

PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN GIỮA CÁC QUẦN THỂ SƠN TRÀ (*Docynia indica* (Wall.) Decne) BẰNG CHỈ THỊ ISSR

Vũ Thị Thu Hiền¹, Trần Thị Liệu¹, Đinh Thị Phòng¹,
Phí Hồng Hải², La Ánh Dương², Vũ Đức Toàn³, Delia Catacutan⁴, Đàm Việt Bắc⁴

¹ Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

² Viện KH Lâm nghiệp Việt Nam

³ Đại học Tây Bắc

⁴ Tổ chức Nông Lâm quốc tế (ICRAF) tại Việt Nam

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 30 chỉ thị ISSR đã được sử dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền genome của 35 mẫu Sơn tra thu thập ở 7 quần thể (Mường La, Cà Mạ, Bắc Yên, Trạm Tấu, Mù Căng Chải, Bát Xát and Sìn Hồ). Kết quả chỉ ra 28/30 chỉ thị chỉ ra tính đa hình và nhân bản được 148 phân đoạn DNA, trong đó có 96 phân đoạn đa hình (chiếm 64,86%). Trung bình giá trị đa dạng gen trên một locus (H_j) và hàm lượng thông tin đa hình của các chỉ thị tương ứng là 0,133 và 0,119. Kết quả phân tích các thông số di truyền của 5 tiểu quần thể Sơn tra (trừ 2 tiểu quần thể Cà Mạ và Sìn Hồ chỉ có một cá thể duy nhất không đánh giá được một số thông số di truyền) cho thấy tính đa dạng di truyền của các tiểu quần thể Sơn tra ở Tây Bắc tương đối thấp ($N_a = 1,013$; $N_e = 1,109$; $I = 0,122$, $H_e = 0,084$; $h = 0,075$ và $PPB = 21,17\%$) trong đó thấp nhất là tiểu quần thể Bát Xát và cao nhất là tiểu quần thể Bắc Yên. Hệ số di nhập gen (N_m) của loài Sơn tra ở mức trung bình ($N_m = 0,843$), thể hiện cao nhất ở hai locus UBC834 và UBC841 ($N_m = 4,0$) và thấp nhất ở locus ISSR6 và UBC859 ($N_m = 0$). Hệ số tương đồng di truyền giữa 35 mẫu Sơn tra dao động từ 0,567 (BY29 và TT45, BS63) đến 0,965 (MCC49 và MCC51). Biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 35 mẫu Sơn tra phân tích với chỉ thị ISSR chia làm 2 nhánh chính có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng 61 - 96%, các mẫu thu ở cùng một địa điểm đều nằm trong những nhánh phụ riêng biệt.

Từ khóa: Sơn tra, *Docynia indica*, đa hình AND, mối quan hệ di truyền, ISSR

Analysis of genetic diversity between populations of *Docynia indica* (Wall.) Dence by ISSR markers

Keywords: *Docynia indica* (Wall.) Dence, polymorphism DNA genetic diversity, ISSR

In our study, 30 ISSR markers were used to assess genetic diversity of 35 *Docynia indica* samples collected from 7 different populations (Muong La, Co Ma, Bac Yen, Tram Tau, Mu Cang Chai, Bat Xat and Sin Ho). Among 30 ISSR markers, there were 28 markers that revealed polymorphism. A total of 148 DNA fragments were generated but only 96 DNA fragments showed polymorphism (approximately 64.86%). Average value of genetic diversity on a locus and polymorphism information of the markers were 0.133 and 0.119, respectively. The results of genetic diversity of 5 populations of *Docynia indica* (except for Co Ma và Sin Ho;

because they have only one sample) showed that genetic diversity of 5 populations of *Docynia indica* was low ($N_a = 1.013$; $N_e = 1.109$; $I = 0.122$, $H_e = 0.084$; $h = 0.075$ và $PPB = 21.17\%$). Bat Xat population was the lowest genetic diversity; Bac Yen population was the highest genetic diversity. Gene-flow (N_m) of *Docynia indica* was average ($N_m = 0.843$), two locus UBC834 và UBC841 ($N_m = 4.0$) had the highest values and two locus ISSR6 and UBC859 ($N_m = 0$) had the lowest. Genetic similarity coefficients between samples ranged from 0.567 (BY29 and TT45, BS63) to 0.965 (MCC49 and MCC51). The pattern of grouping in the dendrogram divided 35 *Docynia indica* samples into 2 main groups, with genetic similarity coefficients ranged from 61-96%. The samples collected from the same population belong to separate subgroups group.

I. MỞ ĐẦU

Sơn tra hay còn gọi là Táo mèo (*Docynia indica* (Wall.) Decne) là loài thân gỗ thuộc chi Táo mèo (*Docynia*) trong họ Hoa hồng (Rosaceae). Sơn tra là loài ưa sáng, thường mọc rải rác trong rừng hoặc thành quần thể thuần loài trong trảng cây bụi, ven đồi, suối, sườn núi ở độ cao 1500 - 3000m. Ở Việt Nam loài được tìm thấy ở các tỉnh miền núi phía Bắc như Lai Châu (Phong Thổ), Lào Cai (Sapa), Cao Bằng, Sơn La (Bắc Yên: Tạ Xùa), Yên Bái. Trên thế giới loài phân bố ở các nước Trung Quốc, Ấn Độ, Mianma và Thái Lan (Sách đỏ Việt Nam, 2007).

Quả và hạt Sơn tra được sử dụng rộng rãi như là nguồn dược liệu nên được nhân dân địa phương khai thác hàng năm để dùng và bán dẫn tới việc giảm số lượng cá thể và thu hẹp khu phân bố. Vì vậy cần có chiến lược khai thác thích hợp (chỉ hái quả, không chặt cây) và khoanh vùng giữ lại các cây con mọc hoang trong rừng, ven bản làng. Đồng thời cần có biện pháp gây trồng trong vườn rừng ở vùng cao (Đinh Thị Kim Chung, 2007).

