


Tạp chí Công nghệ Sinh học 15(3): 497-504, 2017

## ĐÁNH GIÁ CHỈ THỊ SSR VÀ HIỆN TƯỢNG THẤT CỐ CHAI Ở QUẦN THỂ DẦU MÍT (*DIPTEROCARPUS COSTATUS*) TRONG RỪNG NHIỆT ĐỚI ĐÔNG NAM BỘ

Nguyễn Minh Đức<sup>1</sup>, Vũ Đình Duy<sup>2,3</sup>, Trần Thị Việt Thanh<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Ngân<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hải Hà<sup>4</sup>, Nguyễn Thị Phương Trang<sup>1</sup>, Bùi Thị Tuyết Xuân<sup>1,3</sup>, Nguyễn Minh Tâm<sup>2,5</sup> 


<sup>1</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, P.R China

<sup>4</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>5</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

 Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nmtam@vnmn.vast.vn

Ngày nhận bài: 12.4.2016

Ngày nhận đăng: 20.6.2017

### TÓM TẮT

Loài Dầu mít (*Dipterocarpus costatus*) là loài phân bố hẹp trong Rừng nhiệt đới núi thấp Đông Nam Bộ. Do khai thác quá mức vào những năm 1980 và 1990, cùng với nơi sống của chúng bị thu nhỏ, loài này được đưa vào Sách đỏ thế giới năm 1998 và cần được bảo vệ. Để bảo tồn loài Dầu mít, đánh giá đa dạng di truyền loài đã được điều tra trên cơ sở phân tích 9 locus microsatellite (SSR), từ 86 cá thể trưởng thành. Chín locus đều có kết quả đa hình. Tổng số 27 allele đã được ghi nhận cho tất cả locus nghiên cứu. Chỉ số băng đa hình (PIC) cho mỗi cặp mỗi đa hình trung bình 0,207 (0,034-0,514) và chỉ ra mức độ đa hình thấp. Các giá trị đặc điểm của mỗi cặp mỗi SSR cũng được xác định,  $R_p$  (3,092),  $PD$  (0,342) và  $MI$  (0,389). Dữ liệu chỉ mức độ đa dạng di truyền loài Dầu mít ở Rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ thấp, số allele cho một locus là  $N_A = 2,3$ , hệ số gen dị hợp tử quan sát  $H_O = 0,131$ , hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng  $H_E = 0,147$  và hệ số cận loài cao  $F_{IS} = 0,104-0,135$ . Hiện tượng thất cố chai cũng được tìm thấy ở Rừng phòng hộ Tân Phú (Đồng Nai) và Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát (Tây Ninh) ( $p < 0,01$ ). Kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra tầm quan trọng cần phải bảo tồn nguồn gen loài Dầu mít ở Rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ.

**Từ khóa:** Bảo tồn, dầu mít, *Dipterocarpus costatus*, đa dạng di truyền, microsatellite

### MỞ ĐẦU

Các loài cây họ Dầu (*Dipterocarpaceae*) là những cây rừng phổ biến và đóng vai trò quan trọng về giá trị sinh thái và kinh tế. Có khoảng trên 40 loài cây họ Dầu với 6 chi được tìm thấy ở Việt Nam, phần lớn là cây bản địa và đặc hữu (Nghĩa, 2005). Do giá trị thương mại và nhu cầu của người dân địa phương, các loài cây họ Dầu đã bị khai thác quá mức. Rừng, nơi sống của cây Dầu cũng bị suy giảm cả về diện tích và chất lượng. Các mảnh rừng còn lại là hậu quả của quá trình phân cắt. Kết quả này làm ảnh hưởng đến nơi sống của cây họ Dầu. Hiện tại, 33 loài cây họ Dầu đang bị đe dọa ở mức độ toàn cầu. Dầu mít *Dipterocarpus costatus* hiện được tìm thấy ở Vườn Quốc gia Bù Gia Mập (Bình Phước), Tân Phú (Đồng Nai) và Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát (Tây Ninh),

