

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC LOÀI TRÀM (*Melaleuca* spp.) TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Trần Thị Ngọc Trâm^{1,2}, Phan Thị Thúy Hằng², Phạm Thị Diễm Thi¹, Trần Thúy Lan¹, Trương Thị Phương Lan³, Hoàng Tấn Quang^{1,*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

TÓM TẮT

Các loài Tràm được biết đến như là nguồn nguyên liệu sản xuất tinh dầu giá trị và có ý nghĩa rất lớn trong y học, trong đó tinh dầu Tràm được xem là một loại đặc sản của Thừa Thiên Huế. Hiện nay tại Thừa Thiên Huế có nhiều loài Tràm khác nhau đang được trồng, tuy nhiên, nghiên cứu đa dạng di truyền của các quần thể Tràm này đến nay chưa được thực hiện. Chúng tôi đã nghiên cứu đa dạng di truyền của 49 mẫu Tràm (*Melaleuca* spp.) thu ở một số địa phương của Thừa Thiên Huế bằng kỹ thuật đa hình các đoạn khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD). Các chỉ số đa dạng di truyền như số allele quan sát được (na), số allele hiệu quả (ne), hệ số đa dạng di truyền (h) theo Nei (1973), hệ số đa dạng di truyền theo Shannon (I) của 5 quần thể Tràm nghiên cứu lần lượt là 2,000; 1,236; 0,160; 0,274. Chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình giữa các quần thể (Hs) là 0,111 chiếm 68,09% đa dạng nguồn gen của tổng các mẫu (Ht) là 0,163. Chỉ số đa dạng di truyền giữa các quần thể (Gst) là 0,318 và dòng gen ước tính (Nm) là 1,071. Mức độ tương đồng di truyền giữa các quần thể khá cao, dao động từ 0,891 đến 0,963. Các quần thể Tràm năm gân, Tràm gió có độ tập trung di truyền cao, trong khi Tràm lá dài có sự phân tán. Kết quả nghiên cứu chỉ ra Tràm gió ở Phong Bình có sự khác biệt di truyền so với các quần thể Tràm còn lại nên có thể sử dụng làm nguyên liệu cho công tác nhân giống.

Từ khóa: đa dạng di truyền, *Melaleuca*, RAPD, Thừa Thiên Huế

MỞ ĐẦU

Chi Tràm (*Melaleuca*) là một chi thực vật có hoa trong họ Sim (Myrtaceae), với hơn 200 loài phân bố chủ yếu ở các đồi núi thấp, vùng nội địa hay ven biển, trên các loại đất cằn cỗi ở Úc và nhiều nước đông Nam Á [1]. Thừa Thiên Huế là một vùng sản xuất tinh dầu Tràm nổi tiếng, đặc biệt là Tràm gió (*Melaleuca cajuputi* Powell). Hàm lượng tinh dầu chứa trong lá Tràm gió rất cao, trong đó, 1,8-cineol (hay còn gọi là eucalyptol-thành phần chính trong một số loại thuốc điều trị bệnh hô hấp) chiếm từ 24,2 - 66,8% trong tinh dầu thô. Tinh dầu Tràm được chứng minh có hoạt tính kháng nấm, chống viêm, chống oxy hóa, làm trong lành không khí trong phòng, rất hữu ích cho việc chăm sóc phụ nữ và trẻ sơ sinh. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, dầu Tràm có tác dụng kháng virus [2], [3], các monoterpene và dẫn xuất của chúng trong tinh dầu Tràm được cho là có khả năng ngăn ngừa sự lây lan của virus SARS-CoV-2 [4]. Vì vậy, nghề nấu dầu Tràm ngày càng trở nên phổ biến trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, dẫn đến nhu cầu nguyên liệu ngày càng tăng.

