

ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ DÈ TÙNG SỌC TRẮNG HẠP (*Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilg.) Ở SƠN LA VÀ HÒA BÌNH BẰNG CHỈ THỊ ISSR

Phan Thị Thanh Huyền^{1,*}, Trần Hồ Quang², Đoàn Thị Thùy Linh¹

TÓM TẮT

Dẻ tùng sọc trắng hạp là cây lá kim thuộc họ Thông đỏ. Hiện nay, các quần thể *A. argotaenia* liên tục bị suy giảm do chặt phá rừng. Kết quả phân tích ADN của 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hạp bằng 16 chỉ thị ISSR được chia thành 5 nhóm chính, thể hiện 142 phân đoạn ADN, trong đó 87% số phân đoạn đều thể hiện sự đa hình. 11 mẫu thu ở xã Chiềng Sơn (Mộc Châu, Sơn La) đều thuộc nhóm 1 (10 mẫu) và nhóm 2 (mẫu M4). Nhóm 3 và nhóm 4 gồm 7 mẫu thu ở xã Hang Kia (Mai Châu, Hòa Bình). Nhóm 5 gồm 3 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hạp thu ở xã Pà Cò (Mai Châu, Hòa Bình). Các thông số di truyền của quần thể Dẻ tùng sọc trắng hạp được phân tích ở các mức độ quần thể cho thấy số lượng allele quan sát được (N_o) ở mức độ cao và biến động từ 1,063 (quần thể Pà Cò) đến 1,683 (quần thể Chiềng Sơn); số lượng allele hữu hiệu (N_e) dao động từ 1,261 - 1,348; mức độ dị hợp tử mong đợi (H_e) dao động từ 0,214 - 0,157; chỉ số đa dạng di truyền Shannon (J) biến động từ 0,237 (quần thể Pà Cò) đến 0,332 (quần thể Hang Kia). Trong 3 quần thể này, quần thể Hang Kia có mức độ đa dạng di truyền cao nhất và quần thể Pà Cò có mức độ đa dạng di truyền thấp nhất.

Từ khóa: Dẻ tùng sọc trắng hạp, ISSR, đa dạng di truyền quần thể.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dẻ tùng sọc trắng hạp (*Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilg.) thuộc họ Thông đỏ (*Taxaceae*) là một loài hạt trần thường xanh đơn tính, chiều cao đến 7 m; phân bố rộng nhất trong số tất cả các loài thuộc chi *Amentotaxus* và được tìm thấy ở miền Nam và miền Trung - Trung Quốc, miền Bắc Việt Nam và Lào [1]. Dẻ tùng sọc trắng hạp mọc trên đá vôi, sa thạch, đá phiến sét và đá granit và được tìm thấy trên các vách đá dựng đứng, khe núi và rừng núi dọc theo bờ suối, ưa thích môi trường ẩm ướt, bóng râm và tồn tại ở độ cao 300 - 1.100 m [1]. Ở Sơn La, quần thể Dẻ tùng sọc trắng hạp phân bố tập trung chủ yếu tại khu vực đỉnh núi Pha Luông thuộc xã Chiềng Sơn. Tại tỉnh Hòa Bình phân bố ở xã Hang Kia và Pà Cò thuộc huyện Mai Châu. Loài này thường phân bố ở đai cao từ 1.000 - 1.600 m, tập trung nhiều tại đai cao từ 1.300 - 1.600 m so với mực nước biển. Các quần thể *A. argotaenia* liên tục bị suy giảm do chặt phá rừng. Hilton Taylor (2013) [2] đã ước tính rằng phạm vi của *A. argotaenia* đã giảm 20 - 29% và các quần thể còn lại rất nhỏ và cô lập. Trong các chỉ thị được sử

dụng để đánh giá đa dạng di truyền, chỉ thị ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) được sử dụng rộng rãi hơn cả để đánh giá đa dạng di truyền. ISSR nhắm mục tiêu vào các trình tự lặp lại đơn giản có nhiều và phân tán trong toàn hệ gen. Do đó, các chỉ thị ISSR thường biểu hiện một số lượng lớn các đoạn đa hình ở mỗi chỉ thị và cho phép khuếch đại tần số cao hơn do các đoạn mỗi dựa trên ISSR dài hơn, nhanh hơn, đơn giản hơn, tỷ lệ đa hình cao, tiết kiệm chi phí hơn so với các kỹ thuật khác [3], [4]. So với các chỉ thị RFLP, SSR và AFLP, chỉ thị ISSR tỏ ra ưu thế hơn khi không yêu cầu thông tin trình tự trước đó để tạo ra các sản phẩm khuếch đại ADN [5], [6]. Kỹ thuật ISSR được đánh giá có hiệu quả cao trong nghiên cứu đa dạng di truyền trên nhiều đối tượng cây trồng, trong đó có cả một số loài lá kim [6], [7], [8].

Ở Việt Nam, việc sử dụng chỉ thị phân tử ISSR để đánh giá đa dạng di truyền được công bố ở một số loài cây lâm nghiệp như cây Cọ khẹt, cây gỗ Trắc đỏ, cây Sơn tra [9], [10], [11]. Mặc dù vậy, chưa có công bố nào sử dụng chỉ thị ISSR đánh giá đa dạng di truyền các loài Dẻ tùng sọc trắng hạp. Nghiên cứu này cung cấp những dữ liệu về đa dạng di truyền và sự khác biệt di truyền giữa 21 cá thể thuộc 3 quần thể Dẻ tùng sọc trắng hạp phân bố ở khu vực nghiên cứu nhằm góp phần vào việc đề xuất giải pháp bảo tồn, sử dụng và phát triển bền vững loài cây này.