Để công tác bảo tồn loài được hiệu quả, việc nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các quần thể và giữa cá thể trong quần thể hết sức quan trọng và cần thiết. Hiện nay, đã có rất nhiều nghiên cứu sử dụng các chỉ thị phân tử như SSR, ISSR, RFLP, AFLP, RAPD,... trong

đánh giá mức độ di truyền trên nhiều đối tượng sinh vật ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới và Việt Nam. Các kết quả thu được rất có giá trị trong chọn tạo giống cũng như công tác bảo tồn và tái tạo nguồn gen (Chung *et al.*, 2004; Vũ Thị Thu Hiền *et al.*, 2009; Nguyễn Hoàng Nghĩa *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Dinh Thi Phong *et al.*, 2009; 2014). Trong các loại chỉ thị thì chỉ thị ISSR (Inter Sequence Simple Repeat) đang được ứng dụng rộng rãi và có hiệu quả trong việc đánh giá đa dạng di truyền ở cả mức độ quần thể và loài (Nguyễn Đức Thành, 2014; Vũ Đình Duy *et al.*, 2010; Đinh Thị Phòng *et al.*, 2015; Trần Thị Liễu *et al.*, 2015). Tuy nhiên đối với loài Sơn tra và một số loài khác thuộc chi *Docynia* hầu như chưa có một nghiên cứu nào đánh giá về mức độ đa dạng di truyền của loài. Các nghiên cứu mới chỉ tập trung vào thành phần hóa học và tác dụng dược liệu của các sản phẩm chế biến từ quả Sơn tra (Đinh Thị Kim Chung, 2007; Hoàng Thị Minh Tân, 2009; Vũ Thị Huệ và Bùi Thị Việt Hà, 2010; Nguyễn Thị Thanh Loan *et al.*, 2011; Vũ Thị Hạnh Tâm, 2011).

Xuất phát từ cơ sở khoa học trên, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền 35 mẫu Sơn tra bản địa (*Docynia indica*) bằng chỉ thị ISSR tại 7 quần thể ở Tây Bắc làm cơ sở cho công tác bảo tồn và chọn tạo nguồn gen loài Sơn tra của Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu: Bao gồm 35 mẫu lá Sơn tra được ký hiệu và nơi thu thập như bảng 1. Đây là các mẫu lá trộn từ 3 cây cá thể trong các quần thể tự nhiên của Sơn tra tại Tây Bắc. Các cây cá thể được chọn ngẫu nhiên và đảm bảo cách nhau tối thiểu 300m.

Các môi sử dụng trong nghiên cứu: 30 chỉ thị ISSR được tổng hợp bởi hãng IDT (Integrated DNA Technology, Mỹ). Trình tự nucleotide của các môi ISSR được trình bày trong bảng 2.

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số từ 35 mẫu lá Sơn tra được tách chiết theo phương pháp miêu tả bởi Doyle và Doyle (1987) có cải tiến một số bước cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Sau đó được tinh sạch bằng bộ kit (genome DNA purification kit, # KO512) của hãng Fermentas. Hàm lượng và độ sạch của DNA tổng số được đo trên máy quang phổ hấp phụ và kiểm tra trên gel agarose 0,9%.

Phản ứng PCR - RAPD: Một phản ứng PCR có thể tích 25 μ l: Bao gồm dung dịch đệm PCR 1X; 2,5 mM MgCl₂; 2 mM dNTPs; 200nM đoạn môi; 1,125 đơn vị *Taq* polymerase và 10 ng ADN khuôn. Phản ứng PCR - RAPD thực hiện trong máy PCR - Thermal Cycler theo chu trình nhiệt: bước 1: 94°C - 1 phút; bước 2: 92°C - 1 phút; bước 3: 35°C - 1 phút; bước 4: 72°C - 1 phút; từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ; bước 5: 72°C - 10 phút; bước 6: Giữ sản phẩm ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%, nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh trên máy soi gel.

Phân tích số liệu: Phân tích số liệu theo quy ước: 1 = phân đoạn ADN xuất hiện và 0 = phân đoạn ADN không xuất hiện, khi điện di sản phẩm RAPD với các đoạn môi ngẫu nhiên.

Xác định hệ số tương đồng di truyền theo phương pháp của Nei và Li 1979 (hệ số Dice):

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Trong đó: S_{ij} : Hệ số giống nhau giữa cá thể i và j ; a : Số phân đoạn ADN xuất hiện ở cả cá thể i và j ; b : Số phân đoạn ADN xuất hiện ở i và không xuất hiện ở j ; c : Số phân đoạn ADN xuất hiện ở j và không xuất hiện ở i .

Các thông số di truyền nghiên cứu quan tâm như số alen trung bình quan sát (Number of alleles: N_a), số alen hiệu quả (Number of effective alleles: N_e), hệ số gen dị hợp tử mong đợi (Expected heterozygosity: H_e), chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (Shannon's index: I), hệ số di nhập gen (N_m) của 7 tiểu quần thể Sơn tra được tính toán ở mức độ quần thể và loài bằng phần mềm GenAlex 6.3 (Peakall & Smouse, 2006) và phần mềm Popgen (Yeh *et al.*, 1999). Chỉ số đa dạng di truyền (h) theo cách tính của Nei (1973) được tính bằng công thức: $h = \sum p_i^2$ (trong đó p_i là tần số của alen thứ i tại locus đó) (Nei, 1973).

Hàm lượng thông tin đa hình (Polymorphism information content: PIC) của mỗi chỉ thị được xác định theo công thức $PIC = 1 - \sum p_i^2$, trong đó P_i là tần số alen thứ i của kiểu gen được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn). Giá trị đa dạng gen trên một locus (Intralocus Gene Diversity: H_j) được tính theo công thức: $H_j = 1 - p^2 - q^2$.

