

Tạp chí Công nghệ Sinh học 14(3): 441-450, 2016

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG VÀ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN Ở QUẦN THỂ TỰ NHIÊN CỦA DƯỚI LOÀI THÔNG XUÂN NHA (*PINUS ARMANDII* SUBSP. *XUANNHAENSIS* L.K. PHAN) ĐẶC HỮU HẠP Ở SƠN LA, VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ ISSR

Vũ Đình Duy^{1,2}, Bùi Thị Tuyết Xuân^{1,3}, Đỗ Thị Phương Thảo⁵, Phan Kế Lộc⁴, Nguyễn Minh Tâm²

¹Viện Lâm nghiệp, Trường Đại học Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm Tây Bắc, Thiểm Tây, Trung Quốc

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

³Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

⁵Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 17.02.2016

Ngày nhận đăng: 20.6.2016

TÓM TẮT

Thông xuân nha (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan) là một dưới loài của một trong 3 loài Thông 5 lá, mới phát hiện được gần đây ở Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Nha. Đây là dưới loài đặc hữu hẹp và đang bị tuyệt chủng ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, 15 chỉ thị ISSR đã được sử dụng để phân tích đa dạng nguồn gen di truyền quần thể của dưới loài Thông xuân nha thu ở 5 tiểu quần thể Tân Xuân, Thác Nước, Đỉnh VTV2, gần VTV2 và Đỉnh Pomu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Nha, tỉnh Sơn La. Kết quả phân tích đã chỉ ra 15/15 chỉ thị có tính đa hình. Tổng số đã nhân bản được 51 phân đoạn DNA, trong đó 50 phân đoạn đa hình (chiếm 98,04%). Tính đa dạng di truyền thể hiện cao nhất ở tiểu quần thể Đỉnh Pomu ($I = 0,555$; $h = 0,8$; $PPB = 68,76\%$; $Ne = 1,6$ và $He = 0,4$) và thấp nhất ở tiểu quần thể Tân Xuân ($I = 0,428$; $h = 0,6$; $PPB = 57,06\%$, $Ne = 1,215$ và $He = 0,303$). Tổng mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các tiểu quần thể là 7% và giữa các cá thể trong cùng tiểu quần thể là 93%. Biểu đồ phân nhóm chia làm 2 nhánh chính và có hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 0,53 đến 0,96. Thông qua kết quả phân tích phân tử cho thấy dưới loài Thông xuân nha cần có chiến lược sớm để bảo tồn ở mức tiểu quần thể.

Từ khóa: Bảo tồn, đa dạng di truyền, ISSR, *Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan, Thông xuân nha

MỞ ĐẦU

Thông xuân nha là một taxon Thông năm lá mới được phát hiện gần đây ở Khu bảo tồn thiên nhiên (KBTTN) Xuân Nha, huyện Mộc Châu, tỉnh Sơn La. Lúc đầu tên khoa học của taxon này được Phan Kế Lộc xác định là gần giống với *Pinus aff. armandii* Franch (Nguyen Duc To Luu *et al.*, 2013). Đến năm 2014, Averyanov và đồng tác giả đã mô tả là một loài mới cho khoa học, *P. cernua* L.K. Phan ex Aver. K.S. Nguyen & T.H. Nguyen. Gần như vào cùng thời gian đó Phan Kế Lộc đã tu chỉnh lại và cho taxon mới phát hiện được chỉ là dưới loài *Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan của loài *Pinus armandii* phân bố rộng rãi hơn ở ngoài Việt Nam (Phan Ke Loc *et al.*, 2014). Cũng giống với hai loài Thông năm lá khác của Việt Nam là Thông đà lạt (*Pinus dalatensis* Ferré) và Thông pà cò (*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang), Thông xuân nha là dưới loài đặc hữu rất hẹp, chỉ gặp ở khu

vực biên giới của Sơn La và giáp với tỉnh Hua Phan của Lào. Đây là taxon Thông với cây gỗ thường xanh, cao đến 25-30 m với đường kính thân ngang ngực 0,7-0,9 m. Số lượng Thông xuân nha trưởng thành ước còn khoảng 150 cây, phân bố tập trung trên diện tích khoảng 80 km². Cây sinh trưởng phát triển tốt, tuy nhiên rất hiếm cây con tái sinh.

Trong những năm gần đây, do tác động của con người đã dẫn đến diện tích rừng giảm và tăng mức độ phân mảnh của rừng còn sót lại, do đó có ảnh hưởng bất lợi đến môi trường sống tự nhiên của các loài cây. Thông xuân nha đang bị khai thác bởi người dân địa phương và các doanh nghiệp lâm nghiệp. Các hoạt động của con người đã làm suy thoái và phá hủy môi trường sống của nó. Do đó, loài này được ghi lại trong nhiều mảnh rừng thứ sinh ở các khu vực bảo vệ. Các quần thể Thông xuân nha phải đối mặt với các mối đe dọa tuyệt chủng nghiêm trọng như kết quả của việc phá rừng để canh tác, các khu định cư của con người và khai thác gỗ cho mục

đích thương mại. Theo Quỹ Bảo tồn Thiên nhiên quốc tế (IUCN) 2014, Thông xuân nha được xếp vào thứ hạng đang bị tuyệt chủng (EN). Vì vậy, việc bảo tồn hiệu quả nguồn gen Thông xuân nha là nhiệm vụ cấp bách đặt ra cho các nhà làm công tác bảo tồn.

