

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN THIỆT SAM GIẢ LÁ NGẮN (*Pseudotsuga brevifolia* W.C.Cheng & L.K.Fu) Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ ISSR

Ngô Đức Nhạc¹, Nguyễn Công Phương¹, Nguyễn Thị Huyền²

¹Trung tâm Khoa học Lâm nghiệp Đông Bắc Bộ

²Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Thiệt sam giả lá ngắn (*Pseudotsuga brevifolia* W.C.Cheng & L.K.Fu) là loài thường chỉ xuất hiện trên các đỉnh núi đá vôi ở độ cao tương đối lớn, được xếp là loài có nguy cơ tuyệt chủng và sắp nguy cấp trong Sách Đỏ Việt Nam. Việc đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen Thiệt sam giả lá ngắn hiện có là rất cần thiết, làm cơ sở cho công tác bảo tồn và phát triển loài cây này. 71 mẫu Thiệt sam giả lá ngắn thu thập ở các tỉnh Cao Bằng, Hà Giang và Bắc Kạn được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền với 7 chỉ thị ISSR. Kết quả phân tích đã chỉ ra có 62 phân đoạn DNA được nhân bản với 38 phân đoạn đa hình (chiếm 61,90%) và mức độ đa dạng di truyền của loài ở mức trung bình với $I = 0,317$; $h = 0,199$ và $PPB = 85,71\%$. Chỉ số đa dạng di truyền (h) của các quần thể lần lượt là Bắc Kạn = 0,143, Cao Bằng = 0,170 và Hà Giang = 0,175. Tổng mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các quần thể thấp đạt 20,68% và cao giữa các mẫu trong quần thể là 79,32%. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 71 mẫu chia thành các nhánh, với mức độ tương đồng di truyền giữa các quần thể là cao từ 91,7 - 98,3%. Từ các kết quả phân tích này, một số phương án cho chương trình bảo tồn loài đã được đề xuất.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, chỉ thị phân tử, chỉ thị ISSR, Thiệt sam giả lá ngắn.

EVALUATION GENETIC DIVERSITY OF *Pseudotsuga brevifolia* W.C.Cheng & L.K.Fu IN SOME NORTHERN MOUNTAINOUS PROVINCES OF VIETNAM USING ISSR MARKERS

Ngô Đức Nhạc¹, Nguyễn Công Phương¹, Nguyễn Thị Huyền²

¹Forest Science Centre of North - Eastern Vietnam

²Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology

ABSTRACT

Pseudotsuga brevifolia W.C.Cheng & L.K.Fu is a species distributed only in high limestone mountains and is classified as an endangered species in the Vietnam Red Book. The assessment of genetic diversity of *P. brevifolia* is very necessary for the conservation and development of this tree species. To assess the genetic diversity of *Pseudotsuga brevifolia*, 71 samples collected from Cao Bang, Ha Giang, and Bac Kan provinces were analyzed using seven ISSR markers. For these samples, 62 DNA fragments were amplified, of which 38 were polymorphic (accounting for 61.90%), and the genetic diversity according to Nei (h) of the species was at a medium level with $I = 0.317$, $h = 0.199$, and $PPB = 85.71\%$. The genetic diversity according to Nei (h) of the populations ranged from Bac Kan $h = 0.143$, Cao Bang $h = 0.170$, to Ha Giang $h = 0.175$. The total molecular variance (AMOVA) among populations was low (20.68%), while it was high within populations (79.32%). The dendrogram illustrated the genetic relationships among the 71 samples, grouping them into several clusters, with a high genetic similarity between populations ranging from 91.7% to 98.3%. From these analysis results, several options for the species conservation program have been proposed.

Keywords: Genetic diversity, ISSR marker, molecular marker, *Pseudotsuga brevifolia* W.C.Cheng & L.K.Fu.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thiết sam giả lá ngắn (*Pseudotsuga brevifolia* W.C.Cheng & L.K.Fu) là loài lá kim quý hiếm, phân bố chủ yếu tại Trung Quốc và có vùng phân bố hẹp ở Việt Nam trên các đỉnh núi đá vôi thuộc khu vực Đông Bắc Bộ như Hà Giang, Cao Bằng, Bắc Kạn. Đây là loài cây gỗ thường xanh, cao 15 - 20 m, lá kim ngắn 1,5 - 2,5 cm mọc so le, nón đực nhỏ màu đỏ tím mọc dọc theo cành, nón cái hình bầu dục, khi chín có màu nâu (Nguyễn Tiến Hiệp *et al.*, 2004). Gỗ của loài có thớ mịn, màu sáng, bền chắc, được đánh giá cao trong xây dựng và chế tác đồ mộc; nhựa và tinh dầu có tiềm năng sử dụng trong dược liệu, hương liệu và công nghiệp nhẹ (Si Ci Yin *et al.*, 2014).