với số lượng khoảng 150 cây. Đây là loài sinh sản lưỡng tính và thụ phấn nhờ côn trùng. Hoa lớn và có mùi thơm. Quả xuất hiện vào tháng 2 hàng năm. Quả 5 sọng, bao gồm hạt giống số một hạt duy nhất, với hai cánh dài 6-10 cm. Hạt được phát tán nhờ gió. Dầu mít là một loài quan trọng và là thành phần chủ đạo trong hệ sinh thái và kinh tế của khu rừng mưa vùng đất thấp tại Đông Nam Bộ. Gỗ Dầu mít cứng, là một trong những loại gỗ tốt nhất trong chi *Dipterocarpus*. Gỗ được dùng chủ yếu cho các công trình xây dựng. Nhựa cây cũng được sử dụng một nguồn cung cấp nhựa để sơn tàu thuyền. Loài thích độ ẩm cao khác nhau, từ 75% đến 85% và lượng mưa cao 1500 mm đến 2200 mm và nhiệt độ trung bình hàng năm từ 25°C đến 27°C và mùa khô kéo dài 4-6 tháng. Mặc dù phần lớn các loài Dầu là đối tượng đang được bảo vệ trong các khu bảo tồn thiên nhiên và vườn quốc gia,

chúng vẫn đang trong tình trạng bị đe dọa.

Bảo tồn và quản lý một loài đòi hỏi các thông tin về sinh thái và tính đa dạng di truyền. Chỉ thị microsatellite (Single Sequence Repeat - SSR) là một trong những công cụ được sử dụng rộng rãi cho việc đánh giá các mô hình đa dạng di truyền ở thực vật và chỉ thị này có tiềm năng, lợi thế cho việc điều tra các loại cây quý hiếm. Trên thế giới, chỉ thị microsatellite được ứng dụng phổ biến cho các nghiên cứu về đa dạng di truyền đối với một số loài cây họ Dầu (*Ujino et al.*, 1998; *Takeuchi et al.*, 2004).

Hiện nay, chúng ta thiếu các tư liệu về sinh học sinh thái, đặc biệt mức độ đa dạng di truyền loài và quần thể của loài Dầu mít. Mức độ đa dạng di truyền cao đảm bảo sự duy trì tồn tại của chúng ở hiện tại và tương lai trong điều kiện biến đổi khí hậu. Hơn nữa, duy trì mức độ cao đa dạng di truyền quần thể và loài đảm bảo tiềm năng tiến hóa của loài ở các thế hệ tiếp theo. Bởi vậy, trong bài báo này một số chỉ thị SSR được sử dụng để điều tra mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài, cũng như sử dụng để đánh giá hiện tượng thắt cổ chai quần thể (suy giảm số lượng allele và gen dị hợp tử tại locus đa hình trong quần thể suy giảm kích thước) của loài Dầu mít ở Rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ, góp phần cho các nhà quản lý đưa ra các giải pháp bảo tồn, phục hồi và phát triển bền vững.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được tiến hành tại ba khu rừng nhiệt đới thường xanh núi thấp ở Tân Phú (Đông Nai), tọa độ 11°05' Bắc và 107°27' Đông, độ cao 124 m; Vườn Quốc gia Bù Gia Mập (Bình Phước), tọa độ 12°12' Bắc và 107°08' Đông, độ cao 350 m; và Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát, tọa độ 11°37' Bắc và 159°47' Đông, độ cao khoảng 10 m. Thảm thực vật đất trung bởi rừng nhiệt đới với các họ đặc trưng như họ Dầu (Dipterocarpaceae), họ Đậu (Fabaceae), họ Thầu dầu (Eupobiaceae) và họ Côm (Elaeocarpaceae). Các loài cây dầu thường ở tầng tán bao gồm vên vên, dầu nước, dầu mít, sao đen chò và chai. Tầu trắng cũng gặp ở khu vực này. Rừng này thuộc rừng thứ sinh phục hồi sau khai thác chọn vào những năm 1980 và 1990.

Khí hậu khu vực nghiên cứu được phản ánh bởi gió mùa nhiệt đới, hai mùa rõ rệt trong năm. Lượng mưa hằng năm khoảng 2500 - 2800 mm, tập trung chủ yếu vào mùa mưa từ tháng 4 đến tháng 10, nhiệt độ trung bình năm 27°C với độ ẩm 78%.

Để đánh giá tính đa hình của các cặp mồi microsatellite cũng như hiện tượng thắt cổ chai của quần thể nhỏ và cô lập, chúng tôi đã thu thập 86 mẫu vỏ từ 86 cá thể Dầu mít: Tân Phú (31 cá thể), Bù Gia Mập (27) và Lò Gò - Xa Mát (28). Mẫu vỏ cây được đánh số, bảo quản trong silicagel tại hiện trường và sau đó chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ -70°C cho đến khi mẫu được lấy ra phân tích DNA.

