

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ LAN HÀI VÀNG (*PAPHIOPEDILUM VILLOSUM* VAR. *ANNAMENSE* ROLFE.) Ở VÙNG CAO NGUYÊN LÂM VIÊN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD

Đặng Thị Thắm¹, Nông Văn Duy¹, Trần Văn Tiến², Lê Ngọc Triệu², Khuất Hữu Trung³, Vũ Tiến Chính⁴

¹Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Đà Lạt

³Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

⁴Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 17.5.2015

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

TÓM TẮT

Lan hài vàng là loài có hoa to quyền rũ được nhiều người ưa chuộng nên thường xuyên bị tìm kiếm khai thác, hơn nữa môi trường sống của loài đang bị suy giảm. Nếu không có biện pháp bảo tồn loài này sẽ có nguy cơ tuyệt chủng cao. Thông tin về tính đa dạng di truyền ở cả hai mức độ quần thể và loài là cơ sở khoa học phục vụ công tác bảo tồn. Trong nghiên cứu này, hai quần thể Lan hài vàng được thu thập tại Cao nguyên Lâm Viên, Lâm Đồng, Việt Nam để phân tích đa dạng di truyền. Chỉ thị RAPD được sử dụng để khảo sát biến động di truyền trong 20 cá thể từ hai quần thể. Kết quả thu được cho thấy có hai mươi lăm băng được ghi nhận từ 12 mỗi nhận diện đặc trưng. Tỷ lệ đa hình trong các quần thể và ở mức độ loài là thấp ($P_1 = 67,90\%$, $P_2 = 62,35\%$; $P_t = 74,07\%$); trong đó, quần thể 1 có tỷ lệ đa hình cao hơn quần thể 2. Mức độ dị hợp trong các quần thể riêng lẻ và ở mức độ loài thấp ($H_{E1} = 0,23$; $H_{E2} = 0,18$ và $H_{E1} = 0,25$). Mức độ biệt hóa gen giữa các quần thể thấp ($G_{ST} = 0,17$). Khoảng cách di truyền giữa hai quần thể thấp ($D_{12} = 0,079$). Hệ số tương đồng di truyền giữa các cá thể trong quần thể tổng dao động trong khoảng 0,57 - 0,91. Hiện trạng đa dạng di truyền quần thể đã phản ánh sự phân cắt và bị cô lập giữa các quần thể liên quan đến tác động của con người. Một số giải pháp bảo tồn và phát triển bền vững cũng đã được đề cập.

Từ khóa: Bảo tồn, Lan hài vàng, đa dạng di truyền, quần thể, hệ số tương đồng, RAPD

MỞ ĐẦU

Biến dị di truyền được xem là động lực cho sự tồn tại lâu dài của quần thể hay loài. Thông tin về tính đa dạng di truyền ở cả hai mức độ quần thể và loài là cơ sở khoa học phục vụ công tác bảo tồn (Nguyễn Minh Tâm *et al.*, 2005). Loài đang bị đe dọa thường có kích thước quần thể nhỏ. Mức độ khác nhau về di truyền cao xuất hiện giữa các quần thể trong các mảnh rừng bị chia cắt nhỏ (Nguyễn Minh Tâm *et al.*, 2005). Việc hiểu biết mức độ và phân bố đa dạng di truyền của các loài quý hiếm và có nguy cơ bị đe dọa là vấn đề cần thiết, đây là cơ sở để định hướng chiến lược cho các hoạt động bảo tồn đảm bảo sự tồn tại bền vững và tiềm năng tiến hóa của các quần thể (Lopes *et al.*, 2014). Dữ liệu di truyền hỗ trợ cho việc thu thập mẫu phục vụ cho việc bảo tồn ngoại vi, cụ thể là các bộ sưu tập lõi của nguồn tài nguyên di truyền thực vật (Odong *et al.*, 2013). Ngoài ra, dữ liệu di truyền cũng có thể được

sử dụng để đánh giá hiệu quả của công tác bảo tồn quần thể *in situ* và *ex situ* (Qiaoming *et al.*, 2005).

Lan hài vàng (*Paphiopedilum villosum* var. *annamense* Rolfe) là một trong những loài Lan hài được các nhà thực vật học người Pháp phát hiện sớm nhất ở Việt Nam vào đầu thế kỷ trước (Averyanov *et al.*, 2004). Lan hài vàng là loài có hoa to quyền rũ được nhiều người ưa chuộng nên thường xuyên bị tìm kiếm khai thác. Trước đây, loài Lan hài này rất phổ biến ở khu vực Đà Lạt, đặc biệt là ở núi Lang Bian. Nhưng hiện nay loài này có diện tích phân bố, môi trường sống ngày càng bị thu hẹp và đang trong tình trạng phải đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng cao trong tự nhiên (Averyanov *et al.*, 2004). Theo Sách đỏ Việt Nam (2007), loài này được đánh giá ở mức nguy cấp (EN) nên việc bảo tồn, quản lý và khai thác nguồn tài nguyên này một cách hợp lý là cấp thiết (Nguyễn Tiến Bản, 2007).