Hầu hết, các nghiên cứu trước đây mới chỉ tập trung vào việc phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và nơi phân bố (Phan Ke Loc *et al.*, 2014, Nguyen Duc To Luu *et al.*, 2013). Nghiên cứu về đa dạng di truyền nguồn gen cho taxon này chỉ mới bắt đầu (Nguyen Minh Tam *et al.*, 2015). Trong khi đó, ở một số nước khác việc nghiên cứu di truyền quần thể một số loài lá kim phục vụ cho công tác bảo tồn và phục hồi đã được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm (Rao, 2004; Larionova *et al.*, 2007). Thông qua việc phân tích cấu trúc di truyền sử dụng chỉ thị phân tử của một số loài lá kim bị đe dọa tuyệt chủng cho thấy mức độ đa dạng di truyền bị suy giảm rất cao liên quan đến khả năng tăng hệ số đồng hợp tử trong các quần thể nhỏ và hẹp, đồng thời cũng chỉ ra mức độ đa dạng giữa các quần thể là rất lớn và đưa ra một số biện pháp hiệu quả để phục hồi nguồn gen một số loài lá kim bị đe dọa tuyệt chủng (Chung *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011). Một trong những kỹ thuật nghiên cứu đa dạng di truyền được áp dụng hiệu quả hiện nay là sử dụng chỉ thị phân tử (AFLP, ISSR, SSR, RAPD, STS,...) (Goldstein, Schlotterer., 1999; Semagn *et al.*, 2006; Nguyễn Đức Thành *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Trong đó thì chỉ thị ISSR (Inter Sequence Simple Repeat) đang được ứng dụng rộng rãi và có hiệu quả trong việc đánh giá đa dạng di truyền ở cả mức độ quần thể và loài. Điển hình là công bố của Nguyen Minh Tam và đồng tác giả (2009; 2011; 2013; 2015) về việc sử dụng chỉ thị ISSR đánh giá đa dạng di truyền của 2 loài lá kim là Pơ mu (*Fokienia hodginsii*), Sa mộc dầu (*Cunninghamia lanceolata* var. *konishii*).

Tương tự, Đinh Thị Phòng và đồng tác giả (2015a, 2015b), Trần Thị Liễu và đồng tác giả (2015) cũng đã sử dụng chỉ thị ISSR để nghiên cứu đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể của 3 loài Thông đà lạt (*Pinus dalatensis* Ferré), Kim giao núi đất (*Nageia wallichiana* (C.Presl) Kuntze), Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) sống tự nhiên ở Tây Nguyên phục vụ cho công tác bảo tồn.

Xuất phát từ các cơ sở khoa học trên đây, công trình này trình bày kết quả về việc nghiên cứu “Đa dạng và biến đổi di truyền ở quần thể tự nhiên của dưới loài *Thông xuân nha* đặc hữu hẹp ở Sơn La, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR ” nhằm đề xuất giải pháp bảo tồn, sử dụng và phát triển bền vững tính đa dạng sinh học ở Sơn La nói riêng và Việt Nam nói chung.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Bảy mươi một mẫu lá của dưới loài Thông xuân nha được Phan Kế Lộc thu ở 5 tiểu quần thể Tân Xuân, Thác Nước, Đỉnh VTV2, Gàn VTV2 và Đỉnh Pomu tại Khu BTTN Xuân Nha, tỉnh Sơn La (Bảng 1) được sử dụng để phân tích di truyền. Các mẫu được bảo quản trong túi nhựa dẻo trong có chứa silicagel ngay tại thực địa và chuyển đến phòng thí nghiệm giữ ở nhiệt độ phòng đến khi sử dụng phân tích DNA. Để xác định chính xác tên khoa học của dưới loài Thông xuân nha ở mỗi quần thể nghiên cứu, mẫu tiêu bản được thu thập và được lưu giữ tại Phòng mẫu thực vật khô của Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia Hà Nội, ký hiệu HNU. Trình tự 15 chỉ thị ISSR sử dụng trong nghiên cứu, được tổng hợp bởi công ty IDT, Hoa Kỳ (Intergarated DNA Technology, USA) như trong bảng 2.

Bảng 1. Thông tin của các mẫu dưới loài *Thông xuân nha* sử dụng trong nghiên cứu.

Tiểu quần thể	Số mẫu	Ký hiệu mẫu	Tọa độ		
			Vĩ độ	Kinh độ	Độ cao (so mặt nước biển) (m)
Đỉnh Pomu	20	PM1 – PM32	20°42'10"N	104°40'55"E	1000-1050
Tân Xuân	10	TX1 – TX10	20°40'46"N	104°39'46"E	1502
Thác Nước	10	TN1 – TN10	20°42'39"N	104°40'27"E	912
Gàn VTV2	20	GV1-GV20	20°42'38"N	104°40'17"E	890
Đỉnh VTV2	11	DV1-DV11	20°41'40"N	104°39'23"E	1410

Bảng 2. Trình tự nucleotide của 15 chỉ thị ISSR sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Chỉ thị	Trình tự lặp	Nhiệt độ gắn mỗi (°C)	Tài liệu tham khảo
1	ISSR1	(CAG) ₅	50	Bornet <i>et al.</i> , 2011
2	ISSR2	(CAA) ₅	50	Bornet <i>et al.</i> , 2011
3	ISSR5	(CCG) ₆	51	Carrasco <i>et al.</i> , 2013
4	ISSR8	(GAA) ₆	51	Carrasco <i>et al.</i> , 2013
5	ISSR9	(TG) ₈ GA	49	Carrasco <i>et al.</i> , 2013
6	ISSR10	(CTC) ₈	51	Carrasco <i>et al.</i> , 2013
7	UBC808	(AG) ₈ C	50	Isshiki <i>et al.</i> , 2008
8	ISSR55	(AC) ₈ T	51	Arif <i>et al.</i> , 2009
9	ISSR69	(GGGTG) ₃	52	Arif <i>et al.</i> , 2009
10	UBC809	(AG) ₈ G	49	Isshiki <i>et al.</i> , 2008
11	UBC834	(AG) ₈ CT	51	Isshiki <i>et al.</i> , 2008
12	UBC835	(AG) ₇ CC	51	Isshiki <i>et al.</i> , 2008
13	UBC843	(CT) ₈ GA	50	Wang <i>et al.</i> , 2010
14	HB12	(CAC) ₃ GC	50	Parasharami <i>et al.</i> , 2012
15	HB15	(GTG) ₃ GC	50	Parasharami <i>et al.</i> , 2012

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết và làm sạch theo phương pháp của Porebski và đồng tác giả (1997), sau đó kiểm tra độ sạch trên gel agarose 0,9% và đo nồng độ DNA tổng số trên máy UVS 2700, Labomed, Hoa Kỳ.