DNA tổng số được tách chiết từ vỏ cây tươi bằng phương pháp CTAB (Doyle, Doyle, 1990) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Mẫu được nghiền bằng cối sứ có sử dụng nitrogen lỏng. Xác định nồng độ DNA bằng máy quang phổ kế hoặc điện di trên gel agarose 0,8%. Sau khi loại RNA bằng enzyme RNAase, nồng độ DNA được pha loãng đến 10ng/μl. Chín cặp mồi SSR đã được sử dụng cho đánh giá tính đa hình và hiện tượng thắt cổ chai cho mỗi quần thể nghiên cứu (Bảng 1). PCR được tiến hành với thể tích mỗi phản ứng gồm có: 25 μl, trong đó chứa các thành phần gồm dung dịch đệm 1 x PCR; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs; 0,5 pmol cho mỗi mồi xuôi hoặc ngược; 10 ng DNA tổng số và 0,5 U *Taq* polymerase. Quá trình nhân bản được tiến hành trên máy Gene amp PCR system 9700 theo chu trình nhiệt sau: (1) Biến tính ban đầu: 94°C trong 3 phút; (2) Biến tính: 94°C trong 1 phút; (3) Bắt cặp: 55°C trong 1 phút; (4) Kéo dài: 72°C trong 1 phút; (5) Lặp lại (2) đến (4): 40 chu kỳ; (6) Phản ứng kết thúc hoàn toàn: 72°C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C. Điện di sản phẩm trên gel Polyacrylamide 6% trong 40 ml dung dịch đệm 1 x TAE, nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh trên máy soi gel của hãng CLEARVER.

Hiệu quả của mỗi cặp mồi SSR được phân tích thông qua các chỉ số PIC (Polymorphism Information Content - hệ số đa hình), R<sub>p</sub> (resolving power - chỉ số khác nhau của cặp mồi) và PD (Discrimination power - chỉ số khác biệt giữa các cặp cá thể) và MI (Marker index - chỉ số đa dạng trung bình của các băng đa hình) được mô tả bởi Prevost và Wilkinson (1999). Đa dạng di truyền quần thể theo các phần mềm GenAlex (Peakall, Smouse, 2006) và Arlequin (Excoffer *et al.*, 2005) bao gồm N<sub>A</sub> (Số allele cho một locus), H<sub>O</sub> (observed heterozygosity - Hệ số gen dị hợp tử quan sát), H<sub>E</sub> (Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng - expected heterozygosity), F<sub>IS</sub> (Hệ số cận nội - inbreeding coefficient) và F<sub>ST</sub> (Hệ số sai khác giữa các quần thể - genetic differentiation). Xác định hiện tượng thắt cổ chai (bottleneck) cho mỗi quần thể Dầu mít trên

cơ sở 3 mô hình, IAM (Infinite Allele Model - Mô hình allele không xác định), SMM (Mô hình đột biến từng bước - Stepwise Mutation Model) và TPM (Mô

hình đột biến 2 giai đoạn - Two-phase Mutation Model) sử dụng phần mềm BOTTLENECK ver. 1.2 (Piry *et al.*, 1999).

**Bảng 1.** Trình tự các cặp mỗi SSR và nhiệt độ bắt cặp.

Locus	Trình tự mỗi SSR	Trình tự lặp	Kích thước (bp)	Nhiệt độ bắt cặp (°C)	Tài liệu dẫn
Dipt01	F-5'-CTTCCCTAAATTCCCAATGTT-3' R-5'-TAATGGTGTGTGTACCAGGCAT-3'	(AG) <sub>15</sub>	193	55	Isagi <i>et al.</i> , 2002
Dipt03	F-5'-ACAATGAAACTTGACCACCCAT-3' R-5'-CAAAGGACATACCAGCCTAGC-3'	(GA) <sub>24</sub>	226	56	Isagi <i>et al.</i> , 2002
Dipt04	F-5'-TAGGGCATATTGCTTTCTCATC-3' R-5'-CTTATTGCAGTCATCAAGGGAA-3'	(AG) <sub>15</sub>	214	55	Isagi <i>et al.</i> , 2002
Dipt05	F-5'-TCTCAAATCTGCAAAGACAGC-3' R-5'-CCATAGTCATCACCTCTAATGGTC-3'	(GA) <sub>25</sub>	293	55	Isagi <i>et al.</i> , 2002
Dipt06	F-5'-TGGCAAACAAGCTACTGTTCAT-3' R-5'-CATGGGTTTAGCAACCTACACA-3'	(TA) <sub>8</sub>	258	55	Isagi <i>et al.</i> , 2002
Dipt07	F-5'-CAGGAGGGGAATATGGAAAA-3' R-5'-AAGTCGTCATCTTTGGATTGC-3'	(AC) <sub>9</sub>	120	54	Isagi <i>et al.</i> , 2002
Dipt08	F-5'-ATGCTTACCACCAATGTGAATG-3' R-5'-CTCGCAGCAGAACAACCTTCTA-3'	(GA) <sub>6</sub>	170	55	Terauchi, 1994
Shc07	F-5'-ATGTC CATGT TTGAG TG-3' R-5'-CATGG ACATA AGTGG AG-3'	(CT)8CA(CT)5CA CCC(CTCA)3CT(CA)10	169	54	Ujino <i>et al.</i> , 1998
Shc11	F-5'-ATCTGTTCTTCTACAAGCC-3' R-5'-TTAGAATTGAGTCAGATC-3'	(CT)4TT(CT)5	166	54	Ujino <i>et al.</i> , 1998

