

tiếp theo là nhóm cây thân thảo có 275 loài (24,47%), nhóm cây bụi/bụi trườn có 196 loài (17,44%), nhóm dây leo có 155 loài (13,79%), nhóm thực vật ký sinh có 10 loài (0,89%), thấp nhất là nhóm cây phụ sinh với 8 loài (0,80%).

Nhóm cây thuốc sử dụng thân/vỏ (St) chiếm số lượng lớn với 353 loài, chiếm 31,41%, tiếp theo là nhóm sử dụng lá/cành (L) có 340 loài (30,25%), thứ 3 là nhóm sử dụng cả cây (H) với 301 loài (26,78%), nhóm sử dụng rễ/rễ củ/củ (R) với 295 loài (26,25%), nhóm sử dụng hoa/quả/hạt (F) có 172 loài (15,30%), nhóm sử dụng nhựa/mủ thấp nhất với 18 loài (1,60%).

Các loài cây thuốc tại đây có khả năng điều trị 20 nhóm bệnh khác nhau, trong đó có 3 nhóm bệnh có số lượng loài cây thuốc nhiều nhất là nhóm cây thuốc chữa bệnh ngoài da có 393 loài, chiếm 34,96%, tiếp theo là nhóm cây thuốc chữa bệnh về gan, thận, mật, đường tiết niệu có 328 loài (29,18%), nhóm cây thuốc chữa các bệnh về

đường tiêu hóa có 295 loài (26,25%).

Có 65 loài cây thuốc bị đe dọa được ghi nhận trong Sách đỏ Việt Nam (2007), Danh lục đỏ Việt Nam (2007), Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam (2019), Nghị định 06/2019/NĐ-CP, Nghị định 84/2021/NĐ-CP, Cites (2023) và IUCN (2022) là những loài cây thuốc quý hiếm và nguy cấp cần ưu tiên bảo tồn tại tỉnh Kiên Giang.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện từ sự tài trợ kinh phí của chương trình Tây Nam Bộ để thực hiện đề tài: “Đánh giá hiện trạng và tiềm năng phát triển nguồn tài nguyên cây thuốc và nghiên cứu bảo tồn, trồng trọt một số loài cây thuốc ở một số tỉnh vùng Tây Nam Bộ [TNB.ĐT/14-19/C16]”. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Ban Chỉ đạo chương trình Tây Nam Bộ, UBND Tỉnh, Sở, Hội Đông Y tỉnh Kiên Giang, Ban quản lý Rừng Đặc dụng Hòn Đất - Kiên Hà, VQG U Minh Thượng, VQG Phú Quốc và người dân địa phương đã tạo điều kiện và hỗ trợ trong suốt quá trình thực hiện khảo sát nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược liệu, (2006), Nghiên cứu thuốc từ thảo dược, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
2. Võ Văn Chi (2012), Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học tp.HCM.
3. Phạm Hoàng Hộ (1999 - 2000), Cây cỏ Việt Nam, quyển I, II, III, NXB Trẻ tp.HCM.
4. Đỗ Huy Bích (2013), Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, T. I & T. II (2004), T. III (2013).
5. Viện Dược liệu (2016), Danh lục cây thuốc Việt Nam, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
6. Gagnepain F. (1908), Zingiberacées. In: Lecomte H. ed, *Flore Générale de l'Indo-Chine*, Masson & Co., Paris, 6, 1244 pages.
7. Wu Z., Raven P. H., Hong D. (2011), Flora of China 19, Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 694.
8. Nguyễn Tiến Bân (2003 - 2005), Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập I, II, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2.498 tr.
9. www.tropicos.org [https://www.tropicos.org/home] (Truy cập tháng 26 tháng 9 năm 2020).
10. www.ipni.org [https://www.ipni.org/] (Truy cập tháng 26 tháng 9 năm 2020).
11. Plant of the world online [https://powo.science.kew.org/] (Truy cập tháng 26 tháng 12 năm 2022).
12. Nguyễn Nghĩa Thìn (2007), Các phương pháp nghiên cứu thực vật, NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội.
13. Đỗ Tất Lợi (2006), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, NXB Y học.
14. Bộ Khoa học và công nghệ (2007), Sách đỏ Việt Nam, Phần II: Thực vật, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Hà Nội.
15. Bộ Khoa học và công nghệ (2007), Danh lục đỏ Việt Nam, NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ Hà Nội.
16. Nguyễn Tập (2019), Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 24(6), 319-328.
17. Chính phủ (2019), Nghị định 06/2019/NĐ-CP về Quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.
18. Chính phủ (2021), Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22/9/2021 của Chính phủ sửa đổi, bổ sung một số điều của Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.
19. https://cites.org/eng/app/appendices.php (truy cập ngày 22/08/2023).
20. IUCN Red List of Threatened Species (truy cập ngày 22/08/2023).
21. Bộ Y tế (2013), Thông tư số 40/2013/TT-BYT, ngày 18/11/2013 về việc ban hành danh mục thuốc thiết yếu thuốc đông y và thuốc từ dược liệu lần IV.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 59 - 64)