Loài có nguy cơ cao bị tuyệt chủng và được xếp ở bậc sắp nguy cấp (VU) trong Sách Đỏ Việt Nam (2007) và nằm trong Phụ lục I (Danh mục thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm) thuộc nhóm IIA Nghị định 84/2021/NĐ-CP ngày 22/9/2021 sửa đổi, bổ sung một số điều của Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 của của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp. Trong tự nhiên, số lượng các cây trưởng thành của loài cây này còn rất ít và đang bị khai thác theo hình thức tận diệt và khả năng tái sinh tự nhiên rất kém dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng và mất đi nguồn gen quý rất cao (Bộ KH&CN, Viện KH&CN Việt Nam, 2007; Nghị định số 06/2019/NĐ-CP, 2019; Nghị định số 84/2021/NĐ-CP, 2021).

Từ những thực tiễn trên cho thấy, việc phát triển và bảo tồn nguồn gen Thiết sam giả lá ngắn là rất cấp thiết trong thời gian tới. Cơ sở khoa học cho công tác phát triển và bảo tồn nguồn gen loài cây này đạt hiệu quả cao, đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen các quần thể Thiết sam giả lá ngắn tại một số tỉnh miền núi phía Bắc được tiến hành. Để phục vụ nghiên cứu, nhóm đề tài đã tiến hành

thu thập 71 mẫu lá Thiết sam giả lá ngắn tại ba khu vực phân bố tự nhiên: Cao Bằng (23 mẫu), Bắc Kạn (18 mẫu) và Hà Giang (30 mẫu).

Trong nghiên cứu đa dạng di truyền thực vật, các chỉ thị phân tử như RAPD, SSR, ISSR thường được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của loài, trong đó chỉ thị phân tử ISSR hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong đánh giá đa dạng di truyền của các loài thực vật bởi sự đơn giản, tiết kiệm thời gian, tính ổn định và mang lại hiệu quả cao trong quá trình đánh giá nguồn gen thực vật (White *et al.*, 1997). Trong những năm gần đây, chỉ thị ISSR được sử dụng nhiều trong phân tích đa dạng di truyền nhiều loài cây rừng đặc biệt là một số loài có nguy cơ tuyệt chủng hoặc cần bảo tồn đặc biệt (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015, Đinh Thị Phòng *et al.*, 2015, Mai Thị Phương Thúy *et al.*, 2020).

Nghiên cứu này được triển khai trong khuôn khổ đề tài KHCN cấp Nhà nước: “Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Du sam đá vôi (*Keteleeria davidiana* (Bertrand) Beissn) và Thiết sam giả lá ngắn (*Pseudotsuga brevifolia* W.C.Cheng & L.K.Fu) ở một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam”, mã số NVQG-2021/ĐT.31 do Trung tâm Khoa học Lâm nghiệp Đông Bắc Bộ thực hiện.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Sử dụng 71 mẫu, tương ứng 71 cây cá thể được thu tại 3 tỉnh Cao Bằng (23 mẫu), Bắc Kạn (18 mẫu) và Hà Giang (30 mẫu) để phân tích đa dạng di truyền. Ở mỗi địa điểm, chọn cây trưởng thành có đường kính ngang ngực $D_{1,3} > 20$ cm, bố trí khoảng cách giữa các cây ≥ 50 m nhằm hạn chế quan hệ họ hàng gần. Các mẫu lá bánh tẻ được thu thập, cho vào túi zip và bảo quản vận chuyển tới phòng thí nghiệm sinh học phân tử - Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp để tiến hành phân tích (hình 1). Thông tin của các mẫu nghiên cứu trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Thông tin của các mẫu trong nghiên cứu