¹ Trường Đại học Tây Bắc

* Email: phanhuynh@utb.edu.vn

² Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 21 mẫu lá của các cá thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp thu từ 3 địa điểm nghiên cứu được sử dụng để phân tích phân tử. Các mẫu được đặt trong túi

nhựa dẻo có chứa silicagel ngay tại thực địa và chuyển đến phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học, bảo quản tại 4°C cho đến khi sử dụng. Thông tin của các mẫu nghiên cứu được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Thông tin mẫu được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ		Độ cao (m)	Đặc điểm cây
			Kinh độ	Vĩ độ		
1	M0	Xã Chiềng Sơn	00565136	02287214	1368	Cây trưởng thành
2	M2	Xã Chiềng Sơn	00565027	02287844	1440	Cây tái sinh
3	M3	Xã Chiềng Sơn	00565524	02287395	1594	Cây tái sinh
4	M4	Xã Chiềng Sơn	00565538	02287097	1659	Cây tái sinh
5	M5	Xã Chiềng Sơn	00565473	02287138	1663	Cây tái sinh
6	M6	Xã Chiềng Sơn	00565526	02287094	1698	Cây trưởng thành
7	M8	Xã Chiềng Sơn	00566103	02286385	1673	Cây tái sinh
8	M9	Xã Chiềng Sơn	00566088	02286359	1680	Cây tái sinh
9	PL6	Xã Chiềng Sơn	00563995	02286275	1664	Cây trưởng thành
10	PL7	Xã Chiềng Sơn	00565259	2287023	1615	Cây tái sinh
11	PL8	Xã Chiềng Sơn	00565542	2287099	1705	Cây trưởng thành
12	HK5	Xã Pà Cò	00389787	02294065	1010	Cây tái sinh
13	HK6	Xã Pà Cò	00389324	02293977	1002	Cây tái sinh
14	HK7	Xã Pà Cò	00389187	02293823	1022	Cây trưởng thành
15	HB1	Xã Hang Kia	02295913	00382598	1367	Cây tái sinh
16	HB2	Xã Hang Kia	02295641	00382480	1301	Cây tái sinh
17	HB3	Xã Hang Kia	02291833	00389731	1008	Cây tái sinh
18	HB4	Xã Hang Kia	02297224	00382664	1288	Cây tái sinh
19	HB5	Xã Hang Kia	02291842	00389737	1006	Cây tái sinh
20	HB6	Xã Hang Kia	02295784	00390794	1402	Cây tái sinh
21	HB7	Xã Hang Kia	00383261	02297211	1293	Cây tái sinh

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

TT	Tên môi	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
1	HB10	52	(GA) ₆ CC	[12]
2	HB12	50	(CAC) ₃ GC	[11]
3	HB15	50	(GTC) ₃ GC	[11]
4	UBC807	55	(AG) ₈ T	[13]
5	UBC818	58	(CA) ₈ G	[13]
6	UBC824	50	(TC) ₈ G	[7]
7	UBC834	50	(AG) ₈ YT	[11]
8	UBC835	50	(AG) ₈ CC	[14]
9	UBC836	49	(AG) ₈ CA	[14]
10	UBC843	49	(CT) ₈ GA	[11]
11	UBC851	50	(GT) ₈ CG	[11]
12	UBC855	55	(AC) ₈ YT	[7]

13	UBC856	55	(AC) ₈ YA	[7]
14	UBC881	55	(GGGTG) ₃	[7]
15	ISCS14	51	(AGTG) ₅ A	[15]
16	ISCS34	51	(TG) ₈ RC	[15]

16 chỉ thị ISSR đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu này được lựa chọn dựa vào các trình tự nucleotide được tham khảo có mức độ đa hình cao trong các nghiên cứu về thực vật [7], [11], [12], [13], [14], [15] và được đặt tổng hợp tại Công ty Sinh hóa Phù Sa. Danh sách và trình tự 5'-3' của 16 chỉ thị ISSR được thể hiện ở bảng 2.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp miêu tả bởi Yeh và cs (1999) [16]. Sau đó được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch ADN của hãng Fermentas (genome DNA purification kit, #KO512). Kiểm tra độ sạch và đo nồng độ ADN

tổng số trên máy quang phổ Nanodrop Lite (Thermo Scientific), điều chỉnh nồng độ ADN đạt 50 ng/μl.

Phản ứng PCR – ISSR: Phản ứng PCR được thực hiện với từng chỉ thị ISSR trên máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), thể tích mỗi phản ứng là 25 μl, bao gồm 1,0 μl ADN; 1,0 μl mỗi xuôi; 1,0 μl mỗi ngược, 9,5 μl H₂O; 12,5 μl master mix (GoTaq Green Master Mix 2X). Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: (1) 94°C, 5 phút, (2) 94°C, 45 giây, (3) Nhiệt độ gắn mỗi khác nhau tùy theo từng chỉ thị ISSR, 30 giây, (4) 72°C, 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ từ (2) đến (4), (5) 72°C, 5 phút, (6) giữ mẫu ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 8% trong đệm TBE 1x, hiệu điện thế 24V, thời gian 60 phút. Các băng ADN được phát hiện bằng cách nhuộm trong dung dịch ethidium bromide (10 mg/L) khoảng 15 - 20 phút; rửa trong nước cất trong 5 phút, chụp ảnh bản gel với máy đọc gel bằng tia UV.

