

ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI VÊN VÊN (*ANISOPTERA COSTATA* KORTH) Ở RỪNG PHÒNG HỘ TÂN PHÚ, HUYỆN ĐỊNH QUÁN, TỈNH ĐỒNG NAI

Đặng Phan Hiền¹, Nguyễn Minh Đức^{2,6}, Nguyễn Phan Lan Hồng³, Bùi Thị Tuyết Xuân⁴, Vũ Đình Duy⁵, Nguyễn Minh Tâm^{1,6,✉}

¹Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Đại học Mở Hà Nội, Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

⁴Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁵Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga, Bộ Quốc phòng

⁶Học viện Khoa học và Công nghệ, 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: 11.3.2020

Ngày nhận đăng: 02.7.2020

TÓM TẮT

Vên vên (*Anisoptera costata* Korth) là loài phân bố rộng ở rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ và Tây Nguyên và đang bị đe dọa ở cả 2 mức độ Quốc gia và Toàn cầu. Để bảo tồn và phát triển bền vững loài Vên vên ở Việt Nam, chúng tôi đã phân tích đa dạng di truyền của loài này tại rừng phòng hộ Tân Phú tỉnh Đồng Nai, trên cơ sở 8 cặp chỉ thị sinh học microsatellite từ 64 cây thuộc 3 quần thể khác nhau (Thác Mai, Miếu Cô Năm và Bầu Nước). Kết quả phân tích đã chỉ ra đa dạng di truyền của cả 3 quần thể đều ở mức trung bình. Hệ số gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng tương ứng là 0,242 và 0,269. Đa dạng di truyền thấp được tìm thấy ở quần thể Miếu Cô Năm (Hệ số gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng là 0,145 và 0,175). Quần thể Miếu Cô Năm có hệ số cận loài cao hơn (0,168) so với 2 quần thể còn lại. Mức độ đa dạng di truyền giữa các quần thể cũng ở mức trung bình (0,179) và chỉ ra sự trao đổi di truyền bị hạn chế ($N_m = 1,15$). Kết quả này phản ánh kích thước quần thể và nơi sống bị suy giảm, tuy nhiên, quá trình trao đổi di truyền vẫn được tiến hành, nhưng ở mức độ bị giới hạn. Để bảo tồn và phát triển bền vững loài này ở Tân Phú, ngoài công tác bảo tồn nguyên vị, thì cần tăng cường công tác bảo tồn chuyển vị bằng hình thức thu thập hạt để làm tăng kích thước quần thể, đặc biệt quần thể Miếu Cô Năm.

Từ khóa: Bảo tồn, Đa dạng di truyền, Microsatellite, Phân cắt nơi sống, Vên vên

MỞ ĐẦU

Vên vên (*Anisoptera costata* Korth), họ Dầu Dipterocarpaceae hiện phân bố ở miền Nam Trung bộ, Đông Nam Bộ, Tây Nguyên và Kiên Giang và mở rộng sang Campuchia, Lào và Thái Lan (Nghĩa, 2005). Đây là loài sinh sản lưỡng tính và thụ phấn nhờ côn trùng. Vên vên là một loài quan trọng và đóng vai trò chủ đạo trong hệ sinh thái và kinh tế của khu vực rừng mưa nhiệt đới núi đất thấp tại Việt Nam. Gỗ Vên vên phù hợp với mục đích xây dựng như làm cột nhà,

thuyền gỗ dán, cột điện chiếu sáng và chống thấm. Loài này được phân bố rộng rãi ở rừng rụng lá thường xanh và khô các loại đá phù sa cô, đá granit và đá bazan với cấu trúc thấp, độ dốc một cách nhẹ nhàng và những thặng trầm của mực nước có tác dụng nhanh chóng trong cả hai mùa khô và mùa mưa. Loài thích độ ẩm cao khác nhau, 75 – 85% và lượng mưa cao 1500 – 2200 mm và nhiệt độ trung bình hàng năm từ 25 – 27°C và mùa khô kéo dài 4-6 tháng.

Trong những năm gần đây, do khai thác quá

quá mức bởi người dân địa phương và các doanh nghiệp lâm nghiệp, môi trường sống của loài Vên vên bị phân cắt và suy giảm mạnh. Các mảnh rừng còn sót lại hiện nay là hậu quả của quá trình phân cắt và thường bị giới hạn về kích thước. Do đó, việc duy trì tính đa dạng di truyền và môi trường sống của các loài Dầu được xem xét như là công việc ưu tiên trong hoạt động bảo tồn. Loài này được ghi nhận trong các mảnh rừng thứ sinh còn sót lại ở các tỉnh miền Nam Việt Nam và được đưa vào danh sách các loài có nguy cơ tuyệt chủng trong các danh mục IUCN (Nguyen *et al.*, 2017) và Sách đỏ Việt Nam (BKHCN, VKHCNVN, 2007).