Biểu đồ hình cây và biểu đồ đa chiều thể hiện mối quan hệ di truyền của 35 mẫu Sơn tra được thiết lập dựa trên giá trị của khoảng cách di truyền bằng phần mềm NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1992) và giá trị Bootstrap được hỗ trợ bởi phần mềm Win-Boot (Yap, 1996) với số lần lặp lại 1000 lần.

Bảng 1. Nguồn gốc, ký hiệu và tọa độ của 35 mẫu Sơn tra sử dụng trong nghiên cứu

Số mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu hái mẫu	Tọa độ địa lý		
			Kinh độ	Vĩ độ	Độ cao (so mặt nước biển)
7	ML1	Bản Nậm Nghiệp - Ngọc Chiến - Mường La - Sơn La	104 ^o 23.662	21 ^o 60.100	1837
	ML4		104 ^o 27.753	21 ^o 60.180	1889
	ML5		104 ^o 23.920	21 ^o 60.131	1850
	ML6		104 ^o 23.999	21 ^o 60.114	1913
	ML9		104 ^o 24.114	21 ^o 60.063	1920
	ML14		104 ^o 24.580	21 ^o 59.704	1975
	ML19		104 ^o 24.790	21 ^o 59.510	1984
1	ĐB11	Cò Mạ, Sơn La	103 ^o 42.348	21 ^o 36.223	1785
8	BY10	Bắc Yên, Sơn La	104 ^o 40.731	21 ^o 29.339	1707
	BY21	Bản Cáo A - Làng Chiếu - Bắc Yên - Sơn La	104 ^o 40.134	21 ^o 29.366	1711
	BY23		104 ^o 40.158	21 ^o 29.219	1663
	BY26		104 ^o 40.302	21 ^o 29.377	1716
	BY29		104 ^o 40.707	21 ^o 29.431	1716
	BY30		104 ^o 40.713	21 ^o 29.338	1714
	BY32		104 ^o 40.739	21 ^o 29.311	1701
	BY34		104 ^o 40.956	21 ^o 29.371	1717
6	TT36		Thôn Suối Giao - Xà Hồ - Trạm Tầu - Yên Bái	104 ^o 39.168	21 ^o 52.381
	TT37	104 ^o 39.233		21 ^o 52.368	1563
	TT39	104 ^o 39.245		21 ^o 52.317	1556
	TT45	104 ^o 39.251		21 ^o 52.410	1604
	TT47	104 ^o 39.263		21 ^o 52.392	1597
	TT48	104 ^o 39.359		21 ^o 52.078	1464
8	MCC49	Bản Cán Động - Nậm Khắt - Mù Cang Chải - Yên Bái	104 ^o 20.190	21 ^o 67.990	1574
	MCC51		104 ^o 20.142	21 ^o 68.042	1568
	MCC53		104 ^o 20.155	21 ^o 67.975	1580
	MCC56		104 ^o 20.259	21 ^o 67.014	1600
	MCC58		104 ^o 20.280	21 ^o 68.036	1595
	MCC59		104 ^o 20.287	21 ^o 68.015	1605
	MCC60		104 ^o 20.214	22 ^o 63.347	1576
	MCC61		103 ^o 63.049	22 ^o 63.437	1955
4	BS62	Bản Phìn Hồ - Y Tý - Bát Xát - Lào Cai	103 ^o 63.231	22 ^o 63.560	1965
	BS63		103 ^o 63.252	22 ^o 63.545	1971
	BS64		103 ^o 63.254	22 ^o 63.545	1972
	BS65		103 ^o 63.539	22 ^o 63.256	1972
1	SH70	Sìn Hồ, Lai Châu	103 ^o 49.757	22 ^o 08.791	1952

Bảng 2. Trình tự các nucleotide 30 chỉ thị ISSR sử dụng trong nghiên cứu

TT	Chỉ thị	Trình tự nucleotide	Tài liệu tham khảo
1	ISSR1	(CAG) ₅	Bornet <i>et al.</i> , 2011
2	ISSR2	(CAA) ₅	Bornet <i>et al.</i> , 2011
3	ISSR5	(CCG) ₆	Lee <i>et al.</i> , 2011
4	ISSR6	(CTC) ₆	Lee <i>et al.</i> , 2011
5	ISSR8	(GAA) ₆	Baloch <i>et al.</i> , 2010
6	ISSR9	(TG) ₈ GA	Baloch <i>et al.</i> , 2010
7	ISSR11	(CCA) ₅	Mahdizadeh <i>et al.</i> , 2012
8	ISSR14	(CT) ₈ GTC	Mahdizadeh <i>et al.</i> , 2012
9	ISSR16	(CT) ₈ AC	Mahdizadeh <i>et al.</i> , 2012
10	ISSR18	(CT) ₈ A	Mahdizadeh <i>et al.</i> , 2012
11	ISSR52	(CT) ₈ G	Arif <i>et al.</i> , 2009
12	ISSR54	(TC) ₈ G	Arif <i>et al.</i> , 2009
13	ISSR55	(AC) ₈ T	Arif <i>et al.</i> , 2009
14	ISSR59	(GA) ₈ CT	Arif <i>et al.</i> , 2009
15	ISSR61	(AC) ₈ TG	Arif <i>et al.</i> , 2009
16	ISSR64	ACA(GT) ₇	Arif <i>et al.</i> , 2009
17	ISSR67	(ATG) ₆	Arif <i>et al.</i> , 2009
18	ISSR69	(GGGTG) ₃	Arif <i>et al.</i> , 2009
19	HB12	(CAC) ₃ GC	Parasharami <i>et al.</i> , 2012
20	HB15	GTG) ₃ GC	Parasharami <i>et al.</i> , 2012
21	A17901	(CA) ₆ AG	Parasharami <i>et al.</i> , 2012
22	UBC834	(AG) ₈ CT	Isshiki <i>et al.</i> , 2008
23	UBC841	(GA) ₈ CC	Wang <i>et al.</i> , 2010
24	UBC846	(CA) ₈ GT	Wang và Hao 2010
25	UBC849	(GT) ₈ CA	Wang và Hao 2010
26	UBC851	(GT) ₈ CG	Wang và Hao 2010
27	UBC854	(TC) ₈ AG	Wang và Hao 2010
28	UBC855	(AC) ₈ CT	Yang <i>et al.</i> , 2005
29	UBC859	(TG) ₈ GC	Wang <i>et al.</i> , 2010
30	UBC876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	Wang và Hao 2010