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Đánh giá tính đa hình của các cặp SSR

Với 9 cặp mỗi microsatellite, từ 86 cá thể trưởng thành đã xác định được 27 allele khác nhau, với kích thước dao động từ 90 bp đến 340 bp. Các allele lặn không được tìm thấy ở tất cả các locus SSR. Với loài Dầu mít ở Rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ, chín locus nghiên cứu đều cho kết quả đa hình. Số allele trung bình 2,3 cho một locus, dao động từ 2 ở 3 locus Shc11, Dipt05 và Dipt06 đến 4 ở 2 locus Dipt03 và Dipt04. Các giá trị PIC, PD, Rp và MI đã được xác định cho 9 locus đa hình (Bảng 2). Giá trị PIC được tính toán cho tất cả các cặp mỗi SSR đa hình. Giá trị PIC cao nhất (0,514) được tìm thấy ở cặp mỗi

Dipt03 và thấp nhất (0,034) ở Dipt05; giá trị PIC trung bình là 0,207. Giá trị PD dao động từ 0,070 (Dipt05) đến 0,633 (Dipt03), trung bình 0,342. Tương tự, giá trị Rp dao động từ 1,86 (Dipt03) đến 4,6 (Dipt01), trung bình 3,092. Giá trị MI dao động từ 0,017 (Dipt05) đến 1,506 (Dipt04), trung bình 0,389. Kết quả cũng chỉ ra các giá trị này thấp nhất được tìm thấy ở locus Dipt05 và cao nhất ở locus Shc11. Kết quả các giá trị này của loài Dầu mít thấp so với giá trị này (PIC = 0,324) của loài Thông xuân nha (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis*) ở Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Nha (Nguyen Minh Tam *et al.*, 2015). Các giá trị này đã phản ánh các cặp mỗi SSR cung cấp những thông tin có giá trị về đặc điểm loài Dầu mít và có số lượng băng đa hình thấp ở rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ.

**Bảng 2.** Số allele và các giá trị PIC, PD, Rp và MI cho các locus đa hình.

Locus	Số allele	PIC	PD	Rp	MI
Dipt01	3	0,129	0,222	4,6	0,103
Dipt03	4	0,514	0,633	1,86	1,175
Dipt04	4	0,482	0,571	3,25	1,506
Dipt05	2	0,034	0,070	3,0	0,017
Dipt06	2	0,180	0,285	2,68	0,060
Dipt07	3	0,141	0,472	3,32	0,188
Dipt08	3	0,191	0,318	2,8	0,153
Shc07	3	0,196	0,356	3,32	0,261
Shc11	2	0,079	0,150	3,0	0,039
Trung bình		0,207	0,342	3,092	0,389

Chú thích: PIC: Hệ số đa hình, Rp: Chỉ số khác nhau của cặp môi, và PD: Chỉ số khác biệt giữa các cặp cá thể, và MI: Chỉ số đa dạng trung bình của các băng đa hình)

**Đa dạng di truyền quần thể**

Giá trị đa dạng di truyền quần thể của loài Dầu mít ở Rừng nhiệt đới núi thấp Đông Nam Bộ được trình bày ở Bảng 3. Giá trị đa dạng di truyền của loài Dầu mít ở Rừng phòng hộ Tân Phú ( $H_O$  và  $H_E$ ) là cao hơn khi so sánh với loài này ở Vườn Quốc gia Bù Gia Mập và Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát. Hệ số gen dị hợp tử quan sát ở Rừng phòng hộ Tân Phú là 0,152, cao hơn so

với hệ số này ở Vườn Quốc gia Bù Gia Mập) với  $H_O = 0,099$ , và Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát với  $H_O = 0,143$ . Tương tự, hệ số gen dị hợp tử lý thuyết ở Rừng phòng hộ Tân Phú là 0,174, trong khi đó hệ số này thấp hơn ở Bù Gia Mập với  $H_E = 0,110$  và Lò Gò - Xa Mát ( $H_E = 0,166$ ). Hệ số cận Noon được tìm thấy ở Tân Phú là 0,104, thấp hơn so với hệ số này ở Lò Gò - Xa Mát ( $F_{IS} = 0,135$ ,  $p = 0,05$ ) và cao hơn so với Bù Gia Mập ( $F_{IS} = 0,071$ ).

