

THÔNG SỐ VỀ TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ TỰ NHIÊN LOÀI ĐÌNH TÙNG (*CEPHALOTAXUS MANNII* HOOK. F.) Ở TÂY NGUYÊN, VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ SSR

Đình Thị Phòng, Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền

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

Ngày nhận bài: 22.3.1016

Ngày nhận đăng: 25.6.2016

TÓM TẮT

Đình tùng (*Cephalotaxus mannii* Hook.f.) là một trong số 15 loài lá kim có ở Tây Nguyên. Đình tùng là một cây có giá trị dược liệu và đặc hữu của khu vực trung tâm phía nam của Trung Quốc và Việt Nam. Ở Việt Nam, mặc dù loài phân bố rộng rãi (Lào Cai, Hà Giang, Thanh Hóa, Nghệ An, Thừa Thiên Huế, Kon Tum, Gia Lai, Lâm Đồng ...) nhưng được coi là hiếm và sắp tuyệt chủng bởi sự khai thác bừa bãi của con người. Trong nghiên cứu này, 18 chỉ thị SSR đã được sử dụng để phân tích tính đa dạng di truyền của 34 cá thể Đình tùng thu ở Tà Nung và Hiệp An, tỉnh Lâm Đồng. Kết quả phân tích đã chỉ ra 12/18 chỉ thị có tính đa hình. Tổng số đã nhân bản được 36 phân đoạn DNA, trong đó 24 phân đoạn đa hình (chiếm 66,66%). Tính đa dạng di truyền ở quần thể Hiệp An cao hơn ($h = 0,269$; $I = 0,449$ và $PPB = 72,22\%$) so với quần thể Tà Nung ($h = 0,433$; $I = 0,264$ và $PPB = 66,67\%$). Tổng mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các quần thể là 27,74% và giữa các cá thể trong cùng quần thể là 72,26%. Hệ số di nhập gen (Nm) trung bình của loài Đình tùng là 3,310. Cả hai quần thể Tà Nung và Hiệp An đều có hệ số giao phần cận loài $Fis < 0$ (- 0,244 và - 0,052, tương ứng) và xuất hiện allele hiếm (Ap) (0,222 và 0,333, tương ứng). Biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 34 mẫu Đình tùng với chỉ thị SSR chia thành hai nhánh chính có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 65% (Cpm31 và Cpm32) đến 100% (Cpm16 và Cpm17, Cpm21 và Cpm22). Thông qua kết quả phân tích phân tử cho thấy loài Đình tùng cần có chiến lược sớm để bảo tồn loài ở mức quần thể.

Từ khóa: Allele hiếm, *Cephalotaxus mannii*, đa dạng di truyền quần thể, SSR, Tây Nguyên

MỞ ĐẦU

Tây Nguyên được xem là cái nôi cho nhiều loài lá kim của Việt Nam. Hầu hết chúng là những loài lá kim có giá trị khoa học và kinh tế cao. Nhiều loài đang đứng trước nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng, trong đó có loài Đình tùng. Theo Nguyễn Tiến Hiệp ở Việt Nam loài phân bố ở một số vùng núi từ Bắc vào Nam (Điện Biên, Lai Châu, Lào Cai, Hà Giang, Cao Bằng, Tuyên Quang, Hà Nội, Hòa Bình, Thanh Hóa, Quảng Bình, Quảng Trị, Kon Tum, Lâm Đồng và Ninh Thuận) tuy nhiên số lượng cá thể vô cùng ít ỏi (Phan Kế Lộc *et al.*, 2013). Theo Quy Bảo tồn Thiên nhiên quốc tế (IUCN) 2015 (Liao, Yang, 2013), Đình tùng (toàn cầu) được xếp vào bậc sắp nguy cấp (VU A2cd), theo đánh giá của Phan Kế Lộc *et al.*, 2013 thì Đình tùng của Việt Nam được xếp ở thứ hạng sắp bị tuyệt chủng VU A4acd, B1,2ab, C. 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, còn nghiên cứu đa dạng di truyền cho loài Đình tùng ở Tây Nguyên thì hầu như chưa có. Trong số các kỹ thuật phân tử thì kỹ thuật