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng nguồn gen di truyền của 35 mẫu Sơn tra

Kết quả nghiên cứu phân tích tính đa hình DNA của 35 mẫu Sơn tra thu tại 7 tiểu quần thể ở 4 tỉnh Tây Bắc cho thấy có 28/30 chỉ thị chỉ ra tính đa hình, với giá trị PIC dao động từ 0 (chỉ thị ISSR18 và UBC855) đến 0,255 (chỉ thị ISSR54). Số lượng các phân đoạn DNA nhân bản được với mỗi chỉ thị dao động từ 2 (chỉ thị ISSR64) đến 8 phân đoạn (chỉ thị

HB12). Tổng số phân đoạn DNA khi phân tích với 30 chỉ thị là 148 phân đoạn, trong đó có 96 phân đoạn đa hình (chiếm 64,86%) và 52 phân đoạn đồng hình (chiếm 35,14%). Trong tổng số 30 chỉ thị sử dụng phân tích thì có 03 chỉ thị (ISSR8, ISSR59 và UBC849) có số phân đoạn đa hình hoàn toàn (100%), 22 chỉ thị có tính đa hình trên 50%. Trung bình giá trị đa dạng gen trên một locus (H_j) và hàm lượng thông tin đa hình của các chỉ thị (PIC) là 0,133 và 0,119 tương ứng (Bảng 3).

Bảng 3. Tỷ lệ phân đoạn đa hình, giá trị PIC, đa dạng gen một locus và hệ số di nhập gen của 35 mẫu Sơn tra phân tích với 30 chỉ thị ISSR

TT	Chỉ thị	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Tổng phân đoạn	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	% phân đoạn đa hình	Giá trị PIC	Đa dạng gen trên một locus (H)	Hệ số di nhập gen (Nm)
1	ISSR1	375 - 1200	6	5	1	83,33	0,219	0,188	0,158
2	ISSR2	500 - 1200	4	2	2	50,00	0,173	0,196	0,070
3	ISSR5	600 - 1100	3	1	2	33,33	0,005	0,019	2,919
4	ISSR6	600 - 1100	6	5	1	83,33	0,115	0,193	0,000
5	ISSR8	300 - 1400	7	7	0	100,00	0,180	0,272	0,137
6	ISSR9	600 - 1350	6	5	1	83,33	0,158	0,167	0,904
7	ISSR11	350 - 2000	6	3	3	50,00	0,158	0,075	0,610
8	ISSR16	350 - 900	6	4	2	66,67	0,168	0,143	0,520
9	ISSR14	500 - 1350	5	2	3	40,00	0,112	0,157	0,250
10	ISSR18	320 - 950	3	0	3	0,00	0,000	0,000	-
11	ISSR52	300 - 1250	7	6	1	85,71	0,153	0,273	0,430
12	ISSR54	400 - 1050	6	5	1	83,33	0,255	0,190	0,670
13	ISSR55	500 - 1100	5	4	1	80,00	0,181	0,065	2,208
14	ISSR59	600 - 850	3	3	0	100,00	0,083	0,221	0,461
15	ISSR61	400 - 950	6	5	1	83,33	0,185	0,154	0,258
16	ISSR64	650 - 750	2	1	1	50,00	0,022	0,078	2,561
17	ISSR67	400 - 1000	3	1	2	33,33	0,010	0,036	1,750
18	ISSR69	650 - 1300	5	3	2	60,00	0,145	0,120	0,665
19	HB12	500 - 2000	8	4	4	50,00	0,099	0,124	0,231
20	HB15	300 - 1700	7	3	4	42,86	0,015	0,051	0,455
21	A17901	300 - 1600	7	6	1	85,71	0,250	0,246	0,394
22	UBC834	250 - 900	6	4	2	66,67	0,010	0,037	4,000
23	UBC841	500 - 750	3	1	2	33,33	0,005	0,019	4,000
24	UBC846	250 - 1000	7	5	2	71,43	0,123	0,203	0,230
25	UBC849	600 - 1500	4	4	0	100,00	0,244	0,249	0,263
26	UBC851	400 - 950	4	2	2	50,00	0,068	0,149	0,570
27	UBC854	400 - 1000	3	2	1	66,67	0,019	0,071	0,353
28	UBC855	350 - 700	3	3	0	0,00	0,000	0,000	-
29	UBC859	500 - 1000	3	1	2	33,33	0,207	0,082	0,000
30	UBC876	500 - 800	4	2	2	50,00	0,217	0,211	0,231
			148	96	52	64,86	0,119	0,133	0,843

Đến nay có thể nói gần như chưa có một nghiên cứu nào trên thế giới và Việt Nam về đa dạng di truyền loài Sơn tra và các loài trong chi *Docynia*. Các nghiên cứu mới tập trung

trên một số loài thuộc chi khác trong họ Hoa hồng (Rosaceae) như *Crataegus* (Rajeb *et al.*, 2010; Beigmohamadi và Rahmani, 2011), *Rosa* (Jabbarzadeh *et al.*, 2013), *Malus*

(Goulão và Oliveira, 2001; Fazeli *et al.*, 2016) và *Prunus* (Tian *et al.*, 2015). Khi so sánh với một số loài khác trong họ Hoa hồng cho thấy loài Sơn tra ở Việt Nam có phần trăm phân đoạn đa hình (64,86%) thấp hơn loài *Prunus mira* (Trung Quốc) (100%) (Tian *et al.*, 2015), loài *Crataegus azarolus* (Tunisia) (77,14%) (Rajeb *et al.*, 2010), loài *Crataegus* spp. (Iran) (75,25%) (Beigmohamadi và Rahmani, 2011). Ở các quần thể tự nhiên Sơn tra, người dân chặt bỏ các loài cây khác và có thể trồng bổ sung thêm các cây Sơn tra cùng nguồn gốc xuất xứ, do vậy đây có thể là nguyên nhân tính đa hình thấp ở loài Sơn tra ở Việt Nam.