Mẫu	STT	Tỉnh	Số lượng mẫu	Địa điểm thu mẫu
Thiết sam giả lá ngắn	1	Cao Bằng	23	Xã Ca Thành, huyện Nguyên Bình, tỉnh Cao Bằng (ký hiệu CB1-CB23)
	2	Bắc Kạn	18	Xã Kim Hỷ, huyện Na Rì, tỉnh Bắc Kạn (ký hiệu BK1-BK18)
	3	Hà Giang	30	Pải Chư Phìn, xã Bát Đại Sơn, huyện Quản Bạ, tỉnh Hà Giang (HG1-HG30)
Tổng			71 mẫu	



Bắc Kạn



Cao Bằng



Hà Giang

Hình 1. Mẫu lá Thiết sam giả lá ngắn sử dụng trong nghiên cứu

Trước khi phân tích, chúng tôi sàng lọc bộ môi ISSR (UBC và môi nội bộ) trên 8 - 10 cá thể đại diện cho 3 quần thể bằng PCR - gradient 48 - 62°C, lặp ≥ 2 lần/môi. Môi được giữ lại khi đáp ứng các tiêu chí chuẩn cho ISSR: (i) băng khuếch đại rõ và tái lập; (ii) 5 - 20 băng chấm điểm được, kích thước 200 - 2.000 bp; (iii) tỷ lệ đa hình (PPB) $\geq 50\%$; (iv) nền/smear thấp (Zietkiewicz *et al.*, 1994, Bornet & Branchard,

2001, Reddy *et al.*, 2002). Kết quả sàng lọc cho thấy, 7 môi ISSR đáp ứng tốt các tiêu chí và được lựa chọn cho nghiên cứu; các trình tự môi này được tham khảo từ những nghiên cứu trước đây trên một số loài lá kim ở Việt Nam (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015, Đinh Thị Phòng *et al.*, 2015, Mai Thị Phương Thúy *et al.*, 2020) và được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Chỉ thị ISSR được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)
1	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48,8
2	UBC818	CACACACACACACACAG	51,0
3	UBC855	ACACACACACACACACT	51,4
4	UBC856	ACACACACACACACACYA	52,8
5	UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	59,3
6	ISCS34	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	54,5
7	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	46,8

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của mẫu Thiết sam giả lá ngắn được tách chiết theo phương pháp Doyle JJ. và Doyle JL. (1987) và được cải tiến để phù hợp với đối tượng nghiên cứu. Kiểm tra chất lượng sản phẩm DNA các mẫu Thiết sam giả lá ngắn thu được bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và tiến hành quan sát trên máy soi gel sử dụng tia UV. Tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch của mẫu DNA tổng số thu được bằng máy đo quang phổ hấp thụ NanoDrop. Những mẫu DNA đạt nồng độ ≥ 20 ng/ μ l và độ tinh sạch từ 1,8 - 2,0 đủ điều kiện để sử dụng cho phản ứng chuỗi trùng hợp PCR.

Phản ứng PCR - ISSR

Phản ứng PCR - ISSR được thực hiện trên máy PCR Mastercycler® Pro (Đức) với tổng thể tích 25 μ l gồm 12,5 μ l Mastermix 2X, 2 μ l mỗi ISSR 10 μ M, 2 μ l DNA tổng số và 8,5 μ l nước deion. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C trong 4 phút; (94°C: 45 giây; gắn mồi ở nhiệt độ tối ưu của từng mồi (Bảng 2) trong: 60 giây, 72°C: 45 giây) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 7 phút; 12°C. Sau phản ứng PCR - ISSR, sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,8% trong đệm TAE 1X, nhuộm RedSafe, chạy ở 70 V trong 70 phút và quan sát dưới UV. Kết quả được so sánh với thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific).