Nhằm góp phần vào việc xây dựng cơ sở dữ liệu giúp cho việc đưa ra các định hướng cũng như các

biện pháp bảo tồn, quản lý nguồn tài nguyên Lan hài vàng tại Cao nguyên Lâm Viên nói riêng và Việt Nam nói chung, cần tiến hành nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền quần thể của loài này phân bố ở Cao nguyên Lâm Viên. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chỉ thị phân tử (maker) RAPD để phân tích đa dạng di truyền từ hai quần thể khác nhau trong hệ sinh thái rừng tự nhiên núi cao ở Cao nguyên Lâm Viên và đề xuất một số giải pháp bảo tồn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Địa điểm

Các mẫu Lan hài vàng nghiên cứu được thu thập tại 2 địa điểm, Lang Bian (huyện Lạc Dương) và Hòn Nga (huyện Lâm Hà) thuộc tỉnh Lâm Đồng. Các mẫu ở khu vực Lang Bian (quần thể 1) được kí hiệu từ 1 đến 11 và khu vực Hòn Nga (quần thể 2) kí hiệu từ 12 đến 20. Đây là 2 khu vực Lan hài vàng còn tồn tại với số lượng cá thể rất ít.

Vật liệu nghiên cứu

Mỗi cá thể tiến hành thu tối thiểu 3 g, mẫu lá được thu không quá non cũng không quá già, màu xanh, sạch và không bị nhiễm nấm, bệnh. Mẫu được bảo quản theo phương thức giữ mát trong quá trình di chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được đánh dấu bằng cách ghi số hiệu cùng với đặc điểm sinh học. Sau đó mẫu được chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ -30°C trong tủ lạnh sâu. Hai mươi môi RAPD thuộc nhóm môi OPA, OPC, OPM, OPN, OPE, UBC và S do hãng Operon cung cấp được sử dụng trong nghiên cứu ban đầu để sàng lọc môi (Nguyễn Thị Thúy Hà *et al.*, 2012).

Phương pháp

Tách chiết và khuếch đại DNA bằng kỹ thuật RAPD-PCR

Các mẫu lá được tách chiết DNA tổng số bằng quy trình CTAB cải tiến từ quy trình CTAB I theo Kurt *et al.*, (2005), bổ sung 10% SDS vào đệm tách chiết. Chất lượng và nồng độ DNA tổng số tách chiết được kiểm tra bằng phương thức so sánh tương quan mật độ quang đo được ở các bước sóng 260, 280 và 320 nm trên hệ thiết bị SmartSpecTMPlus của hãng Bio Rad (Mỹ) (Kurt *et al.*, 2005).

Các phản ứng chuỗi polymer hóa (PCR) được thực hiện ở thể tích 15 μl gồm: 0,1 μl mỗi loại dNTP 10 mM; 1,2 μl Taq DNA polymerase 1 U/ μl (Fermentas); 1,5 μl mỗi decamer 10 pmol/ μl ; 2 μl khuôn mẫu DNA 30-40 ng/ μl ; 1,5 μl đệm 10X và 8,7

μl nước cất. Việc khuếch đại DNA được thực hiện trên hệ máy MyGenie 96 Thermal Block của hãng Bioneer (Hàn Quốc) với chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 5 phút, 40 chu kỳ lặp lại [94°C trong 1 phút; 36°C trong 2 phút; 72°C trong 2 phút] và kết thúc 72°C trong 10 phút. Đối chứng âm không chứa DNA khuôn mẫu được thêm vào trong mỗi lần chạy PCR.

Sản phẩm khuếch đại được phân tách trên gel điện di Agarose 1,5% (đệm đệm TBE 1X) ở 80 V trong 2 giờ, nhuộm với Ethidium bromide (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), được chụp ảnh lại dưới ánh sáng cực tím ở hai bước sóng 254 và 312 nm trên hệ thiết bị soi gel và ghi ảnh microDOC của hãng Cleaver Scientific (Anh), ảnh được lưu ở dạng tệp điện tử với định dạng JPGE đối với từng môi và từng quần thể.

Phân tích thống kê

Do các chỉ thị RAPD là chỉ thị trội, mỗi dãy băng được xem là đại diện cho 1 locus gồm hai allele trong đó sự thiếu vắng băng đại diện cho trạng thái đồng lặn. Chỉ những phân đoạn rõ ràng có kích thước từ 130 đến 1800 bp được ghi nhận và sử dụng trong phân tích. Các băng RAPD được ghi nhận lại trong một ma trận nhị phân với 1 đại diện cho sự xuất hiện và 0 đại diện cho sự thiếu vắng của một băng nào đó.