3.2. Một số thông số di truyền của các quần thể Sơn tra

Tính đa dạng di truyền giữa 35 mẫu Sơn tra được thể hiện qua các thông số di truyền khi phân tích ở mức độ quần thể và mức độ loài. Riêng hai quần thể Cò Mạ và Sìn Hồ chỉ có một mẫu duy nhất nên không đánh giá được một số thông số như chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (I), hệ số gen dị hợp tử mong đợi (He) và phần trăm phân đoạn đa hình (PPB). Kết quả phân tích các thông số di truyền của 5 quần thể Sơn tra còn lại cho thấy quần thể Bát Xát (Lào Cai) có tính đa dạng di truyền thấp nhất ($Na = 0,985$; $Ne = 1,1$; $I = 0,075$, $He = 0,053$; $h = 0,053$ và $PPB = 11,76\%$), thứ hai là quần thể Mường La ($Na = 1,037$; $Ne = 1,103$; $I = 0,087$, $He = 0,059$; $h = 0,058$ và $PPB = 15,44\%$), thứ ba là quần thể Trạm Tấu ($Na = 1,081$; $Ne = 1,123$; $I = 0,098$, $He = 0,067$; $h = 0,065$ và $PPB = 16,91\%$), thứ tư là quần thể Mù Cang Chải ($Na = 1,074$; $Ne = 1,129$; $I = 0,105$, $He = 0,072$; $h = 0,065$ và $PPB = 18,38\%$) và cao nhất là quần thể Bắc Yên ($Na = 1,346$; $Ne = 1,306$; $I = 0,246$, $He = 0,169$; $h = 0,132$ và $PPB = 43,38\%$) (Bảng 4). Ở mức độ quần thể, trung bình đa dạng di truyền theo Shannon (I) và theo Nei (h), phần trăm phân đoạn đa hình ($PPB\%$) của các quần thể Sơn tra tương ứng là 0,122; 0,075 và

21,17%. So sánh với một số loài khác cho thấy mức đa dạng di truyền của loài Sơn tra ở Việt Nam ($I = 0,122$; $h = 0,075$ và $PPB = 21,17\%$) thấp hơn loài *Prunus mira* ở Trung Quốc ($I = 0,38$; $h = 0,23$ và $PPB = 72,73\%$) (Tian *et al.*, 2015).

Ở mức độ loài, các thông số di truyền như số alen quan sát trung bình (Na); số alen hiệu quả (Ne); chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (I) và theo Nei (h); hệ số gen dị hợp tử mong đợi (He), phần trăm phân đoạn đa hình (PPB) của loài Sơn tra là 1,654; 1,365; 0,333; 0,146; 0,220 và 65,44, tương ứng (Bảng 4).

Kết quả phân tích ở bảng 4 cho thấy hệ số gen dị hợp tử mong đợi (He) của cả 5 tiểu quần thể (trừ tiểu quần thể Cò Mạ và Sìn Hồ) đều ở mức thấp (dao động từ 0,053 - 0,169). Trong đó tiểu quần thể Bát Xát thấp nhất (0,053). Hệ số dị hợp tử thấp đồng nghĩa với hệ số đồng hợp tử cao có thể là kết quả của quá trình giao phối cận huyết do ảnh hưởng bởi sự lạc dòng di truyền (genetic drift) do quần thể nhỏ và bị phân tách. Thêm vào đó số alen hiệu quả (Ne) cũng được tìm thấy rất thấp ở tiểu quần thể Bát Xát (1,100). Kết quả này cho phép nhận định sự suy giảm di truyền cao ở tiểu quần thể Bát Xát và cần sớm có biện pháp bảo vệ đặc biệt đối với tiểu quần thể này. Tuy nhiên kết quả phân tích trong bảng 4 cho thấy hệ số di nhập gen (Nm) của loài ở mức trung bình ($Nm = 0,843$), thể hiện cao nhất ở hai locus UBC834 và UBC841 ($Nm = 4,0$) và thấp nhất ở locus ISSR6 và UBC859 ($Nm = 0$). Kết quả này cho thấy sự biến động alen (thêm vào hay mất đi) xảy ra cao nhất ở hai locus UBC834 và UBC841. Sự di nhập gen có thể làm tăng hoặc giảm sự đa dạng di truyền của quần thể, tuy nhiên nếu sự di nhập gen tương đối cao vào quần thể có thể làm giảm hiệu quả biến đổi gen do chọn lọc tự nhiên, đột biến hay các yếu tố ngẫu nhiên và có thể làm chậm hoặc ngăn cản sự đa dạng của quần thể.