Phân tích phản ứng PCR_ISSR

Phản ứng nhân gen được thực hiện trên máy PCR system 9700 (Hoa Kỳ) với tổng thể tích 25 µl gồm các thành phần: dung dịch đệm PCR 1X; 2,5 mM MgCl₂; 2 mM dNTPs; mỗi 100nM; 50 ng DNA khuôn và 0,5 đơn vị *Taq* polymerase. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: biến tính ở 94°C trong 4 phút, tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: biến tính 94°C trong 1 phút, gắn mỗi 48 - 52°C trong 1 phút, kéo dài chuỗi 72°C trong 1 phút và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% cùng với thang DNA chuẩn 1000 bp, sau đó nhuộm ethidium bromide 15 phút và quan sát dưới tia UV.

Phân tích số liệu

Phân tích số liệu theo quy ước: 1 – phân đoạn DNA xuất hiện và 0 – phân đoạn DNA không xuất hiện khi phân tích sản phẩm PCR-ISSR với phần mềm NTSYS 2.0 (Rohlf, 1992). Các thông số đa dạng di truyền của mỗi quần thể như phân trăm phân

đoạn đa hình (PPB), chỉ số đa dạng di truyền Shannon (*I*), hệ số gen dị hợp tử mong đợi (*He*) và mức biến lượng phân tử (AMOVA) giữa các cá thể trong quần thể và giữa các quần thể được tính toán sử dụng phần mềm GENALEX 6.5 (Peakall, Smouse, 2006). Chỉ số đa dạng di truyền tính theo Nei (*h*) (1973) của mỗi quần thể được tính theo công thức $h = \sum p_i^2$ (trong đó p_i là tần số của allele thứ *i* tại locus đó). Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) của mỗi chỉ thị ISSR được xác định theo công thức: $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ (trong đó P_{ij} là tần số allele thứ *j* của kiểu gen *i* được kiểm tra). Giá trị đa dạng gen trong một locus (Intralocus Gene Diversity: *H_j*) được tính theo công thức: $H_j = 1 - p^2 - q^2$ (trong đó *p* là tần số của allele thứ *i* tại locus đó, *q* = 1-*p*). Thiết lập ma trận khoảng cách di truyền để phân tích thành phần tọa độ (PCA) giữa các cá thể. Lập biểu đồ hình cây theo phương pháp của Nei và Li (1972) trong phần mềm NTSYS 2.0 và giá trị Bootstrap được hỗ trợ bởi phần mềm Win-Boot (Yap, Nelson, 1996) với 1000 lần lặp lại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích đa dạng di truyền trong các tiểu quần thể Thông xuân nha

Mười lăm chỉ thị ISSR đã nhân bản được tổng số 51 phân đoạn DNA với kích thước dao động từ 300 bp đến 1600 bp, trong đó có 50 phân đoạn DNA

đa hình (chiếm 98,04%) khi phân tích với 71 mẫu DNA (mỗi mẫu DNA là 1 cá thể) thuộc 5 tiểu quần thể dưới loài Thông xuân nha ở KBTTN Xuân Nha. Trung bình số phân đoạn DNA nhân bản, hàm lượng thông tin đa hình (PIC) và giá trị trung bình đa dạng gen trong một locus (H_j) khi phân tích với 15 chỉ thị ISSR tương ứng là 3,4; 0,35; 0,208 (Bảng 3). Chỉ số thông tin di truyền của Shannon (I), chỉ số đa dạng di truyền theo Nei (h) và phần trăm phân đoạn đa hình (PPB) trong các tiểu quần thể dao động tương ứng từ 0,428 (Tân Xuân) đến 0,555 (Đình Pomu), từ 0,6

(Tân Xuân) đến 0,8 (Đình Pomu) và từ 52,94% (gần VTV2) đến 68,76% (Đình Pomu) (Bảng 4).

Mức độ đa dạng di truyền của dưới loài Thông xuân nha cao nhất ở tiểu quần thể Đình Pomu ($I = 0,555$; $h = 0,8$ và $PPB = 68,76\%$) và thấp nhất là ở tiểu quần thể Tân Xuân ($I = 0,428$; $h = 0,6$ và $PPB = 56,29\%$) (Bảng 4). Kết quả này cho thấy, dù tính theo phương pháp nào cũng vẫn phản ánh đúng thực trạng về tính đa dạng nguồn gen di truyền của mỗi tiểu quần thể. Kết quả phân tích trong bảng 4 cũng chỉ ra tính đa dạng nguồn gen ở mức độ loài đạt mức cao với giá trị $h = 0,693$ và $I = 0,483$.

Bảng 3. Giá trị PIC và phần trăm phân đoạn đa hình của 71 mẫu *Thông xuân nha* với 15 chỉ thị ISSR.