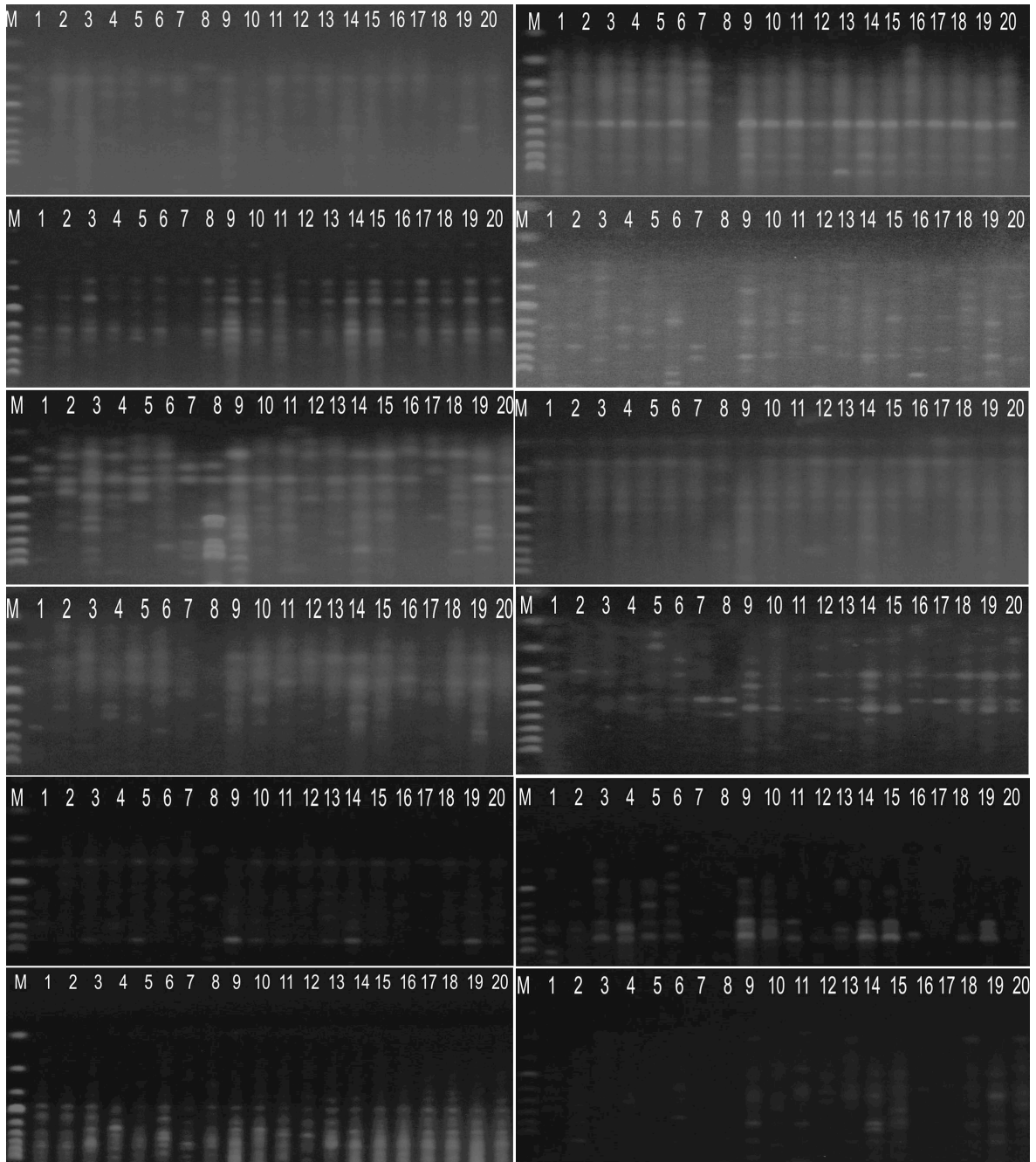
Phần mềm POPGENE 32 được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền thông qua một số tiêu chí sau: tỷ lệ locus đa hình; mức độ dị hợp; mức độ biệt hóa gen và khoảng cách di truyền giữa 2 quần thể (Francis *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2003). Sử dụng phần mềm chuyên dụng NTSYSpc 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) software (Rohlf, 2004) để tiến hành tính toán hệ số tương đồng di truyền giữa các cặp mẫu khảo sát.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng phát triển các chỉ thị đặc hiệu cho quần thể

Qua khảo sát thủ công các băng, nhận thấy có những môi sử dụng tạo được các băng đặc trưng cho quần thể nào đó (hình thành băng ở quần thể này nhưng thiếu vắng ở quần thể còn lại). Sự xuất hiện hay thiếu vắng một cách đặc biệt như thế có thể làm cơ sở để nghiên cứu tiếp nhằm phát triển các marker đặc hiệu cho quần thể. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Qua kết quả khảo sát nhận diện đặc trưng từ 20 môi thì có 12 môi cho kết quả đặc trưng nhận diện DNA đa hình (Hình 1). Trong đó, có 25 băng với kích thước khác nhau từ 130 đến 1600 bp được ghi nhận từ 12 môi, tương đương 2,08 băng cho mỗi môi.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm của RAPD với 12 môi có kết quả đặc trưng nhận diện DNA đa hình. M: thang DNA chuẩn; 1-11: các mẫu Lan hài vàng thu thập tại Lang Bian; 12-20 các mẫu Lan hài vàng thu thập tại Hòn Nga.

Bảng 1. Những mối và băng có khả năng phát triển thành marker đặc hiệu cho quần thể.

Mối	Băng	Quần thể 1	Quần thể 2
OPA6	350	+	-
OPA9	1200	+	-
OPC10	400	+	-
	1300	+	-
OPE1	1000	+	-
	800	-	+
	900	-	+
OPM9	1000	+	-
	1400	+	-
	180	+	-
OPM18	1300	+	-
	1400	+	-
	150	-	+
OPN2	200	+	-
	1300	+	-
OPN3	1400	+	-
	1300	+	-
OPN15	1400	+	-
	1500	+	-
	1600	+	-
OPN17	200	+	-
	400	+	-
	800	-	+
S285	500	+	-

Ghi chú: (+) Có xuất hiện băng trong đặc trưng nhận diện DNA; (-) Không xuất hiện băng trong đặc trưng nhận diện DNA.