Bảng 4. Một số thông số đa dạng di truyền quần thể Sơn tra với chỉ thị ISSR

	Na	Ne	I	He	h	PPB (%)
Mường La	1,037	1,103	0,087	0,059	0,058	15,44
Cò Mạ	0,779	1,000	-	-	-	-
Bắc Yên	1,346	1,306	0,246	0,169	0,132	43,38
Trạm Tấu	1,081	1,123	0,098	0,067	0,065	16,91
Mù Cang Chải	1,074	1,129	0,105	0,072	0,065	18,38
Bát Xát	0,985	1,100	0,075	0,053	0,053	11,76
Sìn Hồ	0,787	1,000	-	-	-	-
Trung bình	1,013	1,109	0,122	0,084	0,075	21,17
Loài	1,654	1,365	0,333	0,220	0,146	65,44

Ghi chú: Na: Số alen quan sát trung bình; Ne: Số alen hiệu quả; I, h: Chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon và theo Nei; He: Hệ số gen di hợp tử mong đợi; PPB: Phần trăm phân đoạn đa hình; “ - ” Không đánh giá.

3.3. Hệ số tương đồng di truyền giữa 35 mẫu trong 7 quần thể Sơn tra

Hệ số tương đồng di truyền của 35 mẫu Sơn tra dao động từ 0,567 (BY29 và TT45, BS63) đến 0,965 (MCC49 và MCC51). Trong số các mẫu Sơn tra nghiên cứu thì mẫu BY29 có hệ số tương đồng di truyền với 34 mẫu còn lại thấp nhất, dao động từ 0,567 (BY29 và TT45, BS63) đến 0,670 (BY29 và BY30). Từ kết quả nhận được cho thấy các mẫu Sơn tra có quan hệ xa nhau về mặt di truyền, nhất là mẫu BY29 với các mẫu còn lại.

Mối quan hệ di truyền giữa các quần thể Sơn tra được xác định dựa trên hệ số tương đồng di

truyền và khoảng cách di truyền giữa 7 quần thể. Kết quả chỉ ra các quần thể Sơn tra nghiên cứu đều có hệ số tương đồng di truyền tương đối cao (dao động từ 0,796 đến 0,942), trung bình 0,881. Trong đó quần thể Bát Xát (Lào Cai) và Sìn Hồ (Lai Châu) có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất (0,942). Hệ số tương đồng di truyền thấp nhất được xác định giữa quần thể Cò Mạ (Sơn La) và quần thể Mùa Cang Chải (Yên Bái) (0,796). Tương tự, khoảng cách di truyền trung bình giữa các quần thể Sơn tra là 0,128 và được xác định cao nhất giữa cặp quần thể Mùa Cang Chải/ Cò Mạ (0,228), thấp nhất giữa cặp quần thể Bát Xát/ Sìn Hồ (0,060) (Bảng 5).

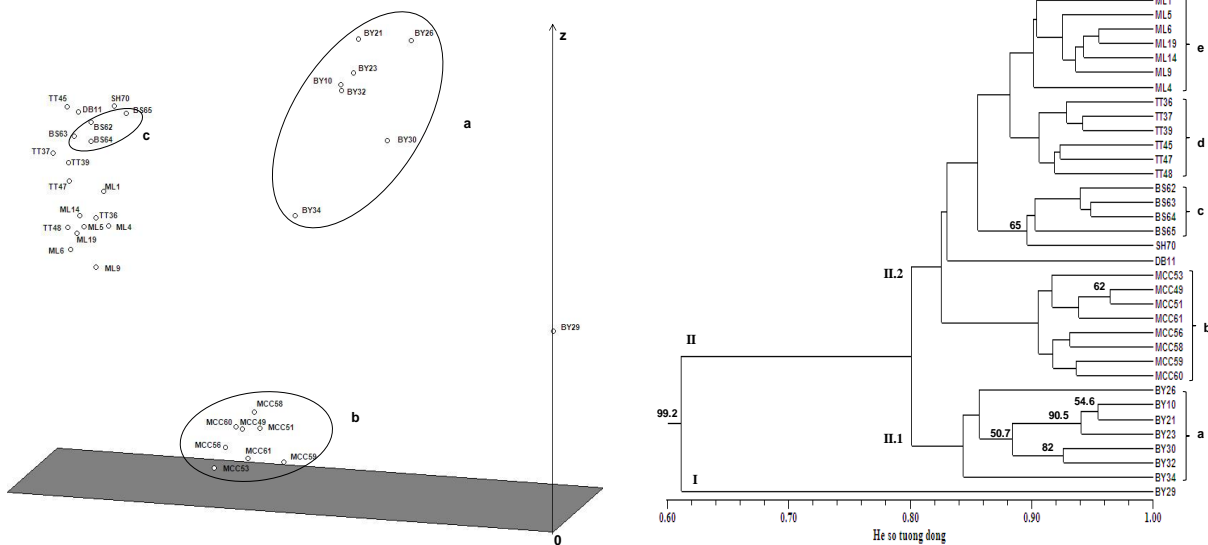
Bảng 5. Hệ số tương đồng di truyền (dưới) và khoảng cách di truyền (trên) theo Nei (1973) giữa 7 quần thể Sơn tra phân tích với chỉ thị ISSR

	Mường La (1)	Cò Mạ (2)	Bắc Yên (3)	Trạm Tấu (4)	Mù Cang Chải (5)	Bát Xát (6)	Sìn Hồ (7)	Trung bình
1		0,143	0,155	0,065	0,099	0,103	0,113	0,128
2	0,867		0,224	0,125	0,228	0,151	0,168	
3	0,857	0,799		0,156	0,147	0,175	0,172	
4	0,937	0,883	0,856		0,108	0,089	0,085	
5	0,906	0,796	0,863	0,898		0,156	0,157	
6	0,902	0,860	0,839	0,915	0,856		0,060	
7	0,893	0,846	0,842	0,918	0,855	0,942		
Trung bình	0,881							

3.4. Mối quan hệ di truyền giữa 35 mẫu Sơn tra nghiên cứu

Để có cái nhìn tổng quát hơn về mối quan hệ di truyền giữa 35 cá thể Sơn tra của 7 quần thể nghiên cứu, chúng tôi đã thiết lập sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 35 cá thể Sơn tra. Trước khi lập biểu đồ hình cây chúng tôi tính được giá trị tương quan

kiểu hình theo phương pháp của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA có giá trị cao nhất ($r = 0,92756$) (số liệu không chỉ ra ở đây). Vì vậy biểu đồ hình cây và biểu đồ đa chiều (Hình 1) của các mẫu Sơn tra nghiên cứu được thiết lập theo hệ số tương đồng di truyền khi tính bằng phương pháp của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA.