Tuy nhiên, vùng nguyên liệu Tràm chưa được quản lý hợp lý, nhiều vùng Tràm gió tự nhiên (huyện Phú Lộc, Hương Trà, Hương Thủy, Quảng Điền, Phong Điền của tỉnh Thừa Thiên Huế) hầu như đã biến mất [5], [6]. Việc khôi phục và phát triển nguồn nguyên liệu hiện nay được tập trung vào cây Tràm gió, nhiều địa phương như Phú Lộc và Phong Điền đã nhân giống và trồng mới nhiều diện tích cây này. Bên cạnh đó, một số giống Tràm khác như Tràm năm gân (*M. quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake), Tràm lá dài (*M. leucadendra* L.) cũng được giới thiệu về trồng ở một số nơi ở Thừa Thiên Huế nhằm đa dạng hóa nguồn nguyên liệu sản xuất tinh dầu Tràm [7].

Cây Tràm là một nguồn tài nguyên nhiều giá trị, tuy nhiên các nghiên cứu về bảo tồn nguồn gen cây dược liệu này đến nay còn rất hạn chế, đặc biệt là ở khu vực Thừa Thiên Huế. Các nghiên cứu đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử nhằm cung cấp thông tin chính xác về loài, về mức độ đa dạng di truyền của các quần thể là cơ sở khoa học nhằm bảo tồn các nguồn gen, đồng thời cũng là cơ sở để tuyển chọn, lai tạo những giống mới, loài mới có ưu thế hơn, có ý nghĩa đặc biệt trong công tác bảo tồn và cải tiến giống. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào chỉ thị phân tử là công cụ không thể thiếu trong đánh giá đa dạng di truyền loài và xác định chính xác ở mức độ loài hay dưới loài. Trong đó thì chỉ thị RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) là kỹ thuật có khả năng nhân bản cao, đơn giản, dễ tiến hành và thường được sử dụng kết hợp với những kỹ thuật khác để đánh giá đa dạng di truyền và nhận diện chỉ thị phân tử có độ tin cậy cao. Bên cạnh đó, kỹ thuật phân tích vùng đệm được

sao mã - ITS (Internal Transcribed Spacer) của gen DNA ribosome (rDNA) mang trình tự vừa có tính bảo thủ cao vừa có tính đa dạng thích hợp để phân biệt giữa các loài, nhằm định danh các giống Tràm ở Huế và nghiên cứu đa dạng di truyền các quần thể Tràm, làm cơ sở cho bảo tồn nguồn gen các giống Tràm ở Huế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Giống Tràm

Chúng tôi tiến hành thu thập và nghiên cứu trên 31 mẫu Tràm gió ở xã Phong Bình, xã Phong Chương (huyện Phong Điền) và xã Lộc Thủy (huyện Phú Lộc); 9 mẫu lá Tràm năm gân thu được ở xã Lộc Thủy và 9 mẫu Tràm lá dài thu được ở Vườn thực nghiệm, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế (Bảng 1). Các mẫu Tràm (2 mẫu ngẫu nhiên/loài) đã được định danh bằng phân tích trình tự vùng ITS.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách từ mẫu lá Tràm bằng bộ kit ISOLATE II Plant DNA kit 50 Preps (BIO-52069, Bioline, Anh). DNA tổng số được bảo quản ở 4°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Nồng độ DNA tổng số sau khi tách chiết được xác định bằng máy quang phổ ở bước sóng 260/280 nm, sau đó pha loãng đến nồng độ cuối cùng khoảng 50 ng/μL cho phản ứng khuếch đại PCR.

Bảng 1. Đặc điểm mẫu Tràm sử dụng trong nghiên cứu

Quần thể	Số lượng	Ký hiệu mẫu	Nguồn gốc
Tràm Năm gân	9	NG	Trồng
Tràm lá dài	9	LD	Trồng, được mua từ thành phố Hồ Chí Minh
Tràm gió-Lộc Thủy	15	GT	Tự nhiên
Tràm gió-Phong Bình	8	GB	Tự nhiên
Tràm gió-Phong Chương	8	GC	Tự nhiên



Hình 1. Hình thái lá của các mẫu Tràm nghiên cứu (lá thứ 4 tính từ đầu cành)

Chỉ thị ITS

Sáu mẫu Tràm ngẫu nhiên được tiến hành khuếch đại phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ITS1F-ITS4R, với thành phần phản ứng bao gồm 30 μL 2x PCR Master Mix (Go Taq Green Master Mix, Promega), 10 pmol với mỗi mồi và 50 ng DNA tổng số với tổng thể tích phản ứng 60 μL. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình sau: biến tính 95°C/10 phút; 30 chu kỳ 95°C/1 phút, 53°C/1 phút, 72°C/1 phút; cuối cùng là 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trình tự tại công ty Firstbase (Malaysia) bằng phương pháp Sanger.