Bảo tồn và quản lý một loài đòi hỏi các thông tin về sinh thái và tính đa dạng di truyền trong và giữa các quần thể. Để có được thông tin đó, phải có sự hiểu biết về kỹ thuật sinh học phân tử. Kỹ thuật Microsatellite (SSR - simple sequence repeats) là một trong những công cụ được sử dụng phổ biến cho việc đánh giá đa dạng di truyền ở thực vật và kỹ thuật này có tiềm năng, liên quan đến đa hình cao và tính kế thừa đồng trội trong genome, và lợi thế cho việc nghiên cứu di truyền các loại cây quý hiếm. Trên thế giới, kỹ thuật Microsatellite được ứng dụng phổ biến cho các nghiên cứu về đa dạng di truyền đối với một số loài cây họ Dầu (Rachmat *et al.*, 2012; Trang *et al.*, 2014; Harada *et al.*, 2018; Vu *et al.*, 2019).

Mức độ đa dạng di truyền cao của loài sẽ đảm bảo 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 của loài sẽ đảm bảo tiềm năng tiến hoá ở các thế hệ tiếp theo. Công trình nghiên cứu về sinh học sinh thái, đặc biệt mức độ đa dạng di truyền loài và quần thể của loài Vên vên có rất ít và tản mạn. Điều này rất khó để các nhà quản lý đưa ra các giải pháp bảo tồn, phục hồi và phát triển bền vững loài này ở Việt Nam. Trong những năm gần đây, chỉ thị Microsatellite được ứng dụng rộng rãi, nhanh và có hiệu quả trong việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài, do tính đa hình cao và phổ biến trong gen nhân. Chỉ thị phân tử này đã được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền cho nhiều loài cây

họ Dầu đang có nguy cơ bị đe dọa (Ujino *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 2004; Vu *et al.*, 2019). Chính vì vậy, mục đích của bài báo này, đánh giá đa dạng di truyền của loài Vên vên tại rừng phòng hộ Tân Phú, huyện Định Quán, Tỉnh Đồng Nai bằng chỉ thị Microsatellite, làm cơ sở để đưa ra các giải pháp bảo tồn hiệu quả cho loài này ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

Vên vên (*Anisoptera costata* Korth) là cây gỗ, cao đến 30-40 cm, đường kính lớn nhất đạt đến 80 cm, thân thẳng, tròn. Vỏ màu xám nâu. Cây già vỏ có rãnh sâu. Lá đơn mọc cách, phiến lá hình bầu dục, thuôn nhỏ, gốc lá tròn hoặc hình tim. Lá dài 10-18 cm, rộng 5-8 cm, gân nổi rõ ở mặt dưới. Cụm hoa chum, mọc ở nách hoặc tận cùng, dài 10-16 cm, 30-35 nhị. Quả hình cầu, màu nâu, có 2 cánh lớn và 3 cánh nhỏ. Quả chín vào tháng 4 và tháng 5 hàng năm. Mỗi quả chỉ có một hạt duy nhất (Hình 1).

Rừng phòng hộ Tân Phú huyện Định Quán tỉnh Đồng Nai nằm ở tọa độ 107°20' - 107°27' Đông và 11°2'32'' - 11°10' Bắc, trong vành đai hệ sinh thái dưới 500 m bao gồm đồng bằng và gò, đồi thấp. Thảm thực vật nơi đây chủ yếu là rừng ẩm thường xanh nhiệt đới rất phong phú và đa dạng, phân bố các loài cây chủ yếu như họ Dầu (Dipterocarpaceae), họ Thầu Dầu (Euphorbiaceae), họ Đậu (Fabaceae).

Tách chiết DNA tổng số và phản ứng PCR

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu 64 mẫu vỏ cây Vên vên trưởng thành thuộc 3 tiểu khu của rừng phòng hộ Tân Phú, bao gồm Thác Mai, Miếu Cô Năm và Bầu Nước (Bảng 1). Mẫu được thu ngẫu nhiên và được bảo quản bằng silicagel và sau đó bảo quản trong tủ - 45°C cho đến khi mẫu được tách chiết. DNA tổng số tách chiết bằng phương pháp CTAB (Doyle, Doyle, 1987) đã được cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Khoảng 100 mg mẫu được nghiền trong nitrogen lỏng bằng Mixer mill MM400. Nồng độ DNA được xác định bằng máy Nanodrop hoặc điện di trên

gel agarose 0,8%. Sau khi loại RNA bằng Enzyme RNase. Cuối cùng, nồng độ DNA sẽ được pha loãng đến 10ng/ μ L.