Hình 1. Biểu đồ hình cây (bên phải) và Biểu đồ đa chiều (bên trái) theo phương pháp của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA với giá trị bootstrap lặp lại 1000 lần thể hiện mối quan hệ di truyền của 35 mẫu Sơn tra phân tích với 30 chỉ thị ISSR (*Ghi chú:* a: mẫu ở Bắc Yên, b: mẫu ở Mù Cang Chải, c: mẫu ở Bát Xát, d: mẫu ở Trạm Tấu, e: mẫu ở Mường La).

Kết quả phân tích hình 1 cho thấy biểu đồ hình cây chia thành 2 nhánh chính I và II riêng biệt có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng 61 - 96%. Nhánh chính I gồm duy nhất mẫu BY29 ở Bắc Yên (Sơn La), nhánh chính II gồm 34 mẫu còn lại. Điều này cho phép nhận định mẫu BY29 có sự khác biệt di truyền với các mẫu còn lại lớn nhất. Kết quả này cũng phù hợp với phân tích hệ số tương đồng di truyền ở trên (mẫu BY29 có hệ số tương đồng di truyền với 34 mẫu còn lại thấp nhất, dao động từ 0,567 đến 0,670). Nhánh chính II chia thành 2 nhánh phụ II.1 và II.2 có hệ số tương

đồng di truyền trong khoảng từ 79,6% đến 96%. Trong đó nhánh phụ II.1 gồm 7 mẫu còn lại ở Bắc Yên là BY10, BY21, BY23, BY26, BY30, BY32 và BY34 có hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 84,2% đến 95,6%. Nhánh phụ II.2 lại chia thành 2 nhóm nhỏ hơn, trong đó nhóm thứ nhất gồm 8 mẫu thu ở Mù Cang Chải, Yên Bái (ký hiệu b) có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng 90,7 - 96%, nhóm thứ 2 gồm 19 mẫu còn lại có nguồn gốc từ Mường La, Cò Mạ (Sơn La), Trạm Tấu (Yên Bái), Bát Xát (Lào Cai) và Sìn Hồ (Lai Châu).

IV. KẾT LUẬN

- Ba mươi chỉ thị phân tử ISSR đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền cho 35 mẫu thuộc 7 tiểu quần thể Sơn tra (*D. indica*) ở 4 tỉnh Tây Bắc (Mường La, Cò Mạ, Bắc Yên, Trạm Tấu, Mù Cang Chải, Bát Xát và Sin Hồ). Kết quả chỉ ra 28/30 chỉ thị chỉ ra tính đa hình và nhân bản được 148 phân đoạn DNA, trong đó có 96 phân đoạn đa hình (chiếm 64,86%). Trung bình giá trị đa dạng gen trên một locus (H_j) và hàm lượng thông tin đa hình của các chỉ thị tương ứng là 0,133 và 0,119.

- Kết quả phân tích các thông số di truyền của 5 tiểu quần thể Sơn tra (trừ 2 tiểu quần thể Cò Mạ và Sin Hồ chỉ có một cá thể duy nhất không đánh giá được một số thông số di truyền) cho thấy tính đa dạng di truyền của các tiểu quần thể Sơn tra ở Tây Bắc tương đối thấp ($N_a = 1,013$; $N_e = 1,109$; $I = 0,122$, $H_e = 0,084$; $h = 0,075$ và $PPB = 21,17\%$) trong đó thấp nhất là tiểu quần thể Bát Xát, thứ hai là tiểu quần thể Mường La, thứ ba là tiểu quần thể Trạm Tấu, thứ tư là tiểu quần thể Mù Cang Chải và cao nhất là tiểu quần thể Bắc Yên. Hệ số di nhập gen (Nm) của loài Sơn tra ở mức trung bình ($Nm = 0,843$), thể hiện cao nhất ở hai locus UBC834 và UBC841 ($Nm = 4,0$) và thấp nhất ở locus ISSR6 và UBC859 ($Nm = 0$).

- Hệ số tương đồng di truyền giữa 35 mẫu Sơn tra dao động từ 0,567 (BY29 và TT45, BS63) đến 0,965 (MCC49 và MCC51). Trong đó mẫu BY29 có hệ số tương đồng di truyền với

34 mẫu còn lại thấp nhất, dao động từ 0,567 (BY29 và TT45, BS63) đến 0,670 (BY29 và BY30). Trong 7 tiểu quần thể Sơn tra nghiên cứu thì tiểu quần thể Bát Xát và Sin Hồ có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất (0,942) và cách xa nhất là tiểu quần thể Cò Mạ và Mù Cang Chải (0,796).

- Biểu đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 35 mẫu Sơn tra phân tích với chỉ thị ISSR chia làm 2 nhánh chính có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng 61 - 96%, các mẫu thu ở cùng một địa điểm đều nằm trong những nhánh phụ riêng biệt. Kết quả phân nhóm trên biểu đồ đa chiều cũng phản ánh kết quả tương tự, các mẫu có khoảng cách di truyền gần nhau thì nằm co cụm lại với nhau.