Thu thập và xử lý số liệu

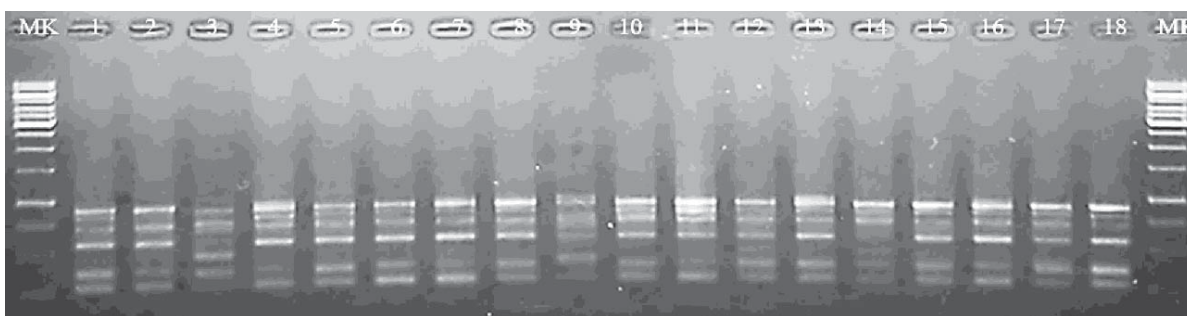
Thu thập số liệu theo quy ước: 1 - phân đoạn DNA xuất hiện và 0 - phân đoạn DNA không xuất hiện khi phân tích sản phẩm PCR - ISSR.

Phần mềm POPGENE v1.32 được sử dụng để xác định các thông số đa dạng di truyền (Yeh *et al.*, 1997). Phân tích phương sai phân tử (AMOVA) và tọa độ thành phần chính (PCoA) của các mẫu nghiên cứu bằng phần mềm GenAlex v6.51b2 (Peakall *et al.*, 2006). Cây quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu bằng phần mềm MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) theo phương pháp nhóm cặp không trọng số UPGMA với giá trị Bootstrap lặp lại 1.000 lần.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng di truyền

Với 7 chỉ thị ISSR sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền cho 71 mẫu Thiết sam giả lá ngắn đã nhân bản được 62 phân đoạn DNA (bằng điện di) với kích thước dao động từ 250 bp đến 2.600 bp (hình 2), trong đó có 38 phân đoạn DNA đa hình chiếm 61,90%. Các chỉ thị ISSR được sử dụng đều có thể tạo các băng điện di khác nhau nhưng với khả năng tái tạo khác nhau chứng tỏ chúng có thể phản ánh được mức độ đa dạng di truyền của các mẫu nghiên cứu.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR - ISSR một số mẫu Thiết sam giả lá ngắn

Kết quả tại bảng 3 cho thấy, loài Thiết sam giả lá ngắn có mức đa dạng di truyền ở mức trung

bình với $Na = 1,857$; $Ne = 1,323$; $I = 0,317$; $h = 0,199$ và $PPB = 85,71\%$. Mức độ đa dạng di

truyền từ trung bình đến khá cao đối với một loài lá kim phân bố hẹp, phản ánh sự tồn tại của nguồn biến dị di truyền đáng kể trong quần thể tự nhiên. Bên cạnh đó, mức độ đa dạng di truyền trung bình của 3 quần thể Thiết sam giả lá ngắn có giá trị trung bình chỉ đạt $Na = 1,492$; $Ne = 1,258$; $I = 0,257$; $h = 0,162$ và $PPB = 61,90\%$, thấp hơn rõ rệt so với toàn loài. Kết quả này cho thấy phần lớn biến dị di truyền nằm trong các quần thể được nghiên cứu.

Số alen quan sát được (Na) dao động trong khoảng 1,381 (Bắc Kạn) đến 1,667 (Cao Bằng) và số alen có ý nghĩa (Ne) nằm trong khoảng từ 1,209 (Bắc Kạn) đến 1,305 (Hà Giang). Kết quả chỉ ra, quần thể thu tại tỉnh Hà Giang có số alen

quan sát xếp thứ hai nhưng số alen có ý nghĩa thu được lớn nhất và thấp nhất thuộc quần thể thu tại Bắc Kạn. Tương tự, chỉ số đa dạng di truyền theo Nei (h) thu được cao nhất thuộc về quần thể thu tại tỉnh Hà Giang với $h = 0,175$, tiếp theo là Cao Bằng ($h = 0,170$) và thấp nhất là tỉnh Bắc Kạn ($h = 0,143$).

Đối với chỉ số thông tin Shannon (I) và phần trăm phân đoạn đa hình (PPB), quần thể tại tỉnh Cao Bằng cho giá trị lớn nhất lần lượt là $I = 0,275$, tiếp theo là quần thể tại Hà Giang $I = 0,262$ và thấp nhất về quần thể tại Bắc Kạn $I = 0,235$. Về phần trăm phân đoạn đa hình (PPB), cao nhất là Cao Bằng (71,43%), tiếp theo là Bắc Kạn (61,90%) và thấp nhất là Hà Giang (52,38%).