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN MỘT SỐ LOÀI KIM NGÂN THƯỜNG SỬ DỤNG LÀM THUỐC Ở VIỆT NAM

Đinh Thanh Giảng¹, Trần Thị Kim Dung¹, Nguyễn Hữu Đức Thịnh², Vũ Minh Hải², Nguyễn Văn Khiêm^{1,*}

¹Viện Dược liệu; ²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: ngvankhiem@yahoo.com

(Nhận bài ngày 21 tháng 11 năm 2023)

Tóm tắt

Kim ngân đã được sử dụng làm thuốc cổ truyền để điều trị nhiều chứng bệnh khác nhau. Ở Việt Nam, có 11 loài trong chi *Lonicera* phân bố tự nhiên từ miền Bắc cho tới Tây Nguyên. Các loài *Lonicera japonica*, *L. confusa* và *L. macrantha* thường được sử dụng làm thuốc phổ biến ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, tổng cộng 20 mẫu của 3 loài kim ngân thu thập ở Việt Nam đã được đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị ISSR. Sử dụng 10 môi chọn lọc đã tạo ra trung bình 8,5 loci/môi, tỷ lệ đa hình là 85,53%. Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp) cao nhất là 6,4 (môi U824), thấp nhất là 2,6 (môi U815) và chỉ số

Rp trung bình là 3,83. Hệ số PIC trung bình là 0,32, dao động từ 0,26 đến 0,40 cho thấy mức độ đa hình của nghiên cứu ở mức cao. Hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,68, dao động từ 0,48 đến 0,99. Tổng cộng 20 mẫu nghiên cứu được chia làm 3 nhóm chính. Nhóm I thuộc loài *L. confusa*, nhóm II thuộc loài *L. macrantha*, nhóm III thuộc loài *L. japonica*. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa quan trọng đối với công tác bảo tồn và chọn giống kim ngân.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, Đa dạng di truyền, Kim ngân, ISSR, *Lonicera*.

Summary

Genetic Diversity Evaluation of some Honeysuckle Species Commonly Used as a Traditional Medicine in Vietnam

Honeysuckle has been used for thousands of years as a traditional medicine to treat many different diseases. In Vietnam, 11 *Lonicera* species are distributed naturally from the North to the Central Highlands. *L. japonica*, *L. confusa*, and *L. macrantha* are commonly used as traditional medicine in Vietnam. In this study, a total of 20 samples of 3 honeysuckle species collected in Vietnam were evaluated for genetic diversity using ISSR markers. Using 10 selective primers produced an average of 8.5 loci/primer, the polymorphism rate was 85.53%. The highest difference between primer pairs (Rp) was 6.4 (primer U824), the lowest was 2.6 (primer U815) and the average Rp index was 3.83. The mean PIC coefficient was 0.32, ranging from 0.26 to 0.40, indicating that the study's polymorphism level was high. The mean genetic similarity coefficient was 0.68, ranging from 0.48 to 0.99. A total of 20 samples were divided into 3 main clusters: group I (*L. confusa*), group II (*L. macrantha*), and group III (*L. japonica*). The present study results are useful for the conservation and breeding of honeysuckle varieties.

Keywords: Molecular marker, Genetic diversity, Honeysuckle, ISSR, *Lonicera*.