Phân tích RAPD

Phản ứng PCR bao gồm 10 μL 2x PCR Master Mix (GoTaq Green Master Mix 2X, Promega, USA), 20 pmol mồi ngẫu nhiên và 50 ng DNA tổng số với tổng thể tích phản ứng là 20 μL. Mồi được sử dụng trong nghiên cứu này được chọn lọc sao cho có khả năng cho độ đa hình cao và khả năng phân biệt các genotype Tràm khác nhau mạnh. Để xác định mồi RAPD cho nhiều thông tin nhất dựa vào các tham số do Laurentin và Karlovsky [8] đề xuất là tổng số băng, số băng đa hình, hệ số PIC (Polymorphism Information Content), hệ số Rp (Resolving power), hệ số MI (Marker Index) của mỗi mồi. Những primer đã qua sàng lọc sau đó sẽ được sử dụng để khuếch đại tất cả các mẫu nghiên cứu.

Phản ứng khuếch đại được thực hiện bởi máy luân nhiệt (SimpliAmp, ThermoFisher Scientific, Mỹ) với quy trình phản ứng PCR như sau: giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút; 43 chu kỳ: 93°C/1 phút, 37°C/ 1 phút, 72°C/ 2 phút và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose gel 1,5% nhuộm bằng Safe View Classic Nucleic Acid Stains (abm, Mỹ) trong đệm TAE 1X [9].

Phương pháp xử lý số liệu thí nghiệm

Phổ điện di sản phẩm PCR-RAPD của các mẫu với mỗi được phân tích theo nguyên tắc dựa vào sự xuất hiện hay không của các băng, đánh số “1” nếu có xuất hiện băng và số “0” nếu không xuất hiện băng [9]. Phân tích AMOVA sử dụng 5 ma trận nhị phân thu được từ 5 quần thể trên được tiến hành bằng phần mềm GenAlEx 6.51. Năm ma trận nhị phân từ 5 quần thể cũng được dùng cho phần mềm POPGENE (version 1.32) để tính các chỉ số đa dạng bao gồm: số allele quan sát được (observed number of alleles: na), số allele hiệu quả (effective number of alleles: ne), hệ số đa dạng di truyền theo Shannon (Shanon’s information index: I), hệ số đa dạng di truyền (h) theo Nei (1973), chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các quần thể (Ht), chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình giữa các quần thể (Hs), chỉ số đa dạng di truyền giữa các quần thể (Gst) và chỉ số dòng gen ước tính (Nm) của các chủng nghiên cứu [9].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định danh loài

Bên cạnh phân loại theo phương pháp truyền thống dựa vào so sánh hình thái giải phẫu của cơ quan dinh dưỡng và cơ quan sinh sản, trình tự các đoạn nucleotide ở vùng ITS đã được sử dụng để định danh loài. Trong nghiên cứu này, ba mẫu DNA tổng số được lựa chọn ngẫu nhiên từ 49 mẫu đại diện cho 3 giống Tràm trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu ITS1-ITS4; kết quả điện di sản phẩm khuếch đại cho băng đơn hình với kích thước khoảng 700 bp. Thông tin đoạn trình tự được đối chiếu trên Genbank để xác định các giống Tràm cho thấy các trình tự thu được có độ tương đồng cao với các trình tự đã được công bố, đạt 99-100% (Bảng 2). Vùng ITS chứa các trình tự bảo tồn cao nên thường được thiết kế để xác định mối quan hệ phát sinh loài thực vật hạt kín [10]. Trình tự ITS hiện diện ở thực vật có hoa với kích thước phổ biến dưới 700 bp [11]. Ladiges và đồng tác giả (1999) đã sử dụng trình tự ITS để định danh nhiều loài thực vật khác nhau, trong đó có 21 loài thuộc chi *Melaleuca* [12].