Bảng 3. Thông số đa dạng di truyền quần thể Thiết sam giả lá ngắn phân tích với chỉ thị ISSR

Tỉnh	Các giá trị đa dạng di truyền trung bình				
	Na	Ne	I	h	PPB (%)
Bắc Kạn	$1,381 \pm 0,189$	$1,209 \pm 0,055$	$0,235 \pm 0,050$	$0,143 \pm 0,033$	61,90
Hà Giang	$1,429 \pm 0,149$	$1,305 \pm 0,086$	$0,262 \pm 0,086$	$0,175 \pm 0,045$	52,38
Cao Bằng	$1,667 \pm 0,126$	$1,261 \pm 0,067$	$0,275 \pm 0,067$	$0,170 \pm 0,036$	71,43
Trung bình	$1,492 \pm 0,090$	$1,258 \pm 0,040$	$0,257 \pm 0,032$	$0,162 \pm 0,022$	61,90
Loài	$1,857 \pm 0,359$	$1,323 \pm 0,352$	$0,317 \pm 0,244$	$0,199 \pm 0,181$	85,71

Ghi chú: Na - Số alen quan sát; Ne - Số alen có ý nghĩa; I - Chỉ số đa dạng Shannon; h - Chỉ số đa dạng theo Nei; PPB (%) - Phần trăm phân đoạn đa hình

Khi so sánh với một số loài lá kim quý hiếm ở Việt Nam nhận thấy, loài Thiết sam giả lá ngắn có mức độ đa dạng di truyền cao hơn rõ rệt ($I = 0,317$; $h = 0,199$; $PPB = 85,71\%$) so với Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) ($I = 0,254$; $h = 0,116$; $PPB = 51,16\%$) và Thông lá dẹt (*Pinus krempfii*) ($I = 0,245$; $h = 0,094$; $PPB = 71,53\%$) (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015). Kết quả tương đương với các nghiên cứu tại Trung Quốc, nơi *P. brevifolia* cũng ghi nhận giá trị $h = 0,20$ và $PPB > 80\%$ (Li *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, loài Douglas - fir (*Pseudotsuga menziesii*) thể hiện mức độ đa dạng cao hơn với h dao động từ 0,23 - 0,38 và $PPB > 70\%$ (Morgado *et al.*, 2009); loài *P. japonica* tại Nhật Bản lại có mức đa

dạng thấp hơn, với $h = 0,15$ và PPB khoảng 60% (Aizawa *et al.*, 2012).

Như vậy, kết quả đa dạng di truyền cho thấy, quần thể Thiết sam giả lá ngắn tại tỉnh Hà Giang và Cao Bằng có giá trị cao hơn so với quần thể tại Bắc Kạn. Mức độ đa dạng di truyền chỉ ra rằng, loài Thiết sam giả lá ngắn ở các tỉnh miền núi phía Bắc có nguy cơ suy giảm đa dạng di truyền ở mức trung bình đến rất cao.

3.2. Cấu trúc di truyền

Mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các quần thể và giữa các mẫu trong cùng quần thể Thiết sam giả lá ngắn thu được cho thấy, tổng mức độ biến đổi phân tử giữa các quần thể tại

các tỉnh là rất thấp (20,68%) và cao giữa các mẫu trong cùng quần thể (79,32%) với giá trị ($p \leq 0,001$) (Bảng 4). Đối với các loài cây rừng nói chung, mức độ sai khác về mặt phân tử gián tiếp phản ánh hệ thống sinh sản của loài, thường đối với các loài có hình thức sinh sản qua thụ phấn chéo thì giá trị này giữa các cá thể trong cùng một quần thể là rất cao (>75%).

Ở các loài cây lá kim thụ phấn nhờ gió và giao phấn chéo cao, phần lớn biến dị di truyền (>75%) tập trung trong cùng quần thể, trong khi mức độ sai khác giữa các quần thể thường thấp (Hamrick & Godt, 1996; Ledig, 1998). Mặc dù chưa có những nghiên cứu rõ ràng về cơ chế sinh học sinh sản ở loài cây này, nhưng phần lớn các loài cây lá kim được thụ phấn chủ yếu nhờ gió và có tỷ lệ giao phấn chéo cao, kết quả phân tích AMOVA cũng ủng hộ cho nhận định này, tuy nhiên, với mức độ sai khác giữa các quần thể đạt 20,68% chứng tỏ giữa các quần thể có mức độ tương đồng về di truyền cao và có sự trao đổi gen giữa các quần thể nghiên cứu.