2.3. Phân tích số liệu

Mã hóa số liệu băng ADN trên bản gel, xuất hiện băng ADN ký hiệu là 1 và không xuất hiện băng ADN ký hiệu là 0; mỗi băng trên gel điện di được sử dụng như một đặc trưng để mô tả biến dị ADN của các mẫu phân tích. Hệ số tương đồng di truyền (S) và hàm lượng thông tin đa hình (PIC - Polymorphism Information Content) được tính theo công thức của Nei (1973) [17].

$$S = 2.N_{xy} / (N_x + N_y)$$

Trong đó: N_{xy} là số allen cùng vị trí của mẫu x và y; N_x, N_y là số alen của mẫu x và y.

$$PIC = 1 - \sum P_i^2$$

Trong đó: P_i là tần số xuất hiện của allen thứ j ở mỗi i.

Số liệu phân tích ISSR được xử lý bằng phần mềm NTSYS pc2.1 để tính hệ số tương đồng di truyền và vẽ sơ đồ biểu thị mối quan hệ di truyền bằng phương pháp UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical averages).

Tỷ lệ biến đổi di truyền trong và giữa các quần thể: Phân tích phương sai phân tử (AMOVA) được sử dụng để tính toán thống kê F - được sử dụng để ước tính tỷ lệ biến đổi di truyền được tìm thấy giữa các quần thể (F_{st}), giữa các quần thể trong các nhóm (F_{sc}) và giữa các nhóm (F_{ct}) sử dụng Areliquin phiên bản 3.01 của Excoffier & Lischer

(2007) [18] và GenAlEx 6.503 của Peakall và Smouse (2012) [19].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết và tinh sạch ADN tổng số

Mẫu ADN của Dẻ tùng sọc trắng hẹp được tách chiết, tinh sạch; xác định hàm lượng và kiểm tra độ sạch trên máy đo quang phổ hấp thụ ở các bước sóng 260 nm và 280 nm. Các mẫu đều có tỷ lệ OD_{260/280} đạt trong mức theo tiêu chuẩn (1,8 – 2,2). Sau đó, các mẫu ADN được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di thể hiện các băng vạch đều rõ nét, chứng tỏ ADN có chất lượng tốt phù hợp cho việc làm khuôn mẫu để tiến hành các phản ứng PCR-ISSR.

3.2. Đa dạng di truyền của 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp

Tính đa hình giữa các mẫu cá thể nghiên cứu thể hiện ở sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn ADN khi so sánh giữa các mẫu khác nhau trong cùng một chỉ thị ISSR. Mười sáu chỉ thị ISSR đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền cho 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp thuộc 3 quần thể thu mẫu, kết quả đánh giá mức độ đa hình được thể hiện trong bảng 3. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) thấp nhất là 0,24 ở chỉ thị ISCS34. 15 chỉ thị ISSR còn lại đều thể hiện giá trị PIC >0,5. Theo phân loại của Botstein (1980) [20], các chỉ thị này được xếp vào loại cho thông tin đa hình rất cao.

Tổng số có 142 phân đoạn ADN được thể hiện qua phân tích 16 chỉ thị ISSR ở 21 mẫu cá thể. Số phân đoạn ADN ở các chỉ thị dao động từ 2 phân đoạn (ISCS34) đến 17 phân đoạn (UBC855), đạt trung bình 8,8 phân đoạn/chỉ thị. Khả năng tạo các phân đoạn ADN đa hình của chỉ thị ISSR là một yếu tố quan trọng trong phân tích đa dạng di truyền, cung cấp lượng thông tin lớn về cấu trúc di truyền giữa các cá thể phân tích. Trong số 142 phân đoạn ADN thu được trong nghiên cứu này, số phân đoạn biểu hiện đa hình là 124 phân đoạn (chiếm 87% tổng số phân đoạn), với trung bình 7,75 phân đoạn đa hình/chỉ thị. Các chỉ thị ISSR có số phân đoạn đa hình dao động từ 2 phân đoạn (ISCS34) đến 13 phân đoạn (UBC834, UBC855, UBC856). Có 16/16 (chiếm 100%) chỉ thị ISSR thể hiện tính đa hình giữa các mẫu nghiên cứu. Tỷ lệ phân đoạn đa hình đạt 100% ở 6 chỉ thị HB12, HB15, UBC818, UBC835, UBC836 và ISCS34.