1. Đặt vấn đề

Kim ngân là tên gọi chung cho một số loài thuộc chi *Lonicera*, họ Caprifoliaceae. Theo Yang và cs. (2011), chi *Lonicera* trên thế giới có khoảng 180 loài, phân bố ở vùng Bắc Phi, châu Âu, Bắc Mỹ và châu Á [1]. Ở Việt Nam, có khoảng 11 loài trong chi *Lonicera* phân bố tự nhiên từ miền Bắc cho tới Tây Nguyên bao gồm: *Lonicera acuminata*, *L. annamensis*, *L. bournei*, *L. cambodiana*, *L. confusa*, *L. dasystyla*, *L. hildebrandiana*, *L. hypoglauca*, *L. japonica*, *L. macrantha*, *L. calcarata* [2]. Hầu hết các loài thuộc chi này ở Việt Nam đều có công dụng làm thuốc. Trong đó được trồng và sử dụng phổ biến nhất là loài kim ngân *L. japonica*. Theo y học cổ truyền, *L. japonica* dùng để chữa các chứng bệnh như mụn nhọt, lở ngứa, mày đay, viêm mũi dị ứng, sốt nóng, sốt rét, ban sởi, đậu, ỉa chảy, lỵ, thấp khớp [3]. Ngoài ra, kim ngân còn có các công dụng như chữa viêm nhiễm đường hô hấp, cảm cúm, viêm kết mạc cấp tính, loét cổ tử cung [4].

Trên thế giới đã có nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền một số loài trong chi kim ngân sử dụng các chỉ thị phân tử ADN như SCOT [5],

RAPD [6], ISSR [7]. Mặc dù kim ngân là dược liệu quý, tuy nhiên cho đến nay chưa thấy có công bố ở trong nước về đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen kim ngân bằng chỉ thị phân tử ADN. Trong bài báo này, chúng tôi đánh giá đa dạng di truyền 20 mẫu thuộc 3 loài thường được sử dụng làm thuốc, gồm: *L. japonica*, *L. confusa* và *L. macrantha* thu thập ở Việt Nam bằng chỉ thị phân tử ISSR. Kết quả nghiên cứu sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu bảo tồn, chọn giống các loài kim ngân.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 20 mẫu nguồn gen kim ngân thu thập từ các vùng khác nhau ở Việt Nam (Bảng 1). Tất cả các mẫu đã được định danh dựa trên các đặc điểm hình thái tại Viện Dược liệu. Trong đó, 19 mẫu đã có hoa được định danh, gồm: KN1, KN2, KN7, KN8, KN9, KN11, KN12, KN13, KN14, KN15, KN20 (loài *L. confusa*), KN4, KN5, KN18, KN19 (*L. japonica*), KN6, KN10, KN16, KN17 (*L. macrantha*), KN3 chưa xác định chính xác tên loài.

Bảng 1. Danh sách các mẫu nguồn gen sử dụng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu	Nơi thu thập	TT	Ký hiệu	Nơi thu thập
1	KN1	Thanh Trì, Hà Nội	11	KN11	Ba Chẽ, Quảng Ninh
2	KN2	Thanh Trì, Hà Nội	12	KN12	Ba Chẽ, Quảng Ninh
3	KN3	Thanh Trì, Hà Nội	13	KN13	Uông Bí, Quảng Ninh
4	KN4	Thanh Trì, Hà Nội	14	KN14	Uông Bí, Quảng Ninh
5	KN5	Thanh Trì, Hà Nội	15	KN15	Đông Triều, Quảng Ninh
6	KN6	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	16	KN16	Vị Xuyên, Hà Giang
7	KN7	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	17	KN17	Quảng Bạ, Hà Giang
8	KN8	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	18	KN18	Kon Plong, Kon Tum
9	KN9	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	19	KN19	Lục Nam, Bắc Giang
10	KN10	Việt Yên, Bắc Giang	20	KN20	Hạ Long, Quảng Ninh

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết ADN tổng số:

ADN tổng số được tách từ các mẫu lá tươi theo phương pháp của Doyle & Doyle, 1987 [8] có cải tiến. Khoảng 200 mg mẫu được nghiền trong ni tơ lỏng bằng cối chày sứ đến bột mịn. Mẫu được chiết trong 800 μ l dung dịch chiết chứa CTAB 2%, EDTA (pH=8) 10 mM, NaCl (1,4M), Tris-HCL 0,1M (pH=8) 100 μ l β -Mercaptoethanol. Sau đó chuyển vào ống eppendorf loại 2 ml và ủ ở 65°C trong 60 phút. Sau đó bổ sung 800 μ l dung dịch phenol:cloroform:isoamylalcohol (25:24:1), lắc trong khoảng 10 phút, ly tâm 13000 v/p trong 10 phút, thu dịch và lặp lại lần hai. Tủa ADN bằng Isopropanol, ly tâm thu tủa. Hoà tan tủa ADN thu được bằng 50 μ l đệm TE. Loại bỏ ARN bằng RNase 0,1 μ g/ μ l ở 37°C trong 3 giờ. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được kiểm tra trên máy đo quang phổ hấp thụ bước sóng 260nm và 280nm (Molecular Devices) kết hợp với điện di trên gel agarose 1%. Pha loãng các mẫu ADN đến

nồng độ 30 ng/ μ l và lưu giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.2.2. Phản ứng PCR-ISSR:

