

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG NGUỒN GEN 25 MẪU TRÀ HOA VÀNG (*Camellia* spp.) THU THẬP TẠI QUẢNG NINH BẰNG CHỈ THỊ RAPD VÀ ISSR

Đặng Quang Bích, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Văn Phú, Ninh Thị Thảo,
Hoàng Hải Hà, Vũ Thị Hải Hà, Đoàn Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thùy Linh, Đinh Trường Sơn *

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: dinhtruongson77@gmail.com

Ngày gửi bài: 24.05.2017

Ngày chấp nhận: 19.09.2017

TÓM TẮT

25 mẫu trà hoa vàng thu thập được tại Quảng Ninh và một số địa phương khác được đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị hình thái, chỉ thị phân tử RAPD và ISSR. Với tổng số 53 mẫu phân tích (45 chỉ thị RAPD và 8 chỉ thị ISSR), 294 locus với tổng số 4.656 băng đã được phát hiện, trong đó có 3.628 băng đa hình. Kết quả phân tích đa dạng di truyền cho thấy hệ số tương đồng di truyền của 25 mẫu giống trà hoa vàng biến động từ 0,54 - 0,81. Với mức tương đồng di truyền 0,71, 25 mẫu giống trà hoa vàng thu thập được tách thành 9 nhóm chính. Như vậy, việc kết hợp giữa phân tích kiểu hình, sự đa dạng di truyền cũng như phân tích các hợp chất có hoạt tính dược lý cho thấy các mẫu giống trà hoa vàng mặc dù có kiểu hình khá giống nhau nhưng lại rất đa dạng về kiểu gen cũng như đa dạng về khả năng tích lũy các hợp chất dược lý. Các mẫu giống thu thập được sẽ là nguồn gen quý cho các chương trình chọn tạo giống trà hoa vàng tại Quảng Ninh.

Từ khoá: Trà hoa vàng, *Camellia* spp., chỉ thị ISSR, RAPD, đa dạng di truyền.

Genetic Diversity Among 25 Accessions of *Camellia* spp. Collected in Quang Ninh by RAPD and ISSR markers

ABSTRACT

Golden flower tea plant (*Camellia* spp.) is one of the important medicinal plant. Genetic diversity among 25 accessions of *Camellia* spp., collected mostly in Quang Ninh, were evaluated by RAPD and ISSR molecular markers. Using 53 molecular markers (45 RAPD and 8 ISSR marker), we detected 294 loci with total 4656 clear and scorable bands, among these, 3628 were polymorphic bands. Based on a total of 4656 bands and similarity coefficient ranged from 0.54 to 0.81, dendrogram analysis was performed. With the genetic similarity at 0.71, 25 *Camellia* spp. accessions could be divided in to 9 distinct clusters. The combination of phenotypic analysis, genetic variation as well as analysis of pharmacologically active compounds showed that amongs 25 golden flower tea accessions, although they look similar, however, quite diverse in genotype and the ability to accumulate pharmacological compounds. The collected accession will be a valuable source for breeding programs of golden flower tea plants in Quang Ninh.

Keywords: Golden flower tea plant, *Camellia* spp. ISSR, RAPD, genetic diversity.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các loài trà hoa vàng thuộc chi Trà (*Camellia*), họ Chè (*Theaceae*), có nguồn gốc ở khu vực miền đông và miền nam Châu Á, từ dãy Himalaya về phía đông tới Nhật Bản và Indonesia. Đây là loài thực vật quý hiếm, vừa có giá trị làm cảnh, vừa có giá trị

chữa bệnh. Khác với các loại trà khác, bên cạnh lá trà thì hoa của cây trà này là bộ phận rất có giá trị do chứa nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt chất dược lý. Các flavonoid, polyphenol, polysaccharide... trong trà hoa vàng có tác dụng chống viêm, ức chế ung thư gan, chống quá trình oxi hóa, điều chỉnh lipid huyết thanh, giảm và kích thích sự thèm ăn... và đặc biệt là

không có tác dụng phụ (Chen *et al.*, 2009). Từ những năm 90 của thế kỷ 20, Việt Nam đã phát hiện trà hoa vàng ở nhiều nơi trong đó Quảng Ninh là tỉnh có nhiều mẫu giống trà trong tự nhiên và hiện tại đang được phát triển, nhân rộng mô hình trồng trà hoa vàng.

Mặc dù là cây dược liệu quý nhưng cho đến nay có rất ít tài liệu trong nước công bố các dữ liệu phân tích đa dạng nguồn gen trà hoa vàng phân bố ở nước ta cũng như chưa có các biện pháp để tạo ra nguồn cây giống có chất lượng. Mặt khác, việc phân loại thường dựa theo hình thái nên gặp những hạn chế nhất định, do hình thái của các loài rất giống nhau. Ngày nay, chỉ thị phân tử là phương pháp hỗ trợ rất hiệu quả trong phân tích đa dạng thực vật.

Chỉ thị RAPD dựa trên kết quả khuếch đại DNA trong phản ứng PCR có sử dụng một môi ngẫu nhiên để nhân bản ngẫu nhiên các locus ở các vị trí khác nhau trong bộ DNA genome. Do sự mất/thêm nucleotide tại vị trí bắt đầu dẫn tới kết quả là sự khác biệt khá lớn về số lượng locus phát hiện được. Chính vì vậy, RAPD cho khả năng phân tích đa hình rất cao (Williams *et al.*, 1990). RAPD được sử dụng nhiều trong nghiên cứu đa dạng di truyền giữa các loài thực vật (Kawa *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010), trong nghiên cứu đặc điểm của giống và đánh giá biến đổi di truyền (Martin *et al.*, 2002) và trong xác định loài (Fouly *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2000).

Mặc dù cũng sử dụng một môi để nhân bản ngẫu nhiên như RAPD, chỉ thị ISSR được thiết kế để nhân bản đoạn DNA nằm giữa hai trình tự lặp lại. Do khi thiết kế người ta sử dụng chính trình tự lặp lại và một vài nucleotide ở vùng 3' hoặc 5' nên số lượng locus phát hiện được khá nhiều. Điểm khác biệt nữa là chỉ thị này sử dụng môi có kích thước lớn hơn chỉ thị RAPD nên kết quả khả năng lặp lại, mức độ tin cậy cao hơn (Mishra *et al.*, 2003). Kỹ thuật ISSR được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền (Guasmi *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2002) nghiên cứu đặc điểm di truyền trong quần thể (Qian *et al.*, 2001) và lấy dấu di truyền (Carvalho *et al.*, 2005; Bhagyawant *et al.*, 2008).

Với mong muốn phân tích sự đa hình của các mẫu giống trà thu thập được, chúng tôi đã sử dụng cả hai chỉ thị phân tử RAPD, ISSR có khả năng phát hiện được mức độ đa hình cao để phân tích tính đa dạng di truyền của một số mẫu giống trà hoa vàng chi *Camellia* thu thập tại Quảng Ninh và một số tỉnh tại Việt Nam và Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần phân loại, bảo tồn và khai thác hiệu quả nguồn gen cây trà hoa vàng quý tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

25 mẫu giống trà hoa vàng được thu thập tại Quảng Ninh và một số tỉnh của Việt Nam và Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu

Các mẫu giống được thu thập theo phương pháp nghiên cứu theo tuyến, có thể tóm tắt như sau: Dựa trên cơ sở bản đồ địa hình của khu vực để xác lập nguyên tắc thu mẫu, mỗi mẫu lấy đầy đủ cành, lá và hoa. Tiến hành ghi chép đặc điểm dễ nhận biết ngoài thiên nhiên như: vỏ, kích thước cây, màu sắc hoa, quả, có hay không có nhựa mủ, mùi vị... Đánh dấu để phân biệt giữa các mẫu, khi đặt mẫu vào túi phải nhẹ nhàng (Hoàng Chung, 2006).