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dựa trên các đặc trưng nhận dạng DNA

Tỷ lệ các locus đa hình (P)

Tỷ lệ các locus đa hình của quần thể 1, quần thể 2 và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu lần lượt là: 67,90%; 62,35% và 74,07%.

Qua kết quả phân tích về tỷ lệ locus đa hình cho thấy, mức độ đa hình ở các quần thể khác nhau là khác nhau, trong đó quần thể 1 cao hơn quần thể 2. Điều này cũng phù hợp với thực tế khảo sát ở các quần thể. Số lượng cá thể và diện tích phân bố Lan hài vàng ở quần thể 1 cao hơn quần thể 2. Tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu có tỷ lệ locus đa hình cao hơn hẳn so với từng quần thể đơn lẻ ($P_i = 74,07\%$), đây là một điều hiển nhiên vì nó thể hiện tính tổ hợp của toàn bộ tập hợp các mẫu được khảo sát. Trong những thập niên gần đây, phân tích đa dạng di truyền dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử xác định được tỷ lệ locus đa hình một số loài thực vật quý hiếm. Kết quả nghiên cứu trên đối tượng

Withania somifera (L.) Dunal cho thấy tỷ lệ locus đa hình trong quần thể dao động trong khoảng 64-83% Dharmar và John (2011); trên đối tượng *Betula pendula* subsp. *fontqueri* (Rothm.) Moreno & Peinado, Carmen *et al.*, (2008) đã xác định mức độ locus đa hình trong quần thể là 64,1%. Ngoài ra, trên đối tượng là các loài thuộc họ Lan có nhiều tác giả khi đánh giá đa dạng di truyền đã xác định được tỷ lệ locus đa hình. Ang *et al.*, (2002) xác định tỷ lệ locus đa hình trong quần thể trung bình là 45,1% và ở quần thể tổng là 71,6% đối với loài *Paphiopedilum micranthum* Tang & Wang. Case *et al.*, (1998) đã xác định tỷ lệ locus đa hình trong quần thể trung bình là 12,5% và ở quần thể tổng là 25% đối với loài *Cypripedium kentuckiensis* Reed. Trên đối tượng Lan gấm đất (*Goodyera procera* Hooker & Jacson), các tác giả Wong và Sun (1999) đã xác định tỷ lệ locus đa hình trung bình ở các quần thể là 55,13% và ở tổng thể loài là 97,03%. Qian *et al.*, (2013) khi nghiên cứu đa dạng di truyền trên các quần thể *Calanthe tsoongiana* Tang & Wang thu được kết quả tỷ lệ locus đa hình trung bình của các quần thể là

50% và trong quần thể tổng bằng 96,8%. So với các kết quả này thì tỷ lệ locus đa hình của các quần thể Lan hài vàng phân bố tại hai khu vực và quần thể tổng của chúng ở mức trung bình thấp.

Tính dị hợp H (Heterozygosity, H_E)

Mức độ dị hợp của quần thể 1, quần thể 2 và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu lần lượt là 0,23; 0,18 và 0,25.

Kết quả thu nhận được cho thấy, quần thể 1 có tính dị hợp cao hơn quần thể 2. Đối với tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu, mức độ dị hợp cao hơn hẳn so với các quần thể tại các khu vực phân bố riêng lẻ.

Đa số các loài quý hiếm có mức độ dị hợp cực kì thấp (Case *et al.*, 1998), có thể hình dung điều này thông qua một số nghiên cứu sau: trên đối tượng *Withania somnifera*, Dharmar và John (2011) đã xác định tính dị hợp H_E của các quần thể nằm trong khoảng 0,29 – 0,39 và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu là 0,36; trên đối tượng Lúa mạch hoang dại (*Hordeum spontaneum* Koch), Sergei *et al.*, (2001) đã xác định tính dị hợp H_E là 0,138. Một số tác giả cũng đã xem xét tính dị hợp trên một số loài thuộc họ Lan: Qian *et al.*, (2013) nghiên cứu đa dạng di truyền trên các quần thể *Calanthe tsoongiana* cho kết quả H_E trung bình của các quần thể là 0,183 và trong quần thể tổng bằng 0,46; Ang *et al.*, (2002) xác định tính dị hợp H_E trung bình các quần thể là 0,1457 và ở tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu là 0,3301 đối với loài *Paphiopedilum micranthum*, tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu là 0,3301 đối với loài *Paphiopedilum malipoense* Chen & Tsi, và tính dị hợp H_E ở tổng thể loài của loài *Cyperipedium kentuckiensis* là 0,45; trên đối tượng *Goodyera procera* Hooker & Jacson, Wong và Sun (1999) đã xác định tính dị hợp quần thể trung bình là 0,18 và tính dị hợp tổng thể loài là 0,29; ... Qua một số kết quả về tính dị hợp nêu trên các tác giả đều cho rằng các chỉ số $H_E < 0,45$ là rất thấp. So với tổng thể chung về tính đa hình của các loài quý hiếm nêu trên thì tính dị hợp H_E của quần thể Lan hài vàng phân bố tại hai địa điểm và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu ở mức rất thấp.

Như vậy, mức độ đa dạng di truyền dựa trên tỷ lệ locus đa hình và mức độ dị hợp của các quần thể Lan hài vàng phân bố tại hai địa điểm và quần thể tổng tại Cao nguyên Lâm Viên được đánh giá ở mức thấp.