Kỹ thuật PCR đánh giá đa dạng di truyền được thực hiện với các môi ISSR. Tổng cộng 10 môi ISSR chọn lọc để tiến hành phản ứng PCR với tất cả các mẫu ADN (Bảng 2) trên máy PCR Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf). Hỗn hợp phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 15 μ l. Mỗi phản ứng gồm 30 ng DNA, mỗi (1 μ M), Thermo Scientific PCR Master Mix (2X) chứa 100 mM mỗi loại dNTP, đệm PCR và 1 U enzym *Taq* polymerase. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt 94°C - 5 phút; 94°C - 30 giây; 53°C - 45 giây; 72°C- 2 phút; lặp lại 39 lần từ bước 2 đến bước 4; 72°C - 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% ở cường độ dòng điện một chiều với hiệu điện thế 70 V khoảng 90 phút trong dung dịch đệm TAE. Tiếp theo, gel được nhuộm trong Ethidium Bromid 4 μ l (10 mg/mL) trong thời gian 30 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra dưới đèn UV, chụp và phân tích gel bằng Gel DocIt2.

Bảng 2. Danh sách môi ISSR chọn lọc sử dụng trong phản ứng PCR

STT	Ký hiệu môi	Trình tự 5'-3'	STT	Ký hiệu môi	Trình tự 5'-3'
1	UBC807	(AG)8T	6	UBC835	(AG)8YC
2	UBC810	(GA)8T	7	UBC836	(AG)8YA
3	UBC815	(CT)8G	8	UBC842	(GA)8YG
4	UBC824	(TC)8G	9	UBC848	(CA)8RG
5	UBC827	(AC)8G	10	UBC857	(AC)8YG

2.2.3. Phân tích số liệu ISSR:

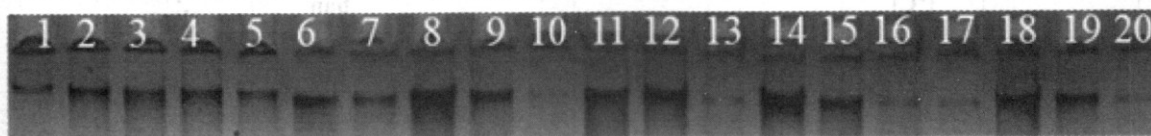
Số liệu được ghi nhận dưới dạng nhị phân trong đó: (1) - băng sáng rõ và ổn định và (0) - không có băng. Phân nhóm trên cây quan hệ di truyền dựa trên hệ số tương đồng Sokal và Michener (1958) [9] và phương pháp phân nhóm UPGMA trên phần mềm NTSYSpc 2.0. [10] Hệ số PIC (Polymorphic information content) của mỗi locus ISSR được tính theo công thức $PIC(i) = 2 \times f_i \times (1 - f_i)$ (RoldanRuiz. *et al.*, 2000) [11], trong đó: f_i là tần số của các băng được khuếch đại (có băng), $1-f_i$ là tần số của các băng không được khuếch đại (không có

băng). Hiệu quả của mỗi môi được phân tích thông qua chỉ số sai khác của mỗi môi Rp (Resolving power) (Prevost và Wilkinson, 1999) [12]. Theo đó $Rp = \sum Ib$ với Ib là giá trị đại diện cho thông tin của đoạn. $Ib = 1 - |2 \times (0,5 - p)|$, p là tỷ lệ các mẫu xuất hiện băng vạch.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số của 20 mẫu đã được tách chiết thành công (Hình 1). Chỉ số A260/A280 của các mẫu ADN dao động 1,79-1,98 cho thấy các mẫu ADN có thể được sử dụng cho phản ứng PCR.