2.2.2. Phương pháp hình thái so sánh

Mẫu giống được phân loại dựa vào đặc điểm hình thái, đặc biệt là hình thái cơ quan sinh sản. Những thực vật có chung nguồn gốc có những tính chất giống nhau. Thực vật càng gần nhau càng có nhiều đặc điểm hình thái giống nhau (Hoàng Thị Sản và Hoàng Thị Bé, 2005).

2.2.3. Đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị ISSR và RAPD

Tách chiết ADN: Khoảng 100 mg lá của 25 mẫu giống trà hoa vàng được tách chiết theo hướng dẫn của Dneasy Plant Mini Kit. Hàm lượng và độ nguyên vẹn của các mẫu DNA sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp

Bảng 1. Danh sách 25 mẫu giống trà hoa vàng

Ký hiệu	Nơi lấy mẫu
Csp1	Khe Sút, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp2	Khe Sút, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp3	Khe Sút, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp4	Bằng Cả, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp5	Bằng Cả, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp6	Cài, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp7	Cài, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp8	Đồng Hỷ, Thái Nguyên
Csp9	Sơn Dương, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp10	Sơn Dương, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp11	Sơn Dương, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp12	Khe Càn, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp13	Khe Càn, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp14	Khe Càn, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp15	Khe Càn, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp16	Bình Lược, Vân Đồn, Quảng Ninh
Csp17	Đài Van, Vân Đồn, Quảng Ninh
Csp18	Xóm Mới, Ba Chẽ, Quảng Ninh
Csp19	Đài Van, Ba Chẽ, Quảng Ninh
Csp20	Nam Mẫu, Yên Tử, Quảng Ninh
Csp21	Việt Hưng, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp22	Việt Hưng, Hoành Bồ, Quảng Ninh
Csp23	Van Tắc, Móng Cái, Quảng Ninh
Csp24	Đồng Hưng, Quảng Tây, Trung Quốc
Csp25	Phúc Kiến, Trung Quốc

điện di trên agarose 1,5%. Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu được kiểm tra trên máy Nanodrop. Sau đó mẫu DNA được bảo quản trong tủ lạnh sâu -20°C.

Kỹ thuật PCR đánh giá đa dạng di truyền sử dụng 8 chỉ thị ISSR và 45 chỉ thị RAPD được thực hiện trên máy PCR (Eppendorf). Danh sách môi và trình tự môi được liệt kê cụ thể trên bảng 3. Đây là các chỉ thị được phân bố đều trên nhiễm sắc thể (Valdemar *et al.*, 2004; Oliveira. *et al.*, 2010). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% và quan sát dưới đèn chiếu UV.

Phản ứng PCR bao gồm các thành phần tiêu chuẩn trong đó sử dụng nồng độ dung dịch đệm theo khuyến cáo của nhà sản xuất, 0,2 mM

dNTPs, 0,25 mM MgCl₂, 0,5 µM mỗi, 0,05 đơn vị enzyme/µl. Phản ứng PCR được thực hiện với chu kỳ nhiệt như sau: 94°C - 3 phút, (94°C - 30 giây, Tm - 30 giây, 72°C - 2 phút) x 40 chu kỳ, 72°C - (5 - 7) phút.

Xử lý số liệu: Xây dựng sơ đồ đa dạng di truyền bằng phần mềm NTSYS 2.1, các băng vạch sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0. Sử dụng “Hệ số tương đồng của Sokal và Michener (1958)” và phương pháp UPGMA trong NTSYS 2.1. Hệ số PIC (Polymorphic Information content) của mỗi locus RAPD được tính theo công thức $PIC(i) = 1 - \sum P_{ij}^2$ (Botstein, 1980). Trong đó, I là số locus RAPD tương ứng; j là số thứ tự allen của locus

RAPD và P_{ij} là tần suất allel thứ j với locus RAPD thứ i .

Hệ số PIC: Trong phân tích ISSR được tính bằng công thức $PIC(i) = 2 \times f_i \times (1-f_i)$ (RoldanRuiz. *et al.*, 2000) trong đó: $PIC(i)$ là PIC của locus i . f_i là tần số của các đoạn được khuếch đại (có băng). $1-f_i$ là tần số của các mảnh không được khuếch đại (không có băng).

Hiệu quả của mỗi cặp mồi được phân tích thông qua các chỉ số sai khác của mỗi cặp mồi R_p (resolving power) (Prevost & Wilkinson, 1999), $R_p = \sum I_b$. I_b : giá trị đại diện cho thông tin của đoạn. $I_b = 1 - [2 \times (0,5 - p)]$, P là tỷ lệ các mẫu xuất hiện băng vạch.

2.2.4. Xác định thành phần và hàm lượng một số hợp chất trong lá trà hoa vàng

Mẫu được lấy, bảo quản và xử lý theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2005 ngày 26/11/2005. Áp dụng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được mô tả theo Ang Zhang *et al.* (2013) để đánh giá thành phần, hàm lượng hợp chất sinh học trong trà hoa vàng. Việc định lượng các hợp chất được dựa vào phương trình đường chuẩn, các hợp chất chuẩn được đặt mua từ Sigma.

Điều kiện sắc ký: Việc phân tách và phân tích các hợp chất hữu cơ, hợp chất thứ cấp dựa trên quy trình chuẩn của hãng Shimadzu (Nhật Bản). Cột: C18ODS (4,6 x 250 mm, 5 μ m); Dung môi kênh A: acetic acid 1%, kênh B: Acetonitrile : acetic acid (99 : 1); Nhiệt độ cột: 30°C; Detector: DAD; Tốc độ dòng: 1 ml/min; Thể tích bơm mẫu: 20 μ l; Chương trình chạy: Sử dụng chế độ gradient với 2 kênh A và kênh B theo bảng 2.

Xử lý số liệu: Microsoft Excel 2010.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích đa dạng kiểu hình mẫu trà hoa vàng thu thập

Chỉ tiêu về hình thái là một trong những chỉ tiêu quan trọng được ứng dụng rộng rãi trong đánh giá đa dạng di truyền. 25 mẫu trà hoa vàng được thu thập chủ yếu tại Quảng Ninh

(Hình 1), một số mẫu thu thập tại các tỉnh khác của Việt Nam và Trung Quốc. Mẫu được thu thập là các mẫu điển hình đại diện cho tuyến, vùng và khu vực thu thập.

Trong quá trình điều tra thu thập chúng tôi tiến hành đánh giá 20 tiêu chí về đặc điểm hình thái của thân, lá, hoa, quả và hạt của cây trà hoa vàng thu thập được. Các đặc điểm về hình thái được đánh giá bao gồm: Cách mọc của lá, hình thái kiểu lá, hình dạng phiến lá, đặc điểm gốc lá, đặc điểm đầu lá, đặc điểm mép lá, độ dày của lá, đặc điểm cuống lá, gân lá, vị trí hoa trên cành, kiểu hoa, đài hoa, tràng, nhị, nhụy, màu hoa, số lượng cánh hoa, kích thước hoa, đặc điểm quả, hạt.

