phút bằng phương pháp nhuộm với EtBr. Kích thước tương đối của các băng khuếch đại được so sánh với thang chuẩn kích thước ADN 1kb (Fermentas, 1kb DNA Ladder).

* Phân tích di truyền bằng RAPD - PCR

Kết quả điện di sản phẩm RAPD-PCR được chuyển thành ma trận nhị phân trong phần mềm NTSYSpc 2.02h (Applied Biotstatistics, New York) theo nguyên tắc: sự có mặt của mỗi băng được ghi là 1, sự vắng mặt được ghi là 0. Từ ma trận nhị phân, hệ số tương quan DICE (SD), ma trận tương đồng theo từng cặp được thiết lập. Hệ số SD được tính bằng hai lần số băng chung của hai mẫu chia cho tổng số băng thu được của hai mẫu đó ($S = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$). Hệ số thu được là 1,0 có nghĩa là hai mẫu hoàn toàn giống nhau, trong khi 0,0 có nghĩa là hai mẫu không có điểm chung nào. Cuối cùng, cây quan hệ di truyền giữa các mẫu được xây dựng theo phương pháp UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages).

3. Kết quả nghiên cứu

Sử dụng 12 mồi ngẫu nhiên (RAPD) để phân tích đa hình di truyền của 15 mẫu đảng sâm Việt Nam đã thu được tổng cộng 106 băng, trung bình là 8,8 băng/mồi. Trong đó, số băng đa hình là 88, (chiếm 83 % tổng số băng). Số băng đồng hình là 18 (chiếm 17%).

3.1. Sự đa dạng di truyền của các mẫu quần thể Đảng sâm Việt Nam

Bằng phần mềm NTSYSpc 2.1, chúng tôi xác định được hệ số tương đồng di truyền (bảng 5) giữa 15 mẫu Đảng sâm. Kết quả cho thấy, các mẫu Đảng sâm thu ở khu vực Tây Bắc (Hà Giang, Lào Cai, Sơn La) và các mẫu thu ở Tây Nguyên (Lâm Đồng, Kon Tum) tách biệt thành 2 nhóm (nhánh) rõ rệt. Sự khác biệt di truyền lớn nhất được tìm thấy giữa mẫu Cj5 (thu ở Thuận Châu, Sơn La) với các mẫu Cj6 và Cj7 (mọc tự nhiên ở Lạc Dương, Lâm Đồng) với hệ số khác biệt di truyền là 0,38. Hai mẫu được xác định có mức độ tương đồng di truyền lớn nhất là Cj8 và Cj9 với hệ số tương đồng di truyền là 0,95. Đây cũng chính là hai mẫu được thu từ vườn trồng của người dân tại Lạc Dương, Lâm Đồng; có lẽ chúng có nguồn gốc gần gũi và là kết quả của người dân nhân giống tự phát.

Khi so sánh giữa các cặp mẫu phân bố trong cùng địa giới hành chính (cùng Tỉnh), thì xu hướng đồng hình (tương đồng di truyền) cao hơn rõ rệt khi so với các cặp mẫu ngoài nhóm. Sự đồng hình cao hơn trong phạm vi mỗi quần thể phản ánh nhiều khả năng chúng có nguồn gốc chung và xuất phát từ những quần thể tự nhiên có kích thước tương đối nhỏ. Điều này cần lưu ý cho công tác bảo tồn, bởi nếu những quần thể như vậy được khai thác liên tục dễ dẫn đến sự mất đi hoàn toàn của một số vốn gen.

Khi so sánh giữa 5 mẫu thu ở khu vực phía Bắc (Cj1 - Cj5), có vẻ như có sự tương quan giữa mức độ khác biệt di truyền với khoảng cách địa lý. Trong đó, hai mẫu thu ở thị trấn Sa

Pa và ở Bản Khoang (Cj1 và Cj3) có mức độ tương đồng di truyền là 90% (SD = 0,9). Sự khác biệt di truyền giữa 2 mẫu này có xu hướng tăng lên khi đối sách với mẫu Cj2 (thu ở Tả Phìn, Lào Cai; SD = 0,81 - 0,82) và Cj4 (thu ở Phó Bảng, Hà Giang; SD = 0,83) và Cj5 (thu ở Thuận Châu, Sơn La; SD = 0,71 - 0,74). Mức độ khác biệt di truyền chung dao động trong khoảng từ 10% (cặp mẫu Cj1 và Cj3) đến 29% (cặp mẫu Cj5 thu ở Thuận Châu, Sơn La với Cj2 thu ở Tả Phìn, Lào Cai).