Phản ứng PCR được tiến hành với thể tích 25 μ L, bao gồm 1x PCR buffer (10 mM TrisHCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 0.2 mM cho mỗi dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10 ng DNA mẫu, 1.25 U Tag DNA polymerase and 10 pmol cho mỗi chỉ thị xuôi hoặc ngược. Sử dụng 8 cặp mồi SSR để đánh giá đa dạng di truyền (Bảng 2).

Quá trình nhân bản được thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 9700 theo chu trình nhiệt như sau: Biến tính ban đầu: 94°C trong 3 phút; tiếp theo lặp lại 35 chu kỳ gồm

có Biến tính: 94°C trong 30 giây, Bắt cặp: 52-56°C trong 30 giây (tùy thuộc vào mỗi cặp mồi) và Kéo dài: 72°C trong 30 giây; Phản ứng kết thúc hoàn toàn: 72°C trong 10 phút. Giữ sản phẩm ở 4°C cho đến khi điện di. Điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide 7% trong 50 ml dung dịch TAE 1x trên bộ điện di Sequi-Gen (BIO-RAD, Mỹ), nhuộm GelRedTM Nucleotic Acid Gel Stain và chụp ảnh trên máy soi gel BioDocAnalyze (BIOMETRA, Đức). Kích thước allele được xác định bởi phần mềm Gel-Analyzer GenoSens1850 (Clinx Sci. Instruments Co. Ltd) với thang marker 25bp DNA (Invitrogen).



Hình 1. Cây Vên vên ở Tân Phú (Đồng Nai)

Bảng 1. Địa điểm thu mẫu và số mẫu phân tích di truyền.

| Địa điểm thu mẫu | Số mẫu | Độ cao (m) | Vĩ độ Bắc | Kinh độ Đông |
|------------------|--------|------------|-----------|--------------|
| Thác Mai | 22 | 110 - 128 | 11°11' | 107°21' |
| Miếu Cô Năm | 19 | 108 - 125 | 11°06' | 107°24' |
| Bàu Nước | 23 | 82 - 125 | 11°03' | 107°22' |

Bảng 2. Danh sách tám mồi SSR dùng trong nghiên cứu.

| Mồi | Trình tự mồi (5'-3') | Số nucleotide lặp lại | Kính thước sản phẩm (bp) | Nhiệt độ bắt cặp (T _m °C) | Tài liệu |
|-------|---|---|--------------------------------|--|----------------------------|
| dipt1 | F: ATGCTTACCACCAATGTGAATG R: CTCGCAGCAGAACAACCTTTCTA | (GA) ₆ | 117-153 | 54 | Terauchi, 1994 |
| dipt2 | F: TAGGGCATATTGCTTTCTCATC R: CTTATTGCAGTCATCAAGGGAA | (AG) ₁₅ | 219-249 | 54 | Isagi <i>et al.</i> , 2002 |
| dipt3 | F: TGGCAAACAAGCTACTGTTCAT R: CATGGGTTTAGCAACCTACACA | (TA) ₈ | 169-205 | 52 | Isagi <i>et al.</i> , 2002 |
| dipt4 | F: CTTCCCTAAATCCCCAATGTT R: TAATGGTGTGTGTACCAGGCAT | (AG) ₁₅ | 198-216 | 55 | Isagi <i>et al.</i> , 2002 |
| dipt5 | F: ACAATGAACTTGACCACCCAT R: CAAAAGGACATACCAGCCTAGC | (GA) ₂₄ | 212-240 | 55 | Isagi <i>et al.</i> , 2002 |
| dipt6 | F: GCT ATT GGC AAG GAT GTT CA R: CTT ATG AGA TCA ATT TGA CAC | (CT) ₈ (CA) ₁₀ CT(CA) ₄ CTCA | 148-212 | 56 | Ujino <i>et al.</i> , 1998 |
| dipt7 | F: ATG TCC ATG TTT GAG TG R: CAT GGA CAT AAG TGG AC | (CT) ₈ CA(CT) ₅ CACCC(CTCA) ₃ CT(CA) ₁₀ | 168-218 | 54 | Ujino <i>et al.</i> , 1998 |
| dipt8 | F: 5'- ATC TGT TCT TCT ACA AGC C R: 5- TTA GAA CTT GAG TCA GAT AC | (CT) ₄ TT(CT) ₅ | 156-192 | 54 | Ujino <i>et al.</i> , 1998 |