STT	Chỉ thị	Kích thước phân đoạn (bp)	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tổng phân đoạn	% phân đoạn đa hình	Đa dạng gen trong một locus (H_j)
1	HB15	300-1600	0,588	6	1	7	85,71	0,161
2	HB12	700-1550	0,439	5	0	5	100	0,211
3	ISSR1	450-1100	0,378	3	0	3	100	0,194
4	ISSR2	450-600	0,171	2	0	2	100	0,429
5	ISSR5	1200-1400	0,146	2	0	2	100	0,395
6	ISSR8	500-700	0,410	4	0	4	100	0,256
7	ISSR9	400	0,021	1	0	1	100	0,080
8	ISSR10	1000	0	1	0	1	100	0,149
9	ISSR55	300-1000	0,6120	7	0	7	100	0,241
10	ISSR69	500-1200	0,347	3	0	3	100	0,330
11	UBC808	500-600	0,444	2	0	2	100	0,166
12	UBC809	300-700	0,337	5	0	5	100	0,027
13	UBC834	500-1100	0,303	2	0	2	100	0,347
14	UBC835	500-750	0,448	3	0	3	100	0,0073
15	UBC843	500-900	0,595	4	0	4	100	0,009
Tổng		300-1600	5,427	50	1	51	-	3,125
Trung bình		-	0,350	3,33	0,067	3,4	98,57	0,208

Bảng 4. Thông số đa dạng di truyền quần thể *Thông xuân nha* phân tích với chỉ thị ISSR.

Tiểu quần thể	N	N_a	N_e	I	H_e	h	PPB (%)
Đình Pomu	20	1.600	1.600	0.555	0,400	0,800	68,76
Tân Xuân	10	1.267	1.215	0.428	0,303	0,600	51,29
Thác Nước	10	1.333	1.333	0.462	0,333	0,667	57,06
Gần VTV2	20	1.467	1.467	0.508	0,367	0,733	52,94
Đình VTV2	11	1.333	1.333	0.462	0,333	0,667	61,47
Trung bình		1.400	1.390	0.483	0,347	0,693	58,304

Ghi chú: N : Số mẫu phân tích; N_a : Số allele quan sát; N_e : Số allele hiệu quả; I : Chỉ số đa dạng Shannon; H_e : Hệ số gen di hợp tử mong đợi; h : Chỉ số đa dạng theo Nei; PPB: Phần trăm phân đoạn đa hình.

So sánh mức độ đa dạng di truyền nguồn gen của dưới loài Thông xuân nha với một số loài Thông khác được nghiên cứu bởi tác giả Việt Nam và trên

thế giới bằng chỉ thị ISSR cho thấy dưới loài Thông xuân nha có mức độ đa dạng di truyền nguồn gen cao hơn ($I = 0,483$ và $PPB = 58,304\%$) so với loài

Thông lá dẹt (*Pinus krempfii*) ($I = 0,137$ và $PPB = 30,11\%$) (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015), Thông đà lạt (*Pinus dalatensis* Ferré) ($I = 0,094$ và $PPB = 17,72\%$) (Đinh Thị Phòng *et al.*, 2015b), Sa mộc dầu (*Cunninghamia lanceolata* var. *konishii*) ($I = 0,1765$), Pơ mu (*Fokienia hodginsii*) ($I = 0,1145$) (Nguyễn Minh Tam *et al.*, 2013) và thấp hơn loài *Pinus nigra* của Trung Quốc ($I = 0,262$ và $PPB = 51,04\%$) (Rubio-Moraga *et al.*, 2013), loài *Pinus sylvestris* ở Đức và Tây Ban Nha ($I = 0,690$ và $PPB = 99,76\%$) (Cipriano *et al.*, 2013) và Kim giao núi đất (*Nageia wallichiana* (C. Presl) Kuntze) ($I = 0,258$ và $PPB = 43,42\%$) (Đinh Thị Phong *et al.*, 2015a).

Kết quả phân tích trong Bảng 4 cũng chỉ ra, số allele hiệu quả (N_e) và hệ số gen dị hợp tử mong đợi (H_e) của tiểu quần thể Đinh Pơmu đạt cao nhất ($N_e = 1,6$ và $H_e = 0,4$) và thấp nhất là tiểu quần thể Tân Xuân ($N_e = 1,215$ và $H_e = 0,303$). Kết quả phân tích về các thông số này cũng phù hợp với kết quả của các thông số đa dạng di truyền theo cách tính (h) của Nei (1973), chỉ số I của Shannon (1949) và phần trăm phân đoạn đa hình ở mức độ tiểu quần thể (cao nhất vẫn là tiểu quần thể ở Đinh Pơmu và thấp nhất vẫn là tiểu quần thể ở Tân Xuân).

Mức độ đa dạng di truyền trong quần thể dưới loài Thông xuân nha trong nghiên cứu này thể hiện ở mức thấp ($He = 0,347$) khi so sánh với một số loài cây lá kim khác trên thế giới và ở Việt Nam khi sử dụng kỹ thuật ISSR, chẳng hạn loài *Pinus tabulaeformis* ($He = 0,415$) (Wang *et al.*, 2010), *Pinus koraiensis* ($He = 0,348$) (Feng *et al.*, 2006), Kim giao núi đất (*Nageia wallichiana* (C. Presl) Kuntze) ($He = 0,348$) (Đinh Thị Phong *et al.*, 2015a), nhưng lại cao hơn loài *Pinus sibirica* ($He = 0,267$) (Yang *et al.*, 2005), *Pinus sylvestris* ($He = 0,262$) (Liu *et al.*, 2005;), Thông lá dẹt (*Pinus*

krempfii) ($He = 0,089$) (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015), Thông đà lạt (*Pinus dalatensis* Ferré) ($h = 0,128$) (Đinh Thị Phòng *et al.*, 2015b), Sa mộc dầu (*Cunninghamia lanceolata* var. *konishii*) ($h = 0,063$) (Nguyễn Minh Tam *et al.*, 2009) và Pơ mu (*Fokienia hodginsii*) ($h = 0,070$) (Nguyễn Minh Tam *et al.*, 2011). Từ các phân tích trên đây chúng tôi có nhận xét dưới loài Thông xuân nha ở Khu BTTN Xuân Nha có đa dạng di truyền ở mức khá cao.