Từ những đặc điểm hình thái của từng mẫu đã thu thập được ở trên chúng tôi tiến hành đánh giá sự đa dạng di truyền của các mẫu giống và thu được cây phân loại của 25 mẫu giống trà (Hình 2). Kết quả thu được cho thấy: hệ số tương đồng của 25 mẫu giống trà hoa vàng thu thập được dao động từ 0,64 - 100%. Ở mức độ tương đồng 0,9 thì 25 mẫu giống trà hoa vàng được phân thành bốn nhóm chính bao gồm: nhóm 1 gồm các mẫu Csp1, Csp2, Csp3, Csp4, Csp6, Csp7, Csp9, Csp10, Csp11, Csp12, Csp13, Csp14, Csp15, Csp21, Csp22; nhóm 2 gồm các mẫu: Csp5, Csp8, Csp18, Csp19; nhóm 3 gồm các mẫu: Csp16, Csp17, Csp20; nhóm 4 gồm các mẫu Csp23, Csp24 và Csp25. Trong số đó rất nhiều mẫu giống trong cùng một nhóm có mức độ tương đồng tới 100% (nhóm 1, 2 và 4). Kết quả trên chứng tỏ khi dựa trên các đặc điểm hình thái, các mẫu giống trà hoa vàng có mức độ tương đồng rất cao và thậm chí có thể không phân biệt được nếu chỉ dựa trên 20 tiêu chí trên. Có thể, do hầu hết các mẫu giống được thu thập tại cùng một địa phương nên các đặc điểm hình thái đã thích nghi với điều kiện sinh thái do vậy có độ tương đồng rất cao. Tuy nhiên, mẫu Csp5 mẫu thu thập tại Băng Că - Hoàn Bồ lại không theo quy luật này. Có thể đây là cá thể đột biến hình thái hoặc vì lý do nào đó dẫn đến sự khác biệt về hình thái tại thời điểm theo dõi hoặc có thể đây là một loài khác hoàn toàn. Mẫu thu tại Thái Nguyên có kiểu hình giống với mẫu thu tại

Bảng 2. Chế độ gradient với 2 kênh A và kênh B

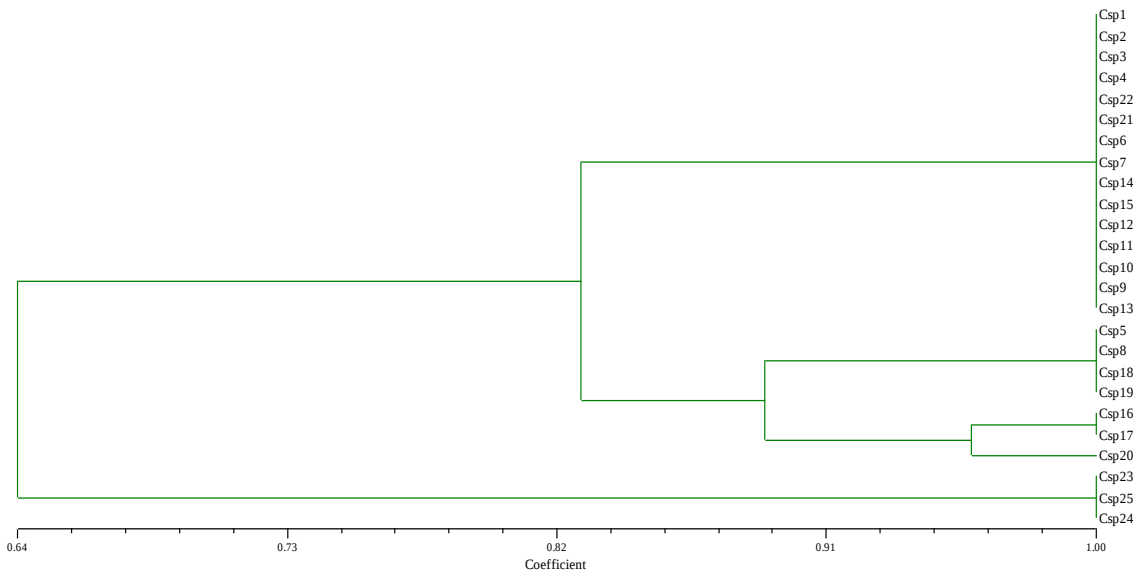
Thời gian (phút)	Kênh A	Kênh B
0	100	0
2	100	0
8	70	30
22	20	80
26	0	100
30	0	100
32	100	0
34	100	0



Hình 1. Lá, hoa, quả và cây trà hoa vàng thu thập tại Hoành Bồ, Quảng Ninh

Ba Chẽ nên 4 mẫu giống này (Csp5, Csp8, Csp18, Csp19) thuộc cùng nhóm 2. Các mẫu

thu tại Yên Tử thuộc cùng nhóm 3. Các mẫu thu tại Trung Quốc và Móng Cái thuộc nhóm 4.



Hình 2. Sơ đồ quan hệ di truyền của 25 mẫu giống trà hoa vàng dựa trên chỉ thị hình thái

Như vậy, sự tương đồng của 25 mẫu giống trà hoa vàng là rất cao khi dựa trên 20 tiêu chí về hình thái. Liệu khi các mẫu giống trên được phân tích bằng các chỉ thị DNA có phát hiện được sự khác biệt hay không? Để trả lời câu hỏi đó chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá đa dạng di truyền các mẫu trà thu thập được bằng phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử RAPD và ISSR.

3.2. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị RAPD và ISSR

Sau khi tách DNA tổng số chúng tôi kiểm tra mức độ tinh sạch và nguyên vẹn bằng kỹ thuật điện di và đo quang phổ Nanodrop. Kết quả điện di cho thấy 25 mẫu DNA tổng số thu được xuất hiện vạch băng rõ ràng, kích thước lớn, ít bị đứt gãy do đó đáp ứng tốt cho mục đích sử dụng làm DNA khuôn cho chỉ thị ISSR và RAPD.

a. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị RAPD

45 môi RAPD đã được sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của 25 mẫu giống trà hoa vàng. Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% cho thấy tất cả các môi đều cho đa hình (Hình 3). Các môi đã tạo ra 4007 băng, trung bình 160,28 băng trên mỗi mẫu trà hoa vàng và 89,04 băng/môi. Trong đó nhóm các chỉ thị OPAK15 và OPAW10 cho số băng trung