Bảng 2. So sánh trình tự đoạn ITS của các mẫu nghiên cứu với các trình tự đã công bố trên GenBank

Tên mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ tương đồng (%)
NG2	AY835614.1 <i>Melaleuca quinquenervia</i>	99,02%
LD1	MH731137.1 <i>Melaleuca leucadendra</i>	100%
GB5	MH731078.1 <i>Melaleuca cajuputi</i> subsp. <i>cajuputi</i>	99,65%

Phân tích RAPD

Kết quả điện di thu được sau khi thực hiện kỹ thuật RAPD với 6 mồi của 49 mẫu nghiên cứu cho thấy tổng cộng có 104 băng DNA được tạo ra (Bảng 3). Mỗi có số băng DNA khuếch đại nhiều nhất là OPA-09 (22 băng, Hình 2), tiếp đến là OPB-01 (19 băng), OPD-02 (18 băng) và OPN-06 (16 băng). Hai mồi OPA-08 (14 băng) và OPD-11 (15 băng) có số băng khuếch đại ít nhất. Trong 6 mồi sử dụng, mồi OPD-02 và mồi OPD-11 đều cho sản phẩm khuếch đại ở tất cả 49 mẫu. Hai mồi OPA-09 và OPN06 với 48 mẫu được khuếch đại. Số mẫu khuếch đại thấp nhất ở hai mồi OPA-08 và OPB-01.

Bảng 3. Số mẫu khuếch đại và số băng khuếch đại của từng mồi

Mồi	Trình tự nucleotide (5’-3’)	Số mẫu khuếch đại	Tổng số băng DNA	Phạm vi kích thước DNA (bp)
OPA08	GTGACGTAGG	45	14	250 - 2500
OPA09	GGGTAACGCC	48	22	320 - 1770
OPB01	GTTTCGCTCC	45	19	400 - 2700
OPD02	GGACCCAACC	49	18	360 - 2700
OPD11	AGCGCCATTG	49	15	300 - 1450
OPN06	GAGACGCACA	48	16	250 - 1500
Tổng			104	

Sáu mồi sử dụng để khuếch đại 49 mẫu DNA Tràm đều cho tỷ lệ băng đa hình là 100%. Kích thước của các băng dao động trong khoảng từ 250 bp đến 2.700 bp. Tỷ lệ băng đa hình cao chứng tỏ các mẫu Tràm ở Thừa Thiên Huế có sự đa dạng về mặt di truyền. Trong nghiên cứu mối quan hệ di truyền của 12 xuất xứ Tràm bản địa

Việt Nam được thực hiện bởi Nguyễn Việt Cường và đồng tác giả (2011) cho thấy các môi sử dụng trong nghiên cứu này chỉ cho tỷ lệ băng đa hình là 57,8% [13].