Biến đổi di truyền giữa các tiểu quần thể Thông xuân nha

Kết quả phân tích về mức độ biến đổi phân tử (AMOVA) giữa các tiểu quần thể và giữa các cá thể trong cùng tiểu quần thể ở bảng 5 cũng cho thấy, tổng mức độ thay đổi phân tử rất thấp giữa các tiểu quần thể (7%) và cao giữa các cá thể trong cùng tiểu quần thể (93%) với giá trị $P < 0,001$. Cho đến nay chưa có một đánh giá đầy đủ nào về đa dạng di truyền đối với quần thể dưới loài Thông xuân nha, tuy nhiên so sánh với loài Kim giao núi đất (*Nageia wallichiana* (C. Presl) Kuntze) của Đinh Thị Phòng và đồng tác giả (2015a) phân tích với 30 chỉ thị ISSR nhận thấy, mức độ thay đổi phân tử giữa các tiểu quần thể là 40,07% và giữa các cá thể trong cùng một tiểu quần thể là 59,93%, hay theo Trần Thị Liễu và đồng tác giả (2015) loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii*) có tổng mức độ thay đổi phân tử giữa các tiểu quần thể 20,28% và giữa các cá thể trong cùng một tiểu quần thể 79,82% khi phân tích với 26 chỉ thị ISSR và Thông đà lạt (*Pinus dalatensis* Ferré) khi phân tích với 26 chỉ thị ISSR có mức độ thay đổi phân tử giữa các tiểu quần thể 41,99% và giữa các cá thể trong cùng một tiểu quần thể 58,01% (Đinh Thị Phòng *et al.*, 2015b).

Bảng 5. Mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các tiểu quần thể và trong quần thể Thông xuân nha.

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Thành phần biến đổi	Tổng sự biến đổi (%)	Giá trị p
Giữa các tiểu quần thể	4	64,552	16,130	7,00	<0,001
Trong cùng tiểu quần thể	71	575,5	6,683	93,00	

Khoảng cách di truyền và phân nhóm

Khoảng cách di truyền và mức độ tương đồng di truyền giữa các tiểu quần thể nhận

được theo cách tính của Nei (1973) (Bảng 6). Kết quả chỉ ra rằng tiểu quần thể Thông xuân nha ở Đinh Pơmu và tiểu quần thể Tân Xuân có khoảng cách di truyền lớn nhất (0,453) và nhỏ

nhất (0,162) là giữa các tiểu quần thể Tân Xuân và Đỉnh VTV2. Tương tự, khi so sánh mức độ tương đồng di truyền thì các tiểu quần thể Tân Xuân và Đỉnh VTV2 là giống nhau nhiều nhất (0,842) và ít nhất là giữa các tiểu quần thể Đỉnh Pơmu và Tân Xuân (0,575).

Phân tích UPGMA (Unweighted Pair Group Method) trên cơ sở ma trận của kiểu gen (genotype) từ 15 môi ISSR cho mỗi cá thể trong loài theo phần mềm Winboot và NTSYS cũng đã chỉ ra mối quan hệ giữa các cá thể trong dưới loài Thông nghiên cứu (Hình 1). Kết quả chỉ ra các cá thể trong cùng một

tiểu quần thể có quan hệ gần gũi nhau về mặt di truyền và đều nằm co cụm vào từng nhóm riêng biệt trên biểu đồ hình cây và chia thành hai nhóm chính (I và II) riêng biệt có hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 0,53 đến 0,96. Nhóm chính I chia thành 2 phân nhóm I.1 và I.2 bao gồm các cá thể của hai tiểu quần thể Tân Xuân và Đỉnh VTV2. Nhóm 2 chia thành 2 phân nhóm II.1 và II.2 bao gồm các cá thể của ba tiểu quần thể Thác Nước, gần VTV2 và Đỉnh Pơmu. Kết quả phân nhóm trên biểu đồ tọa độ (PCA) (Hình 2) cũng phản ánh kết quả tương tự biểu đồ hình cây.

Bảng 6. Ma trận khoảng cách di truyền (dưới) và tương đồng di truyền (trên) giữa các cặp tiểu quần thể của dưới loài *Thông xuân nha* (theo Nei, 1973).