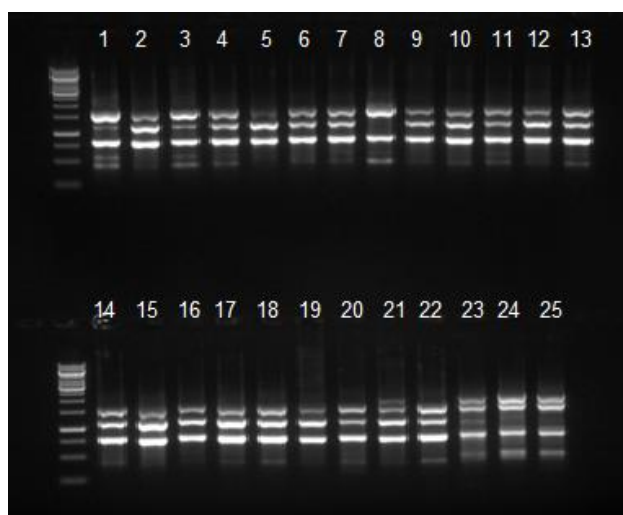
bình cao nhất và đều đạt 7,48 băng/mẫu. Các chỉ thị OPAR11, OPAE15 cho số băng DNA trung bình tính trên mỗi mẫu đạt thấp nhất (lần lượt là 1,32 và 1,40) (Bảng 3). Dựa trên kết quả thu được có thể thấy việc sử dụng chỉ thị RAPD trong phân tích mối quan hệ di truyền trong quần thể các mẫu trà hoa vàng nghiên cứu đã chỉ ra sự đa dạng di truyền ở các mẫu trà hoa vàng thu thập được. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn, chúng tôi đã tiếp tục sử dụng chỉ thị ISSR để phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu giống trà hoa vàng này.

b. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị ISSR

Các chỉ thị ISSR đã sử dụng cũng đều thể hiện sự đa hình, tổng số 649 băng ADN được tạo ra, trung bình 25,96 băng/mẫu trà hoa vàng và 5,38 băng/môi. Nhóm các chỉ thị ISSR T3, T14 cho số băng ADN trung bình tính trên các mẫu trà hoa vàng đạt cao nhất, tương ứng 5,28 và 4,20 băng/mẫu. Nhóm chỉ thị ISSR cho số băng ADN trung bình trên mẫu thấp nhất là ISSR6 và ISSRT1 cho số băng ADN trung bình thấp nhất tương ứng là 0,88 và 1,84 băng/mẫu.

c. Tổng hợp kết quả phân tích đa dạng di truyền dựa trên hai chỉ thị ISSR và RAPD

Sản phẩm PCR của 25 mẫu giống trà hoa vàng thu được sau khi nhân bản bởi 53 môi (45 môi RAPD và 8 môi ISSR) cho tổng số băng thu



Hình 3. Môi RAPD02 (Ảnh điện di sản phẩm phản ứng môi RAPD02 với 25 mẫu trà)

được là 4.656 băng, trong đó có 3.628 băng đa hình, mẫu khá biến động, đạt cao nhất 169 băng ở mẫu chiếm 77,92%. Số băng đa hình thu được trên mỗi Csp18 và thấp nhất đạt 124 băng ở mẫu Csp8.

Bảng 3. Đa hình của 25 mẫu giống trà hoa vàng dựa trên chỉ thị RAPD và ISSR

Chỉ thị RAPD									
STT	Tên mẫu	Trình tự mẫu	Tm (°C)	Tổng số locus phát hiện được	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu u giống	Chỉ số sai khác giữa các cặp mẫu (RP)	Hệ số PIC
1	OPA10	GTGATCGCAG	34	8	100	95	3,78	7,60	0,31
2	OPAD14	GAACGAGGGT	34	7	100	107	4,28	8,56	0,42
3	OPAK15	ACCTGCCGTT	34	8	87,5	187	7,48	14,96	0,12
4	OPAM01	TCACGTACGG	34	7	100	93	3,72	7,44	0,30
5	OPAN01	ACTCCACGTC	34	7	100	114	4,56	9,12	0,33
6	OPAR16	CCTTGCGCCT	34	8	100	147	5,88	11,76	0,30
7	OPAW10	GGTGTTCGCC	34	8	100	187	7,48	14,96	0,12
8	OPAW14	GGTTCTGCTC	34	8	100	119	4,76	9,52	0,33
9	OPD18	GAGAGCCAAC	34	6	100	75	3,00	6,00	0,37
10	OPE18	GGACTGCAGA	34	6	100	87	3,48	6,96	0,44
11	OPP14	CCAGCCGAAC	34	6	83,33	95	3,80	7,60	0,31
12	OPX17	GACACGGACC	34	8	87,5	130	5,20	10,40	0,34
13	OPX18	GACTAGGTGG	34	6	100	87	3,48	6,96	0,34
14	OPY04	GGCTGCAATG	34	6	50	88	3,52	7,04	0,07
15	P28	GACCGCTTGT	34	6	100	79	3,16	6,32	0,42
16	P37	CTGACCAGCC	34	5	100	109	4,36	8,72	0,11
17	RAPD02	GTTTCGCTCC	34	6	66,66	107	4,28	8,56	0,14
18	OPAR05	CATACCTGCC	34	7	100	71	2,84	5,68	0,38
19	OPAU12	CCACTCGTGT	34	7	85,71	104	4,16	8,32	0,38
20	OPAV19	CTCGATCACC	34	5	80	84	3,36	6,72	0,28
21	OPE20	AACGGTGACC	34	4	100	54	2,16	4,32	0,27
22	RAPD05	AACGCGCAAC	34	3	100	41	1,64	3,28	0,23
23	UPC11	AAAGCTGCGG	34	4	75	85	3,40	6,80	0,29
24	UBC465	GGTCAGGGCT	34	6	100	106	4,24	8,48	0,27
25	AK12	AGTGTAGCCC	34	4	75	79	3,16	6,32	0,18
26	OPA14	TCTGTGCTGG	34	4	100	75	3,00	6,00	0,21
27	OPA15	TTCCGAACCC	34	5	100	68	2,72	5,44	0,47
28	OPAE03	CATAGAGCGG	34	5	100	56	2,24	4,48	0,45
29	OPAE15	TGCCTGGACC	34	2	100	35	1,40	2,80	0,24
30	OPAR02	CACCTGCTGA	34	4	100	70	2,80	5,60	0,26
31	OPAR04	CCAGGAGAAG	34	4	100	67	2,68	5,36	0,24
32	OPAR11	GGGAAGACGG	34	2	100	33	1,32	2,64	0,00
33	OPAR15	ACACTCTGCC	34	4	100	59	2,36	4,72	0,25
34	OPAT08	TCCTCGTGGG	34	6	100	69	2,76	5,52	0,45

Đánh giá đa dạng nguồn gen 25 mẫu trà hoa vàng (*Camellia* spp.) thu thập tại Quảng Ninh bằng chỉ thị RAPD và ISSR