Mức độ biệt hóa gen giữa hai quần thể (G_{ST})

Qua kết quả nghiên cứu, mức độ biệt hóa gen

giữa hai quần thể: $G_{ST} = 0,17$. Theo kết quả này, nhận thấy mức độ biệt hóa gen giữa hai quần thể tại hai khu vực Lang Bian và Hòn Nga là không lớn. Vì Theo Kurt *et al.*, (2005) khi $G_{ST} \geq 0,25$ thì biệt hóa di truyền giữa các quần thể là rất lớn, nghĩa là cấu trúc của quần thể bị phá vỡ và có sự mất mát gen. Kết quả phân tích trên có thể giải thích cho dù khoảng cách giữa các khu vực phân bố khá xa nhau nhưng vẫn có điều kiện tốt cho việc trao đổi nguồn gen vì vùng ngăn cách giữa hai khu vực là đất rừng hoặc vùng đất ít bị tác động của con người một cách liên tục.

Khoảng cách di truyền giữa hai quần thể (D)

Kết quả thu được cho thấy, khoảng cách di truyền giữa quần thể 1 và quần thể 2 là: $D_{12} = 0,079$.

Trong các nghiên cứu trước đây, Carmen *et al.*, (2008) khi nghiên cứu về khoảng cách di truyền giữa các quần thể của loài *Betula pendula* subsp. *fontqueri* thu được kết quả chỉ số tương đồng di truyền giữa các quần thể của khu vực Sierra Nevada là 0,79; giữa các cá thể của khu vực La Ventilla là 0,84. Trên đối tượng *Fraxinus excelsa*, Pvingila *et al.*, (2005) thu được kết quả chỉ số tương đồng di truyền giữa các quần thể là 0,91. Trên đối tượng *Paphiopedilum micranthum*, Li *et al.*, (2013) thu được kết quả khoảng cách di truyền giữa các quần thể là 0,1268. Qian *et al.*, (2013) khi nghiên cứu khoảng cách di truyền các quần thể *Calanthe tsoongiana* thu được kết quả khoảng cách di truyền dao động từ 0,229 đến 0,638... So với các kết quả nghiên cứu trên, khoảng cách di truyền giữa hai quần thể Lan hài vàng phân bố ở cao nguyên Lâm Viên ở mức độ thấp, nghĩa là giữa hai quần thể vẫn xảy ra sự trao đổi nguồn gen.

Từ kết quả trên, có thể nhận thấy khoảng cách địa lý giữa quần thể 1 và 2 tuy xa nhưng vẫn có những phần rừng hoặc đất ít bị tác động của con người một cách liên tục. Tính liên tục của rừng hoặc đất ít bị tác động của con người có thể dùng để lý giải tại sao dù khoảng cách địa lý giữa chúng xa nhưng khoảng cách di truyền giữa chúng lại không lớn khi xét trong tổng thể phân bố loài ghi nhận được tại Cao nguyên Lâm Viên. Điều này cũng gợi ra rằng có lẽ trong quá khứ Lan hài vàng phân bố trên một vùng rộng lớn, bao trùm cả hai khu vực phân bố hiện nay và sự phân cắt (nếu có) chỉ do yếu tố địa hình, dưới sự tác động của con người trong hoạt động xây dựng, canh tác, phá rừng... vùng phân bố ban đầu đã phân mảnh, thu hẹp dần để rồi còn lại như hiện nay.

Hệ số tương đồng giữa các mẫu

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở quần thể 1: Hệ số tương đồng giữa các cặp cá thể trong nội quần thể nằm trong khoảng 0,58 – 0,86, hệ số tương đồng trung bình giữa các cặp cá thể trong quần thể bằng 0,74. Trong đó, có những cặp cá thể có hệ số tương đồng thấp đó là các cặp cá thể: 1 và 9 có hệ số tương đồng bằng 0,58; 1 và 3 có hệ số tương đồng bằng 0,63;... Trong quần thể này có những cặp cá thể khác nhau về di truyền cao điều này cũng phù hợp với quan sát ngoài thực địa. Địa hình ở khu vực Lang Bian không đồng nhất phân thành những mảnh rừng nhỏ với môi trường sống đa dạng vì vậy các cá thể trong quần thể phân bố thành từng đám nhỏ rải rác trong diện tích tương đối lớn, chính sự phân cắt nơi sống làm suy giảm mức độ trao đổi di truyền ảnh hưởng bất lợi đến

tính đa dạng di truyền quần thể. Loài đang bị đe dọa thường có kích thước quần thể nhỏ. Như vậy, mức độ khác nhau về di truyền cao xuất hiện giữa các quần thể trong các mảnh rừng bị chia cắt nhỏ (Barrett *et al.*, 1991; Godt *et al.*, 1993). Case *et al.*, (1998) đã chỉ ra rằng quần thể nhỏ sự phân cắt nơi sống làm suy giảm mức độ trao đổi di truyền và tăng sự khác nhau về di truyền giữa các quần thể *Cymbidium kentuckiense* ở vùng Virginia (Mỹ). Izawa *et al.*, (2007) cũng ghi nhận sự phân cắt nơi sống ảnh hưởng bất lợi đến tính đa dạng di truyền quần thể *Cymbidium macranthos* var. *rebuense* trên đảo Ruben của Nhật Bản... Do quần thể nhỏ duy trì số allele ít và gen đồng hợp tử cao, nên mức độ đa dạng di truyền thấp. Rõ ràng, quần thể bị phân cắt thành các quần thể nhỏ hơn về kích thước và cuối cùng dẫn đến sự tuyệt chủng loài (Templeton, 1991).