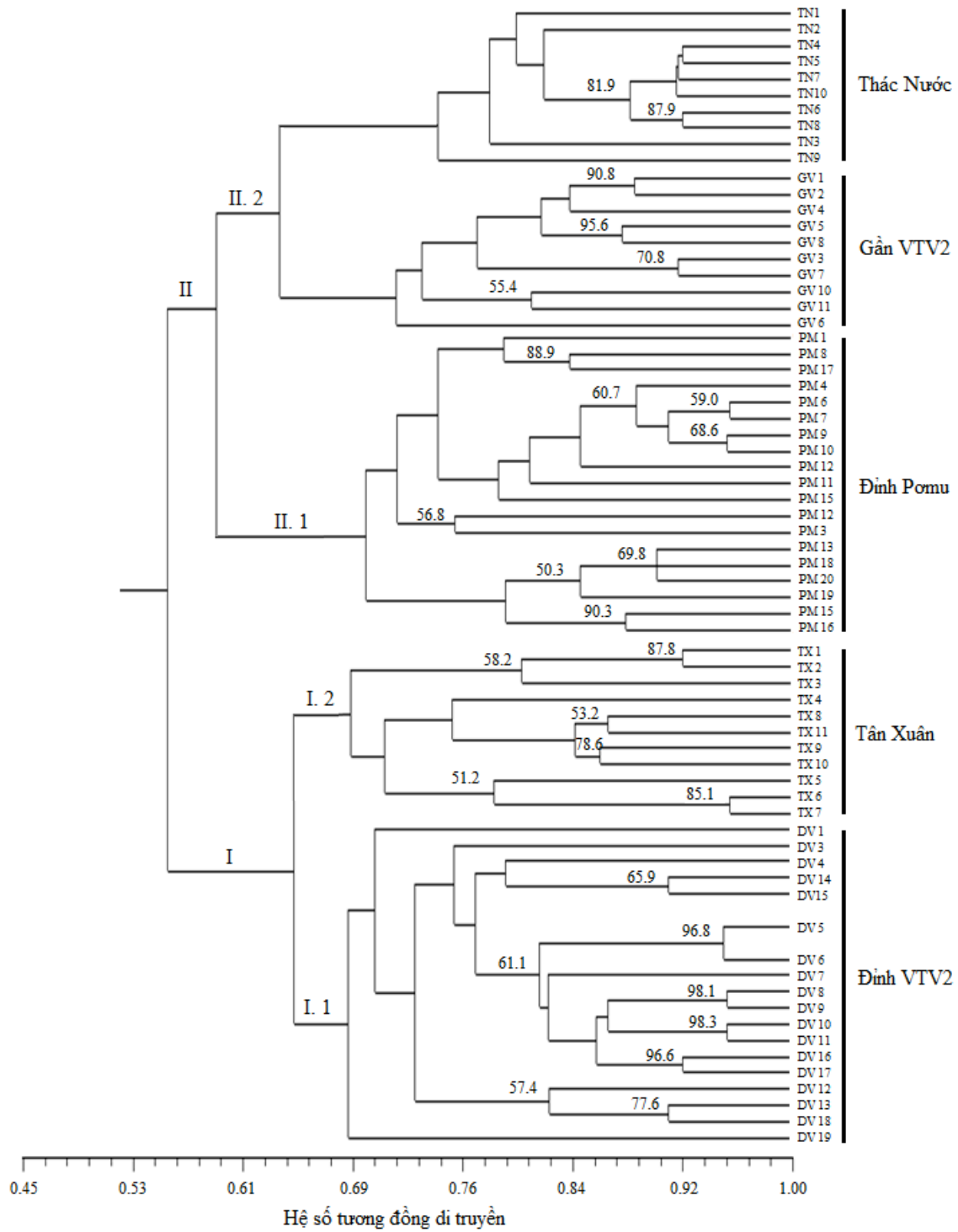
	Tân Xuân	Thác nước	Đỉnh VTV2	Gần VTV2	Đỉnh Pơ mu
Tân Xuân	-	0,832	0,842	0,702	0,575
Thác nước	0,172	-	0,647	0,817	0,730
Đỉnh VTV2	0,162	0,404	-	0,667	0,631
Gần VTV2	0,354	0,186	0,344	-	0,870
Đỉnh Pơ mu	0,453	0,314	0,374	0,139	-

Đề xuất việc bảo tồn

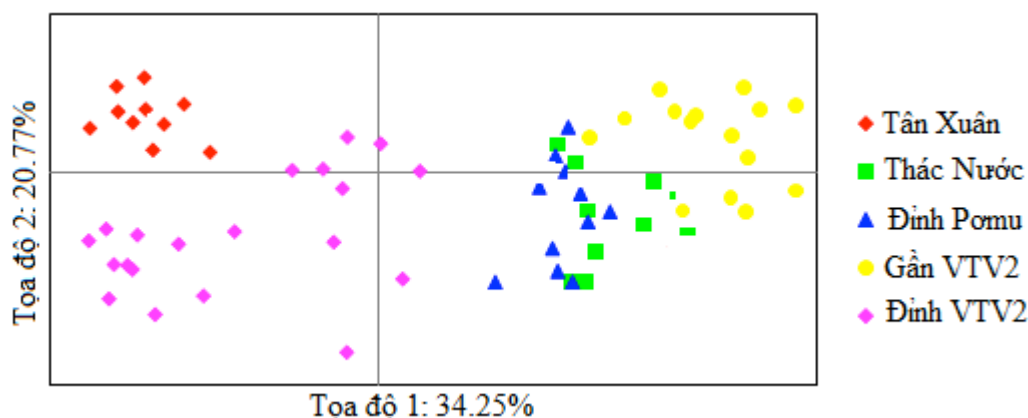
Mục tiêu chính trong bất kỳ chương trình bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật nào là duy trì được tính đa dạng nguồn gen di truyền hay duy trì liên tục sự tiến hóa của loài (Karp, 1997). Tiềm năng tiến hóa phụ thuộc vào mức độ đa dạng di truyền trong và giữa các quần thể của mỗi loài. Tại mức độ cá thể, tính đa dạng di truyền giảm do tần số gen đồng hợp tử cao ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức chịu đựng với môi trường sống. Đối với quần thể, giảm tính đa dạng di truyền có thể làm giảm cơ hội mà quần thể có khả năng thích nghi với môi trường sống bị biến đổi. Giảm đa dạng di truyền của loài sẽ làm giảm tiềm năng thích nghi với môi trường sống thay đổi trong phạm vi phân bố của chúng. Rõ ràng, sự tồn tại của loài phụ thuộc rất nhiều vào nguồn gen ở mức độ quần thể và cá thể. Như vậy, bảo tồn ở mỗi loài là khác nhau và phụ thuộc vào nguồn gen cụ thể của mỗi loài.

Từ kết quả khảo sát thực địa và phân tích đa

dạng di truyền nhận thấy dưới loài *Thông xuân nha* có tính đa dạng di truyền khá cao nên ưu tiên bảo tồn nguyên vị và cần có chiến lược thu thập hạt giống để bảo tồn nguồn tài nguyên tự nhiên, và việc trồng *Thông xuân nha* cần được khuyến khích. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự suy giảm tính đa dạng di truyền được tìm thấy bao gồm nơi sống của chúng bị phá hủy và suy giảm. Những mảnh rừng, nơi sống của chúng còn sót lại đều bị thu nhỏ và bị phân cắt. Quần thể của loài đều có kích thước nhỏ và bị cô lập. Mặc khác số lượng tiểu quần thể của chúng trong tự nhiên thấp. Điều này đã ảnh hưởng xấu đến hệ thống sinh sản của chúng. Sinh sản cận noãn xuất hiện với tần số cao. Hậu quả của quá trình này thường dẫn đến giảm tính đa dạng di truyền quần thể và loài, sau đó làm tăng khả năng nhiễm bệnh và giảm tính thích nghi trong môi trường sống. Hơn nữa, yếu tố khác cũng đóng vai trò quan trọng là khai thác cây rừng, đặc biệt các loài thuộc đối tượng bảo vệ càng làm tăng khả năng tuyệt chủng của chúng trong tương lai gần.