Bảng 3. Mức độ đa hình của các chỉ thị ISSR của Dẻ tùng sọc trắng hẹp

Chỉ thị	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đơn hình	Số phân đoạn đa hình	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (%)	PIC
HB10	5	1	4	80	0,68
HB12	12	0	12	100	0,90
HB15	8	0	8	100	0,77
UBC807	8	2	6	75	0,80
UBC818	10	0	10	100	0,85
UBC824	4	1	3	75	0,66
UBC834	15	2	13	87	0,87
UBC835	6	0	6	100	0,72
UBC836	10	0	10	100	0,80
UBC843	5	1	4	80	0,55
UBC851	11	2	9	82	0,84
UBC855	17	4	13	76	0,91
UBC856	14	1	13	93	0,90
UBC881	8	3	5	63	0,56
ISCS14	7	1	6	86	0,69
ISCS34	2	0	2	100	0,24
Tổng	142	18	124		
Trung bình	8,88	1,13	7,75	87	0,73

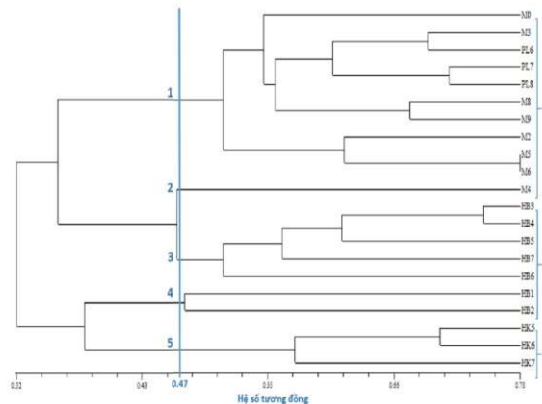
Đối với một số cây bản địa và cây lâm nghiệp, tổng số phân đoạn ADN khi phân tích bằng chỉ thị ISSR sẽ thấp hơn [21], điều này có thể giải thích do hệ gen của cây gỗ có nhiều vùng gen bảo thủ nên số phân đoạn ISSR sẽ thấp hơn so với cây nông nghiệp. Giá trị thông tin đa hình PIC của các chỉ thị ISSR trong nghiên cứu này dao động từ 0,24 – 0,91 là phù hợp với các nghiên cứu trước đây đối với cây lâm nghiệp bản địa [22], [23].

3.3. Mối quan hệ di truyền và đa dạng di truyền của các mẫu nghiên cứu

Để tính hệ số tương đồng di truyền và xây dựng biểu đồ mối quan hệ di truyền giữa các mẫu cá thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp, kết quả ISSR được mã hóa và xây dựng sơ đồ mối tương quan di truyền bằng phần mềm NTSYSpc version 2.1 với phương pháp phân nhóm UPGMA. Kết quả thể hiện ở bảng 4 cho thấy, có sự biến động lớn về hệ số tương đồng giữa các mẫu nghiên cứu: hệ số tương đồng di truyền cao nhất ở cặp mẫu M5-M6 (0,78) và thấp nhất ở cặp mẫu

M2-HB1 (0,32). Trong đó, tỷ lệ số cặp có hệ số tương đồng từ 0,5 trở lên là 57,9%, tương ứng với 110/190 cặp mẫu; tỷ lệ số cặp có hệ số tương đồng từ 0,7 trở lên là 3,2%, tương ứng với 6/190 cặp mẫu (M5-M6, PL7-PL8, PL6-HB3, HB3-HB5, HB3-HB4, HK5-HK6).

Dựa vào các hệ số tương đồng di truyền ở bảng 4, biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa của 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp lá hẹp được xây dựng và thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp theo hệ số di truyền của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA

(A: mẫu thu ở xã Chiềng Sơn, B: mẫu thu ở xã Hang Kia, C: mẫu thu ở xã Pà Cò)

Ở mức độ tương đồng 0,47: 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp nghiên cứu được chia thành 5 nhóm chính. 11 mẫu thu ở xã Chiềng Sơn (Mộc Châu, Sơn La) đều thuộc nhóm 1 (M0, M3, PL6, PL7, PL8, M8, M9, M2, M5, M6) và nhóm 2 (mẫu M4). Trong nhóm 1 có cặp mẫu M5-M6 có hệ số tương đồng cao nhất (0,78). Nhóm 3 và nhóm 4 gồm 7 mẫu thu ở xã Hang Kia (Mai Châu, Hòa Bình), trong đó 5 mẫu HB3, HB4, HB5, HB6, HB7 tạo thành nhóm 3, và 2 mẫu HB1, HB2 tạo thành nhóm 4. Trong nhóm 3, cặp mẫu HB3-HB4 có hệ số tương đồng cao (0,74). Nhóm 5 gồm 3 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp thu ở xã Pà Cò (Mai Châu, Hòa Bình), ba mẫu này (HK5, HK6, HK7) có hệ số tương đồng theo từng cặp (HK5-HK6 là 0,70, HK5-HK7 là 0,57, HK6-HK7 là 0,60) và có quan hệ di truyền khá xa so với các mẫu khác. Điều này cho thấy các cặp cá thể cùng quần thể có hệ số tương đồng cao tức là các cá thể trong quần thể có sự thụ phấn chéo với nhau. Còn mối quan hệ giữa các cá thể khác quần thể có hệ số tương đồng di truyền tương đối thấp ít có sự giao thoa di truyền giữa các quần thể với nhau nguyên nhân là do

khoảng cách địa lý giữa 3 quần thể cách xa nhau từ 30 - 50 km ít có sự trao đổi nguồn gen với nhau.

Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền của 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp

	M0	M2	M3	M4	M5	M6	M8	M9	PL6	PL7	PL8	HB1	HB2	HB3	HB4	HB5	HB6	HB7	HK5	HK6	HK7
M0	1,00																				
M2	0,53	1,00																			
M3	0,54	0,54	1,00																		
M4	0,47	0,44	0,51	1,00																	
M5	0,60	0,62	0,66	0,51	1,00																
M6	0,57	0,62	0,59	0,46	0,78	1,00															
M8	0,55	0,51	0,58	0,40	0,59	0,60	1,00														
M9	0,58	0,56	0,61	0,49	0,64	0,65	0,68	1,00													
PL6	0,61	0,56	0,69	0,47	0,59	0,59	0,55	0,63	1,00												
PL7	0,58	0,55	0,68	0,49	0,69	0,65	0,59	0,66	0,61	1,00											
PL8	0,57	0,51	0,68	0,46	0,62	0,60	0,61	0,69	0,65	0,71	1,00										
HB1	0,39	0,32	0,40	0,34	0,34	0,38	0,36	0,36	0,44	0,36	0,37	1,00									
HB2	0,41	0,39	0,44	0,43	0,47	0,43	0,36	0,46	0,46	0,42	0,39	0,47	1,00								
HB3	0,57	0,51	0,66	0,52	0,59	0,56	0,56	0,61	0,71	0,63	0,60	0,43	0,41	1,00							
HB4	0,51	0,46	0,61	0,55	0,62	0,58	0,53	0,62	0,56	0,64	0,61	0,42	0,45	0,74	1,00						
HB5	0,51	0,47	0,54	0,48	0,55	0,54	0,52	0,55	0,54	0,59	0,50	0,37	0,45	0,72	0,61	1,00					
HB6	0,47	0,36	0,49	0,48	0,45	0,40	0,41	0,48	0,49	0,49	0,46	0,45	0,41	0,56	0,51	0,52	1,00				
HB7	0,53	0,45	0,51	0,46	0,55	0,52	0,45	0,55	0,51	0,53	0,48	0,49	0,45	0,62	0,56	0,56	0,54	1,00			
HK5	0,40	0,41	0,50	0,38	0,49	0,53	0,43	0,52	0,50	0,53	0,51	0,38	0,42	0,49	0,53	0,43	0,37	0,44	1,00		
HK6	0,39	0,37	0,50	0,38	0,45	0,43	0,41	0,41	0,48	0,49	0,49	0,39	0,39	0,43	0,47	0,39	0,38	0,41	0,70	1,00	
HK7	0,44	0,39	0,54	0,42	0,49	0,47	0,45	0,52	0,46	0,49	0,53	0,40	0,44	0,49	0,53	0,47	0,42	0,51	0,57	0,60	1,00

3.4. Đánh giá đa dạng di truyền giữa ba quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp

Quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp phân bố tập trung chủ yếu ở khu vực đỉnh núi Pha Luông, xã Chiềng Sơn thuộc Khu rừng đặc dụng Xuân Nha, tỉnh Sơn La. Đây là khu vực được bảo vệ khá nghiêm ngặt diện tích rừng ở trạng thái IIA vẫn còn nhiều nên mức độ đa dạng sinh học cao. Theo số liệu điều tra cho thấy, loài Dẻ tùng sọc trắng hẹp thường mọc tập trung tại đai cao từ 1.000 – 1.600 m, tập trung

nhiều tại đai cao từ 1.300 – 1.600 m so với mực nước biển.

Tại 3 đai cao, kết quả cho thấy quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp có số lượng cây trưởng thành còn rất ít (điều tra đặc điểm lâm học số lượng cây trưởng thành bắt gặp trên các tuyến điều tra chưa đến 20 cây mọc rải rác cách xa nhau). Quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp còn lại chủ yếu là cây tái sinh từ hạt thường mọc thành đám rải rác trên các khu vực đất bồi tụ có tầng đất dày quanh các phiến đá nổi lớn

theo các khe nước chảy từ trên đỉnh xuống đến sườn núi.

Tại quần thể Hang Kia, qua điều tra đặc điểm lâm học cho thấy khu vực vẫn còn sinh cảnh rừng thuộc khu vực lõi của Khu rừng đặc dụng Hang Kia - Pà Cò, có mức độ đa dạng sinh học đang giảm dần do bị tác động cạnh tác nông nghiệp. Quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp tại đây gồm có cây trưởng thành số lượng còn rất ít chủ yếu là cây tái sinh từ hạt phân bố ở đai cao từ 1.000 – 1.300 m so với mực nước biển. Các cá thể thường phân bố rải rác tại chủ yếu là núi đá đất bồi tụ cạnh các hốc đá hoặc cạnh cây gỗ lớn

trong rừng. Đặc điểm đất đai nơi quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp phân bố là đất xen lẫn đá và tầng đất mỏng. Tại quần thể Pà Cò, do diện tích rừng ở đây đã bị người dân khai thác nhiều để làm nương rẫy nên số lượng cây Dẻ tùng sọc trắng hẹp hầu như không còn. Kết quả điều tra cho thấy, hiện chỉ còn 3 cây gồm 2 cây tái sinh và 1 cây trưởng thành. Do vậy, mức độ đa dạng di truyền của Dẻ tùng sọc trắng hẹp tại khu vực này rất thấp.