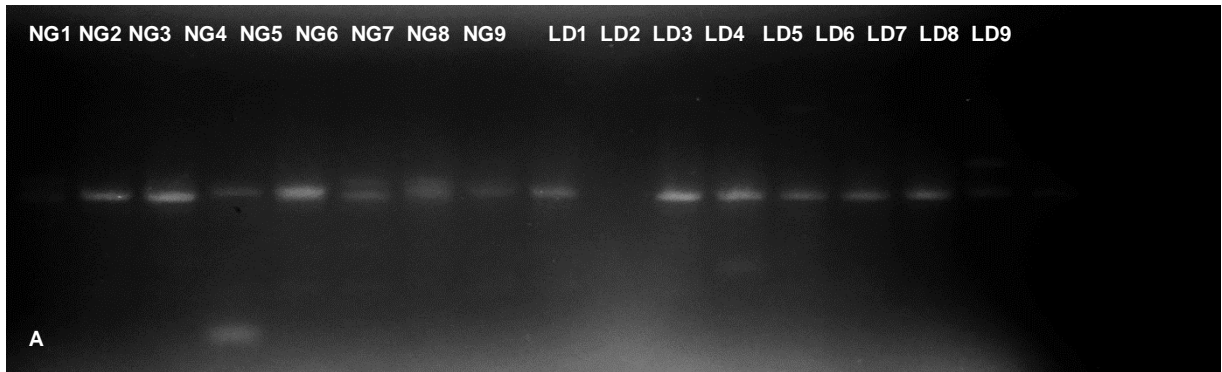
Phân tích đa dạng di truyền

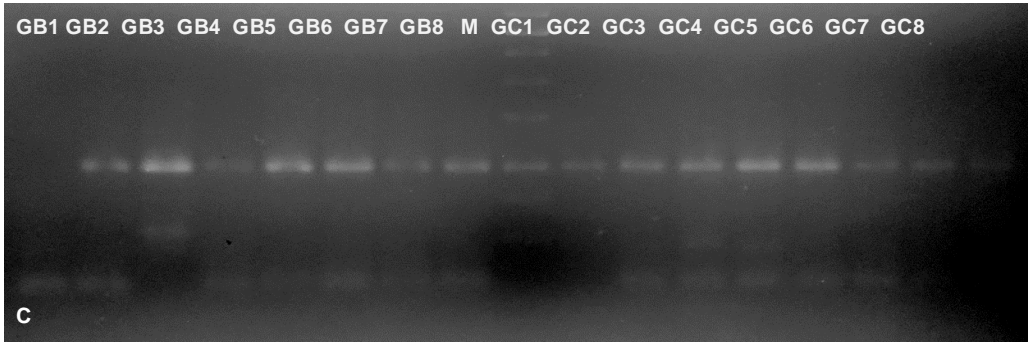
Các chỉ số đa dạng di truyền như số allele quan sát được (observed number of allele: na), số allele hiệu quả (effective number of allele: ne), hệ số đa dạng di truyền (h) theo Nei (1973), hệ số đa dạng di truyền theo Shannon (Shanon's information index: I) thu nhận được sau khi xử lí số liệu ma trận nhị phân của 5 quần thể bằng phần mềm POPGENE 1.32 lần lượt là 2,000; 1,236; 0,160; 0,274 (Bảng 4).

Bảng 4. Chỉ số đa dạng di truyền của 5 quần thể Tràm

Quần thể	Số allele quan sát được (na)	Số allele hiệu quả (ne)	Hệ số đa dạng di truyền (h)	Hệ số Shannon (I)
Tràm Năm gân	1,519	1,216	0,136	0,216
Tràm lá dài	1,529	1,257	0,157	0,242
Tràm gió - Lộc Thủy	1,471	1,173	0,110	0,177
Tràm gió - Phong Bình	1,269	1,145	0,087	0,132
Tràm gió - Phong Chương	1,192	1,115	0,066	0,099
Tất cả các mẫu	2,000	1,236	0,160	0,274
Độ lệch chuẩn (SD)	0,000	0,270	0,143	0,195

Chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình giữa các quần thể (Hs) là 0,111 chiếm 68,09% đa dạng nguồn gen của tổng các mẫu (Ht) là 0,163. Chỉ số đa dạng di truyền giữa các quần thể (Gst) là 0,318 cho thấy mức độ đa dạng di truyền khác biệt cao giữa các quần thể và chỉ số dòng gen ước tính (Nm) là 1,071 cho thấy có sự kết nối cao về mặt di truyền giữa các quần thể khảo sát (Bảng 5). So với nghiên cứu của Butcher và đồng tác giả (1992), dòng gen ở các quần thể Tràm *Melaleuca alternifolia* ở Queensland, Úc cao (Nm>5,97) [14].





Hình 2. Hình ảnh điện di PCR- RAPD 49 mẫu trầm với mồi OPA-09. A. Mẫu trầm năm gân và trầm lá dài. B. Mẫu trầm gió thu tại xã Lộc Thủy. C. Mẫu trầm gió thu tại xã Phong Bình và Phong Chương. M: Marker DNA 1kb.

Bảng 5. Phân tích tóm tắt về sự biến đổi di truyền của tất cả các quần thể Tràm ở Thừa Thiên Huế.