**Bảng 3.** Các giá trị  $H_O$ ,  $H_E$  và  $F_{IS}$  của các quần thể Dầu mít ở Đông Nam Bộ.

Quần thể	Kích thước quần thể	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	Giá trị P
Tân Phú	31	0,152	0,174	0,104	ns
Bù Gia Mập	27	0,099	0,110	0,071	ns
Lò Gò - Xa Mát	28	0,143	0,166	0,135	0,05
Trung bình		0,131	0,150	0,103	

Chú thích:  $H_O$ : Hệ số gen dị hợp tử quan sát,  $H_E$ : Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng,  $F_{IS}$ : Hệ số cận Noon, P: mức ý nghĩa, ns: không có ý nghĩa.

Kết quả đa dạng di truyền của loài Dầu mít ở Đông Nam Bộ đều thấp hơn so với một số loài Dầu khác ở Việt Nam, như Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*) với  $H_O = 0,209$  và  $H_E = 0,239$  (Nguyễn Minh Tam *et al.*, 2014); Sao đen (*Hopea odorata*) với  $H_O = 0,366$  và  $H_E = 0,356$  (Nguyễn Thị Phương Trang *et al.*, 2014). Khi so sánh đa dạng di truyền của loài Dầu mít (*D. costatus*) với một số loài Dầu khác cũng chỉ ra mức độ di truyền thấp hơn nhiều như loài *Shorea leprosula* ( $H_O = 0,63-0,66$ ,  $H_E = 0,69-0,71$ ;

Ng *et al.*, 2004), *Parashorea malaanonan* ( $H_O = 0,26$ ,  $H_E = 0,46$ ; Abasolo *et al.*, 2009). Bên cạnh đó, số allele cho một locus ( $N_A$ ) ở loài Dầu mít nghiên cứu cũng thấp hơn nhiều như *S. leprosula* ( $N_A = 11,0 - 11,4$ ; Ng *et al.*, 2004), *Dryobalanops aromatic* ( $N_A = 5,1$ ; Lim *et al.*, 2001). Tuy nhiên, cũng có kết quả di truyền của loài Dầu rái ở Thái Lan thấp hơn ( $H_O = 0,088$ ,  $H_E = 0,092$ ; Changtragoon, 2001) loài Dầu mít nghiên cứu.

Như vậy, suy giảm rừng liên quan đến phân cắt

nơi sống, suy giảm nơi sống và khai thác gỗ của loài Dầu mít là những nguyên nhân chủ yếu và có thể giải thích mức độ đa dạng di truyền thấp của loài Dầu mít ở cả 3 khu rừng nghiên cứu. Số lượng cá thể của loài Dầu mít ở mỗi khu vực chỉ còn khoảng 50 cá thể trưởng thành và chỉ tìm thấy ở mảnh rừng thứ sinh đã được phục hồi sau khai thác. Không có cây tái sinh của loài này được tìm thấy ở cả 3 khu rừng. Rõ ràng, số lượng cá thể thấp có thể ảnh hưởng đến số lượng allele của loài Dầu mít. Như vậy, quần thể nhỏ cũng dẫn đến quan hệ cận loài giữa các cá thể ở cùng một nơi sống và chỉ ra mức độ thiếu hụt hệ số gen dị hợp tử của loài Dầu mít ở cả 3 khu rừng.

Mức độ khác nhau giữa các cặp quần thể nghiên cứu ( $F_{ST}$ ) cũng được xác định từ kết quả phân tích AMOVA và chỉ ra rằng hầu hết sự khác nhau này đều có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Giá trị khác nhau giữa các cặp quần thể dao động từ 0,315 giữa quần thể Bù Gia Mập và Lò Gò - Xa Mát đến 0,481 giữa Tân Phú và Bù Gia Mập, trung bình 0,402, ( $p < 0,05$ ) và dòng gen trao đổi (gene flow) giữa các quần thể, trung bình 0,37 (0,269 giữa Tân Phú và Bù Gia Mập đến 0,544 giữa Bù Gia Mập và Lò Gò - Xa Mát). Kết quả này chỉ ra giữa các nơi thu thập loài Dầu mít ở trạng thái cô lập, sự trao đổi di truyền là rất thấp.