Các thông số di truyền của quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp được phân tích ở các mức độ quần thể và thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Mức độ đa dạng di truyền của 3 quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp

Chỉ số đa dạng di truyền		Chiềng Sơn	Hang Kia	Pà Cò	Tổng cộng
N_a	Trung bình	1,683	1,620	1,063	1,455
	SD	0,053	0,061	0,078	0,040
N_e	Trung bình	1,321	1,348	1,261	1,310
	SD	0,028	0,029	0,029	0,017
H_e	Trung bình	0,199	0,214	0,157	0,190
	SD	0,015	0,015	0,016	0,009
I	Trung bình	0,313	0,332	0,237	0,294
	SD	0,021	0,021	0,023	0,013

Ghi chú: N : Số mẫu phân tích; N_a : Số alen quan sát trung bình; N_e : Số alen hữu hiệu; H_e : Hệ số gen di hợp tử mong đợi; I : Chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon; h : chỉ số đa dạng theo Nei, PPB: phần trăm phân đoạn đơn hình.

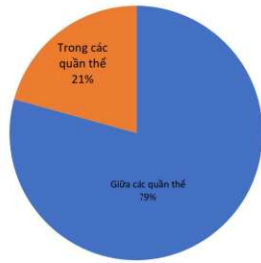
Các thông số di truyền của quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp được phân tích ở các mức độ quần thể ở bảng 5 cho thấy, số lượng alen quan sát được (N_a) ở mức độ cao và biến động từ 1,063 (quần thể Pà Cò) đến 1,683 (quần thể Chiềng Sơn); số lượng alen hữu hiệu (N_e) dao động từ 1,261 - 1,348; mức độ dị hợp tử mong đợi (H_e) dao động từ 0,214 - 0,157; chỉ số đa dạng di truyền Shannon (I) biến động từ 0,237 quần thể Pà Cò đến 0,332 (quần thể Hang Kia). Trong 3 quần thể này, quần thể Hang Kia có mức độ đa dạng di truyền cao nhất và quần thể Pà Cò có mức độ đa dạng di truyền thấp nhất.

Mức độ đa dạng di truyền của các quần thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đối với quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp tại Hang Kia và Chiềng Sơn phân bố ở khu vực được bảo vệ khá nghiêm ngặt nên số lượng các loài cây còn tương đối nhiều và có mức độ đa dạng sinh học cao. Quần thể cây Dẻ tùng sọc trắng hẹp tại 2 địa điểm này tái sinh nhiều hơn so với quần thể tại Pà Cò. Tại Pà Cò số lượng cá thể chỉ còn 3 cây do các trạng thái rừng bị mất đi chủ yếu là do bị đốn bừa bãi quá trình người dân phá rừng làm nương rẫy. Đây là

lý do chính khiến cho mức độ đa dạng di truyền của quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp tại đây thấp hơn so với quần thể tại Hang Kia và Chiềng Sơn.

3.5. Mức độ biến dị phân tử trong quần thể và giữa các quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp

Biến dị phân tử (AMOVA) được sử dụng để đánh giá mức độ biến dị giữa và trong các quần thể nghiên cứu. Đây cũng là một chỉ tiêu cần thiết để so sánh mức độ biến dị trong và giữa các quần thể. Khoảng cách địa lý tính theo đường chim bay giữa quần thể Chiềng Sơn và quần thể Hang Kia khoảng 35 km, giữa quần thể Hang Kia và quần thể Pà Cò khoảng 25 km, còn quần thể Chiềng Sơn và quần thể Pà Cò cách nhau khoảng 50 km. Khoảng cách giữa quần thể Chiềng Sơn và quần thể Pà Cò xa hơn từ quần thể Hang Kia đến quần thể Pà Cò (Hình 2). Tuy nhiên, khoảng cách di truyền giữa quần thể Chiềng Sơn và quần thể Pà Cò bé hơn khoảng cách di truyền giữa quần thể Hang Kia và quần thể Chiềng Sơn. Điều này có thể giải thích bởi sự chia cắt địa hình bởi các dãy núi núi cao.



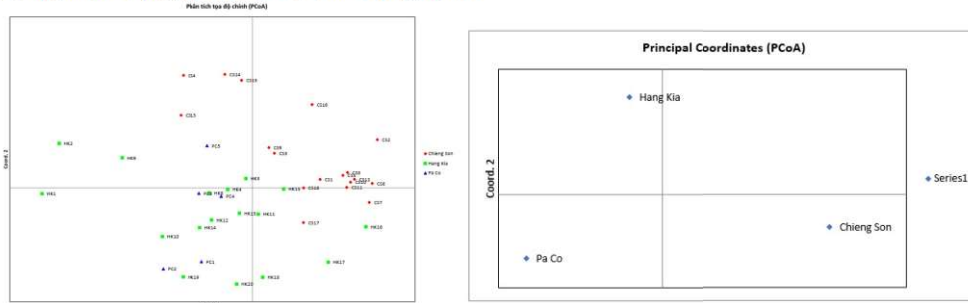
Hình 2. Mức độ biến động phân tử của các quần thể
Dẻ tùng sọc trắng hẹp dựa trên chỉ thị ISSR

Phân tích AMOVA cho thấy sự khác biệt di truyền đáng chú ý giữa 3 quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp với 79% tổng biến động là giữa các quần thể khảo sát và 21% tổng biến động giữa các cá thể trong quần

thể loài khảo sát tính lần lượt dựa trên dữ liệu ISSR. Kết quả phân tích AMOVA được thể hiện chi tiết trong hình 2.