Bảng 2. Hệ số tương đồng di truyền giữa các cặp cá thể Lan hài vàng trong tổng thể loài phân bố tại Cao nguyên Lâm Viên

Mẫu/cá thể	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1																			
2	0,72	1,00																		
3	0,63	0,77	1,00																	
4	0,74	0,73	0,79	1,00																
5	0,69	0,76	0,78	0,80	1,00															
6	0,72	0,76	0,79	0,81	0,83	1,00														
7	0,72	0,75	0,73	0,78	0,75	0,77	1,00													
8	0,67	0,66	0,68	0,68	0,67	0,68	0,72	1,00												
9	0,58	0,69	0,77	0,68	0,70	0,68	0,62	0,63	1,00											
10	0,72	0,78	0,79	0,80	0,85	0,79	0,70	0,68	0,78	1,00										
11	0,73	0,79	0,78	0,78	0,77	0,76	0,72	0,69	0,76	0,86	1,00									
12	0,73	0,75	0,78	0,78	0,79	0,77	0,73	0,64	0,63	0,77	0,73	1,00								
13	0,70	0,78	0,79	0,83	0,83	0,79	0,71	0,64	0,70	0,86	0,82	0,85	1,00							
14	0,58	0,70	0,77	0,72	0,73	0,69	0,64	0,68	0,91	0,79	0,78	0,69	0,77	1,00						
15	0,67	0,77	0,81	0,78	0,79	0,77	0,66	0,65	0,81	0,86	0,85	0,77	0,85	0,89	1,00					
16	0,74	0,76	0,75	0,78	0,79	0,79	0,70	0,64	0,67	0,79	0,75	0,83	0,81	0,69	0,77	1,00				
17	0,72	0,73	0,73	0,75	0,76	0,75	0,69	0,67	0,57	0,73	0,70	0,83	0,77	0,62	0,70	0,86	1,00			
18	0,70	0,74	0,80	0,78	0,81	0,80	0,67	0,62	0,77	0,88	0,84	0,77	0,87	0,80	0,86	0,85	0,74	1,00		
19	0,61	0,72	0,77	0,73	0,76	0,71	0,62	0,62	0,86	0,83	0,78	0,66	0,78	0,91	0,87	0,73	0,63	0,85	1,00	
20	0,68	0,80	0,80	0,77	0,84	0,78	0,66	0,60	0,75	0,86	0,81	0,78	0,85	0,79	0,88	0,85	0,75	0,91	0,86	1,00

Đối với quần thể 2: Hệ số tương đồng giữa các cặp cá thể trong quần thể 2 nằm trong khoảng 0,62 – 0,91. Hệ số tương đồng trung bình giữa các cặp cá thể trong quần thể 2 bằng 0,80 cao hơn hệ số tương đồng trung bình giữa các cặp cá thể trong quần thể 1 bằng 0,74. Như vậy, ở quần thể 2 giữa các cá thể có khả năng giao phối gần cao hơn quần thể 1. Trong đó, có những cặp cá thể với hệ số tương đồng cao (0,91) đó là các cặp cá thể 14 và 19; 18 và 20. Điều đó phù hợp với thực tế, các cá thể phân bố trong một không gian không lớn, số lượng cá thể không nhiều,

khả năng giao phối gần rất cao vì vậy hệ số tương đồng di truyền cao, cũng đồng nghĩa với là khoảng cách di truyền giữa các cặp cá thể này rất thấp.

Đối với quần thể tổng: Có các cặp cá thể thuộc 2 quần thể khác nhau như cặp cá thể 9 và 14 có hệ số tương đồng di truyền cao bằng 0,91; 10 và 18 có hệ số tương đồng là 0,88; 9 và 19 có hệ số tương đồng bằng 0,86... Điều đó, chứng tỏ giữa hai quần thể vẫn có sự trao đổi nguồn gen, bởi các tác nhân như gió hoặc động vật đưa hạt phấn hay hạt giống phát tán từ quần thể này sang quần thể khác. Đây chính là động

lực thúc đẩy việc duy trì và gia tăng các biến dị di truyền trong quần thể tổng tại Cao nguyên Lâm Viên, nếu hạt lai giữa hai quần thể này có khả năng này nhằm để hình thành thế hệ mới với số lượng nhiều. Đây chính là cơ sở để cho loài tồn tại và phát triển nếu chúng ta tiến hành các biện pháp bảo vệ môi trường sống, xúc tiến tái sinh tự nhiên nhằm duy trì và gia tăng số lượng cá thể trong quần thể.

Mức độ tương đồng gen thấp nhất là 0,57 ở cặp cá thể 17 và 9, hai cá thể này thuộc hai quần thể khác nhau. Như vậy, có thể trong bản thân 2 quần thể, bên cạnh một số cá thể có sự trao đổi nguồn gen, thì vẫn tồn tại những cá thể cách ly nhau dẫn đến khoảng cách di truyền của những cá thể này cao.