Phân tích số liệu

Các thông số đa dạng di truyền được xác định bởi phần mềm FSTAT v.2.9.4 (Goudet, 2003) trên cơ sở tần số allele của mỗi locus, bao gồm số allele cho một locus (N_A), hệ số F (F_{IS}<0 - hệ số cận noãn) và hệ số khác nhau giữa các cặp quần thể (F_{ST}). Thêm vào đó, hệ số gen dị hợp tử quan sát (H_O), hệ số gen dị hợp tử kỳ vòng (H_E), Giá trị trung bình của sự thiếu hụt gen di hợp tử (H_{IT}) được xác định bởi GENALEX (Peakall, Smouse, 2012). Chỉ số locus đa hình được xác định theo Cervus (Kalinowski *et al.* 2007). Tần số allele lặn được

xác định theo Micro-Checker (van Oosterhout *et al.*, 2004). Hệ số cận noãn được hiệu chỉnh cho tần số allele lặn trên cơ sở mô hình cận noãn ở mức cá thể (IIM) sử dụng INEst (Chybicki, Buczzyk 2009). Dòng gen được xác định theo công thức N_m = [(1/F_{ST}) - 1]/4. Kiểm định giả thiết từ phương trình HW tại mỗi locus được thực hiện theo GENEPOP v. 4.6 (Rousset, 2008). Phân tích ở mức độ phân tử (AMOVA) được thực hiện bởi phần mềm ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Phân tích Bayesia được thực hiện theo STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) và xác định nhóm tối ưu theo STRUCTURE HARVESTER (Earl, von-Holdt,

2012) dựa trên giá trị ΔK theo Evanno *et al.* (2005).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng số 64 mẫu vỏ cây Vên vên trưởng thành ở rừng phòng hộ Tân Phú, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai đã được phân tích và sản sinh ra 20 allele khác nhau từ 8 locus. Kiểm định giả thuyết cũng đã chỉ ra 14 trong tổng số 28 ở mức độ locus cho toàn bộ mẫu là có ý nghĩa ($p < 0,05$). Các thông số đa dạng di truyền ở mỗi locus được trình bày ở Bảng 3. Số allele cho một locus dao động từ 1,3 ở locus dipt3 đến 2,3 ở 3 locus dipt2, dipt6 và dipt8. Số allele hữu hiệu cho một locus từ 1,2 ở 2 locus dipt3 và 4 đến 1,6 ở 2 locus dipt2 và 6. Hệ số locus đa hình cao được tìm thấy ở dipt6 (0,517) và thấp nhất tại locus dipt4 (0,139). Năm trong tổng số 8 locus có sự thiếu hụt gen dị hợp tử dưới phương trình

Hardy-Weinberg (HW) và chỉ ra hiện tượng cận noãn hoặc allele lặn xuất hiện ở loài Vên vên. Phần mềm Micro-Checker đã xác định được tần số allele lặn tại mỗi locus (Bảng 3). Tần số allele lặn cao được xác định ở locus dipt1 (0,237). Không tìm thấy allele lặn ở 2 locus dipt4 và 5. Hệ số gen dị hợp tử quan sát (H_O) dao động từ 0,101 ở locus dipt3 đến 0,342 ở locus dipt6. Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng (H_E) dao động từ 0,121 ở dipt3 đến 0,370 ở dipt2. Mức độ di truyền khác nhau là thấp ở locus dipt5 (0,018) và cao ở locus dipt6 (0,396). Giá trị thiếu hụt gen dị hợp tử (F_{IT}) là thấp ở 2 locus dipt4 (-0,066) và dipt5 (-0,009) và cao ở locus dipt6 (0,432). Mức độ khác nhau di truyền trung bình giữa các allele trong mỗi locus loài Vên vên (F_{ST}) là 0,179 và chỉ ra trao đổi di truyền trung bình giữa các allele trong một locus là cao, $N_m = 4,297$. Kết quả này có thể liên quan đến trao đổi di truyền cao ở locus dipt5 ($N_m = 13,318$).