Chỉ số	Ht	Hs	Gst	Nm
Trung bình	0,163	0,111	0,318	1,071
SD	0,021	0,009		

Qua phân tích mức độ tương đồng di truyền Nei's (1987) và khác biệt di truyền giữa các quần thể Tràm (Bảng 6) cho thấy giá trị về mức độ tương đồng di truyền giữa các quần thể là rất cao trong khoảng 0,891 đến 0,963 và giá trị của sự khác biệt di truyền giữa các quần thể giao động trong khoảng 0,038 đến 0,116. Quần thể Tràm gió Phong Chương và quần thể Tràm gió Lộc Thủy có mức độ tương đồng di truyền cao nhất (0,963), trong khi sự tương đồng di truyền thấp nhất (0,891) xuất hiện ở hai quần thể Tràm Năm gân và Tràm gió Phong Bình.

Bảng 6. Mức độ tương đồng di truyền Nei's (1987) và khác biệt di truyền của 5 quần thể Tràm ở Thừa Thiên Huế

Quần thể	Tràm Năm gân	Tràm lá dài	Tràm gió - Lộc Thủy	Tràm gió - Phong Bình	Tràm gió - Phong Chương
Tràm Năm gân	****	0,942	0,942	0,891	0,904
Tràm Lá dài	0,060	****	0,948	0,937	0,920
Tràm gió - Lộc Thủy	0,060	0,054	****	0,955	0,963
Tràm gió - Phong Bình	0,116	0,065	0,046	****	0,940
Tràm gió - Phong Chương	0,101	0,083	0,038	0,062	****

Ghi chú: Mức độ tương đồng di truyền (ở trên đường chéo) và khác biệt di truyền (ở dưới đường chéo)

Phân tích AMOVA cũng cho thấy có sự khác biệt di truyền đáng kể giữa 5 quần thể trầm NG, LD, GT, GB, GC ($P(\text{rand} \geq \text{data}) = 0,001$). Thêm vào đó, có 35% sự khác biệt di truyền khi so sánh giữa các quần thể với nhau và 65% sự khác biệt di truyền ở cấp độ giữa các cá thể trong cùng 1 quần thể (Bảng 7).

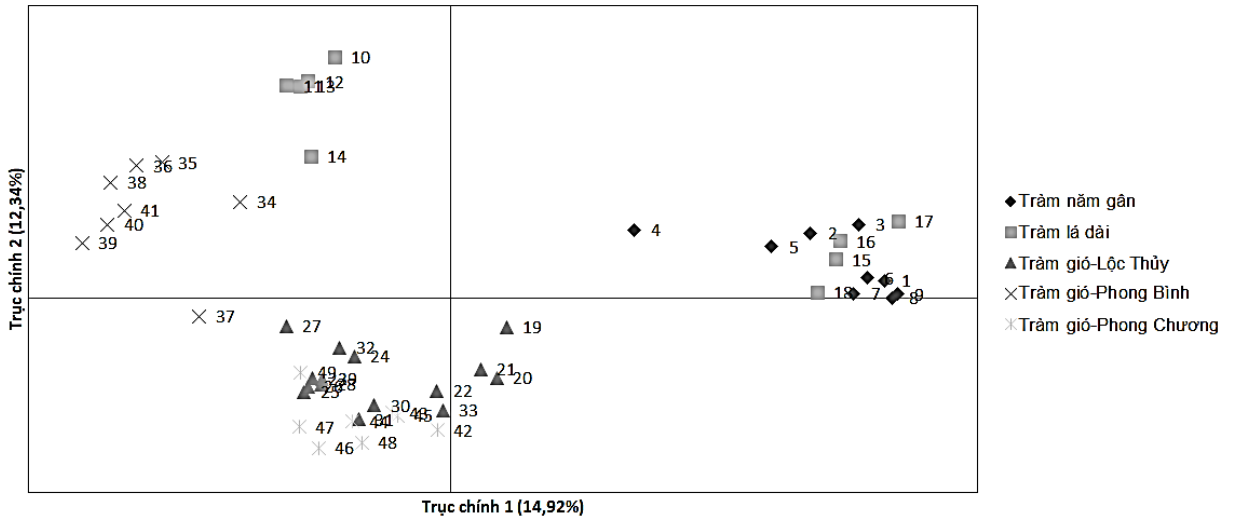
Bảng 7. Kết quả phân tích AMOVA với 49 mẫu thuộc 5 quần thể Tràm nghiên cứu