SSR được xem 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 trên thế giới và Việt Nam (Arif *et al.*, 2009; Isshiki *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Xuất phát từ các cơ sở khoa học trên đây, công trình này trình bày kết quả nghiên cứu “Thông số về tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài Đình tùng ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị SSR” làm cơ sở cho việc đề xuất giải pháp bảo tồn, sử dụng và phát triển bền vững tính đa dạng sinh học ở Tây Nguyên nói riêng và Việt Nam nói chung.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Ba mươi tư mẫu lá hoặc vỏ thân (mỗi mẫu là một cá thể, chiều cao từ > 0,5 m đến 20 m) thu tại Tà Nung và Hiệp An tỉnh Lâm Đồng được sử dụng để phân tích phân tử. Các mẫu được bảo quản trong túi nhựa dẻo có chứa silicagel ngay tại thực địa và chuyển đến phòng thí nghiệm giữ ở nhiệt độ phòng

đến khi sử dụng. Thông tin của các mẫu nghiên cứu như trong bảng 1.

Trình tự 18 chỉ thị SSR (Simple Sequence

Repeat) trong nghiên cứu được khai thác từ các tài liệu (Bảng 2). Tổng hợp các môi SSR bởi công ty IDT, Hoa Kỳ (Intergarated DNA Technology, USA).

Bảng 1. Thông tin của các mẫu Đỉnh từng sử dụng trong nghiên cứu phân tử.

Quản thể	Địa điểm	Số mẫu	Ký hiệu mẫu	Tọa độ		
				Vĩ độ (°N)	Kinh độ (°E)	Độ cao (so mặt nước biển) (m)
Tà Nung	Tà Nung, Đà Lạt, Lâm Đồng	5	Cpm1- Cpm5	11° 56' 01.3"	108° 23' 12.5"	1364
Hiệp An	Hiệp An, Đức Trọng, Lâm Đồng	29	Cpm6 - Cpm34	11° 50' 13.3"	108° 25' 37.5"	1392

Bảng 2. Trình tự nucleotide và nhiệt độ gắn mỗi của 18 chỉ thị SSR.

Chi thị	Trình tự	Tài liệu tham khảo	Nhiệt độ bắt cặp (°C)
1	CO4 5' TCAGGCTTTAGATCTTGGGAATGT 3' 3' GTGGTGGGAGTTCCGGAGTTTT 5'	Miao <i>et al.</i> , 2012	52
2	CO7 5' GAGGAGGTTCAAGGTGGTCT 3' 3' CCCACTTCCTCCAGCAATAC 5'	Miao <i>et al.</i> , 2012	52
3	CO15 5' TCCAAGGATGCACATTCAAT 3' 3' AAACAAAACCTCACTCAATGAA 5'	Miao <i>et al.</i> , 2012	54
4	CO17 5' ACCTAAGGGTGCTTGGAGATA 3' 3' GATGATGACACCTGTTATGCC 5'	Miao <i>et al.</i> , 2012	53
5	CT08 5' TTTATGAGTTCAAGAGGAGTATGT3' 3' TGAGTAAGGGCGTAGCAG 5'	Pan <i>et al.</i> , 2011	51
6	Pt15169 5' CTTGGATGGAATAGCAGCC 3' 3' GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA 5'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996	53
7	Pt26081 5' CCCGTATCCAGATATACTTCCA 3' 3' TGTTTTGATTTCATTTCGTTTCAT 5'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996	52
8	Pt36480 5' TTTTGGCTTACAAAATAAAAGAGG 3' 3' AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA5'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996	53
9	Pt71936 5' TTCATTGGAATACACTAGCCC 3' 3' AAAACCGTACATGAGATTCCC 5'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996	54
10	Pt110048 5' TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA 3' 3' TTCGATATTGAACCTTGGACA 5'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996	50
11	PtTX3020 5' GTCGGGGAAGTGAAAGTA 3' 3' CTAGGTGCAAGAAAAGAGTAT 5'	Elsik <i>et al.</i> , 2000	51
12	PtTX3030 5' AATGAAAGGCAAGTGTCG 3' 3' GAGATGCAAGATAAAGGAAGTT 5'	Elsik <i>et al.</i> , 2000	53
13	PtTX3034 5' TCAAAATGCAAAAGACG 3' 3' ATTAGGACTGGGGATGAT 5'	Elsik <i>et al.</i> , 2000	53
14	PtTX3037 5' CGTTTGGAGCACTACTT 3' 3' AAGTCACTTAATGCAATATGTA 5'	Elsik <i>et al.</i> , 2000	52
15	Pinus02 5' GTCCCTGGCTTGCAGACTAT 3' 3' ACACACACACACAGAGAGAGAG 5'	Hung <i>et al.</i> , 2012	55
16	ITPH4516 5' TGATGCAAACAAGTTCCATG 3' 3' AGCACTCGCTAAACTATGAAGG 5'	Mariettea <i>et al.</i> , 2011	54
17	PRE13 5' GATGTGCTTTAGGCTCGTTGC 3' 3' AGGGTTAGTAATCACGGCCTGT 5'	Boys <i>et al.</i> , 2005	52
18	RPS2 5' CATGGTGTGGTTCATTGTTCCA 3' 3' TGGAGGCTATCACGTATGCACC 5'	Echt <i>et al.</i> , 1996	51