Đối với 10 mẫu thu ở khu vực phía Nam, sự khác biệt di truyền dao động trong khoảng từ 5% (cặp mẫu Cj8 và Cj9, đều là mẫu trồng thu ở Lạc Dương, Lâm Đồng) đến 32% (cặp mẫu Cj11 thu ở Hòa Bình, Kon Tum và Cj14 thu ở Tu Mơ Rông, Kon Tum).

Kết quả bước đầu cho thấy, mức độ khác biệt di truyền giữa các cặp mẫu trong cùng nhóm thu ở khu vực miền Bắc hoặc miền Nam là tương đương nhau (dao động trong khoảng từ 5% đến trên dưới 30%). Sự khác biệt này tăng lên rõ rệt khi so sánh giữa hai cặp mẫu bất kỳ thu ở hai miền, với mức độ khác biệt di truyền

giữa các cặp mẫu dao động từ 22% (mẫu Cj3 thu ở Bản Khoang, Lào Cai và Cj8 thu ở Lạc Dương, Lâm Đồng) tới 38% (mẫu Cj5 thu ở Thuận Châu, Sơn La với Cj6/Cj7 thu ở Lạc Dương, Lâm Đồng).

3.2. Xây dựng cây quan hệ di truyền

Mỗi mẫu trong nghiên cứu đại diện cho quần thể ở khu vực chúng phân bố, cây quan hệ di truyền giữa 15 mẫu quần thể này được phân tích nhờ chỉ thị RAPD-PCR trong nghiên cứu này (hình 1) phản ánh chúng tách thành 2 cụm (nhánh) tương quan rõ rệt tương ứng với phân bố địa lý. Mặc dù xét tổng thể các mẫu thu thập từ 2 miền, sự đa dạng di truyền của loài Đảng sâm ở nước ta được tìm thấy, song trong phạm vi mỗi vùng phân bố, hệ số đa dạng (khác biệt) di truyền giữa các mẫu giảm rõ rệt. Yếu tố địa lý có tương quan đến sự khác biệt di truyền. Theo đó, xu hướng phổ biến là các mẫu có vị trí phân bố địa lý càng hình gần, mức tương đồng di truyền có xu hướng càng cao và ngược lại.

Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền giữa 15 mẫu Đảng sâm được thu thập trong nghiên cứu

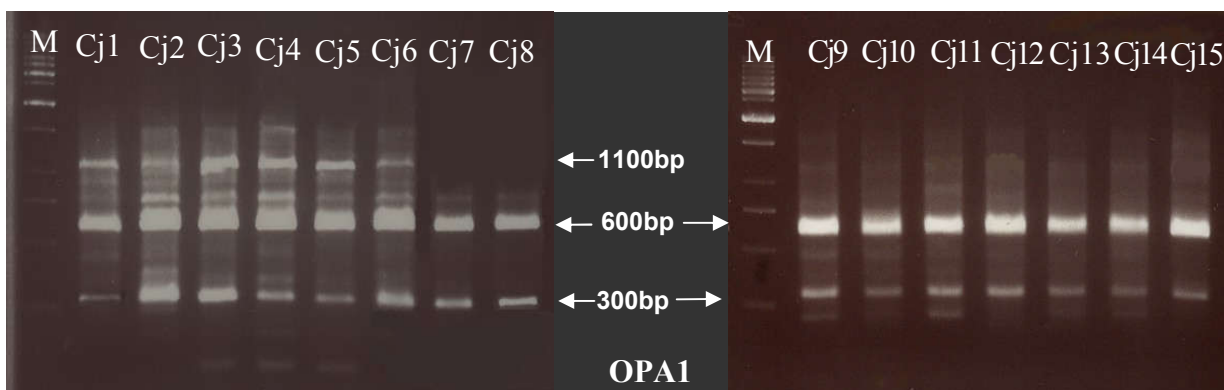
Tên mẫu	Cj1	Cj2	Cj3	Cj4	Cj5	Cj6	Cj7	Cj8	Cj9	Cj10	Cj11	Cj12	Cj13	Cj14	Cj15
Cj1	1,00														
Cj2	0,82	1,00													
Cj3	0,90	0,81	1,00												
Cj4	0,83	0,82	0,80	1,00											
Cj5	0,74	0,71	0,78	0,71	1,00										
Cj6	0,68	0,65	0,70	0,76	<u>0,62</u>	1,00									
Cj7	0,69	0,67	0,67	0,77	<u>0,62</u>	0,90	1,00								
Cj8	0,73	0,68	0,78	0,73	0,65	0,76	0,75	1,00							
Cj9	0,73	0,66	0,76	0,75	0,66	0,78	0,75	0,95	1,00						
Cj10	0,69	0,68	0,70	0,75	0,66	0,80	0,76	0,74	0,73	1,00					
Cj11	0,67	0,67	0,66	0,70	0,66	0,78	0,81	0,72	0,71	0,91	1,00				
Cj12	0,68	0,66	0,72	0,70	0,66	0,84	0,82	0,78	0,77	0,74	0,75	1,00			
Cj13	0,71	0,65	0,73	0,69	0,65	0,86	0,83	0,78	0,77	0,75	0,77	0,92	1,00		
Cj14	0,74	0,72	0,78	0,67	0,64	0,76	0,72	0,78	0,78	0,69	0,68	0,77	0,78	1,00	
Cj15	0,69	0,64	0,71	0,71	0,66	0,80	0,76	0,79	0,78	0,76	0,74	0,84	0,90	0,84	1,00