#### **Hiện tượng thắt cổ chai quần thể**

Ba mô hình đột biến, gồm có IAM, SMM và TPM được sử dụng cho phân tích Bottleneck (Bảng 4). Quần thể Tân Phú, kiểm định giả thiết SIGN (SIGN test) đã chỉ ra số gen dị hợp tử kỳ vọng vượt trội là 4,27 (IAM), 4,25 (TPM) và 4,77 (SMM) cao hơn số gen dị hợp tử quan sát vượt trội ở cả ba mô hình IAM, TPM và SMM. Theo lý thuyết, quần thể có hiện tượng suy giảm kích thước hữu hiệu thể hiện sự suy giảm tương quan với số allele và hệ số đa dạng di truyền tại các locus đa hình. Số allele bị suy giảm nhanh hơn hệ số đa dạng quần thể. Kết

quả cho thấy, đối với quần thể Tân Phú kiểm định SIGN đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa hai hệ số gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng theo mô hình đột biến IAM và TPM không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ), trong khi đó ở mô hình SSM sự khác nhau này là có ý nghĩa ( $p < 0,001$ ). Kiểm định Chuẩn (T2) ở quần thể này cung cấp đa dạng di truyền vượt trội có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) ở cả 3 mô hình IAM (-1,976), SMM (-4,280) và TPM (-2,141) và có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ). Kiểm định giả thiết Wilcoxon, giá trị xác suất 0,019 (IAM), 0,097 (TPM) và 0,002 (SMM) là có ý nghĩa và chỉ ra có hiện tượng thắt cổ chai ở quần thể này. Như vậy, kết quả kiểm định SIGN, Chuẩn và Wilcoxon đều chỉ ra hiện tượng thắt cổ chai trong quần thể Dầu mít ở rừng phòng hộ Tân Phú. Kiểm định Mode-shift cũng được sử dụng như phương pháp tiếp theo để xác định hiện tượng thắt cổ chai tiềm năng của quần thể Tân Phú. Số allele với tần số thấp (0,01-0,1) chiếm tỉ lệ lớn nhất (0,478) và phân bố dạng “L-shaped” bình thường.

Cũng tương tự, quần thể Bù Gia Mập, kiểm định SIGN cho cả 3 mô hình IAM, SMM và TPM đều chỉ ra số gen dị hợp tử kỳ vọng vượt trội đều thấp hơn số gen dị hợp tử quan sát vượt trội, và không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ). Kiểm định Chuẩn (T2) đã chỉ ra đa dạng di truyền vượt trội ở cả 3 mô hình IAM (-1,017;  $p > 0,05$ ), TPM (-1,115;  $p > 0,05$ ) và SMM (-1,979;  $p < 0,05$ ). Kiểm định giả thiết Wilcoxon, mô hình đột biến được tìm thấy có ý nghĩa ở TPM và SSM ( $p < 0,05$ ). Kiểm định theo phương pháp Mode-shift chỉ ra số allele với tần số thấp (0,01-0,1) chiếm tỉ lệ cao nhất (0,462) và phân bố dạng “L” bình thường. Đối với quần thể Lò Gò - Xa Mát, kiểm định cả 3 giả thiết SIGN, kiểm định Chuẩn (T2) và Wilcoxon cho cả 3 mô hình đột biến IAM, TPM và SMM đều chỉ ra sự khác nhau giữa hệ số gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ). Như vậy, kết quả cho thấy hiện tượng thắt cổ chai được tìm thấy ở 2 quần thể Dầu mít ở Tân Phú và Lò Gò - Xa Mát.