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). Kiểm tra độ sạch trên gel agarose 0,9% và đo nồng độ DNA tổng số trên máy UVS 2700, Labomed, Hoa Kỳ.

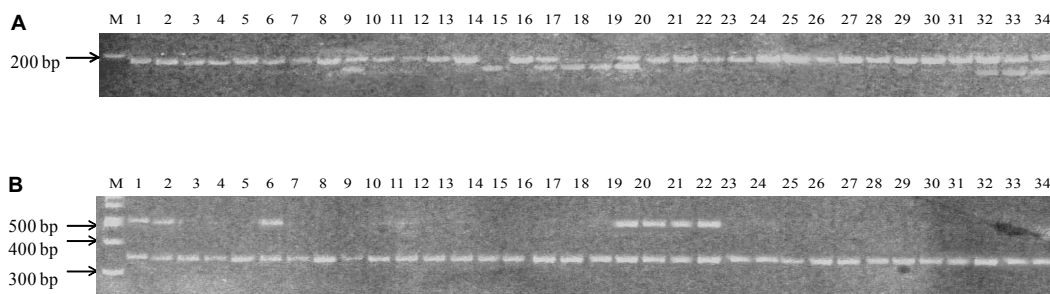
Phản ứng PCR_SSR và phân tích số liệu: Phản ứng nhân gen được thực hiện trên máy PCR system 9700 (Hoa Kỳ) với tổng thể tích 25 μ l. Thành phần của phản ứng, chu trình nhiệt và phân tích một số thông số về tính đa dạng di truyền như trong công bố của Trần Thị Liễu và đồng tác giả (2015) và Đinh Thị Phòng và đồng tác giả (2014).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa dạng di truyền

Mười tám chỉ thị SSR đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền cho 34 mẫu Đinh tùng thuộc 2 quần thể thu ở Lâm Đồng thì có 12 chỉ thị thể hiện tính đa hình giữa các mẫu nghiên cứu. Tổng số đã nhân bản được 36 phân đoạn, trong đó có 24 phân đoạn đa hình (chiếm 66,67%). Các phân đoạn nhân bản được có kích thước trong khoảng từ 100 đến 500 bp. Giá trị trung bình hàm lượng thông tin đa hình (PIC) và đa dạng gen trong một locus (H_j) là 0,170 và 0,186, tương ứng, trong đó chỉ thị Pt71936 có hàm lượng thông tin đa hình cao nhất (0,461) và chỉ thị ITPH4516 có giá trị đa dạng gen trong một locus cao nhất (0,457) (Bảng 3). Kết quả điện di sản phẩm PCR của 34 mẫu Đinh tùng với chỉ thị PtTX3020 và Pt71936 đại diện cho 18 chỉ thị SSR được thể hiện