Điều này cũng phù hợp với địa hình phân bố địa lý của 3 quần thể nghiên cứu bị phân tách bởi các dãy núi cao và có thể do khai thác rừng đã làm giảm đi mức độ biến dị phân tử trong các quần thể (21%).

Kết quả cây phân loại cũng phù hợp với kết quả của phân tích tọa độ chính (Principle Coordinate Analysis) các mẫu nghiên cứu cho thấy, các cây cá thể thuộc các quần thể ít có sự đan xen nhau và có xu hướng phân tách riêng.



Hình 3. Phân tích tọa độ chính các mẫu nghiên cứu

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1. Kết luận

Kết quả phân tích ADN của 21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp bằng 16 chỉ thị ISSR nhân bản được 142 phân đoạn ADN, trong đó 87% số phân đoạn thể hiện sự đa hình. Số lượng phân đoạn ở mỗi chỉ thị ISSR dao động từ 2 phân đoạn (ISCS34) đến 17 phân đoạn (UBC855), trung bình 8,8 phân đoạn/chỉ thị. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) thấp nhất là 0,24 ở chỉ thị ISCS34. 15 chỉ thị ISSR còn lại đều thể hiện giá trị PIC > 0,5. Có sự biến động lớn về hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu: hệ số tương đồng di truyền cao nhất ở cặp mẫu M5 - M6 (0,78) và thấp nhất ở cặp mẫu M2 - HB1 (0,32). Tỷ lệ số cặp có hệ số tương đồng di truyền từ 0,5 trở lên là 57,9%, tương ứng với 110/190 cặp mẫu; tỷ lệ số cặp có hệ số tương đồng di truyền từ 0,7 trở lên là 3,2%, tương ứng với 6/190 cặp mẫu.

21 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp nghiên cứu được chia thành 5 nhóm chính: 11 mẫu thu ở xã Chiềng Sơn (Mộc Châu, Sơn La) đều thuộc nhóm 1 (10 mẫu) và nhóm 2 (mẫu M4); nhóm 3 và nhóm 4 gồm 7 mẫu thu ở xã Hàng Kia (Mai Châu, Hòa Bình); nhóm 5 gồm 3 mẫu Dẻ tùng sọc trắng hẹp thu ở xã Pà Cò (Mai Châu, Hòa Bình), ba mẫu này có hệ số tương

đồng theo từng cặp cao và có quan hệ di truyền khá xa so với các mẫu khác.

Các thông số di truyền của quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp được phân tích ở các mức độ quần thể cho thấy số lượng allele quan sát được (N_o) ở mức độ cao và biến động từ 1,063 (quần thể Pà Cò) đến 1,683 (quần thể Chiềng Sơn); số lượng allele hữu hiệu (N_e) dao động từ 1,261 - 1,348; mức độ dị hợp tử mong đợi (H_e) dao động từ 0,214 - 0,157; chỉ số đa dạng di truyền Shannon (H') biến động từ 0,237 quần thể Pà Cò đến 0,332 (quần thể Hàng Kia). Trong 3 quần thể này, quần thể Hàng Kia có mức độ đa dạng di truyền cao nhất và quần thể Pà Cò có mức độ đa dạng di truyền thấp nhất.