Từ các kết quả thu được, bước đầu đã xác định một số chỉ thị đặc trưng phân biệt hai nhóm đảng sâm Việt Nam thu ở Tây Bắc và Tây Nguyên (bảng 6). Các hình 2, 3 và 4 minh họa một số băng đồng hình và đa hình phân biệt

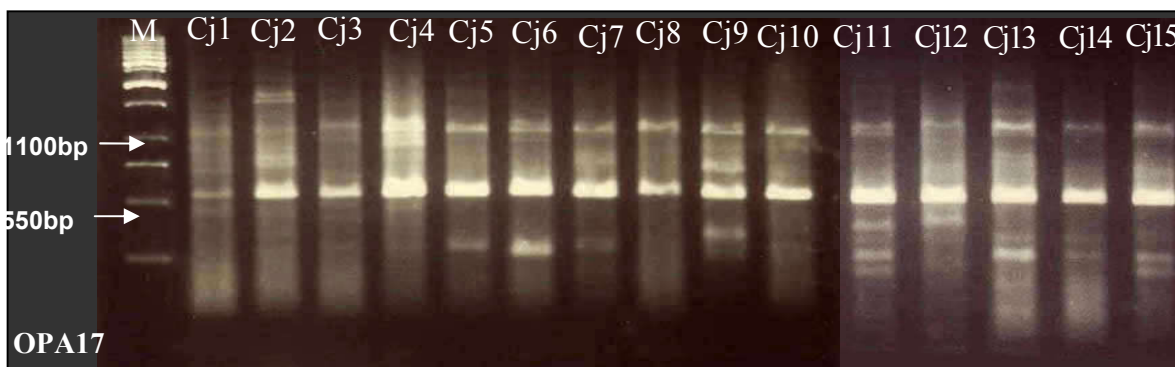
giữa các quần thể. Đây là cơ sở cho việc có thể sử dụng chỉ thị ADN, trong đó có RAPD-PCR trong việc định hướng bảo tồn và phát triển các nguồn gen Đảng sâm nói riêng và các cây dược liệu nói chung.

Bảng 6. Một số chỉ thị RAPD-PCR đồng hình và đa hình của nguồn gen đảng sâm Việt Nam