trong Hình 1. Các thông số di truyền của quần thể Đinh tùng được phân tích ở cả mức độ quần thể và loài đã chỉ ra quần thể Đinh tùng ở Hiệp An có tính đa dạng di truyền cao hơn ($h = 0,269$; $I = 0,449$ và $PPB = 72,22\%$) so với quần thể Tà Nung ($h = 0,264$; $I = 0,433$ và $PPB = 66,67\%$) (Bảng 4). Hệ số gen dị hợp tử mong đợi (H_e) ở quần thể Hiệp An (0,308) cao hơn so với quần thể Tà Nung (0,306), trong khi đó hệ số gen dị hợp tử quan sát (H_o) ở quần thể Tà Nung lại cao hơn so với quần thể Hiệp An (0,411 so với 0,330). Điều này cho phép nhận định quần thể Đinh tùng ở Hiệp An bị thiếu hụt gen dị hợp tử. Số allele hiếm (A_p) đã tìm thấy cả trong hai quần thể Tà Nung ($A_p = 0,222$) và Hiệp An ($A_p = 0,333$). Ở mức độ quần thể, chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (I) và theo Nei (h) của quần thể Đinh tùng là 0,441 và 0,266, tương ứng. Mức đa dạng này cao hơn so với loài *Pinus krempfii* ở Tây Nguyên ($I = 0,377$; $h = 0,137$), loài *C. koreana* của Hàn Quốc ($I = 0,344$) (Đinh Thị Phòng *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2014). Hệ số gen dị hợp tử của quần thể Đinh tùng của Tây Nguyên ở mức trung bình ($H_e = 0,307$; $H_o = 0,370$) và thấp hơn khi so sánh với loài *C. oliveri* của Trung Quốc ($H_e = 0,604$; $H_o = 0,538$ đối với quần thể ở Quảng Châu), ($H_e = 0,566$; $H_o = 0,583$ đối với quần thể ở Vân Nam) và ($H_e = 0,533$; $H_o = 0,588$ đối với quần thể ở Giang Tây) (Miao *et al.*, 2012). Tuy nhiên, khi so sánh mức độ dị hợp tử (H_e) giữa một số loài lá kim trong chi *Cephalotaxus* cho thấy, loài Đinh tùng *C. mannii* ($H_e = 0,307$) ở Tây Nguyên, Việt Nam cao hơn so với loài *C. mannii* ($H_e = 0,135$) và loài *C. oliveri* ($H_e = 0,118$) của Trung Quốc, loài *C. koreana* của Hàn Quốc ($H_e = 0,224$) (Xiang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2014)



Hình 1. Sản phẩm PCR-SSR của 34 mẫu Đinh tùng với chỉ thị PtTX3020 (A) và Pt71936 (B) trên gel polyacrylamide 6% (giếng 1 - 34 thứ tự sắp xếp của các mẫu Đinh tùng từ Cpm1 - Cpm34), M: marker phân tử 100 bp).

Bảng 3. Giá trị PIC, đa dạng gen trong một locus và tỷ lệ phân đoạn đa hình của 34 mẫu Đình tùng phân tích với chỉ thị SSR.

TT	Chỉ thị	Kích thước (bp)	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tổng số phân đoạn	% phân đoạn đa hình	Đa dạng gen trong một locus (H _j)
1	CO4	180 - 270	0,000	0	2	2	0	0,000
2	CO7	150 - 175	0,216	1	1	2	50	0,219
3	CO15	250 - 250	0,000	0	1	1	0	0,000
4	CO17	295 - 295	0,000	0	1	1	0	0,000
5	CT08	320 - 480	0,216	1	1	2	50	0,219
6	Pt15169	400 - 450	0,259	2	0	2	100	0,450
7	Pt26081	250 - 300	0,262	2	0	2	100	0,431
8	Pt36480	300 - 300	0,000	0	1	1	0	0,000
9	Pt71936	140 - 180	0,461	4	0	4	100	0,285
10	Pt110048	100 - 100	0,000	0	1	1	0	0,000
11	PtTX3020	185 - 195	0,419	3	0	3	100	0,367
12	PtTX3030	200 - 240	0,000	0	2	2	0	0,000
13	PtTX3034	100 - 105	0,351	1	1	2	50	0,080
14	PtTX3037	260 - 305	0,278	3	0	3	100	0,300
15	Pinus02	350 - 500	0,273	1	1	2	50	0,163
16	ITPH4516	290 - 305	0,196	2	0	2	100	0,457
17	PRE13	115 - 160	0,070	2	0	2	100	0,208
18	RPS2	195 - 210	0,051	2	0	2	100	0,166
Tổng			3,052	24	12	36	-	3,345
Trung bình			0,170	1,333	0,667	2	66,67	0,186

Xem xét ở khía cạnh giao phần (*Fis*) trong quần thể đạt giá trị trung bình là - 0,148 (*Fis* = - 0,244 ở Tà Nung và *Fis* = - 0,052 ở Hiệp An) (Bảng 4). Điều này cho thấy khả năng giao phần chéo tương đối cao trong cả 2 quần thể. Để có thêm cơ sở đánh giá đa dạng di truyền quần thể Đình tùng, chúng tôi cũng đã quan tâm đến kết quả phân tích các thông số di truyền cho từng chỉ thị SSR. Kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 5 cho thấy, mức độ di nhập gen (*Nm*) trong quần thể Đình tùng khi phân tích với các chỉ thị SSR tương đối cao, dao động từ 0,500 (chỉ thị PtTX3034) đến 17,813 (chỉ thị ITPH4516), trung bình 3,310. So sánh với loài *Pinus krempfii* ở Tây Nguyên, Việt Nam cho thấy mức độ di nhập gen của loài Đình tùng cao hơn (3,310 so với 2,315, tương ứng) (Đình Thị Phòng *et al.*, 2014).