V. LỜI CẢM ƠN

Công trình này là sản phẩm của dự án hợp tác nghiên cứu “Duy trì và Phát triển ngân hàng gen cây Sơn tra bản địa tại miền Bắc Việt Nam” giữa Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, ICRAF Việt Nam và World Agroforestry Centre thực hiện trong giai đoạn 2013-2016. Các tác giả xin chân thành cảm ơn World Agroforestry Centre đã tài trợ kinh phí nghiên cứu; Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam về việc sử dụng một số trang thiết bị; Trung tâm KHLN Tây Bắc đã tạo điều kiện thuận lợi để các tác giả thu thập mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beigmohamadi M. and Rahmani F., 2011. Genetic variation in hawthorn (*Crataegus* spp.) using RAPD markers. African Journal of Biotechnology 10(37): 7131-7135.
2. Chung J.D., Lin T.P., Tan J.C., Lin M.Y., Hwang S.Y., 2004. Genetic diversity and biogeography of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae), an island species in Taiwan: a comparison with *Cunninghamia lanceolata*, a mainland species in China. Mol. Phylogenet. Evol. 33: 791-801.

3. Đinh Thị Kim Chung, 2007. Ảnh hưởng của một số yếu tố tới quá trình lên men vang Táo mèo (*Docynia indica*). Tạp chí Khoa học và Công nghệ 45(2): 87 - 92.
4. Dinh Thi Phong, Vu Thi Thu Hien, Tran Thi Lieu, 2015. Genetic variation of *Pinus dalatensis* Ferre' (Pinaceae) populations - endemic species in Vietnam revealed by ISSR markers. J. Chem. Bio. Phys.Sci. 5 (2): 415-1425.
5. Đinh 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 SSR. Tạp chí Sinh học, 36 (2): 210-219.
6. Doyle J.J. and Doyle J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
7. Fazeli Sh., Sheidai M., Farahani F., Noormohammadi Z., 2016. Looking for genetic diversity in Iranian apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 27 (3): 205-215.
8. Goulão L., Oliveira C. M., 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica 122 (1): 81 - 89.
9. Hoàng Thị Minh Tân, 2009. Nghiên cứu tách chiết một số hợp chất tự nhiên từ cây Táo mèo có tác dụng chống rối loạn trao đổi glucit, lipid, Luận văn thạc sĩ Sinh học.
10. Jabbarzadeh Z., Khosh-khui M., Salehi H., Shahsavari A.R., Saberivand A., 2013. Assessment of Genetic Relatedness in Roses by ISSR Markers. World Applied Sciences Journal 28 (12): 2085-2090.
11. Nei M., 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 3321-3323.
12. Nguyễn Đức Thành, 2014. Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. Tạp chí Sinh học 36 (3): 265-294 DOI:10.15625/0866-7160/v36n3.5974.
13. Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Đức Thành, Lê Thị Bích Thủy, 2010. Phân tích đa dạng di truyền loài Giổi xương (*Michelia baillonii* (Pierre) Fin. et Gagnep) bằng chỉ thị phân tử RAPD và cp SSR. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp
14. Nguyễn Thị Thanh Loan (2011). Tác dụng chống béo phì và giảm trọng lượng của dịch chiết quả Táo mèo *Docynia indica* (Wall.) Decne trên mô hình chuột béo phì thực nghiệm. Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, 27: 125 - 133.
15. Peakall R. and Smouse P.E., 2006. GenA1EX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Note 6: 288-295.
16. Rajeb C., Chokri Messaoud C., Chograni H., Bejaoui A., Boulila A., Rejeb M.N., Boussaid M., 2010. Genetic diversity in Tunisian *Crataegus azarolus* L. var. *Aronia* L. populations assessed using RAPD markers. Ann. For. Sci. 67: 512 DOI:10.1051/forest/2010014.
17. Rohlf F.J., 1992. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0. State University of New York (Stony Brook, New York).
18. Sách đỏ Việt Nam - Phần II: Thực vật (2007). Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và công nghệ.
19. Tian Y., Xing C., Cao Y., Wang C., Guan F., Li R., Meng, 2015. Evaluation of genetic diversity on *Prunus mira* Koehne by using ISSR and RAPD markers. Biotechnology & Biotechnological Equipment 29 (6): 1053 - 1061.
20. Trần Thị Liễu, Lê Thị Quỳnh, Vũ Thị Thu Hiền, Đinh Thị Phòng, 2015. Thông số về tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. Tạp chí Sinh học 37 (4): 463-469.
21. Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, Trần Vinh, Nguyễn Minh Tâm, 2010. Phân tích đa dạng và quan hệ di truyền quần thể Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis*) ở Đắk Lắk bằng chỉ thị SSR. Tạp chí Công nghệ sinh học 8 (3): 331-336.

22. Vũ Thị Hạnh Tâm, 2011. Nghiên cứu tác dụng hạ lipid và đường huyết của dịch chiết quả Táo mèo (*Docynia indica* (Wall.) Dene) trên mô hình chuột thực nghiệm. Luận văn tốt nghiệp, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội.
23. Vu Thi Hue, Bui Thi Viet Ha, 2010. Study on antibacterial activity toward bacteria causing upper respiratory (*Moraxella catarrhalis*) of Bacillus sp TM1.2 isolated from vinegar Docynia fruit (*Docynia indica* (Wall.) Decne). J. Scien anh Technol 26 (4): 537-542.
24. Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Việt Thanh, Lê Anh Tuấn, Phí Hồng Hải, Đinh Thị Phòng, 2009. Phân tích mối quan hệ di truyền tập đoàn giống cây Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) bằng chỉ thị RAPD và DNA lục lạp. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 3: 122-128.
25. Wu Z.Y., Liu J.F., Hong W., Pan D.M., Zheng S.Q., 2011. Genetic diversity of natural and planted *Glyptostrobus pensilis* populations: a comparative study. Chinese Journal of Applied Ecology 22(4): 873-9.
26. Yap I. V. and Nelson R. J., 1996. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence of UPGMA-based dendrograms, IRRI, Manila.
27. Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T., 1999. POPGENE Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31, University of Alberta, Edmonton.

Người thẩm định: TS. Nguyễn Đức Kiên