Bảng 4. Mức độ biến đổi phân tử (AMOVA) giữa và trong quần thể Thiết sam giả lá ngắn

AMOVA	Tỷ lệ
Giữa các quần thể	20,68%
Giữa các mẫu trong quần thể	79,32%
Φ_{IPT}	0,207 ($p \leq 0,001$)

Cho đến nay, các quần thể Thiết sam giả lá ngắn ở nước ta chưa có nghiên cứu về mức độ đa dạng di truyền đối với loài. Khi so sánh với loài lá kim tại Việt Nam, loài Thiết sam giả lá ngắn ở các tỉnh miền núi phía Bắc có mức biến đổi phân tử giữa các quần thể là tương đương với loài Thông lá dẹt (20,68% so với 20,28%) (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015); cao hơn so với Thông Pa cò (20,68% so với 13%) (Mai Thị Phương Thủy *et al.*, 2020) nhưng lại thấp hơn so với Bách xanh (20,68% so với 36,33%) (Trần Thị Liễu *et al.*, 2015) được đánh giá bằng chỉ thị ISSR.

Bảng 5. Các chỉ số đa dạng di truyền giữa các mẫu Thiết sam giả lá ngắn

Các chỉ số	Trung bình
Số lượng mẫu	71
H_T	0,1948 $\pm$ 0,0295
H_S	0,1624 $\pm$ 0,0188
G_{ST}	0,1664
N_m	2,5045

Ghi chú: H_T - chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các quần thể; H_S - chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình trong quần thể; G_{ST} - chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các quần thể và N_m - chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể

Kết quả phân tích các chỉ số đa dạng di truyền tại bảng 5 cho thấy, các quần thể Thiết sam giả lá ngắn có tính đa dạng di truyền ở mức trung bình với chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình trong quần thể là $H_S = 0,1624$, chiếm 84,31% đa dạng nguồn gen của tổng các quần thể $H_T = 0,1948$. Chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các quần thể tại 3 tỉnh thu mẫu đạt $G_{ST} = 0,1664$, chứng tỏ có 16,64% (> 10%) sự khác biệt giữa các quần thể được nghiên cứu. Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể được tính toán và đạt $N_m = 2,5045$ chứng tỏ có sự trao đổi gen giữa các mẫu và giữa các quần thể Thiết sam giả lá ngắn ở mức trung bình. Sự đa dạng về mặt di truyền chủ yếu là giữa các cá thể trong cùng 1 quần thể chứ không phải giữa các quần thể khác nhau, mặc dù hiện nay phân bố của loài bị phân mảnh. Do đó, công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây này tại các tỉnh miền núi phía Bắc cần được chú trọng và cần thiết trong thời gian tới.

Bảng 6. Khoảng cách di truyền (dưới) và mức độ tương đồng di truyền (trên) giữa các quần thể Thiết sam giả lá ngắn

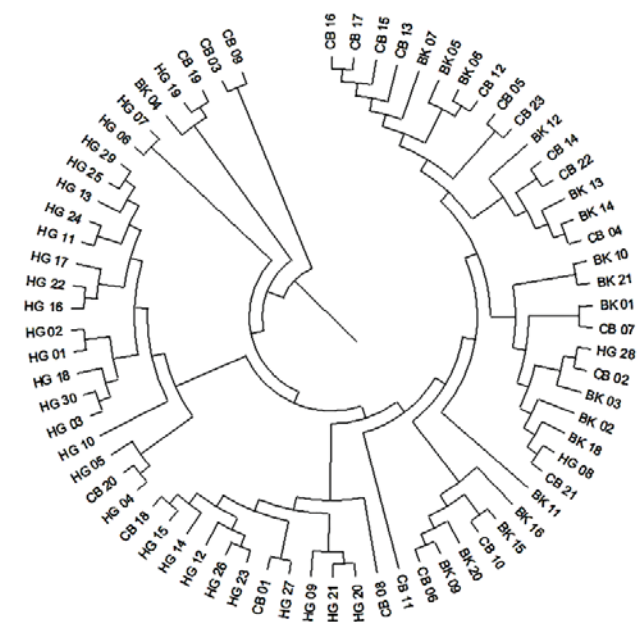
	Bắc Kạn	Hà Giang	Cao Bằng
Bắc Kạn	-	0,917	0,983
Hà Giang	0,087	-	0,926
Cao Bằng	0,017	0,077	-