Cấu trúc di truyền

Phân tích mức độ thay đổi phân tử giữa các quần thể và giữa các cá thể Đình tùng đối với chỉ thị SSR chỉ ra, tổng mức độ thay đổi phân tử rất thấp giữa các quần thể (27,74%) và cao giữa các cá thể trong cùng quần thể (72,26%) với giá trị $P < 0,001$ (Bảng 6). Cho đến nay, chưa có công bố nào về mức độ đa dạng di truyền của quần thể Đình tùng ở Việt Nam. Trong nghiên cứu của Du *et al.*, 2002, Xiang *et al.*, 2001 cũng mới chỉ ra tính đa dạng di truyền của quần thể *C. mannii* ở Trung Quốc nhưng chưa nghiên cứu mức độ thay đổi phân tử giữa các quần thể. Tuy nhiên, khi so sánh loài Đình tùng ở Việt Nam với loài *C. koreana* ở Hàn Quốc (Hong *et al.*, 2014) cho thấy mức độ thay đổi phân tử giữa các quần thể cao hơn (27,74% so với 13,9%, tương ứng)

và giữa các cá thể trong quần thể là thấp hơn (72,26% so với 86,1%, tương ứng).

Thông qua kết quả phân tích tổng mức độ thay đổi phân tử rất thấp giữa các quần thể (27,74%) và cao giữa các cá thể trong cùng quần thể (72,26%) của loài Đinh tùng ở Tây Nguyên đã cho thấy mức độ bảo thủ rất cao trong hệ gen của loài. Đây chính là yếu tố

di truyền của bất kỳ một loài sinh vật nào đó. Mức độ thay đổi phân tử cao giữa các cá thể trong quần thể của loài Đinh tùng ở Tây Nguyên là tín hiệu tốt cho việc bảo toàn tính đa dạng di truyền. Khía cạnh này cũng được phản ánh khi phân tích các thông số di truyền như hệ số di nhập gen Nm , Fis ,... trong bảng 4 và bảng 5.

Bảng 4. Một số thông số di truyền của quần thể Đinh tùng phân tích với chỉ thị SSR

Quần thể	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>h</i>	PPB (%)	<i>Ap</i>	<i>Fis</i>
Tà Nung	5	1,667	1,574	0,433	0,411	0,306	0,264	66,67	0,222	-0,244
Hiệp An	29	1,778	1,585	0,449	0,330	0,308	0,269	72,22	0,333	-0,052
Trung bình	17	1,722	1,580	0,441	0,370	0,307	0,266	69,45	0,277	-0,148
Loài	34	2,0	1,627	0,496	0,342	0,326	0,291	77,78	-	-

Ghi chú: *N*: Số mẫu; *Na*: Số allele quan sát trung bình; *Ne*: Số allele hiệu quả; *I*: Chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon; *Ho* và *He*: Hệ số gen di hợp tử quan sát và mong đợi; *h*: Chỉ số đa dạng di truyền theo Nei; PPB: Phần trăm phân đoạn đa hình; *Ap*: Số allele hiếm trên một locus; *Fis*: Hệ số giao phần cận loài với $p < 0,05$.

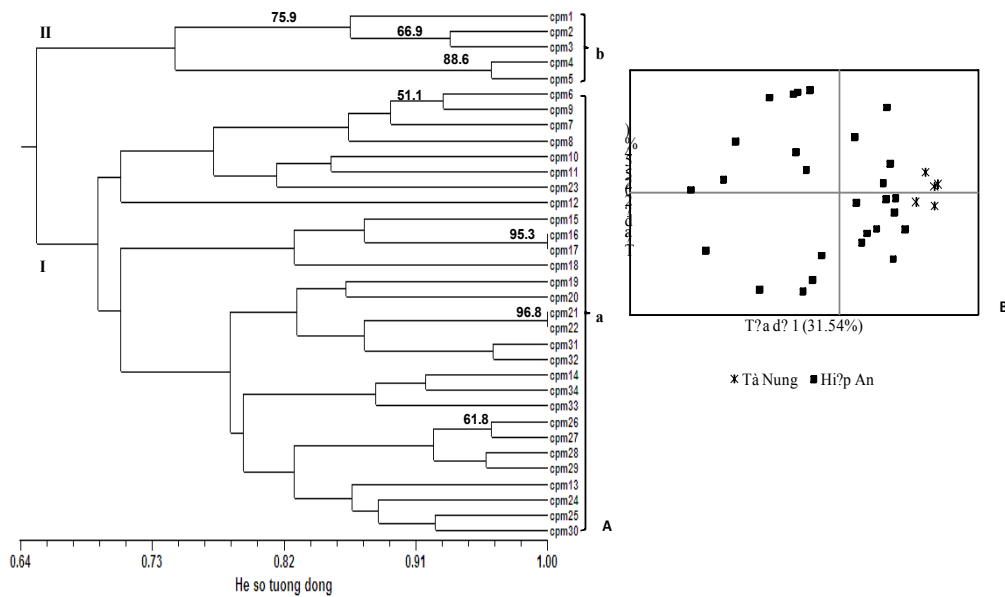
Bảng 5. Một số thông số di truyền của quần thể Đinh tùng phân tích với từng chỉ thị SSR.