Hình 1. Biểu đồ hình cây của 71 mẫu của dưới loài Thông xuân nha theo hệ số di truyền của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA.



Hình 2. Biểu đồ đa chiều (PCA) của 71 mẫu của dưới loài Thông xuân nha theo hệ số di truyền của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA.

KẾT LUẬN

Tính đa dạng di truyền của dưới loài Thông xuân nha ở Khu BTTN Xuân Nha cao nhất ở tiểu quần thể Đình Pơmu ($I = 0.555$; $h = 0.8$; $PPB = 68.76\%$; $Ne = 1.6$ và $He = 0.4$) và thấp nhất ở tiểu quần thể Tân Xuân ($I = 0.428$; $h = 0.6$; $PPB = 57.06\%$, $Ne = 1.215$ và $He = 0.303$). Tổng mức độ thay đổi phân tử giữa các tiểu quần thể rất thấp là 7% và cao giữa các cá thể trong cùng quần thể 93%. Mọi quan hệ di truyền của 71 mẫu Thông xuân nha thu từ 5 tiểu quần thể phân tích với 15 chỉ thị ISSR chia thành hai nhóm chính có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,53 đến 0,96. Các cá thể trong cùng tiểu quần thể có quan hệ gần gũi nhau về mặt di truyền và đều nằm co cụm vào từng nhóm riêng biệt trên biểu đồ hình cây. Kết quả phân nhóm trên biểu đồ tọa độ (PCA) cũng phản ánh kết quả tương tự. Số allele hiệu quả (Ne) và hệ số gen dị hợp tử mong đợi (He) của tiểu quần thể Đình Pơmu đạt cao nhất ($Ne = 1.6$ và $He = 0.4$) và thấp nhất là tiểu quần thể Tân Xuân ($Ne = 1.215$ và $He = 0.303$). Tuy nhiên hệ số dị hợp tử của các tiểu quần thể khá cao (0,347). Vì thế cần phải có chiến lược bảo tồn nguyên vị cả ở mức cá thể và quần thể.

Lời cảm ơn: Đề tài này được hỗ trợ bởi nguồn kinh phí thuộc đề tài Nafosted mã số 106.11-2012.30 do Phan Kế Lộc làm chủ nhiệm và sự hỗ trợ một số trang thiết bị của quỹ bảo tồn động vật hoang dã (IDEAWILD) cho Vũ Đình Duy và Bùi Thị Tuyết Xuân năm 2015.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arif M, Zaidi NM, Singh YP, Haq QMR, Singh US (2009) A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). *Plant Mol Biol Rep* 27: 488–495.
- Averyanov LV, Nguyen TH, Khang KN, Pham TV, Lamxay V, Bounphanmy S, Lorphengsy S, Phan LK, Lanorsavanh S, Chantthavongsa K (2014) Gymnosperms of Laos. *Nord J Bot* 32: 765–805.
- Bornet B, Branchard M (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 19: 209–215.
- Carrasco B, Retamales JB, Quiroz K, Garriga M, Caligari PDS, Gonzales RG (2013) Inter simple sequence repeat markers associated with flowering time duration in the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*). *J Agr Sci Tech* 15: 1195–1207.
- Chung JD, Lin TP, Tan JC, Lin MY, Hwang SY (2004) Genetic diversity and biogeography of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae), an island species in Taiwan: a comparison with *Cunninghamia lanceolata*, a mainland species in China. *Mol Phylogenet Evol* 33: 791–801.
- Cipriano J, Carvalho A, Fernandes C, Gaspar MJ, Pires J, Bento J, Roxo L, Louzada J, Lima-Brito J (2013) Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *J Genet* 92: e41–e48.
- Đình Thị Phong, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu (2015a) Genetic variation of *Pinus dalatensis* Ferre' (Pinaceae) populations - endemic species in Vietnam revealed by ISSR markers. *J Chem Bio Phy Sci Sec B* 5(2): 1415–1425.