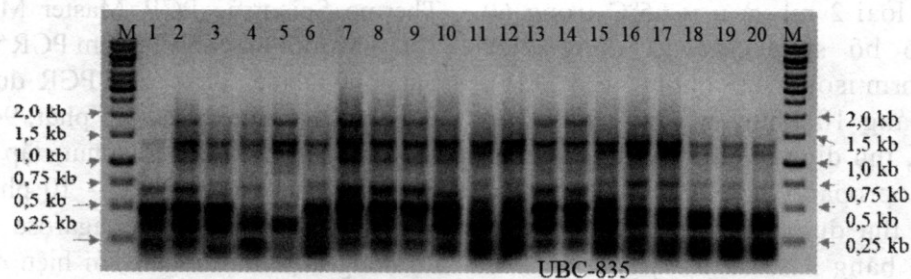


Hình 1. Ảnh điện di ADN tổng số tách chiết từ 20 mẫu kim ngân. Mẫu KN1-KN20 tương ứng giống 1-20

3.2. Phân tích đa dạng di truyền trong số 20 mẫu nguồn gen kim ngân bằng chỉ thị ISSR

Tổng cộng 30 mẫu ISSR đã được sàng lọc, chọn lọc được 10 mẫu để tiến hành phản ứng PCR với tất cả các mẫu. Sản phẩm PCR sử dụng mỗi UBC835 để khuếch đại 20 mẫu kim ngân được thể hiện trong Hình 2. Các mẫu chọn lọc sử dụng trong nghiên cứu này đều thể hiện sự đa hình cao. Bảng 3 cho thấy, tổng số 976 băng ADN được tạo ra, trung bình 48,8 băng/mẫu và

97,6 băng/mẫu. Tổng số loci tạo ra là 85, số loci phát hiện trên mỗi dao động từ 5 - 11, trung bình 8,5 loci/mẫu với số loci đa hình trung bình là 7,2 loci/mẫu. Tỷ lệ đa hình các loci tương đối cao, dao động từ 63,64 đến 100%, trung bình là 85,53%. Có thể thấy, mỗi UBC835 phát hiện được 11 loci nhưng tỷ lệ đa hình các loci chỉ đạt 63,64%. Trong khi đó, các mẫu UBC815, UBC824 phát hiện lần lượt là 5 và 11 loci có tỷ lệ đa hình cao lên đến 100%.



Hình 2. Điện di sản phẩm phản ứng PCR mỗi UBC835 với 20 mẫu kim ngân
M: chuẩn ADN 1 kb, giếng 1-20 tương ứng mẫu KN1 - KN20.

Chỉ số sai khác giữa các cặp mẫu (Rp) cao nhất là 6,4 thuộc về mẫu U824, thấp nhất là 2,6 của mẫu U815 và chỉ số Rp trung bình là 3,83. Theo Prevost và Wilkinson (1999), chỉ số Rp chỉ ra sự tương quan giữa các kiểu gen với mỗi sử dụng, chỉ số Rp càng cao chứng tỏ mỗi đó hữu hiệu trong việc phân nhóm kiểu gen. Từ kết quả trên cho thấy mỗi UBC824 rất hữu hiệu trong việc sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền trong số 20 mẫu kim ngân [12].

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy chỉ số PIC thấp nhất là 0,26 (mẫu UBC810, UBC827) và chỉ số PIC cao nhất là 0,40 (UBC857). Nhìn chung, tất cả các chỉ số PIC của 10 mẫu đều lớn hơn 0,25 và thấp hơn 0,5 và điều này cho thấy 10 mẫu sử dụng trong nghiên cứu cho kết quả đa hình tương đối cao.

Sun và cs. (2013) đã sử dụng 12 mẫu ISSR để nghiên cứu đa hình của 36 mẫu thuộc loài *L. japonica* ở Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỉ lệ đa hình đạt 88,37% [13]. He và cs.

(2017) đã phân tích đa dạng di truyền của 21 mẫu kim ngân thu thập từ 4 tỉnh ở Trung Quốc là Sơn Đông Hà Nam, Hà Bắc, Tứ Xuyên. Tổng cộng 272 băng ADN được tạo ra từ 8 mẫu ISSR, tỷ lệ băng đa hình là 98,16%. Hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,4816 đến 0,9118, trung bình là 0,6337. Các mẫu được chia làm 2 nhóm chính: nhóm I gồm 4 mẫu thuộc loài *Lonicera macranthoides*, nhóm II gồm 17 mẫu thuộc loài *L. japonica*. Như vậy, chỉ thị ISSR đã được sử dụng để phân biệt có hiệu quả những biến thể giữa 2 loài kim ngân tại Trung Quốc và có thể sử dụng để nhận dạng loài *L. japonica* cho trồng trọt, sử dụng làm thuốc và bảo tồn nguồn gen [15]. Mặc dù tỷ lệ đa hình của nghiên cứu này thu được thấp hơn so với các nghiên cứu trên (85,53%), chỉ thị ISSR cũng đã được sử dụng hiệu quả để đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen kim ngân thu thập ở Việt Nam.