Chỉ thị	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>Fst</i>	<i>Nm</i>
CO4	2,00	2,000	0,693	1,000	0,500	-1	0	-
CO7	2,00	1,497	0,490	0,421	0,316	-0,331	0,048	4,916
CO15	1,00	1,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
CO17	1,00	1,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
CT08	2,00	1,518	0,506	0,438	0,329	-0,331	0,038	6,261
Pt15169	1,50	1,471	0,339	0,069	0,243	0,716	0,261	0,708
Pt26081	1,50	1,471	0,339	0,069	0,243	0,716	0,261	0,708
Pt36480	1,00	1,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
Pt71936	2,50	1,907	0,739	0,490	0,471	-0,040	0,092	2,482
Pt110048	1,00	1,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
PtTX3020	2	1,951	0,680	0,269	0,487	0,448	0,157	1,341
PtTX3030	2,00	2,000	0,693	1,000	0,500	-1,000	0,000	-
PtTX3034	1,50	1,500	0,347	0,100	0,250	0,600	0,333	0,500
PtTX3037	2,00	1,989	0,690	0,845	0,497	-0,699	0,219	0,893
Pinus02	2,00	1,329	0,397	0,286	0,239	-0,199	0,026	9,220
ITPH4516	2,00	1,960	0,683	0,503	0,490	-0,028	0,014	17,813
PRE13	2,00	1,891	0,664	0,762	0,471	-0,618	0,057	4,160
RPS2	2,00	1,951	0,680	0,414	0,487	0,151	0,023	10,585
Trung bình	1,72	1,580	0,441	0,370	0,307	-0,115	0,109	3,310

Ghi chú: *Na*: Số allele quan sát trung bình; *Ne*: Số allele hiệu quả; *I*: Chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon; *Ho* và *He*: Hệ số gen di hợp tử quan sát và mong đợi; *h*: Chỉ số đa dạng di truyền theo Nei; PPB: Phần trăm phân đoạn đa hình; *Ap*: Số allele hiếm trên một locus; *Fis*: Hệ số giao phần cận loài với $p < 0,05$; *Fst*: Hệ số khác biệt di truyền; *Nm*: Hệ số di nhập gen.

Bảng 6. Mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa và trong quần thể Đinh tùng phân tích với chỉ thị SSR

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Thành phần biến đổi	Tổng sự biến đổi (%)	Giá trị P
Giữa các quần thể	1	22,384	2,010	27,74	< 0,001
Giữa các cá thể trong quần thể	32	167,586	5,237	72,26	



Hình 2. Biểu đồ hình cây theo phương pháp của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA (A) và Biểu đồ phân nhóm (B) thể hiện mối quan hệ di truyền của 34 mẫu Đinh tùng phân tích với 18 chỉ thị SSR (Ghi chú: a: mẫu ở Hiệp An, b: mẫu ở Tà Nung).

Khoảng cách di truyền và phân nhóm

Biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 34 mẫu Đinh tùng với chỉ thị SSR (Hình 2) chia thành hai nhánh chính I và II riêng biệt có hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 65 (Cpm31 và Cpm32) đến 100% (Cpm16 và Cpm17, Cpm21 và Cpm22). Trong đó nhánh chính I gồm 29 mẫu có nguồn gốc ở Hiệp An, có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng từ 69 đến 100%. Nhánh chính II gồm 5 mẫu Cpm1, Cpm2, Cpm3, Cpm4 và Cpm5 có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng từ 74,8 đến 96% và đều có nguồn gốc ở Tà Nung.