Chỉ thị RAPD									
STT	Tên mẫu	Trình tự mẫu	Tm (°C)	Tổng số locus phát hiện được	Tỷ lệ đa hình của các locus (%)	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu u giống	Chỉ số sai khác giữa các cặp mẫu (RP)	Hệ số PIC
35	OPAV03	TGTAGCCGTG	34	6	100	96	3,84	7,68	0,26
36	OPAW07	AGCCCCCAAG	34	5	100	67	2,68	5,36	0,45
37	OPAW08	CTGTCTGTGG	34	5	100	60	2,40	4,80	0,28
38	OPAX07	ACGCGACAGA	34	6	83,33	97	3,88	7,76	0,38
39	OPM12	GGGACGTTGG	34	5	100	77	3,08	6,16	0,37
40	OPP05	CCCCGGTAAC	34	6	66,66	123	4,92	9,84	0,11
41	OPW09	GTGACCGAGT	34	5	100	96	3,84	7,68	0,37
42	OPW13	CACAGCGACA	34	4	100	56	2,24	4,48	0,47
43	S201	GGGCCACTCA	34	3	100	58	2,32	4,64	0,33
44	S202	GGAGAGACTC	34	6	100	54	2,16	4,32	0,28
45	S208	AACGGCGACA	34	8	100	161	6,44	12,88	0,24
Tổng số (RAPD)				251		4.007			
Trung bình/mẫu (RAPD)				5,58	94,24	89,04	3,56	7,12	0,29
Giá trị trung bình /mẫu giống (RAPD)				10,04	169,63	160,28	6,41		
Chỉ thị ISSR									
STT	Tên mẫu	Trình tự mẫu	Tm (°C)	Tổng số locus phát hiện được	Tỷ lệ đa hình của các locus	Tổng số băng nhân bản được	Số băng/mẫu u giống	Chỉ số sai khác giữa các cặp mẫu (RP)	Hệ số PIC
1	ISSR1	(CA) ₈ AG	56	1	100	93	3,72	7,44	0,30
2	ISSR6	(CA) ₈ GC	56	6	100	22	0,88	1,76	0,20
3	ISSR13	CAG(CA) ₈	44	7	100	75	3,00	6,00	0,35
4	ISSR14	CGT(CA) ₈	44	7	85,71	105	4,20	8,40	0,35
5	ISSRT1	(GT) ₆ CC	54	3	100	46	1,84	3,68	0,31
6	ISSRT2	(CT) ₆ TG	56	8	100	101	4,04	8,08	0,39
7	ISSRT3	(AC) ₆ CG	42	7	85,71	132	5,28	10,56	0,35
8	ISSRT4	(CAC) ₅	50	4	100	75	3,00	6,00	0,27
Tổng số (ISSR)				43		649			
Trung bình/mẫu (ISSR)				5,38	96,43	81,13	3,25	6,49	0,32
Giá trị trung bình/mẫu giống (ISSR)				1,72	30,86	25,96	1,04		
Tổng số băng ISSR + RAPD						4656			
Trung bình/mẫu (ISSR + RAPD)				5,48	95,33	85,08	3,40		

Qua bảng 3 cho ta thấy số locus trung bình mỗi mẫu RAPD có thể phát hiện được là 5,58 và dao động từ 2 - 8 locus/mẫu. Tỷ lệ đa hình của các locus là 94,24% (dao động từ 66,66 - 100%). Trung bình tổng số băng/mẫu đạt 89 (dao động

từ 33 - 187 băng). Chỉ số sai khác giữa các cặp mẫu (RP) là 7,12 (dao động từ 2,64 - 14,96), hệ số PIC của chỉ thị RAPD là 0,29.

Với chỉ thị ISSR số locus trung bình mỗi mẫu ISSR có thể phát hiện được 5,38 (dao động

từ 1 - 8 locus/mẫu). Tỷ lệ đa hình của các locus trung bình là 96,43% (dao động từ 85,71 - 100%). Trung bình tổng số băng/mẫu đạt 81,13 (dao động từ 22 - 132). Chỉ số sai khác của các cặp mẫu (RP) là 6,49 (dao động từ 1,76 - 10,56), hệ số PIC của chỉ thị ISSR trung bình đạt 0,32.

Theo tác Nguyễn Văn Mùi (2004) sử dụng 6 mẫu RAPD để nghiên cứu đa hình của 4 mẫu trà hoa vàng cho thấy: tỷ lệ đa hình đạt từ 76,92 - 91,67%. Tỷ lệ băng đa hình của 25 giống trà hoa vàng mà chúng tôi nghiên cứu đạt từ 75,3 - 80,47%. So với nghiên cứu của Hoàng Thị Thu Yến và cs. (2012) “Nghiên cứu sự đa dạng của các mẫu giống chè *Camellia siensis* bằng kỹ thuật RAPD”, các giá trị về tỷ lệ đa hình của các locus và số băng nhân bản được của chúng tôi đều cao hơn. Hoàng Thị Thu Yến và cs. (2012) cũng chỉ ra rằng loài *Camellia siensis* rất đa dạng về di truyền. Zheng *et al.* (2013) đã sử dụng 14 mẫu ISSR để phân tích 29 mẫu trà hoa vàng thu thập tại tỉnh Nam Ninh - Trung Quốc cũng đã chỉ ra được tổng số locus phát hiện được là 133, tỷ lệ băng đa hình là 94,74%. Kết quả này khá tương đồng với kết nghiên cứu của chúng tôi (Bảng 3).

Như vậy, có thể thấy sự đa hình của các mẫu trà hoa vàng nghiên cứu thể hiện qua số locus, tỷ lệ đa hình, số băng nhân bản, giá trị RP, PIC và số vạch băng thu nhận của từng mẫu sau khi phân tích RAPD và ISSR tương đối cao. Điều này chứng tỏ có thể do các mẫu trà hoa vàng thu thập tại các địa điểm khác nhau, có vùng sinh thái khác nhau nên đã trải qua quá trình tiến hóa, chọn lọc tự nhiên khác nhau và do vậy đã dẫn đến sự khác biệt di truyền.

Sử dụng hệ số tương đồng Sokal và Michener (1958) và phương pháp UPGMA trong phần mềm NTSYS 2.1 để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 25 mẫu trà hoa vàng, chúng tôi thu được kết quả được thể hiện ở bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền phản ánh quan hệ di truyền của các mẫu trà hoa vàng với nhau. Hai mẫu trà hoa vàng càng gần nhau về thông tin di truyền thì hệ số tương đồng giữa chúng càng lớn và ngược lại, hai mẫu có hệ số tương đồng di truyền thấp thì mối quan hệ di truyền của chúng càng xa nhau.

Bảng 4 thể hiện hệ số tương đồng di truyền của từng cặp mẫu. Kết quả cho thấy, hệ số tương đồng của 25 mẫu trà hoa vàng biến động từ 0,54 - 0,81. Trong đó, hai mẫu Csp1 và Csp3 (đều thu thập từ Khe Sút, Hoàn Bồ - Quảng Ninh) có hệ số tương đồng di truyền là 0,81, lớn nhất trong số 25 mẫu giống thu thập được. Ngược lại, mức độ tương đồng thấp nhất được ghi nhận là 0,54 giữa cặp mẫu giống Csp3 (thu thập từ Khe Sút, Hoàn Bồ - Quảng Ninh) và Csp5 (thu thập từ Bằng Cả, Hoàn Bồ - Quảng Ninh) (Hình 4).