**Bảng 4.** Mô hình đột biến ở mức độ quần thể loài Dầu mít.

Mô hình	Kiểm định SIGN	Kiểm định Chuẩn	Kiểm định Wilcoxon
<b>Tân Phú:</b>			
IAM	Hex = 4,27 Hd = 7; Hox = 2 p = 0,1158	T2= -1,976 p = 0,024	p (xác suất phân bố bất đối xứng đối với gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,009 p (xác suất phân bố bất đối xứng đối với gen dị hợp tử vượt trội) = 0,993 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,019
TPM	Hex = 4,25 Hd = 7; Hox = 2 p = 0,117	T2= -2,141 p = 0,016	p (xác suất phân bố bất đối xứng đối với gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,005 p (xác suất phân bố bất đối xứng đối với gen gen dị hợp tử vượt trội) = 0,997 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,097
SMM	Hex = 4,77 Hd = 9; Hox = 0 p = 0,001	T2= -4,280 p = 0,001	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,0009 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử vượt trội) = 1,000 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,002
<b>Bù Gia Mập:</b>			
IAM	Hex = 2,62 Hd = 5; Hox = 1 p = 0,1787	T2= -1,017 p = 1,547	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,055 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử vượt trội) = 0,961 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,109
TPM	Hex = 2,72 Hd = 5; Hox = 1 p = 0,1582	T2= -1,115 p = 0,132	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,015 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử vượt trội) = 0,992 p (phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,031
SMM	Hex = 3,04 Hd = 5; Hox = 1 p = 0,102	T2= -1,979 p = 0,024	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,015 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử vượt trội) = 0,992 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,031
<b>Lò Gò - Xa Mát:</b>			
IAM	Hex = 4,26 Hd = 9; Hox = 0 p = 0,003	T2= -2,149 p = 0,016	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho số gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,001 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho số gen dị hợp tử vượt trội) = 1,000 p (xác suất phân bố bình thường cho số gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,002
TPM	Hex = 4,37 Hd = 9; Hox = 0 p = 0,002	T2= -2,343 p = 0,009	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,001 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử vượt trội) = 1,000 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,002
SMM	Hex = 4,73 Hd = 9; Hox = 0 p = 0,001	T2= -4,433 p = 0,001	p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử thiếu hụt) = 0,001 p (xác suất phân bố bất đối xứng cho gen dị hợp tử vượt trội) = 1,000 p (xác suất phân bố bình thường cho gen dị hợp tử vượt trội/thiếu hụt) = 0,001

*Chú thích:* Thông số cho TPM (biến = 30% và SMM trong TPM=70%), số lần tính được lặp lại 1000; Hex: số gen dị hợp tử kỳ vọng vượt trội; Hd: Số gen dị hợp tử thiếu hụt; Hox: Số gen dị hợp tử quan sát vượt trội; p: Xác suất phân bố gen dị hợp tử.

## KẾT LUẬN

Những kết quả nghiên cứu di truyền loài Dầu mít ở rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ đã chỉ ra loài Dầu mít duy trì mức độ đa dạng di truyền khá thấp ( $N_A = 2,3$ ;  $H_o = 0,131$  và  $H_e = 0,147$ ). Kết quả này phản ánh mối quan hệ cận noãn cao liên quan đến số lượng cá thể của loài Dầu mít ở Đông Nam Bộ thấp ở cả 3 quần thể. Trong thời gian khảo sát, cây con tái sinh không được tìm thấy ở cả khu rừng này. Kết quả phân tích hiện tượng thắt cổ chai ở cả 3 khu vực nghiên cứu đều chỉ ra rằng kích thước quần thể thấp (số cá thể trong mỗi quần thể rất thấp, khoảng 50 cá thể cho mỗi quần thể) làm suy giảm số lượng allele trong mỗi locus đa hình và hệ số gen dị hợp tử quan sát. Để góp phần bảo tồn loài Dầu mít ở Rừng nhiệt đới núi thấp Đông Nam Bộ, bảo tồn chuyên vị là giải pháp cấp bách hiện nay. Phương pháp này sẽ làm tăng số lượng cá thể hiện có trong tự nhiên hoặc có thể tạo ra quần thể mới có kích thước lớn hơn có thể duy trì tính đa dạng di truyền cao và có khả năng chịu đựng tốt trong môi trường bất lợi.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được hỗ trợ từ nhiệm vụ Bảo vệ môi trường, mã số VAST.BVMT.01/15-16 và Quỹ IFS No#D/5766-1.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abasolo MA, Fernando ES, Borromeo TH, Hautea DM (2009) Cross-species amplification of *Shorea* microsatellite DNA markers in *Parashorea malaanonan* (Dipterocarpaceae). *Philippine J of Sci*, 138(1): 23-28.
- Changtragoon S (2001) Evaluating genetic diversity of *Dipterocarpus alatus* genetic resources in Thailand using isozyme gene markers, In In-situ and Ex-situ conservation of commercial tropical trees (Thielges BA, Sastrapradja SD and Rimbawanto A, eds). Gadjah Mada Univ. Yogyakarta: 349-354.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin ver.3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.
- Isagi V, Kenta T, Nakashizuka T (2002) Microsatellite loci for a tropical emergent tree, *Dipterocarpus tempehes* V. S1 (Dipterocarpaceae). *Mol Ecol Notes* 2(1): 12-13.
- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 208-295.
- Piry S, Luikart G, Cornnet JM (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size frequency data. *J of Hered* 90: 502-503.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR finger of potato cultivars. *Heor Appl Genet* 98: 107-112.
- Lim LS, Wickneswari R, Lee SL, Latiff A (2001) Genetic structure of natural populations of *Dryobalanops aromatic* Gaertn. F. (Dipterocarpaceae) in Peninsular Malaysia. In In-situ and Ex-situ conservation of commercial tropical trees (Thielges BA, Sastrapradja SD and Rimbawanto A, eds). Gadjah Mada Univ. Yogyakarta: 309-324.
- Ng KKS, Lee SL, Koh CL (2004) Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Mol Ecol* doi: 10.1046/j.1365-294x.2004.02094.x
- Nghĩa NH (2005) Cây họ Dầu (Dipterocarpaceae) ở Việt Nam. NXB Nông thôn, Hà Nội.
- Takeuchi Y, Ichikawa S, Tomaru N, Niiyama K, Lee SL, Muhammad N, Tsumara Y (2004) Comparison of the fine-scale genetic structure of three dipterocarp species. *Heredity* 92: 323-328.
- Nguyen Minh Tam, Phan Ke Loc, Vu Dinh Duy (2015) Genetic diversity in Xuan nha pine (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan). *Resear J Biotechnol* 10(3): 30-36.
- Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy, Nguyen Minh Duc, Vu Dinh Giap, Bui T. Tuyet Xuan (2014) Genetic variation in and spatial structure of natural populations of *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae) determined using single sequence repeat markers. *Genet Mol Research* 13(3): 5378-5386.
- Nguyen Thi Phuong Trang, Tran Thu Huong, Nguyen Minh Duc, Sierens Tim, Ludwig Triest (2014) Genetic population of threatened *Hopea odorata* Roxb. In the protected areas of Vietnam. *J Viet Env* 6(1): 69-76.
- Terauchi R (1994) A polymorphic microsatellite marker from the tropical tree *Dryobalanops lanceolata* (Dipterocarpaceae). *Jpn J of Genetics* 69(5): 567-576.
- Ujino T, Kawahara T, Tsumara Y, Nagamitsu T, Yoshimaru H, Ratnam W (1998) Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81: 422-428.