Theo kết quả điều tra thực địa của chúng tôi cho thấy cả 2 quần thể Đinh tùng đều quá nhỏ về kích thước trong các mảnh rừng bị suy giảm, không quá 20 cá thể/quần thể.

Thêm vào đó, qua khảo sát về khả năng tạo hạt, nảy mầm và phát triển tại hai quần thể Tà Nung và Hiệp An cho thấy tỷ lệ tạo hạt và tái sinh cây mạ rất cao, nhưng chỉ có một tỷ lệ rất thấp (19,4%) (số liệu không chi ra ở đây) trong số đó phát triển thành cây có chiều cao 1 m. Lý do mà cây mạ không phát triển thành cây là do rễ cây mạ không nhận được dinh dưỡng bởi các lớp hồng của các tầng mùn tự nhiên hình thành. Việc mất môi trường sống cũng là nguy

cơ giảm quy mô quần thể. Vì vậy, mặc dù có tính đa dạng di truyền tương đối cao xong lại có nguy cơ đe dọa tuyệt chủng (thuộc khung EN). Vì thế, việc bảo tồn và duy trì tính đa dạng di truyền của loài cần được các nhà nghiên cứu quan tâm sớm.

KẾT LUẬN

Tính đa dạng di truyền của quần thể Đinh tùng ở Hiệp An cao hơn ($h = 0,269$; $I = 0,449$ và $PPB = 72,22\%$) so với quần thể Tà Nung ($h = 0,264$; $I = 0,433$ và $PPB = 66,67\%$). Tổng mức thay đổi phân tử (AMOVA) tương đối thấp giữa các quần thể (27,74%) và cao giữa các cá thể trong cùng quần thể (72,26%). Mức độ tương đồng di truyền của loài Đinh tùng ở Tây Nguyên dao động từ 65 đến 100%. Hệ số di nhập gen (Nm) trong quần thể Đinh tùng tương đối cao, trung bình là 3,310. Cả hai quần thể đều có hiện tượng trao đổi chéo cao (giá trị $Fis < 0$) đồng nghĩa với việc giao phối cận loài rất thấp. Số allele hiếm (Ap) đã tìm thấy cả trong hai quần thể Tà Nung (0,222) và Hiệp An (0,333) khi phân tích chỉ thị SSR. Thông qua hệ số Fis , sự xuất hiện của allele hiếm (Ap) và tổng mức độ thay đổi của quần thể rõ ràng cho thấy tính đa dạng di truyền ở mức bảo động, mặc dù có sự di nhập gen tương đối cao ở một số locus (ví dụ $Nm = 17,813$ đôi với chỉ thị

ITPH4516). Tuy nhiên việc mất môi trường sống và giảm đáng kể số lượng cá thể trong quần thể lại là nguy cơ dẫn đến sự tuyệt chủng của loài. Vì thế cần sớm có chiến lược bảo tồn ở mức cá thể và quần thể.

Lời cảm ơn: Đây là một phần kết quả nghiên cứu của đề tài mã số TN3/T15 thuộc Chương trình Tây Nguyên 3. Chủ nhiệm đề tài xin chân thành cảm ơn các thành viên và các cơ quan địa phương ở Tây Nguyên đã tham gia thực hiện đề tài.