Bảng 3. Đa dạng di truyền mức độ locus của loài Vên vên.

| Loci | N_A | N_E | PIC | H_O | H_E | F | Null allele | F_{IT} | F_{ST} | N_m |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------|----------|----------|--------|
| dipt1 | 2 | 1,5 | 0,375 | 0,225 | 0,333 | 0,325 | 0,237 | 0,549 | 0,333 | 0,502 |
| dipt2 | 2,3 | 1,6 | 0,344 | 0,306 | 0,370 | 0,178* | 0,087 | 0,196 | 0,028 | 8,571 |
| dipt3 | 1,3 | 1,2 | 0,145 | 0,101 | 0,121 | 0,164* | 0,104 | 0,309 | 0,173 | 1,193 |
| dipt4 | 1,7 | 1,2 | 0,139 | 0,151 | 0,129 | -0,171 | no | -0,066 | 0,089 | 2,552 |
| dipt5 | 2 | 1,4 | 0,251 | 0,293 | 0,285 | -0,028 | no | -0,009 | 0,018 | 13,318 |
| dipt6 | 2,3 | 1,6 | 0,517 | 0,342 | 0,364 | 0,060 | 0,201 | 0,432 | 0,396 | 0,382 |
| dipt7 | 1,7 | 1,4 | 0,294 | 0,264 | 0,219 | -0,204 | 0,097 | 0,229 | 0,359 | 0,446 |
| dipt8 | 2,3 | 1,5 | 0,291 | 0,252 | 0,334 | 0,243 | 0,118 | 0,268 | 0,033 | 7,417 |
| Trung bình | 2 | 1,4 | 0,294 | 0,242 | | 0,070 | | 0,238 | 0,179 | 4,297 |

Chú thích: N_A Số allele, N_E allele hữu hiệu, PIC Hệ số locus đa hình, H_O and H_E Gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng, F Hệ số fix, F_{IT} Giá trị của sự thiếu hụt gen dị hợp tử, F_{ST} Hệ số khác nhau giữa các cặp quần thể, N_m Số cá thể di cư, * $p < 0,01$.

Tại mức độ quần thể, tỉ lệ phần trăm locus đa hình được tìm thấy ở cả 3 quần thể. Tuy nhiên, tỉ lệ đa hình cao nhất ở quần thể Bàu Nước (100%) và thấp hơn ở cả 2 quần thể Miếu Cô Năm và Thác Mai (75%), trung bình 83,3% (Bảng 4). Số allele cho một locus là cao ở quần thể Bàu Nước, trong khi đó 2 quần thể Miếu Cô Năm và Thác Mai là tương đương (1,9). Allele hiếm được xác định ở 2 quần thể Miếu Cô Năm và Bàu Nước, tương ứng là 0,164 và 0,183. Hệ số gen dị hợp quan sát và hệ số gen dị hợp từ kỳ vọng là cao ở quần thể Bàu Nước ($H_o = 0,348$ và $H_E = 0,363$), tiếp theo quần thể Thác Mai ($H_o = 0,233$ và $H_E = 0,271$). Quần thể Miếu Cô Năm có hệ số gen dị hợp từ quan sát và kỳ vọng là thấp nhất (Bảng 4). Hệ số Fix (F_{IS} , - hệ số cận Noon) là dương ở cả 3 quần thể, và chỉ ra sự thiếu hụt gen dị hợp từ ở cả 3 quần thể. Tuy nhiên, hệ số dương thấp nhất xuất hiện ở quần thể Bàu Nước, và phản ánh tính đa dạng di truyền cao ở quần thể này. Hệ số cận Noon được hiệu chỉnh cho allele lặn dựa trên cơ sở mô hình cận Noon cá thể ($F_{IS}IIM$) là khác nhau, dao động từ 0,079 ở quần thể Bàu Nước đến 0,210 ở quần thể Miếu Cô Năm, trung bình 0,134, cũng chỉ ra vượt trội của gen đồng hợp từ trong mỗi quần thể.

Kết quả chỉ ra loài Vên vên ở Tân Phú có tính đa dạng di truyền thấp so với một số loài, như *Shorea leprosula* ($H_o = 0.63-0.66$, $H_E = 0.69-0.71$, Nguyen *et al.*, 2004), *Shorea robusta* ($H_o = 0.68$, $H_E = 0.68$, Pandey, Geburek, 2011). Tuy nhiên, kết quả này cũng tương đương với một số loài dầu khác như loài *Shorea leprosula*,