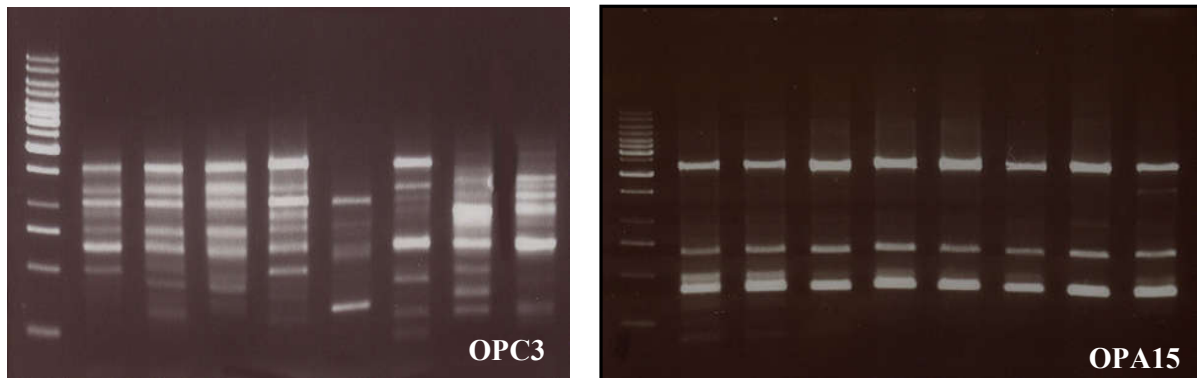
Nhóm mẫu	Miền Bắc (Lào Cai, Sơn La, Hà Giang)	Miền Nam (Lâm Đồng, Kon Tum)
Chỉ thị đặc trưng (đa hình)	OPA1 _{1100bp} , OPA7 _{600bp} , OPA13 _{200bp} , OPA20 _{1000bp} , OPC3 _{850bp}	OPA19 _{600bp} , OPA19 _{700bp} , OPA19 _{1000bp} , OPC1 _{300bp} , OPC12 _{750bp} ,
Chỉ thị chung (đồng hình)	OPA1 _{600bp} , OPA19 _{850bp} , OPA17 _{1100bp} , OPA17 _{550bp} , OPA15 _{2200bp} , OPC1 _{400bp} , OPC1 _{700bp} , OPC3 _{650bp} , OPC12 _{500bp} , OPC12 _{600bp} , OPC20 _{500bp} , OPC20 _{1400bp}	OPA3 _{525bp} , OPA15 _{400bp} , OPA15 _{700bp} ,



Hình 1. Chỉ thị RAPD-PCR của 15 mẫu đảng sâm Việt Nam với mồi OPA1. Mũi tên và kích thước chỉ bằng 600bp (chỉ thị OPA1_{600bp}) là băng đồng hình cho tất các mẫu, các băng còn lại là các băng đa hình. Cj1 - Cj15: kí hiệu các mẫu Đảng sâm; M: marker ADN 1kb (Fermentas).



Hình 2. Chỉ thị RAPD-PCR của 15 mẫu đảng sâm Việt Nam với mồi OPA17. Mũi tên và kích thước các chỉ băng 1100bp và 550bp (các chỉ thị OPA17_{1100bp} và OPA17_{550bp}) là băng đồng hình cho tất các mẫu, các băng còn lại là các băng đa hình. Cj1 - Cj15: kí hiệu các mẫu Đảng sâm; M: marker ADN 1kb (Fermentas)



Hình 3. Chỉ thị RAPD-PCR của một số mẫu đảng sâm Việt Nam với môi OPC3 (hình trái) và OPA15 (hình phải). Hình ảnh phản ánh hiệu quả (tỉ lệ) tạo các băng đồng hình và đa hình khác nhau của các môi RAPD. Cj1 - Cj15: kí hiệu các mẫu đảng sâm Việt Nam; M: marker ADN 1kb (Fermentas).

4. Kết luận

1. Đã thiết lập được thành phần và điều kiện phản ứng PCR phù hợp cho phân tích chỉ thị RAPD-PCR cho phân tích di truyền ở loài đảng sâm Việt Nam. Theo đó, mỗi 25 μ L thể tích phản ứng gồm 25 ng ADN khuôn (mẫu thực vật), 1,75mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 1 μ M môi RAPD và 1 đơn vị (u) enzym Taq DNA polymerase; với 35 chu trình ở nhiệt độ bất cấp môi 37°C.