Bảng 3. Đa hình các locut ISSR trong số 20 mẫu nguồn gen kim ngân

STT	Tên mẫu	Nhiệt độ gắn mẫu (°C)	Số loci	Số loci đa hình	Tỷ lệ đa hình các loci (%)	Tổng số băng nhân bản	Chỉ số sai khác giữa các cặp mẫu (Rp)	Hệ số PIC
1	UBC807	53	7	6	85,71	68	2,8	0,29
2	UBC810	53	10	8	80,0	136	3,4	0,26
3	UBC815	53	5	5	100	62	2,6	0,36
4	UBC824	53	11	11	100	98	6,4	0,38
5	UBC827	53	8	6	75,0	120	3,0	0,26

STT	Tên môi	Nhiệt độ gần môi (°C)	Số loci	Số loci đa hình	Tỷ lệ đa hình các loci (%)	Tổng số băng nhân bản	Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp)	Hệ số PIC
6	UBC835	53	11	7	63,64	143	5,3	0,29
7	UBC836	53	7	6	85,71	66	3,4	0,32
8	UBC842	53	9	8	88,89	99	3,3	0,29
9	UBC848	53	9	8	88,89	92	5,6	0,37
10	UBC857	53	8	7	87,50	92	5,2	0,40
Tổng số			85			976		
Trung bình/môi			8,5	7.2	85,53	97,6	3,83	0,32
Trung bình/mẫu			4,25		42,77	48,8		

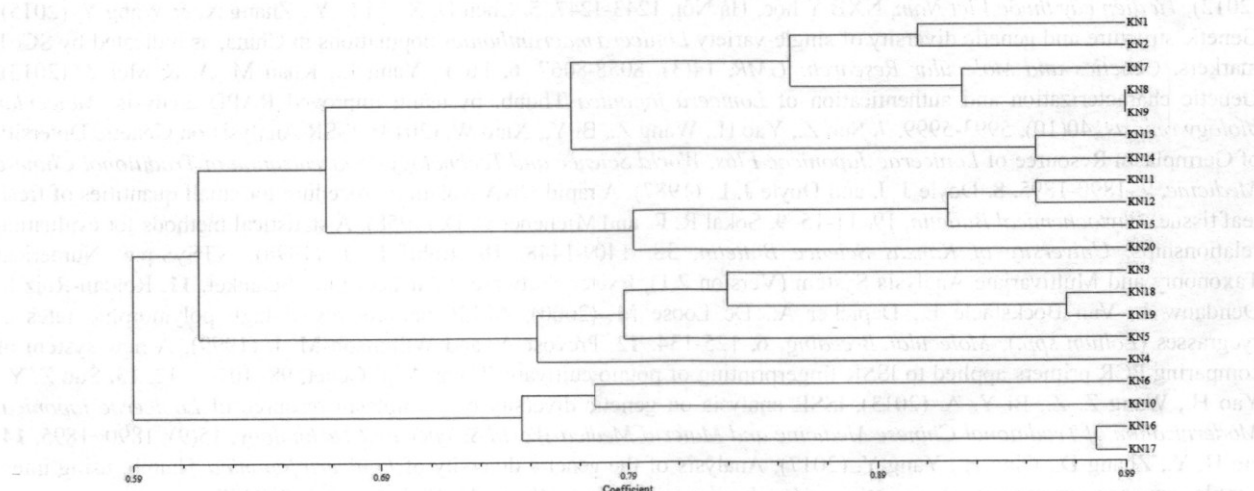
Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền trong số 20 nguồn gen kim ngân