Parashorea malaanonan ($N_A = 3.7$, $H_o = 0.26$, $H_E = 0.46$, Abasolo *et al.*, 2009), *S. javanica* ($N_A = 3.0$, $H_o = 0.281$, $H_E = 0.477$, Rachmat *et al.*, 2012), *Hopea odorata* ($N_A = 2.7$, $H_o = 0.366$, $H_E = 0.356$, Trang *et al.*, 2014), *Dipterocarpus alatus* ($N_A = 2.2$, $H_o = 0.209$, $H_E = 0.239$, Tam *et al.*, 2014; $N_A = 2.3$, $H = 0.223$, Vu *et al.*, 2019) and *D. costatus* ($N_A = 2.3$, $H = 2.2$, Vu *et al.*, 2018; $N_A = 2.3$, $H_o = 0.13$, $H_E = 0.151$, Duc *et al.*, 2016). Kết quả nghiên cứu đã phản ánh một số ảnh hưởng của con người đến tính đa dạng di truyền của loài Vên vên ở rừng phòng hộ Tân Phú như nơi sống bị phân cắt và suy giảm, số lượng cá thể của loài Vên vên thấp. Kết quả cũng nhận thấy giá trị cận Noon được tìm thấy ở cả 3 quần thể Vên vên tại 3 điểm nghiên cứu, tuy nhiên, giá trị cao được tìm thấy ở quần thể Miếu Cô Năm ($F_{IS} = 0,168$), điều này chỉ ra sự thiếu hụt gen di hợp từ trong quần thể và của loài Vên vên ở Tân Phú.

Phân tích sự khác nhau ở mức độ phân tử (AMOVA) được trình bày ở Bảng 5, và chỉ ra sự khác nhau chủ yếu xuất hiện ở mức độ cá thể, chiếm 64,68%. Mức độ khác nhau thấp xuất hiện giữa các cá thể trong quần thể ở rừng phòng hộ Tân Phú, chiếm 9,04%. Kết quả nghiên cứu cũng phản ánh được mức độ khác nhau trong loài ở mức trung bình (0,179) và chỉ ra dòng gen giữa các quần thể vẫn được duy trì cao ($N_m > 1$). Dẫn liệu này có thể giả thiết loài Vên vên thụ phấn nhờ gió và côn trùng tham gia phát tán hạt. Sóc ăn và làm rơi quả cũng đã được xác định ở Tân Phú trong thời gian khảo sát.

Bảng 4. Đa dạng di truyền của 3 quần thể loài Vên vên ở Tân Phú.

| Quần thể | N | P (%) | N_A | A_P | H_o (SE) | H_E (SE) | F_{IS} (SE) | $F_{IS} IIM$ |
|-------------|----|-------|-------|-------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Miếu Cô Năm | 19 | 75 | 1,9 | 0,164 | 0,145 (0,043) | 0,175 (0,05) | 0,168 | 0,210 |
| Thác Mai | 22 | 75 | 1,9 | no | 0,233 (0,055) | 0,271 (0,067) | 0,112 | 0,113 |
| Bàu Nước | 23 | 100 | 2,1 | 0,183 | 0,348 (0,048) | 0,363 (0,033) | 0,050 | 0,079 |
| Trung bình | | 83,3 | 2 | | 0,242 (0,032) | 0,269 (0,033) | 0,104 | 0,134 |

Chú thích: N Số mẫu, P (%) Tỉ lệ phần trăm locus đa hình, N_A Số allele cho một locus, A_P Tần số allele hiếm, H_o và H_E Hệ số gen dị hợp từ quan sát và kỳ vọng, F_{IS} Hệ số Fix, $F_{IS}IIM$ Hệ số cận Noon cho allele lặn.