## EVALUATION OF SSR MARKERS AND A BOTTLENECK IN *DIPTEROCARPUS COSTATUS* POPULATIONS IN TROPICAL RAIN FORESTS OF DONG NAM BO

Nguyen Minh Duc<sup>1</sup>, Vu Dinh Duy<sup>2,3</sup>, Tran Thi Viet Thanh<sup>2</sup>, Nguyen Thi Ngan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hai Ha<sup>4</sup>,  
Nguyen Thi Phuong Trang<sup>1</sup>, Bui Thi Tuyet Xuan<sup>1,3</sup>, Nguyen Minh Tam<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>3</sup>*College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China*

<sup>4</sup>*College of Forestry Biotechnology*

<sup>5</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

*Dipterocarpus costatus* (Dipterocarpaceae) is restrictly distributed in lowland rainforests in southeast Vietnam. Due to over - exploitation and habitat destruction in the 1980s and 1990s, the species is listed as threatened. Understanding the genetic variation within and among *D. costatus* populations that occur in forest patches is necessary to establish effectively conservation strategies for this species. To conserve the species in tropical forests, genetic diversity was investigated on the basis of nine microsatellites (single sequence repeat, SSR). In all, eighty six *D. costatus* individuals in Dong Nam Bo rainforests were analyzed. All of the nine loci were polymorphic. A total of 27 alleles were observed across the screened loci. The polymorphic information content (PIC) averaged 0.207 (0.034 – 0.514) and indicated low polymorphic value. Other values including discrimination power (PD = 0.342), resolving power (Rp = 3.092) and Marker index (MI = 0.389) were revealed. The SSR data indicated a high genetic diversity ( $N_A = 2.3$ ;  $H_o = 0.131$  and  $H_e = 0.147$ ) and the inbreeding value was high,  $F_{IS} = 0.104-0.135$ . Bottleneck tests found two out of three populations under the two phase model, suggesting a decline of recent population size. This study also indicated the importance of conserving the genetic resources of *Dipterocarpus costatus* species in Dong Nam Bo rainforests. The threatened status of *D. costatus* was related to a lack of genetic diversity. All populations remained in small forest patches and isolation. The conservation atrategy should be established an ex-situ conservation site with new big population for this species from all genetic groups, which might improve its fitness under different environmental stresses.

**Keywords:** *Dipterocarpus costatus*, genetic diversity, species conservation, SSRs