	KN1	KN2	KN3	KN4	KN5	KN6	KN7	KN8	KN9	KN10	KN11	KN12	KN13	KN14	KN15	KN16	KN17	KN18	KN19	KN20
KN1	1																			
KN2	0.91	1																		
KN3	0.61	0.64	1																	
KN4	0.73	0.71	0.76	1																
KN5	0.55	0.60	0.75	0.75	1															
KN6	0.58	0.53	0.64	0.59	0.55	1														
KN7	0.84	0.84	0.56	0.64	0.53	0.55	1													
KN8	0.87	0.87	0.60	0.69	0.59	0.59	0.92	1												
KN9	0.86	0.86	0.59	0.68	0.58	0.60	0.93	0.99	1											
KN10	0.64	0.61	0.65	0.51	0.49	0.78	0.71	0.67	0.68	1										
KN11	0.64	0.64	0.53	0.55	0.66	0.61	0.64	0.69	0.68	0.58	1									
KN12	0.66	0.66	0.55	0.58	0.66	0.64	0.68	0.72	0.71	0.62	0.95	1								
KN13	0.72	0.74	0.61	0.64	0.62	0.51	0.76	0.82	0.84	0.56	0.61	0.64	1							
KN14	0.69	0.72	0.64	0.64	0.65	0.53	0.76	0.80	0.81	0.59	0.59	0.61	0.95	1						
KN15	0.67	0.67	0.56	0.59	0.67	0.62	0.65	0.71	0.69	0.56	0.94	0.89	0.60	0.58	1					
KN16	0.53	0.53	0.54	0.52	0.62	0.74	0.55	0.56	0.58	0.75	0.73	0.68	0.48	0.51	0.79	1				
KN17	0.55	0.53	0.54	0.54	0.60	0.74	0.58	0.56	0.58	0.75	0.71	0.66	0.48	0.51	0.76	0.98	1			
KN18	0.62	0.65	0.85	0.75	0.81	0.60	0.55	0.59	0.58	0.52	0.59	0.61	0.58	0.60	0.65	0.60	0.60	1		
KN19	0.61	0.64	0.81	0.74	0.80	0.59	0.54	0.58	0.56	0.51	0.62	0.65	0.56	0.59	0.66	0.61	0.61	0.96	1	
KN20	0.78	0.78	0.67	0.67	0.64	0.71	0.71	0.76	0.75	0.60	0.76	0.79	0.64	0.61	0.82	0.66	0.66	0.80	0.76	1

3.3. Phân tích mối quan hệ giữa các mẫu kim ngân

Hệ số đa dạng di truyền trong số 20 mẫu kim ngân được thể hiện ở Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền trong số 20 mẫu thuộc 3 loài kim ngân dao động từ 0,48 (mẫu KN13 với KN16, KN17) đến 0,99 (KN8 với KN9). Các mẫu có hệ số

tương đồng di truyền cao như KN7 với KN8 (0,92), KN7 với KN9 (0,93), KN13 với KN14 (0,95), KN16 với KN17 (0,98), KN18 với KN19 (0,96). Hệ số tương đồng di truyền phản ánh quan hệ di truyền trong số các mẫu kim ngân với nhau.



Hình 3. Sơ đồ cây quan hệ di truyền trong số 20 mẫu giống kim ngân

Kết quả phân nhóm trong số 20 mẫu kim ngân được thể hiện ở Hình 3. Trên Sơ đồ cây quan hệ di truyền có thể chia 20 mẫu thành 3 nhóm chính. Nhóm I có hai phân nhóm. Phân nhóm 1 gồm 7 mẫu: KN1, KN2, KN7, KN8, KN9, KN13, KN14 trong đó hệ số tương đồng lớn nhất là 0,99 giữa 2 mẫu KN8 và KN9; thấp nhất là 0,72 giữa mẫu KN1 với KN13 và KN2 với KN14. Phân nhóm 2 gồm 4 mẫu: KN11, KN12, KN15, KN20 trong đó hệ số tương đồng lớn nhất là 0,95 giữa 2 mẫu KN11 và KN12; thấp nhất là 0,76 ở mẫu KN11 với mẫu KN20. Nhóm II gồm 5 mẫu: số KN3, KN18, KN19, KN4, KN5 trong đó hệ số tương đồng lớn nhất là 0,96 giữa 2 mẫu KN18 và KN19, thấp nhất là 0,75 ở mẫu KN4 với mẫu KN19. Nhóm III gồm 4 mẫu: KN6, KN10, KN16, KN17 trong đó hệ số tương đồng cao nhất là 0,98 giữa 2 mẫu KN16 và KN17; thấp nhất là 0,74 ở mẫu KN6 với hai mẫu KN16 và KN17.