Chỉ thị phân tử RAPD và ISSR

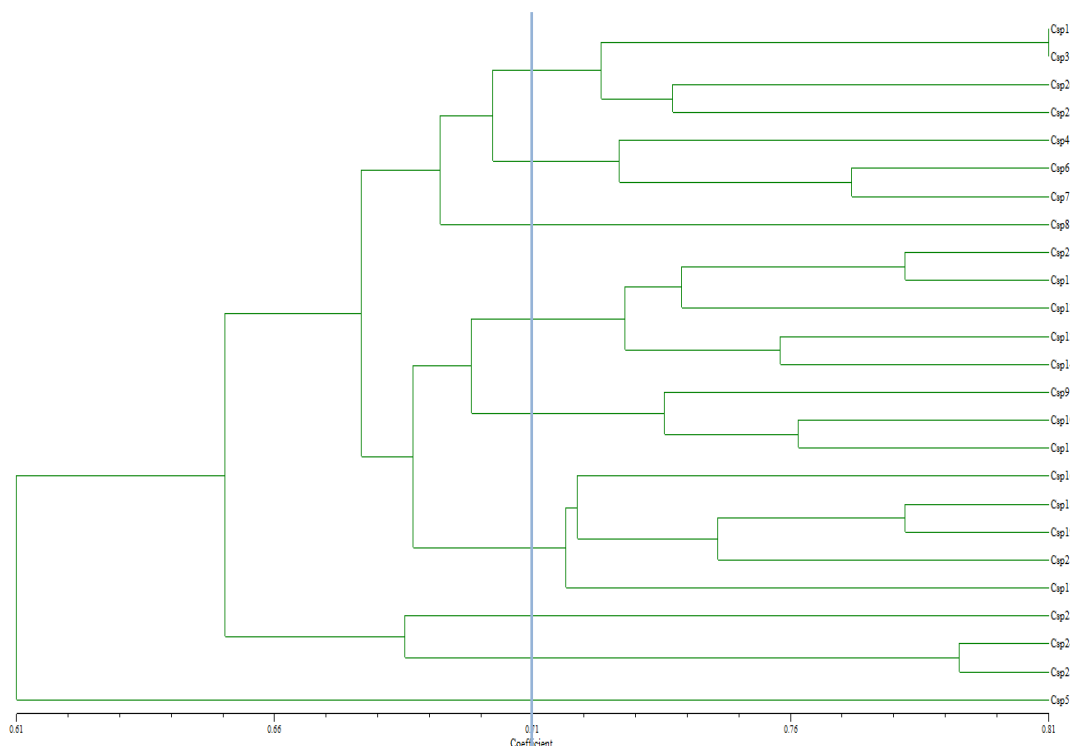
Sơ đồ mối quan hệ trên hình 4 cho thấy hầu hết các mẫu thu thập cùng địa phương đều được phân loại vào cùng một nhóm với nhau. Kết quả phân tích ở mức tương đồng di truyền 0,71 chúng tôi thu nhận được 9 nhóm phân thành 9 nhánh di truyền chính. Trong đó Csp5; Csp8 và Csp23 là các nhánh riêng biệt (nhánh 9, nhánh 3, nhánh 7) và có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với các nhánh còn lại; nhánh 1 gồm 4 mẫu giống: Csp1, Csp3, Csp20, Csp22; nhánh 2 gồm 3 mẫu: Csp4, Csp6, Csp7; nhánh 4 gồm 5 mẫu: Csp2, Csp12, Csp13, Csp14, Csp15; nhánh 5 gồm 3 mẫu: Csp9, Csp10, Csp11; nhánh 6 gồm 5 mẫu: Csp16, Csp17, Csp18, Csp19, Csp21; nhánh 8 gồm 2 mẫu: Csp24; Csp25.

Sự phân nhánh trong cây phả hệ đã thể rất rõ ở các mẫu Csp8 thuộc nhánh 3; Csp23 thuộc nhánh 7 và nhóm hai mẫu Csp24, Csp25 thuộc nhánh 8. Các mẫu lấy đều đại diện đặc trưng cho từng vùng cụ thể. Mẫu Csp8 là mẫu duy nhất thu thập ở Thái Nguyên, mẫu Csp23 là mẫu duy nhất ở Móng Cái - Quảng Ninh, mẫu Csp24, Csp25 được thu thập từ Trung Quốc. Điều này có thể giải thích là do mẫu trà hoa vàng trong quá trình chọn lọc tự nhiên ở các vùng địa lý và sinh thái khác nhau đã tạo ra sự khác biệt này, tuy nhiên những nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành để tìm được câu trả lời chính xác nhất. Những kết quả thu được về tương quan di truyền của các mẫu trà hoa vàng sẽ là cơ sở dữ liệu quan trọng cung cấp cho các nhà chọn tạo giống tham khảo trước khi quyết định sử dụng vào các mục tiêu nghiên cứu khác nhau, như thu thập, phân

Đánh giá đa dạng nguồn gen 25 mẫu trà hoa vàng (*Camellia* spp.) thu thập tại Quảng Ninh bằng chỉ thị RADP và ISSR

Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền của 25 mẫu giống trà hoa vàng

	Csp1	Csp2	Csp3	Csp4	Csp5	Csp6	Csp7	Csp8	Csp9	Csp10	Csp11	Csp12	Csp13	Csp14	Csp15	Csp16	Csp17	Csp18	Csp19	Csp20	Csp21	Csp22	Csp23	Csp24	Csp25
Csp1	1,00																								
Csp2	0,70	1,00																							
Csp3	0,81	0,70	1,00																						
Csp4	0,69	0,69	0,73	1,00																					
Csp5	0,59	0,63	0,54	0,61	1,00																				
Csp6	0,67	0,67	0,66	0,70	0,66	1,00																			
Csp7	0,67	0,70	0,70	0,76	0,65	0,77	1,00																		
Csp8	0,69	0,67	0,74	0,70	0,57	0,65	0,70	1,00																	
Csp9	0,67	0,71	0,68	0,66	0,60	0,70	0,73	0,64	1,00																
Csp10	0,66	0,72	0,68	0,70	0,64	0,71	0,73	0,71	0,74	1,00															
Csp11	0,71	0,71	0,70	0,66	0,57	0,68	0,69	0,66	0,73	0,76	1,00														
Csp12	0,64	0,74	0,64	0,63	0,63	0,71	0,64	0,63	0,67	0,70	0,67	1,00													
Csp13	0,68	0,73	0,69	0,72	0,57	0,72	0,77	0,67	0,73	0,70	0,75	0,72	1,00												
Csp14	0,69	0,74	0,69	0,69	0,59	0,68	0,73	0,70	0,69	0,71	0,67	0,74	0,76	1,00											
Csp15	0,64	0,78	0,65	0,66	0,66	0,68	0,71	0,63	0,69	0,69	0,67	0,73	0,71	0,73	1,00										
Csp16	0,63	0,71	0,66	0,65	0,66	0,72	0,74	0,68	0,67	0,71	0,64	0,71	0,67	0,73	0,74	1,00									
Csp17	0,63	0,70	0,60	0,70	0,63	0,70	0,72	0,60	0,67	0,70	0,66	0,70	0,69	0,71	0,70	0,71	1,00								
Csp18	0,65	0,69	0,63	0,71	0,63	0,73	0,71	0,66	0,66	0,76	0,66	0,64	0,67	0,72	0,68	0,71	0,71	1,00							
Csp19	0,63	0,73	0,66	0,66	0,66	0,71	0,68	0,64	0,69	0,71	0,64	0,69	0,67	0,73	0,74	0,74	0,74	0,78	1,00						
Csp20	0,72	0,69	0,73	0,71	0,58	0,71	0,75	0,70	0,66	0,68	0,64	0,62	0,68	0,70	0,66	0,69	0,67	0,69	0,67	1,00					
Csp21	0,64	0,66	0,63	0,67	0,62	0,71	0,69	0,59	0,67	0,65	0,63	0,66	0,68	0,68	0,69	0,71	0,71	0,75	0,74	0,68	1,00				
Csp22	0,76	0,68	0,69	0,70	0,62	0,71	0,73	0,67	0,67	0,70	0,68	0,66	0,72	0,72	0,65	0,68	0,72	0,73	0,70	0,74	0,73	1,00			
Csp23	0,61	0,70	0,60	0,60	0,57	0,57	0,61	0,59	0,61	0,61	0,62	0,63	0,64	0,66	0,69	0,68	0,61	0,61	0,65	0,65	0,62	0,62	1,00		
Csp24	0,65	0,69	0,64	0,68	0,62	0,65	0,66	0,61	0,59	0,65	0,61	0,66	0,71	0,67	0,64	0,67	0,67	0,65	0,66	0,65	0,67	0,67	0,69	1,00	
Csp25	0,70	0,64	0,71	0,66	0,60	0,66	0,68	0,68	0,63	0,69	0,63	0,67	0,67	0,67	0,64	0,74	0,65	0,67	0,67	0,71	0,67	0,71	0,69	0,79	1,00