Kết quả bảng 6 chỉ ra rằng, quần thể Hà Giang và Bắc Kạn có khoảng cách di truyền lớn nhất

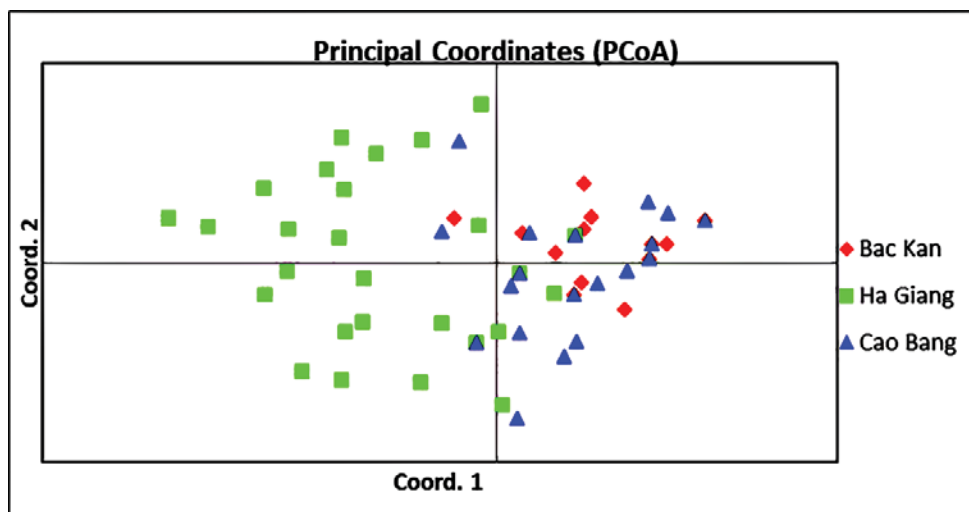
(0,087) và nhỏ nhất giữa quần thể Cao Bằng và Bắc Kạn (0,017). Tương tự, mức độ tương đồng di truyền giữa quần thể Cao Bằng và Bắc Kạn (0,983) giống nhau nhiều nhất, giữa quần thể Hà Giang và Bắc Kạn (0,917) là ít nhất.

Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 71 mẫu Thiết sam giả lá ngắn đánh giá đa dạng di truyền (hình 3) chia thành các nhóm có sự đan xen nhau giữa các quần thể nghiên cứu.

Trong đó, các mẫu thuộc quần thể Hà Giang có xu hướng tập trung gần nhau, trong khi các mẫu Bắc Kạn và Cao Bằng lại phân bố xen kẽ. Điều này phản ánh sự trao đổi nguồn gen giữa các quần thể và cho thấy khoảng cách di truyền giữa chúng tương đối gần nhau. Kết quả này phù hợp với phân tích tọa độ chính (PCoA) (hình 4), khi các mẫu nghiên cứu cũng không tách biệt rõ ràng theo từng quần thể.



Hình 3. Sơ đồ hình cây của 71 mẫu Thiết sam giả lá ngắn theo mức độ tương đồng và kiểu phân nhóm UPGMA



Hình 4. Phân tích tọa độ chính PCoA của 71 mẫu Thiết sam giả lá ngắn được nghiên cứu

Như vậy, với mức độ đa dạng di truyền chủ yếu tồn tại giữa các cá thể trong cùng quần thể và hệ thống sinh sản chủ yếu là thụ phấn chéo bằng gió, có thể đề xuất một số định hướng bảo tồn như sau:

- Bảo vệ tối đa các cá thể hiện có trong các quần thể tự nhiên còn tồn tại ở nước ta, nhằm duy trì nguồn gen tại chỗ.
- Xây dựng các khu bảo tồn chuyển chỗ (Ex situ), trong đó nguồn vật liệu di truyền cần được lựa chọn từ các cá thể có khoảng cách di truyền xa nhau cả trong cùng quần thể và giữa các quần thể, nhằm tăng cường khả năng thụ phấn chéo và duy trì mức độ đa dạng di truyền của loài.

IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả phân tích đa dạng di truyền của 71 mẫu Thiết sam giả lá ngắn bằng chỉ thị ISSR, có

thể khẳng định rằng loài này vẫn duy trì được mức biến dị di truyền trung bình khá. Kết quả phân tích đã thu được 62 phân đoạn DNA, trong đó có 38 phân đoạn đa hình (chiếm 61,90%). Mức độ đa dạng di truyền trung bình của các quần thể đạt $N_a = 1,492$; $N_e = 1,258$; $I = 0,257$; $h = 0,162$ và $PPB = 61,90\%$. Kết quả AMOVA cho thấy phần lớn biến dị di truyền tập trung trong từng quần thể (79,32%), trong khi biến dị giữa các quần thể chỉ chiếm 20,68%, phản ánh đặc trưng hệ thống sinh sản thụ phấn chéo phổ biến ở các loài lá kim thụ phấn nhờ gió. Các chỉ số $G_{ST} = 0,1664$ và $N_m = 2,5045$ cho thấy, dòng gen giữa các quần thể vẫn duy trì ở mức đủ lớn để hạn chế sự phân hóa di truyền; khoảng cách di truyền dao động từ 0,017 đến 0,087, trong khi mức độ tương đồng di truyền tương đối cao (0,917 - 0,983).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aizawa, M., Yoshimaru, H., Saito, H., 2012. Genetic diversity and structure of Japanese Douglas - fir (*Pseudotsuga japonica*). *Tree Genetics & Genomes*, 8: 1203 - 1212.
2. Bornet, B., Branchard, M., 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 209-215. DOI: 10.1007/bf02772892.
3. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam - Phần II: Thực vật. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
4. Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
5. Đinh Thị Phòng, Vũ Đình Phương, Nguyễn Thanh Tiến, 2015. Nghiên cứu đa dạng di truyền Thông pà cò (*Pinus kwangtungensis*) ở Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 8: 112 - 118.
6. Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351: 1291 - 1298. DOI: 10.1098/rstb.1996.0112.
7. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547 - 1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
8. Ledig, F.T., 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson, D.M. (ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 251 - 280.
9. Li, X., Zhang, Y., Chen, L., 2017. Genetic diversity of *Pseudotsuga brevifolia* in China assessed by ISSR markers. *Plant Diversity*, 41: 95 - 103.
10. Mai Thi Phuong Thuy, Tran Thi Thu Ha, Tran Ho Quang, 2020. Analysis of genetic diversity in Pa Co pine (*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang) using RAPD and ISSR markers. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 62(1) p 62 - 68. DOI: 10.31276/VJSTE.62(1).62 - 68.
11. Morgado, E.S., Rodrigues, J., Silva, P., 2009. Genetic variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) populations based on ISSR markers. *Annals of Forest Science*, 66: 707.

12. Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5269 - 5273. DOI: 10.1073/pnas.76.10.5269.
13. Nguyễn Tiến Hiệp, Phan Kế Lộc, Nguyễn Thị Dần, 2004. Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Tập II. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
14. Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước CITES.
15. Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22/9/2021 của Chính phủ. Sửa đổi, bổ sung một số điều của Nghị định số 06/2019/NĐ-CP về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước CITES.
16. Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288 - 295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
17. Peakall R, Smouse P.E., 2012. GenAlEx 6.5: an update for genetic analysis in Excel. *Bioinformatics*, 28: 2537 - 2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
18. Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1): 9 - 17. DOI: 10.1023/A:1020691618797.
19. Si Ci Yin, Li, J., Wang, Y., 2014. The essential oil composition of *Pseudotsuga brevifolia*. *Journal of Essential Oil Research*, 26(2): 145 - 152.
20. Trần Thị Liễu, Nguyễn Văn Trương, Nguyễn Ngọc Nam, 2015. Đa dạng di truyền của loài Bách xanh (*Calocedrus macrolepis* Kurz) và Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 3: 45 - 53.
21. White, G., Powell, W., 1997. Utility of ISSR markers in plant genetic studies. *Molecular Ecology*, 6: 881 - 891.
22. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T., 1997. POPGENE, Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
23. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2): 176 - 183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.

Email tác giả liên hệ: ngoducnhac@gmail.com

Ngày nhận bài: 26/08/2025

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 27/08/2025; 28/08/2025

Ngày duyệt đăng: 30/09/2025