Kết quả phân nhóm dựa trên chỉ thị ISSR tương đồng với kết quả giám định bằng khóa phân loại dựa trên đặc điểm hình thái. Trên sơ đồ cây quan hệ di truyền mẫu KN3 được xếp vào nhóm III, cùng với các mẫu KN18, KN19, KN5 thuộc loài *L. japonica*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của He và

cs. (2017), sử dụng mỗi ISSR có thể phân biệt loài *L. macrantha* và *L. japonica* và nhận dạng loài *L. japonica* cho trồng trọt, sử dụng làm thuốc và bảo tồn nguồn gen [14].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chỉ thị ISSR đã được áp dụng thành công để đánh giá đa dạng di truyền 20 mẫu của 3 loài kim ngân thường được sử dụng làm thuốc, gồm *L. confusa*, *L. macrantha* và *L. japonica*. Phân tích đa hình từ 10 mỗi chọn lọc đã tạo ra trung bình 8,5 loci/mỗi, tỷ lệ đa hình trung bình là 85,53%. Chỉ số sai khác giữa các cặp môi (Rp) cao nhất là 6,4 thuộc về môi U824, thấp nhất là 2,6 của môi U815 và chỉ số Rp trung bình là 3,83. Hệ số PIC trung bình là 0,32, dao động từ 0,26 đến 0,40. Hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,68, dao động từ 0,48 đến 0,99. Tổng cộng 20 mẫu của 3 loài kim ngân thu thập từ 6 tỉnh/thành ở Việt Nam được chia làm 3 nhóm chính tương đồng giữa kết quả phân tích ISSR và phân loại dựa trên khóa phân loại dựa trên đặc điểm hình thái. Nhóm I, các mẫu thuộc loài *L. confusa*, nhóm II các mẫu thuộc loài *L. japonica*, nhóm III các mẫu thuộc loài *L. macrantha*. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng đối với công tác bảo tồn và chọn giống kim ngân.

Tài liệu tham khảo

1. Yang L., Khan M. A., Mei Z., Yang M., Zhang T., Wei C., Yang W., Zhu L., Long Y., & Fu J. (2014), Development of RAPD-SCAR markers for *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae) variety authentication by improved RAPD and DNA cloning, *Revista de biologia tropical*, 62(4), 1649-1657.
2. Hoàng Văn Toán, Phạm Thanh Huyền, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Xuân Nam, Phan Văn Trường (2013), Bổ sung loài *Lonicera calcarata* Hemsl. (họ Kim ngân - Caprifoliaceae) cho hệ thực vật Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 18(6), 351-354.
3. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, T. II; NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội; 106-112.
4. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội, 1243-1247.
5. Chen D. X., Li L. Y., Zhang X. & Wang Y. (2015), Genetic structure and genetic diversity of single-variety *Lonicera macranthoides* populations in China, as indicated by SCoT markers, *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(3), 8058-8067.
6. Fu J., Yang L., Khan M. A. & Mei Z. (2013), Genetic characterization and authentication of *Lonicera japonica* Thunb. by using improved RAPD analysis, *Molecular biology reports*, 40(10), 5993-5999.
7. Sun Z., Yao H., Wang Z., Bi Y., Xiao W. (2013), ISSR Analysis on Genetic Diversity of Germplasm Resource of *Lonicerae Japonicae* Flos, *World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine*, 9, 1890-1895.
8. Doyle J. J. and Doyle J. L. (1987), A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
9. Sokal R. R. and Michener C. D. (1958), A statistical methods for evaluating relationships, *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409-1448.
10. Rohlf F. J. (1998), NTSYS-p.c. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.1), Exeter Software Publishers Ltd., Setauket.
11. Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. (2000), AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*), *Molecular Breeding*, 6, 125-134.
12. Prevost A. and Wilkinson M. J. (1999), A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, *Theor Appl Genet*, 98, 107—112.
13. Sun Z. Y., Yao H., Wang Z. Z., Bi Y. A. (2013), ISSR analysis on genetic diversity of germplasm resource of *Lonicerae japonica*, *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 15(9), 1890—1895.
14. He H. Y., Zhang D., Qing H., Yang Y. (2017), Analysis of the genetic diversity of *Lonicera japonica* Thumb. using inter-simple sequence repeat markers, *Genetics and molecular research: GMR*, 16(1), 10.4238/gmr16019338.