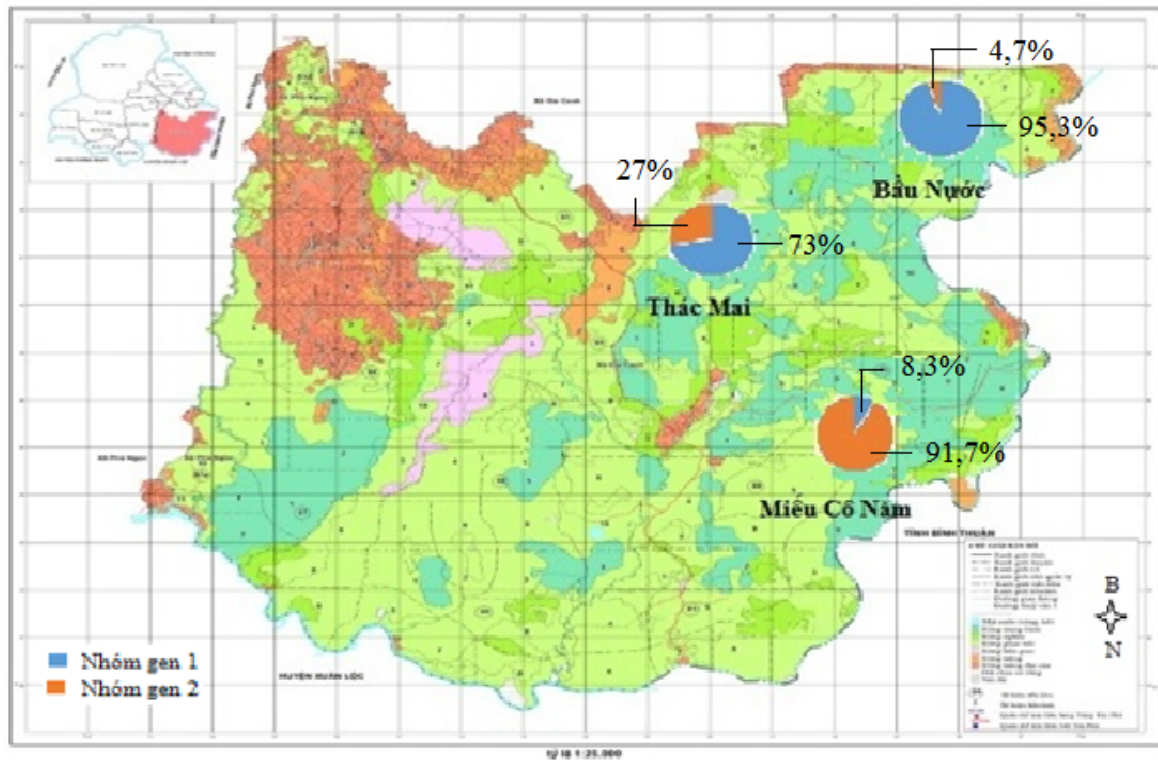
Bảng 5. Phân tích AMOVA của loài Vên vên ở Tân Phú.

| | df | Tổng bình phương | Thành phần khác nhau | Phần trăm khác nhau (%) |
|--------------------------------|----|------------------|----------------------|-------------------------|
| Giữa các quần thể | 2 | 36,8 | 0,403 | 26,28 |
| Giữa các cá thể trong quần thể | 61 | 77,45 | 0,139 | 9,04 |
| Giữa các cá thể | 64 | 63,5 | 0,992 | 64,68 |

Chú thích: df: mức tự do

Phân tích nhóm sử dụng phần mềm STRUCTURE đã chỉ ra mối quan hệ di truyền giữa các cá thể hoặc giữa ba quần thể loài Vên vên ở Tân Phú (Hình 2). Kết quả cho thấy hai nhóm gen ở rừng phòng hộ Tân Phú đã được xác định. Nhóm gen 1 chiếm ưu thế ở 2 quần

thể còn lại là Thác Mai (73%) và Bàu Nước (95,3%). Nhóm gen 2 chiếm ưu thế ở quần thể Miếu Cồ Năm với 91,7%, Kết quả này đã chỉ ra sự trao đổi di truyền giữa các quần thể vẫn được duy trì ở Tân Phú, những ở mức giới hạn ($N_m = 1,15$).



Hình 2. Mối quan hệ di truyền giữa 2 nhóm gen trong ba quần thể Vên vên ở Tân Phú.

KẾT LUẬN

Tính đa dạng di truyền thấp ở quần thể Miếu Cô Năm và cao hơn ở 2 quần thể còn lại tại Thác Mai và Bầu Nước và điều này có thể liên quan đến hệ số cận noãn ở Miếu Cô Năm. Tính đa dạng của cả 3 quần thể ở rừng phòng hộ Tân Phú đều ở mức trung bình. Tuy nhiên, tính đa dạng di truyền cao của 2 quần thể Thác Mai và Bầu Nước sẽ làm suy giảm hệ số cận noãn của quần thể Miếu Cô Năm và làm tăng mức độ đa dạng di truyền của quần thể này trong tương lai. Thu thập hạt như là nguồn để thiết lập số cá thể cần thiết để kết nối di truyền giữa các quần thể ở Tân Phú.

Lời cảm ơn: Bài báo được hỗ trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, NVCC33-04/20-20.

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 Sci* 138: 23-28.

BKHCN và VKHCNVN (Bộ Khoa học và Công nghệ và Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) (2007) *Sách đỏ Việt Nam*. Nhà Xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

Chybicki IJ, Buczyc J (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficient. *J Hered* 100: 106–113.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.

Duc NM, Duy VD, Xuan BTT, Thang BV, Ha NTH, Tam NM (2016) Genetic structure in threatened *Dipterocarpus costatus* populations in lowland tropical rainforests of southern Vietnam. *Genet Mole Res* 15(4). <http://dx.doi.org/10.4238/gmr15048821>

Earl DA, von-Holdt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Cons Genet Res* 4: 359-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin v. 3.0. an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinformatics online* 1: 47–50.