Hình 4. Sơ đồ quan hệ di truyền của 25 mẫu giống trà hoa vàng dựa trên

loại, bảo tồn nguồn gen và sử dụng cho các chương trình chọn tạo giống.

Giá trị PIC thể hiện sự đa dạng di truyền của các alen trên từng locus. Giá trị PIC càng lớn thì sự đa dạng càng cao và ngược lại. Với chỉ thị RAPD và ISSR đều là chỉ thị trội, giá trị PIC dao động từ 0 - 0,5. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) của 45 mỗi RAPD và 8 mỗi ISSR dao động từ 0,000 (OPAR11) đến 0,47232 (OPA15). Hệ số PIC trung bình của hai chỉ thị đạt 0,30 cho thấy các mẫu trà hoa vàng thu thập được khá là đa dạng về nguồn gen.

Kết quả của cây phân loại di truyền (Hình 4) cũng rất phù hợp với cây phân loại hình thái (Hình 2). Qua so sánh với cây phân loại hình thái (Hình 2), nhận thấy hầu hết các mẫu nằm trong cùng một nhóm thu thập từ cùng địa điểm. Riêng chỉ có mẫu Csp5 thu thập tại Bằng Cỏ, Hoài Bồ, Quảng Ninh nhưng lại có sự khác biệt rất rõ ràng với các mẫu giống thu được tại Quảng Ninh kể cả khi phân tích bằng kiểu gen (RAPD, ISSR) và kiểu hình. Có thể đây là cá thể khác loài trong số các mẫu giống trà thu thập được tại Quảng Ninh.

này rất có thể là một loài trà hoa vàng khác biệt có họ hàng xa so với loài trà cùng tồn tại cùng khu vực mặc dù chúng có hình thái tương tự nhau. Điểm đặc biệt là mẫu giống Csp5 mặc dù được thu tại Bằng Cỏ, Hoài Bồ, Quảng Ninh nhưng lại có sự khác biệt rất rõ ràng với các mẫu giống thu được tại Quảng Ninh kể cả khi phân tích bằng kiểu gen (RAPD, ISSR) và kiểu hình. Có thể đây là cá thể khác loài trong số các mẫu giống trà thu thập được tại Quảng Ninh.

Kết quả xác định hàm lượng hoạt chất thiên nhiên của các mẫu lá thu tại huyện Hoài Bồ với mẫu lá thu tại huyện Ba Chẽ của tỉnh Quảng Ninh cũng thấy sự khác biệt về hàm lượng hoạt chất giữa hai khu vực này. Đối với các mẫu thu tại Ba Chẽ, hàm lượng Catechin C = 0,49 mg/g CK; Catechin EC = 0,21 mg/g CK; Catechin EGCG = 0,28 mg/g CK; Catechin ECG = 0,30 mg/g CK. Với các mẫu thu tại Hoài Bồ, các hoạt chất đạt tương ứng là 0,32; 0,20; 0,29 và 0,60 mg/g CK. Ngoài ra hàm lượng rutin và quercetin trong các mẫu lá trà hoa vàng thu thập tại các địa điểm khác nhau của huyện Hoài Bồ (68,4 mg/g CK; 57,5 mg/g CK) cao hơn

so với các mẫu lá trà hoa vàng tại các địa điểm của huyện Ba Chẽ (64,5 mg/g CK; 40,4 mg/g CK)... Điều này chứng tỏ rằng các mẫu trà hoa vàng không những chỉ đa dạng về di truyền mà hàm lượng hoạt chất một số hợp chất thiên nhiên của chúng cũng rất đa dạng và khác nhau ở từng khu vực phân bố.

4. KẾT LUẬN

Phân tích mối quan hệ di truyền của 25 mẫu trà hoa vàng bằng 53 môi (45 môi RAPD và 8 môi ISSR) cho thấy: Tổng số băng thu được là 4.656 trong đó có 3.628 băng đa hình, hệ số PIC của chỉ thị RAPD là 0,29 và của chỉ thị ISSR là 0,32. Hệ số tương đồng của 25 mẫu trà hoa vàng biến động từ 0,54 - 0,8. Trong đó, hai mẫu Csp1 và Csp3 có hệ số đồng dạng lớn nhất là 0,81 và cặp mẫu giống Csp3 và Csp5 có hệ số đồng dạng là thấp nhất (0,54). Kết quả phân tích kiểu gen ở mức tương đồng di truyền 0,71 chúng tôi thu nhận được 9 nhóm chính trong đó nhóm Csp5, Csp8 và Csp23 là ba nhóm riêng biệt. Phân tích kiểu hình ở mức độ tương đồng 0,9 đã chia 25 mẫu giống trà hoa vàng thành 4 nhóm chính. Kết hợp giữa phân tích kiểu gen, kiểu hình với phân tích các hợp chất có hoạt tính dược lý cho thấy: các mẫu giống trà hoa vàng mặc dù có kiểu hình khá giống nhau nhưng lại khá đa dạng về kiểu gen cũng như đa dạng về khả năng tích lũy hàm lượng các hợp chất dược lý. Đây sẽ là nguồn gen quý cho các chương trình chọn tạo giống trà hoa vàng tại Quảng Ninh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Zhang Ang, Wan Li, Wu Cuiyun, Fang Yulin, Han Guomin, Li Hua, Zhang Zhenwen and Wang Hua (2013). Simultaneous Determination of 14 Phenolic Compounds in Grape Canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength Switching Detection. *Molecules*, 18: 14241-14257.

Baghyawant S. S., Srivastava N. (2008). Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(24): 4428-4431.

Carvalho A., Matos M., Lima-Brito J., Guedes-Pinto H., Benito C. (2005). DNA fingerprint of F1 interspecific hybrids from the Triticeae tribe using ISSRs. *Euphytica*, 143(1-2): 93-99.

Chen, Y.Y, Huang, Y.L, Wen, Y.X, Li, D.P, Liu, J.L, Wei, X. (2009). Analysis of volatile components in *Camellia nitidissima* by GC-MS, Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006

Fouly H.M., Wilkinson H.T., Domier L.L (1996). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeumannomyces* species. *Soil Biol. Biochem.*, 28(6): 703-710.

Guasmi F., Elfalleh W., Hannachi H., Fères K., Touil L., Marzougui N., Triki T and Ferchichi A. (2012). The use of ISSR and RAPD markers for genetic diversity among South Tunisian barley. *ISRN Agronomy*. Article ID 952196.