Đề xuất bảo tồn

Mục tiêu cuối cùng của việc bảo tồn là đảm bảo sự tồn tại và duy trì tiềm năng tiến hóa của quần thể bằng cách giữ được sự đa dạng di truyền của chúng. Trong một loài khi có sự khác biệt di truyền cao giữa các quần thể, nếu xảy ra sự mất mát bất kỳ quần thể nào sẽ gây thiệt hại lớn cho sự đa dạng di truyền của loài. Qua kết quả phân tích đa dạng di truyền của quần thể Lan hài vàng tại Cao nguyên Lâm Viên cho thấy tỷ lệ đa hình và mức độ dị hợp của các quần thể đơn lẻ cũng như quần thể tổng tương đối thấp, nghĩa là nền tảng di truyền của loài thấp. Giữa các quần thể có mức độ biệt hóa gen không lớn và khoảng cách di truyền thấp, nguyên nhân có thể là do một số cá thể thuộc hai quần thể có sự trao đổi nguồn gen, điều này giúp duy trì và gia tăng các biến dị di truyền của loài. Cũng thông qua các chuyến khảo sát, chúng tôi nhận thấy môi trường sống của Lan hài vàng đã bị mất mát, thay đổi bởi các hoạt động của con người, ngoài ra việc thu mua với số lượng lớn để buôn bán là nhân tố chính làm suy giảm nhanh chóng số lượng cá thể trong quần thể. Cần có biện pháp để bảo vệ tất cả các quần thể còn tồn tại và môi trường sống của loài, để ngăn chặn sự suy giảm tính đa dạng di truyền của quần thể và bảo tồn nguồn gen của loài này. Trước mắt cần tiến hành bảo tồn theo hai hình thức là bảo tồn *in situ* và *ex situ* như: Kiểm soát và loại trừ các loài có khả năng gây hại cho sự sống sót của loài; bảo vệ rừng để giữ môi trường sống và điều kiện sinh thái ở khu phân bố; tạo điều kiện tối đa cho tái sinh tự nhiên như mở khoảng trống cần thiết, phát dọn thực bì; nghiên cứu, nhận dạng và tạo điều kiện phát triển nầm cộng sinh ở các khu phân bố thực này nhằm hạt Lan hài vàng; để duy trì và gia tăng các biến dị di truyền nên có các biện pháp di thực như thu hạt phấn, hạt giống trồng thành chồi từ quần thể này sang quần thể khác và từ khu vực này sang

khu vực khác trong quần thể tại Lang Bian; chuyển cây trồng thành giữa các quần thể cũng có thể là một cách hiệu quả để tăng sự đa dạng di truyền; khoanh vùng bảo vệ và bảo vệ khỏi sự xâm nhập khai thác của con người; ngăn cấm có hiệu quả việc khai thác Lan hài vàng tự nhiên; mở rộng quần thể bằng cách trồng dặm ra vùng đệm; nghiên cứu những khu vực có điều kiện sinh thái tương tự để trồng mở rộng quần thể và nhân giống bằng hạt và nuôi cấy tế bào để tạo ra lượng lớn cây giống cho sản xuất đại trà giúp giảm bớt áp lực thu hái của người dân vào quần thể tự nhiên.

KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy, có 12 mồi cho đặc trưng nhận diện DNA đa hình. Trong đó, có 25 băng kích thước khác nhau từ 130 đến 1600 bp được ghi nhận từ 12 mồi, tương đương 2,08 băng cho mỗi mồi. Tỷ lệ locus đa hình ở các quần thể 1, 2 và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu đạt mức trung bình thấp lần lượt là: $P_1 = 67,90\%$; $P_2 = 62,35\%$ và $P_t = 74,07\%$. Tính dị hợp tử của các quần thể 1, 2 và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu rất thấp lần lượt là $H_{E1} = 0,23$; $H_{E2} = 0,18$ và $H_{Et} = 0,25$. Mức độ biệt hóa gen giữa hai quần thể không cao: $G_{ST} = 0,17$. Khoảng cách di truyền giữa hai quần thể thấp: $D_{12} = 0,079$ và hệ số tương đồng di truyền giữa các cá thể trong quần thể tổng nằm trong khoảng 0,57 đến 0,91. Mức độ đa dạng di truyền của hai quần thể Lan hài vàng phân bố tại Cao nguyên Lâm Viên và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu thấp, trong đó quần thể khu vực vườn quốc gia Lang Bian (quần thể 1) mức độ đa dạng di truyền cao hơn quần thể núi Hòn Nga (quần thể 2).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Chương trình Tây Nguyên 3 và Đề tài mã số TN3/T31 đã hỗ trợ kinh phí công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ang L, Luo YB, Xiong ZT, Song GE (2002) A preliminary study on conservation genetics of three endangered Orchid species. *Act Bot Sin* 44(2): 250-252.
- Averyanov L, Phillip C, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp (2004) *Lan hài Việt Nam*. Nhà xuất bản Giao thông vận tải.
- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants:

- implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press: 3-30.
- Carmen M, Teresa P, Margarita CM, Esteban HB (2008) Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* populations in the South of Spain. *Silva Fennica* 42(4): 487-498.
- Case MA, Mlodozienec HT, Wallace LE, Weldy TW (1998) Conservation genetic and taxonomic status of the rare Kentucky lady's Slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchiadaceae). *Amer J of Boty* 85(12): 1779-1786.
- Dharmar K, John ADB (2011) RAPD analysis of genetic variability in wild populations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Inter J of Biol Tech*: 21-25.
- Francis CY, Rong-cai Y, Boyle T (1999) POPGENE version 1.31 Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis - quick user guide. A joint project development by, university of Alberta and centre for international forestry research.
- Godt MJW, Hamrick JL (1993) Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuicaulis* (Commelinaceae). *Amern J of Bot* 80(8): 959-966.
- Izawa T, Kawahara, Takahashi H (2007) Genetic diversity of an endangered plant, *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae): background genetic research for future conservation. *Conser Gen* 8: 1369-1376.
- Kurt W, Hilde N, Kirsten W, Kahl G (2005) *DNA Fingerprinting in plants principles, methods, and applications (second Edition)*. Cpc press Taylor & Fancies group.
- Li ZY, Li J, Ceng MB, Li MY (2013) Genetic structure of *Paphiopedilum micranthum* populations from core distribution in southeast Yunnan. *J of Pl Gen Res*: 407-413.
- Lopes MS, Mendonça D, Bettencourt SX, Borba AR, Melo C, Baptista C, da Câmara Machado A. (2014) Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from inter-simple sequence repeat markers. *AoB PLANTS*: 6: plu034.
- Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Thị Phương Trang, Nguyễn Tiến Hiệp, Trần Đình Lý, Ludwig Triest (2005) Đánh giá đa dạng di truyền quần thể Tuế *Cycas dolichophylla* (Cycadaceae). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(1): 79-88.
- Nguyễn Thuý Hà, Nông Văn Tiếp, Lê Ngọc Triệu, Nông Văn Duy, Trần Văn Tiên (2012) Phân tích đa dạng di truyền quần thể Lan lười ngựa lá thuôn (*Rhomboda lanceolata* Ormd) ở Lâm Đồng bằng chi thị phân tử RAPD. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp* 4: 2410-2425.
- Nguyễn Tiến Bản (2007) *Sách đỏ Việt Nam-phần II: Thực vật*. Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ.
- Odong TL, Jansen J, van Eeuwijk FA, van Hintum TJJ (2013) Quality of core collections for effective utilisation of genetic resources review, discussion and interpretation. *Theor Appl Genet* 126: 289-305.
- Pvingila D, Verbylaitė R, Baliuckas V, Pliūra A, Kuusienė S (2005) Genetic diversity (RAPD) in natural Lithuanian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Biologija* 3: 46-53.
- Qian X, Wang C, Tian M (2013) Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China. *Int J Mol Sci* 14(10): 20399-20413.
- Qiaoming L, Tianhua H, Zaifu X (2005) Genetic evaluation of the efficacy of *in situ* and *ex situ* conservation of *Parashorea chinensis* (Dipterocarpaceae) in Southwestern China. *Biochemical genetics* 43(7): 387-406.
- Rohlf FJ (2004) NTSYSpc-numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1-user guide. Applied Biostatistics Inc.
- Sergei V, Bahtiyour Y, Irina S, David W, Varda Z, Samuel M (2001) Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biol J of the Lin Soc* 74: 289-303.
- Templeton AR (1991) Off – sife breeding of animals and implication for plant conservation of rare *plants*. *Oxford Univ Press*: 182-194.
- Vicente MCD, Lopez C, Fulton T. (2003) Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and Cornell University.
- Woff PG, Sinclair RB (1997) Highly differentiated populations of the narrow endemic plant Maquire Primrose (*Primula maguirei*). *Conser Biol* 11: 375-391.
- Wong KC, Sun M (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *Amer J of Bot* 86(10): 1406-1413.

RAPD ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF TWO NATURAL POPULATIONS OF *PAPHIOPEDILUM VILLOSUM* VAR. *ANNAMENSE* ROLFE. IN THE LAM VIEN PLATEAU

Dang Thi Tham¹, Nong Van Duy^{1,✉}, Tran Van Tien², Le Ngoc Trieu², Khuat Huu Trung³, Vu Tien Chinh⁴

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Dalat University, Vietnam

³Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agriculture Sciences

⁴Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Paphiopedilum villosum var. *annamense* Rolfe. is the attractive pot plant characterize by its larger and beautiful flower. Wild population of that orchid are now considered to be rare in nature as a result of habitat destruction and commercial preference. Thus, it is very important that actions should be taken to conserve this orchid before it becomes extinct. The information of genetic variation at both population and species levels is a scientific basic for species conservation. In this research, two populations of *Paphiopedilum villosum* var. *annamense* Rolfe were collected in Lam Dong province, Vietnam for analysing of genetic variation. RAPD directive was used to examine genetic variability in 20 individuals of two populations. The results showed that 25 bands were recorded from 12 specific identification primers. The percentages of polymorphic loci at species and population levels in the research were not high ($P_t = 74.07\%$; $P_1 = 67.90\%$; $P_2 = 62.35\%$). However, in the first population, a higher percentage of polymorphic loci was observed as in the second one. Significant heterozygosity at both population and species levels was also low ($H_{E1} = 0.23$; $H_{E2} = 0.18$; and $H_{Et} = 0.25$). The total gene diversity at the species level was partitioned primarily between two populations, as show by low $G_{ST} = 0.17$. Genetic distance between two populations was low ($D_{12} = 0.079$). In the orther hand, Genetic similarity coefficients between individuals in the general population were ranged from 0.57 to 0.91. The results suggested that the small population sizes in isolation had led to increase of inbred individuals within populations. Some solutions to the conservation and sustainable development have been mentioned.

Keywords: Genetic diversity, *Paphiopedilum villosum* var. *annamense* Rolfe, population, RAPD, similarity coefficient

✉ Author for correspondence: E-mail: duynongvan@yahoo.com