- Đinh Thị Phòng, Nguyễn Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Quốc Bình, Vũ Đình Duy, Nguyễn Tiến Hiệp, Phạm Hữu Nhân (2015b) Đánh giá đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài Kim giao núi đất (*Nageia wallichiana* (C. Presl) Kuntze) ở Tây Nguyên bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(1): 131–141.
- Feng FJ, Han SJ, Wang HM (2006) Genetic diversity and genetic differentiation of natural *Pinus koraiensis* populations. *J For Res* 17: 21–24.
- Goldstein DB, Schlotterer C (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford Press, Oxford UK.
- Isshiki S, Iwata N, Khan MMR (2008) ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *Scientia Horti* 117: 186–190.
- Karp A (1997) *Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: A Guide to the Technologies*. Biodiversity International, Rome, Italy.
- Larionova AY, Ekart AK, Kravchenko AN (2007) Genetic diversity and population structure of Siberian fir (*Abies sibirica* Leder.) in Middle Siberia, Russia, Eusian. *J For Res* 10 (2): 185–192.
- Mahdizadeh V, Safaie N, Goltapeh EM (2012) Genetic diversity of sesame isolates of *Macrophomina phaseolina* using RAPD and ISSR markers. *Trakia J Sci* 10(2): 65–74.
- Nguyen DTL, Phan VT, Dang XT, Ha CL, Phan KL (2013) *Pinus* aff. *armandii* Franch., a five needle pine, new occurrence for the conifer flora of Vietnam, In Proceedings of the 5th National Conference on Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Institute of Ecology and Biological Resources, *Agr Publ House*, Hanoi, 152–156.
- Liu GF, Dong JX, Jiang Y, Lu YF, Jiang J, Zhao GY (2005) Analysis of genetic relationship in 12 species of section *Strobus* with ISSR markers. *J For Res* 16: 213–215.
- Moraga AR, Perez DC, Lucas-Borja ME, Tiscar PA, Viñegla B, Linares JC, Gómez-Gómez L, Ahrazem O (2013) Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles. *Int Jour Mol Scien* 13: 5645–5658.
- Nei M (1973) Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321–3323.
- Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thúy Hạnh, Nguyễn Hoàng Nghĩa (2005) Nghiên cứu quan hệ di truyền của một số loài thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae) ở Việt Nam dựa trên đa hình DNA genome và lục lạp. “Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống”. Kỳ yếu Hội nghị toàn quốc, *Nxb KH & KT*, Hà Nội: 1379–1382.
- Nguyen Minh Tam, Nguyen Thi Hoa, Nguyen Thi Phuong Trang (2009) Genetic variation in threatened conifer *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* using ISSR markers, Implications for conservation, *J Biol* (Hanoi) 31: 66–72.
- Nguyen Minh Tam, Nguyen Thi Phuong Trang, Nguyen Thi Hoa (2011) Genetic diversity of an endangered species, *Fokienia hodginsii* (Cupressaceae). *Afr J Biotech* 10(71): 15838–15844.
- Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy and Nguyen Minh Duc (2013) Preserve of threatened Conifers (Cupressaceae) in Vietnam. *Cur Rese J Biol Sci* 5(4): 141–148.
- Nguyen Minh Tam, Phan Ke Loc, Vu Dinh Duy (2015) Genetic diversity in Xuan nha pine (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan). *Res J Biotech* 10(3): 30–36.
- Parasharami VA, Thengane SR (2012) Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances. *Int J Biodivers Conserv* 4 (5): 219–227.
- Peakall R, Smouse PE (2006) *GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Australian National University, Canberra, Australia (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>).
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15 (1): 8–15.
- Phan KL, Phan VT, Ha CL, Nguyen DTL (2014) Updated knowledge to Xuan nha pine *Pinus armandii* Franch. subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan in Vietnam, *Econ Ecol J* (Vietnam) 46: 66–75.
- Rao NK (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *Afr J Biotechnol* 3(2): 136–145.
- Rohlf FJ (1992) *NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0*. State University of New York (Stony Brook, New York).
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants, *Afr J Biotechnol* 5 (25): 2540–2568.
- The IUCN Red list of threatened species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 January 2015.
- Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Tiến Hiệp, Đinh Thị Phòng (2015) Tính đa dạng nguồn gen di truyền loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) - Loài đặc hữu hẹp ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 53 (2): 169–179.
- Wang MB, Hao ZZ (2010) Rangeland genetic diversity in natural populations of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*). *Biochem Genet* 48: 590–602.
- Wu ZY, Liu JF, Hong W, Pan DM, Zheng SQ (2011)

Genetic diversity of natural and planted *Glyptostrobus pensilis* populations: a comparative study. *Chinese J Appl Ecol* 22 (4): 873.

Yang C P, Wei L, Jiang J, Liu GF, Zhao GY (2005) Analysis of genetic diversity for nineteen populations of *Pinus sibirica* Du Tour with technique of ISSR. *J Northeast For Univ* 33: 1–3.

Yap IV, Nelson RJ (1996) *Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence of UPGMA-based dendrograms*, IRRI, Manila.

Zhang ZY, Chen YY, Li DZ (2005) Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochem Genet* 43: 239-249.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY AND MOLECULAR VARIATION IN NATURAL POPULATIONS OF *PINUS ARMANDII* SUBSP. *XUANNHAENSIS* L.K. PHAN - AN ENDEMIC SPECIES IN SON LA, VIETNAM USING ISSR MARKERS

Vu Dinh Duy^{1,2,✉}, Bui Thi Tuyet Xuan^{1,3}, Do Thi Phuong Thao⁵, Phan Ke Loc⁴, Nguyen Minh Tam²

¹College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, P.R China

²Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology

³Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

⁴Hanoi University of Science, Vietnam National University, Vietnam

⁵Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Pinus armandii subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan is a new five needle pine discovered recently from Xuan Nha Nature Reserve, Son La province. This subspecies is considered as a narrow endemic to Vietnam and is assessed as endangered. In this study, 15 ISSR markers were used to analyze the genetic diversity of this taxon collected in five subpopulations (Tan Xuan, Thac Nuoc, Dinh VTV2, Near VTV2 and Dinh Pomu). Results of the analysis showed 15/15 markers were polymorphic. A total of 51 DNA fragments were amplified, in which 50 fragments were polymorphic (98.04%). Genetic diversity was the highest in Dinh Pomu subpopulation ($I = 0.555$; $h = 0.8$; $PPB = 68.76\%$; $N_e = 1.6$ and $He = 0.4$) and the lowest in Tan Xuan subpopulation ($I = 0.428$; $h = 0.6$; $PPB = 57.06\%$, $N_e = 1.215$ and $He = 0.303$). Analysis of molecular variance (AMOVA) results showed that the total level of molecular changes between subpopulations was 7% and between individuals in the same subpopulation was 93%. A constructed dendrogram based on similarity matrix of 71 *Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan samples divided the samples into two main groups with genetic similarity coefficients ranged from 0.53 to 0.96. Results of the molecular analysis showed that *Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan species should be protected at the population level.

Keywords: Conservation, genetic diversity, ISSR, *Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan, Xuan Nha Nature Reserve

✉ Author for correspondence: E-mail: duyvu@vnmn.vast.vn