	df	SS	MS	Tỷ lệ khác biệt (%)	PhiPT	$P(\text{rand} \geq \text{data})$
Giữa các quần thể	4	187,559	46,89	35	0,352	0,001
Trong các quần thể	44	331,053	7,524	65		
Tổng	48	518,612		100		

Phân tích PCoA với hai trục 1 và 2 giải thích 27,26% sự biến động di truyền của các cá thể Tràm nghiên cứu. Phân tích tọa độ di truyền của 5 quần thể Tràm cho thấy các quần thể Tràm gió và quần thể Tràm năm gân có độ

tập trung cao, nhưng bên cạnh đó có sự phân tán rõ rệt của các cá thể thuộc quần thể Tràm lá dài (Hình 3). Các quần thể Tràm gió cũng thể hiện sự phân cụm, cho thấy sự khác biệt về mặt di truyền, trong đó Tràm gió Phong Bình có sự khác biệt di truyền so với hai quần thể Tràm còn lại. Vì vậy các quần thể Tràm gió này có giá trị và cần được bảo tồn nguồn gen.

Hệ trục 1 và 2



Hình 3. Kết quả phân tích PCoA của 5 quần thể Tràm nghiên cứu

Như vậy, kết quả phân tích các chỉ số đa dạng di truyền và tọa độ phân bố di truyền của 5 quần thể Tràm cho kết quả tương tự nhau, trong đó quần thể Tràm năm gân và quần thể Tràm gió Phong Bình có khoảng cách di truyền cao nhất.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy mức độ đa dạng di truyền cao giữa các quần thể Tràm thu ở những khu vực khác nhau, là cây tự nhiên hay cây trồng. Trong các quần thể Tràm gió có sự khác biệt di truyền rõ rệt, nhưng vẫn gần gũi hơn so với các quần thể Tràm khác loài, trong đó Tràm gió Phong Bình có sự khác biệt di truyền cao nên có thể được sử dụng để làm nguồn nguyên liệu cho công tác nhân giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J. J. Brophy, L. A. Craven, and J. C. Doran, "Melaleucas their botany, essential oils and uses," *Australian Centre for International Agricultural Research*, pp. 104-105, 2013.

[2] J. C. Doran and B. V. Gunn, "Exploring the genetic resources of tropical melaleucas," *Forest Genetic Resources*, vol. 2, pp. 12-24, 1994.

[3] O. Leo and N. X. Dung, "Essential oil plants," *Plant Resources of South-East Asia*, pp. 126-131, 1999.

[4] T. T. A. My *et al.*, "Evaluation of the Inhibitory Activities of COVID-19 of *Melaleuca cajuputi* Oil Using Docking Simulation," *ChemistrySelect*, vol. 5, no. 21, pp. 6312-6320, 2020, doi: 10.1002/slct.202000822.

[5] L. T. P. Thao, C. T. Thanh, N. D. Phong, N. T. P. Anh, and P. T. P. Thao, "Current status of cultivation of cajuput trees (*Melaleuca cajuputi* Powell) in local areas in Thua Thien Hue province," (in Vietnamese), *Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 18, pp. 102-108, 2018.

[6] T. T. H. Thao and H. D. T. Hoang, "Characteristics of vegetation submerged inland sandy area in Phong Dien district, Thua Thien Hue province," (in Vietnamese), *Hue University Journal of Science: Earth Science and Environment*, vol. 127, no. 4A, pp. 53-63, 2019, doi: 10.26459/hueuni-jese.v127i4A.5028.

[7] H. Thang, "Establishing and managing a geographical indication for cajeput essential oil product of Thua Thien Hue province," *Thua Thien Hue Journal of Research and Development*, vol. 4, no. 167, pp. 66-81, 2021.