4.2. Đề xuất

Để tăng sự đa dạng di truyền giữa các quần thể Dẻ tùng sọc trắng hẹp tại 2 tỉnh Sơn La và Hòa Bình thông qua nhân giống gây trồng bảo tồn nguồn gen từ hạt hoặc từ hom cành. Tiến hành các biện pháp khoan nuôi xúc tiến tái sinh kết hợp với trồng bổ sung những cây hom từ các cá thể có sự khác biệt di truyền cao từ 3 quần thể nhằm tăng số lượng các cá thể trong tự nhiên đồng thời gia tăng sự thụ phấn tự do góp phần gia tăng mức độ đa dạng nguồn gen di truyền loài Dẻ tùng sọc trắng hẹp trong tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Farjon, A., Filer, D. (2013). *An atlas of the world's conifers: an analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status*, Leiden.
2. Hilton - Taylor, C., Yang Y., Rushforth K., and Liao W. (2013). *Amentotaxus argotaenia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T42545A2986540. <https://doi.org/10.2305/iucn.uk.20131.rlts.t42545a2986540.en>
3. Liu L., Zhao L., Gong Y., Wang M., Chen L., Yang J., Wang Y., Yu E., Wang L. (2008). DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR, and SRAP markers. *Sci. Hortic.*, 116 (3): 240 - 247.
4. Wang Z., Liao L., Yuan X., Guo H., Guo A., Liu J. (2013). Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.*, 46: 108 - 115.
5. Mukherjee AK., Ratha S., Dhar S., Debata AK., Acharya P. (2010). Genetic relationships among 22 taxa of bamboo revealed by ISSR and EST-based random primers. *Biochem Genet.* 48: 1015 - 1025.
6. Tian, B., Yang, HQ., Wong, KM., Liu AZ., Ruan ZY. (2012). ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. *Genet Resour Crop Evol*, 59: 901 - 908.
7. Pharmawati, M., Yang, G., & Finnegan, P. M. (2005). Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. *Annals of Botany*, 95 (7), 1163 - 1170.
8. Isshiki S., Iwata N., Khan M. M. R. (2008). ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *J. Amer. Soci. Hort. Sci.*, 117, pp. 186 - 190.
9. Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu, Đinh Thị Phòng, Phí Hồng Hải, La Ánh Dương, Vũ Đức Toàn, Delia Catacutan, Đàm Việt Bắc (2016). Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các quần thể sơn tra (*Docynia indica* (Wall.) Decne) bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 4/2016: 4603 - 4613.
10. Đinh Thị Phòng, Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền (2016). Thông số về tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài Đinh tùng (*Cephalotaxus Mannii* Hook. F.) ở Tây Nguyên Việt Nam bằng chỉ thị SSR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14 (2): 245 - 252.
11. Trần Thị Liễu, Lê Thị Quỳnh, Vũ Thị Thu Hiền, Đinh Thị Phòng (2015). Thông số về tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Sinh học*, 37 (4): 463 - 469.
12. Ahmed, Ekram & Booles, Hoda & Farag, Ibrahim & Nada, Somaia & Fadel, M. (2012). Study of Therapeutical Role of Chromium - Enriched Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on Genetic Alterations and Sperm Abnormalities in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats. *World Applied Sciences Journal* 16. 39 - 51.
13. Nguyễn Văn Khiêm, Dương Thị Ngọc Anh, Nguyễn Xuân Cảnh (2021). Đa dạng di truyền nguồn gen sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn) bằng chỉ thị phân tử ISSR. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, kỳ 1+2 - tháng 2/2021, 26 - 32.
14. Isshiki S., Iwata N., Khan M. M. R. (2008). ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *J. Amer. Soci. Hort. Sci.*, 117, pp. 186-190.
15. Mir, Javid & Ahmed, Nazeer & Khan, Mudassir H & Mokhdomi, Taseem & Wani, Sajad & BUKHARI, Shoiab & Amin, Asif & Qadri, Raies. (2015). Molecular Characterization of Saffron - Potential Candidates for Crop Improvement. *Notulae Scientia Biologicae*. 7. 10.15835/nsb.7.1.9346.
16. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. (1999). *POPGENE Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31*, University of Alberta, Edmonton.
17. Nei M., Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70 (1973) 3321.
18. Excoffier L., Laval G., & Schneider S. (2007). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for data analysis of population genetics. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47 - 50.
19. Peakall R., Smouse P. (2012) *GenAIX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update*. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539
20. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R, W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length

polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.

21. Sing A. K., Devanshi, Pankaj Sharma, Rakesh Singh, Bhanumati Singh, K. R. Koundal and Singh N. K (2007). Assessment of genetic diversity in *Ziziphus Mauritania* using inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* Vol. 1691: 35-40.

22. Mai Thi Phuong Thuy, Tran Thu Ha, Tran Ho Quang (2019). Analysis of genetic diversity in Pa

Co pine (*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang) using RAPD and ISSR markers. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, Vol. 62 No. 1.

23. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Văn Thọ, Nguyễn Viễn, Phạm Quang Tiến, Lê Thị Mai Linh, Nguyễn Thị Hồng Mai (2018). Đánh giá đa dạng di truyền hai loài tre thuộc chi Luồng (*Dendrocalamus* Nees) ở miền Bắc Việt Nam dựa trên chỉ thị phân tử ISSR. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 1: 17 - 26.

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF GERMPLASMS *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilg. IN SON LA AND HOA BINH USING ISSR MARKER

Phan Thi Thanh Huyen, Tran Ho Quang, Doan Thi Thuy Linh

Summary

The *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilg is the red pine family. Currently, *A. argotaenia* populations are constantly reduced due to deforestation. The report is the result of DNA analysis of 21 narrow white striped conifer samples with 16 ISSR markers divided into 5 main groups, expressing 142 DNA segments, of which 87% of segments show polymorphism. The 11 samples collected in Chieng Son commune (Moc Chau, Son La) belong to group 1 (10 samples) and group 2 (sample M4). Groups 3 and 4 included 7 samples collected in Hang Kia commune (Mai Chau, Hoa Binh). Group 5 includes 3 samples of white striped pine trees collected in Pa Co commune (Mai Chau, Hoa Binh). The genetic parameters of the white-striped conifer population analyzed at population levels showed that the number of observed alleles (N_a) was high and varied from 1.063 (Pa Co populations) to 1.683 (Chieng Son populations); the number of effective alleles (N_e) ranges from 1.261 to 1.348; expected heterozygosity (H_e) ranges from 0.214 to 0.157; Shannon genetic diversity index (I) varied from 0.237 (Pa Co populations) to 0.332 (Hang Kia populations). Of these three populations, the Hang Kia population has the highest genetic diversity, and the Pa Co population has the lowest genetic diversity.

Keywords: *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilg., ISSR, population genetic diversity.

Người phản biện: PGS. TS. Bùi Văn Thắng

Ngày nhận bài: 26/11/2022

Ngày thông qua phản biện: 26/12/2022

Ngày duyệt đăng: 30/12/2022