Goudet J (2003) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.4). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Finkeldey R, Hattemer HH (2007) Tropical forest genetics. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-37398-8.

Isagi V, Kenta T, Nakashizuka T (2002) Microsatellite loci for a tropical emergent tree, *Dipterocarpus tempehes* V. S1 (Dipterocarpaceae). *Mol Ecol Notes* 2: 12–13. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00127.x>.

Harada K, Dwiyanti FG, Siregar IS, Subiakto A, Chong L, Diway B, Lee YF, Ninomiya I, Kamiya K (2018) Genetic variation and genetic structure of two closely related dipterocarp species, *Dryobalanops aromatica* C.F.Gaertn. and *D. Beccarii* Dyer. *J Bot Gard Hort* 16: 179–187.

Kalnowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16(5): 1099-1106. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x.

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* 13: 657-669. doi: 10.1046/j.1365-294X.2004.0294.x.

Nghia NH (2005) *Dipterocarps of Vietnam*. Nhà xuất bản Nông thôn.

Nguyen HN, Vu VD, Luu HT, Hoang VS, Pooma R, Khou E, Nanthavong K, NEWMAN MF, Ly V (2017) Barstow. *Anisoptera costata*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T33166A2833752. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3>.

Pandey M, Geburek T (2009) Successful cross-amplification of *Shorea* microsatellites reveals genetic variation in the tropical tree, *Shorea robusta*

- Gaertn. *Hereditas* 146: 29-32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.2009.02070.x>.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rachmat HH, Kamiya K, Harada K (2012) Genetic diversity, population structure and conservation implication of the endemic Sumatran lowland dipterocarp tree species (*Shorea javanica*). *Int J Biodiv Cons* 4: 573–583. doi: 10.5897/IJBC12.045.
- Rousset F (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Res* 8: 103–106.
- Terauchi R (1994) A polymorphic microsatellite marker from the tropical tree *Dryobalanops lanceolata* (Dipterocarpaceae). *Japan J Genet* 69: 567–576. <http://dx.doi.org/10.1266/jjg.69.567>
- Trang NTP, Huong TT, Duc NM, Tim S, Triest L (2014) Genetic population of threatened *Hopea odorata* Roxb. in the protected areas of Vietnam. *J Vietn Env* 6: 69–76. doi: 10.13141/jve.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley DF (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 435–538. . <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vu DD, Bui TTX, Nguyen MD, Shah SNM, Vu DG, Zhang Y, Nguyen MT and Huang XH (2019) Genetic diversity and conservation of two threatened dipterocarps (Dipterocarpaceae) in southeast Vietnam. *J For Res* 30(5): 1823–1831. doi.org/10.1007/s11676-018-0735-1.
- Ujino T, Kawaharam 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. *Hereditas* 81: 422–428. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00423.x>.

GENETIC VARIATION OF *ANISOPTERA COSTATA* IN TAN PHU TROPICAL FOREST, DINH QUAN DISTRICT, DONG NAI PROVINCE

Dang Phan Hien¹, Nguyen Minh Duc², Nguyen Phan Lan Hong³, Bui Thi Tuyet Xuan⁴, Vu Dinh Duy⁵, Nguyen Minh Tam^{1,6}

¹Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

³Hanoi Open University

⁴Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

⁵Vietnam - Russia Tropical Centre

⁶Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Anisoptera costata Korth, an endangered species is distributed in lowland tropical forests of southern Vietnam. Habitat loss and over-exploitation are the major reasons for threatening this species. Eight polymorphic microsatellite markers were used to analyze 64 adult trees from three *A. costata* populations in lowland tropical forests of Tan Phu, Dinh Quan district, Dong Nai Province in Southeast Vietnam to detect the effects of deforestation on gene flow and the differentiation among populations in lowland tropical forests. The results showed that all *A. costata* populations have the moderate levels of the genetic diversity within populations with mean values of observed and expected heterozygosities, 0.242 and 0.269, respectively, moderate genetic differentiation among *A. costata* populations (0.179), and indicating limited gene flow ($N_m = 1.15$). Analysis of molecular variance indicated high genetic variation within populations (64.68%) and indicating

moderate genetic structure in *A. costata* in Tan Phu. Bayesian analysis detected two genetic lineages, cluster 1 including one population of Mieu Co Nam and cluster 2 including two populations, Thac Mai and Bau Nuoc. These results contribute understanding genetic diversity of *A. costata* in lowland forests of Southeastern Vietnam and will provide guidelines for conservation, management and resoration of the species.

Keywords: *Anisoptera costata*, genetic diversity, species conservation, SSRs