[8] Namita, Sapna Panwar, Humira Sonah, Kanwar P Singh, and T R Sharma, "Genetic diversity analysis of marigold (*Tagetes* sp) genotypes using RAPD and ISSR markers," (in E), *Indian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 83, pp. 484-490, 2013.

[9] H. T. Quang *et al.*, "Genetic diversity and toxic genes analysis of *Vibrio* spp. isolated from white leg shrimp and marine fishes cultured in Tam Giang lagoon in Thua Thien Hue province, Vietnam," *Indian Journal of Science & Technology*, vol. 13, no. 13, pp. 1412-1422, 2020, doi: https://doi.org/10.17485/IJST/v13i13.161.

[10] R. Bellarosa, M. C. Simeone, A. Papini, and B. Schirone, "Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp.," *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 34, no. 2, pp. 355-370, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.014.

- [11] B. G. Baldwin, M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue, "The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny," *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 82, no. 2, pp. 247-277, 1995, doi: 10.2307/2399880.
- [12] P. Y. Ladiges, G. I. McFadden, N. Middleton, D. A. Orlovich, N. Treloar, and F. Udovicic, "Phylogeny of *Melaleuca*, *Callistemon*, and Related Genera of the *Beaufortia* Suballiance (Myrtaceae) Based on 5S and ITS-1 Spacer Regions of nrDNA," *Cladistics*, vol. 15, no. 2, pp. 151-172, 1999/06/01/ 1999, doi: <https://doi.org/10.1006/clad.1999.0097>.
- [13] D. V. Cuong, D. T. M. hien, and T. Q. Trong, "Study on genetic similarity of 12 *Melaleuca cajuputi* vouch using RAPD and chrotoplast DNA technique," (in Vietnamese), *Proceeding of Conference on Forestry Science with sustainable forest development and climate change*, pp. 23-30, 2011.
- [14] J. C. B. P. A. Butcher, G. F. Moran, "Patterns of Genetic Diversity and Nature of the Breeding System in *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae)," (in E), *Aust. J. Bot.*, vol. 40, pp. 365-375, 1992.

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF *Melaleuca* SPECIES IN THUA THIEN HUE PROVINCE, VIETNAM

Tran Thi Ngoc Tram^{1,2}, Phan Thi Thuy Hang², Pham Thi Diem Thi¹, Tran Thuy Lan¹, Truong Thi Phuong Lan³, Hoang Tan Quang^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology, Hue University*

²*University of Sciences, Hue University*

³*University of Medicine and Pharmacy, Hue University*

SUMMARY

Melaleuca species is known as a raw material for essential oil production and has great medicinal values, in which *Melaleuca* essential oil is considered a specialty of Thua Thien Hue province. In Thua Thien Hue, there are many different species of *Melaleuca* genus have been growing. However, genetic diversity of these populations have not been investigated. In this study, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technology is used to analyse genetic diversity of 49 *Melaleuca* samples in Thua Thien Hue province. Genetic parameters include the observed number of alleles (n_a), effective number of alleles (n_e), Nei's (1973) gene diversity (h), Shannon's information Index (I) for all *Vibrio* strains were analyzed by 6 RAPD primers with the values of 2.000; 1.236; 0.160; and 0.274, respectively. The total genotype diversity within populations (H_s) is 0.111, accounting for 68.09% of genetic diversity of all strains ($H_t = 0.163$). The mean coefficient of gene differentiation (G_{st}) is 0.318 and estimate of gene flow (N_m) is 1.071. The degree of genetic similarity between these species is relatively high, ranging from 0.891 to 0.963. Principal Coordinates Analysis showed that the species with low level of genetic diversity are *M. quinquenervia* and *M. cajuputi*, while *M. leucadendra* has a higher level. The *M. cajuputi* population in Phong Binh has a highest level of genetic diversity, so it can be used as a material for breeding in the future.

Keywords: genetic diversity, *Melaleuca*, RAPD, Thua Thien Hue province

*Author for correspondence: Tel: +84-983735509; Email: htquang@hueuni.edu.vn