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.
- Boys J, Cherry M, Dayanandan S (2005) Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations on red pine (*Pinus resinosa*, pinaceae). *Amer J Bot* 92(5): 833-841.
- Chen S, Sima Y, Fang B (2003) The genetic diversity of *Cephalotaxus oliveri* and its endangered causes. *J Northwest Forestry Univ* 18(2): 29-32 (Abstract in English).
- Du D, Su J, Fu Y, Zhou P, Ma W, Xiang Z (2002) Genetic diversity of *Cephalotaxus mannii*, a rare and endangered plant. *Acta Botanica Sinica* 44(2): 193-198 (Abstract in English).
- Đình Thị Phòng, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu, Nguyễn Tiến Hiệp (2014) Đánh giá tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị SSR. *Tạp chí Sinh học* 36(2): 210-219.
- Echt CS, May-Marquardt P, Hseih M, Zahorchak R (1996) Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39: 1102-1108.
- Elsik CG, Minihan VT, Hall SE, Scarpa AM, Williams CG (2000) Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43: 550-555.
- Hong KN, Kim YM, Park YJ, Lee JW (2014) Genetic diversity and population genetic structure of *Cephalotaxus koreana* in South Korea. *Korean J Plant Res* 27(6): 660-670.
- Hung KH, Lin CY, Huang CC, Hwang CC, Hsu TW, Ku YL, Wang WK, Hung CY, Chiang TY (2012) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Pinus massoniana* (Pinaceae). *Botanical Studies* 53: 191-196.
- Isshiki S, Iwata N, Khan MMR (2008) ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *Scientia Horti* 117:186–190.
- Liao W, Yang Y (2013) *Cephalotaxus mannii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T18625568A2804770.
- Mariettea S, Chagnéa D, Decroocqa S, Vendraminb GG, Lalanea C, Madura D, Plomiona C (2001) Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann For Sci* 58: 203-206.
- Miao Y, Lang X, Li S, Su J, Wang Y (2012) Characterization of 15 polymorphic microsatellite loci for *Cephalotaxus oliveri* (Cephalotaxaceae), a conifer of medicinal importance. *Int J Mol Sci* 13: 11165-11172.
- Pan HW, Guo YR, Su YJ, Wang T (2011) Development of microsatellite loci for *Cephalotaxus oliveri* (Cephalotaxaceae) and cross-amplification in *Cephalotaxus*. *Amer J Bot* e229-e232.
- Phan Kế Lộc, Phạm Văn Thê, Nguyễn Sinh Khang, Nguyễn Thị Thanh Hương, Averyanov LV (2013) *Trích yếu được cập nhật hóa Thông mộc tự nhiên ở Việt Nam*. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 5: 135- 143.
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plan Mol Biol Rep* 15(1): 8-15.
- Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Tiến Hiệp, Đình Thị Phòng (2015) Tính đa dạng nguồn gen di truyền và cấu trúc quần thể loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) – loài đặc hữu hẹp ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR.
- Vendramin GG, Lelli L, Rossi P, Morgante M (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol Ecol* 5: 595-598.
- Xiang Z, Liu Y, Du D (2001) Genetic diversity and population differentiation of *Cephalotaxus mannii* Hk.f. populations. *J Wuhan Botanical Res* 19(3): 220-224 (Abstract in English).
- Yang CP, 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.
- 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.

GENETIC DIVERSITY IN NATURAL POPULATIONS OF (*CEPHALOTAXUS MANNII* HOOK. F.) IN TAY NGUYEN, VIETNAM BASE ON SSR MARKERS

Đinh Thị Phòng[✉], Tran Thi Lieu, Vu Thi Thu Hien

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

SUMMARY

Cephalotaxus mannii Hook.f. is one of 15 species of conifer in the Central Highlands. *Cephalotaxus mannii* is a scarce medicinal conifer endemic to the south central region of China and Vietnam. In Vietnam, although widely distributed species (Lao Cai, Ha Giang, Thanh Hoa, Nghe An, Thua Thien Hue, Kon Tum, Gia Lai, Lam Dong...) but is considered rare and vulnerable by the indiscriminately exploitation of people. In this study, 18 SSR markers were used to analyze the genetic diversity of 34 individuals *C. mannii* collected in Ta Nung and Hiep An of Lam Dong province. The results showed 12/18 polymorphic markers. Among 36 DNA amplified fragments, 24 were polymorphic (66.66%). Genetic diversity in Hiep An population ($h = 0.269$; $I = 0.449$ and $PPB = 72.22\%$) was higher than that of Ta Nung ($h = 0.433$; $I = 0.264$ and $PPB = 66.67\%$). The total level of molecular variance (AMOVA) among populations was 27.74% and among individuals within the populations was 72.26%. The average of gene flow value (Nm) of the species *C. mannii* populations was 3,310. Both Ta Nung and Hiep An populations had Wright's inbreeding coefficient $F_{is} < 0$ (-0.244, -0.052, respectively) and the private allele (A_p) (0.222, 0.333, respectively). A dendrogram constructed based on similarity matrix of 34 *C. mannii* samples divided into two main groups with their genetic similarity coefficient ranged from 65% (Cpm31 and Cpm32) to 100% (Cpm16 and Cpm17, Cpm21 and Cpm22). Molecular analysis results showed that *C. mannii* species should be protected at the population level.

Keywords: Private allele, *Cephalotaxus mannii*, population genetic diversity, SSR, Tay Nguyen

[✉] Authors for correspondence: Tel: +84-4-39941215; E-mail: dinhthiphong@hotmail.com