2. Kỹ thuật RAPD-PCR đã được dùng để đánh giá mức đa dạng di truyền của 15 mẫu quần thể đảng sâm thu thập ở Việt Nam. Sự tương đồng di truyền được tìm thấy trong đồng với khoảng cách địa lý. Các mẫu thu ở khu vực Tây Bắc (Hà Giang, Lào Cai, Sơn La) có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,71 đến 0,90. Các mẫu thu ở khu vực Tây nguyên (Lâm Đồng, Kon Tum) mức tương đồng di truyền trong khoảng 0,68 - 0,95. Sự khác biệt di truyền rõ nhất được tìm thấy giữa các cặp mẫu được thu thập từ 2 vùng, điển hình nhất là mẫu thu tại Thuận Châu (Sơn La) với các mẫu thu ở Lạc Dương (Lâm Đồng) với hệ số khác biệt di truyền được xác định là 0,32.

Cây quan hệ di truyền phân tách 15 mẫu thành 2 nhánh rõ rệt phân bố ở miền Bắc và miền Nam. Một số chỉ thị RAPD - PCR đồng hình cho tất cả các mẫu của loài đảng sâm Việt Nam, trong khi một số khác có tính đặc trưng giúp phân biệt 2 nhóm nguồn gen. Chẳng hạn,

các chỉ thị OPA1_{600bp}, OPA19_{850bp}, OPA17_{1100bp}, v.v. có tính đồng hình ở tất cả các mẫu Đảng sâm. Trong khi OPA1_{1100bp} đặc trưng cho nhóm mẫu thu ở Tây Bắc, hay OPA19_{1000bp} chỉ tìm thấy ở nhóm mẫu thu ở Tây Nguyên.

5. Kiến nghị

Cần tiếp tục mở rộng nghiên cứu vốn gen cây Đảng sâm nói riêng và các loài cây dược liệu ở Việt Nam nói chung bằng các kỹ thuật phân tích ADN, gen và hệ gen, trong đó có kỹ thuật RAPD-PCR, phục vụ định hướng cho công tác bảo tồn, chọn, tạo giống và tiêu chuẩn hóa nguồn dược liệu làm thuốc.

Lời cảm ơn

Bài báo là kết quả thực hiện nhiệm vụ quỹ gen cấp Nhà nước “Khai thác và phát triển nguồn gen Hà thủ ô đỏ và Đảng sâm Việt Nam làm nguyên liệu sản xuất thuốc” giai đoạn 2011 - 2015.

Tài liệu tham khảo

- [1] Nguyễn Tiến Bản và nhiều người khác (2007). Sách đỏ Việt Nam (phần II - Thực vật), NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ, tr 152 - 153 và 303-304.

- [2] Nguyễn Tập (2006). Danh lục Đỗ cây thuốc Việt Nam. Tạp chí Dược liệu, tập 11, số 3, tr. 97 - 105.
- [3] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2003). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (Tập 1 + 2), NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- [4] Sanghai-Maroo MA, KM Soliman, RA Jorgensen, RW Allard, Ribosomal DNA, Spacer-length polymorphisms in barley Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81: 8014-8018.
- [5] Edwards K, Johnstone, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res; 19(6): 1349.

Analysis of Genetic Diversity on Medicinal Plants of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. using RAPD-PCR Technique Towards Conservation and Plant Breeding in Vietnam

Pham Thanh Huyen¹, Dinh Doan Long²

¹National Institute of Medicinal Materials, Ministry of Health, 3B Quang Trung, Hanoi, Vietnam

²VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Abstract: This study was subjected to assess the genetic diversity of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook f. germplasm in Vietnam for the purposes of conservation and its breeding for planting expansion. Samples of 15 natural and cultivated accessions were collected throughout the country with two major areas of distribution in Northwest Highlands (Lao Cai, Ha Giang, Son La) and Western Highlands (Lam Dong, Kon Tum). DNA of 15 accessions were isolated and amplified by 12 arbitrary primers. A total of 106 RAPD-PCR loci were detected, among which 88 loci (83%) were polymorphic, whereas the other 18 (17%) were homogeneous for all the collected accessions. The cluster analysis showed that 15 accessions were divided into 2 obviously distinct groups. One consisted of 5 accessions collected in Northwest highlands, while the other consisted of 10 remaining accessions collected in West highlands. Thus, RAPD-PCR results indicated that there was abundant genetic diversity amongst natural and cultivated population of *C. javanica* in Vietnam and their genetic relationship appeared to be related to their geographic distance. Thus, germplasms at geographic distance should be subjected to the conservation and breeding programs of this medicinal plant species.

Keywords: *Codonopsis javanica*, RAPD-PCR, genetic diversity, geographic distance.