Hoàng Chung (2006). Các phương pháp nghiên cứu quần xã thực vật. Nhà xuất bản Giáo Dục.

Hoàng Thị Sản, Hoàng Thị Bé (2005). Phân loại thực vật học. Nhà xuất bản Đại học Sư phạm, tr. 18-19; 297-303.

Hoàng Thị Thu Yến, Nguyễn Văn Tuấn, Hoàng Thị Nga (2012). Nghiên cứu đa dạng di truyền genome một số dòng chè (*Camellia siensis*) trồng tại xã Tân Cương, thành phố Thái Nguyên bằng kỹ thuật RAPD, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, 96(08): 139-143.

Kawa P.G., Devarumath R.M., Nerka Y (2009). Use of RAPD marker for assessment of genetic diversity in sugarcane cultivars. *Indian J. Biotechnol.*, 8: 67-81.

Khan A., Awan S., Sadia B., Rana R. M Khan I. A (2010). Genetic diversity study among coloured cotton genotypes by using RAPD markers. *Pak. J. Bot.*, 42(1): 71-77.

Lin S.Y, Chen I.Z, Tsai C.M, Chen Y.L (2005). Detection of genetic relationship in Taiwan tea variety (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) with RAPD markers, *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 51(4): 357-366.

Matsumoto S, Takeuchi A, Hayatsu M, Kondo S (1994). Molecular cloning of *phenylalanine ammonia-lyase* cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the tea PAL cDNA probe, *Theoretical and applied genetics*, 89(6): 671-675.

Martin C., Uberhuaga E., Pérez C. (2002). Application of RAPD markers in the characterisation of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *Euphytica*, 127(2): 247-253.

Mishra P.K., Fox R.T.V., Culham A. (2003). Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and longrange dispersal in *Fusarium culmorum*. School of Plant Sciences, The University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AS, UK, 2003 Association of Applied Biologists.

- Nguyễn Văn Mùi, Lê Thị Hoài Thu (2004). Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của một số loài trà hoa vàng (*Camellia*) Việt Nam bằng kỹ thuật RAPD - PCR. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, KHTN & CN, XX(4).
- Ngô Quang Đê (1996). Nghiên cứu hai loài cây *Camellia* có triển vọng thuần hóa làm cây cảnh ở Ba Vì - Hà Tây, Báo cáo kết quả nghiên cứu khoa học, Trường đại học Lâm nghiệp.
- Oliveira E.C, Amaral Junior A.T, Goncalves L.S.A, Pena G.F, Freitas Junior S.P, Ribeiro R.M, Pereira M.G (2010). Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting inter-simple sequence repeat markers in corn (*Zea mays*). Genetic and Molecular Research, 9(2): 835-842.
- Qian W., Ge S., Hong D. Y. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet., 102(2-3): 440-449.
- Reddy P.M., Sarla N., Siddiq E.A (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128(2): 9-17.
- Rossi. I., Bartolacci. B., Potenza. L., Bertini. L., Barbieri. E., Stocchi. V. (2000). Identification of white truffle species using RAPD markers. Plant and Soil, 219(1-2): 127-133.
- Sinchan Adhikari Soumen Saha Tapas Kumar Bandyopadhyay Parthadeb Ghosh (2014). Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. Plant Systematics and Evolution, January 2014, Volume 301, Issue 1, pp 439-450
- Trần Ninh, Hakoda Naotoshi (2010). Các loài trà ở vườn Quốc gia Tam đảo, tr. 122-125.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski A.J., and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531-6535.
- Zheng Xiao, Zhi Hui-Li, Huang Dong-Lian, Zheng Qi-Fan, Chang Jie-Jiang (2013). Genetic Relationship among 29 Yellow *Camellia* Germplasms in Nanning Golden Park by ISSR Analysis. Research Institute of Subtropical, Forestry, Caf, Fuyang, 311400, Zhejiang, China; Nanning Golden Camellia Park, Nanning, Guangxi, 530023, China.

Phụ lục 1. Tỷ lệ băng đa hình của 25 mẫu trà hoa vàng nghiên cứu khi thực hiện với 45 chỉ thị RAPD và 8 chỉ thị ISSR

Stt	Tên mẫu	Tổng số băng	Tổng số băng đa hình	Tỷ lệ băng đa hình (%)
1	Csp1	192	150	78,12
2	Csp2	181	140	77,34
3	Csp3	188	149	79,25
4	Csp4	174	134	77,01
5	Csp5	168	126	75,00
6	Csp6	197	157	79,69
7	Csp7	184	142	77,17
8	Csp8	165	124	75,15
9	Csp9	187	146	78,07
10	Csp10	185	144	77,83
11	Csp11	183	142	77,59
12	Csp12	183	134	73,22
13	Csp13	176	136	77,27
14	Csp14	170	138	81,17
15	Csp15	189	139	73,54
16	Csp16	192	152	79,16
17	Csp17	192	151	78,64
18	Csp18	210	169	80,47
19	Csp19	200	164	82,00
20	Csp20	191	150	78,53
21	Csp21	210	168	80,00
22	Csp22	198	157	79,29
23	Csp23	167	125	74,85
24	Csp24	181	140	77,34
25	Csp25	193	151	78,23
Tổng số		4656	3628	

Đánh giá đa dạng nguồn gen 25 mẫu trà hoa vàng (*Camellia* spp.) thu thập tại Quảng Ninh bằng chỉ thị RADP và ISSR

Phụ lục 2. Các tính trạng kiểu hình của 25 mẫu trà hoa vàng thu thập

Mẫu																										
		C.sp1	C.sp2	C.sp3	C.sp4	C.sp5	C.sp6	C.sp7	C.sp8	C.sp9	C.sp10	C.sp11	C.sp12	C.sp13	C.sp14	C.sp15	C.sp16	C.sp17	C.sp18	C.sp19	C.sp20	C.sp21	C.sp22	C.sp23	C.sp24	C.sp25
Đặc điểm																										
Thân	Đặc điểm thân	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ	Thân gỗ nhỏ
Lá	Cách mọc của lá	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm	Lá mọc cách, không có lá kèm
	Hình thái kiểu lá	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn	Kiểu lá đơn
	Hình dạng phiến lá	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy	Phiến lá nguyên không chia thùy
	Đặc điểm góc lá	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm hẹp	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm hẹp	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp	Hình nêm rộng	Hình nêm rộng	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp	Hình nêm hẹp
	Đặc điểm đầu lá	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá có mũi nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn	Hình lá nhọn
	Đặc điểm mép lá	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa	Có răng cưa
	Đặc điểm mép lá	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa sâu	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu	Răng cưa nông	Răng cưa nông	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu	Răng cưa sâu
	Độ dày của lá	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	Lá mỏng	lá dày	lá dày	lá dày	lá dày

Đặng Quang Bích, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Văn Phú, Ninh Thị Thảo, Hoàng Hải Hà,
Vũ Thị Hải Hà, Đoàn Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thùy Linh, Đinh Trường Sơn

[illegible]

Đánh giá đa dạng nguồn gen 25 mẫu trà hoa vàng (*Camellia* spp.) thu thập tại Quảng Ninh bằng chỉ thị RADP và ISSR

[illegible]