

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN HAI LOÀI TRE THUỘC CHI LUỒNG (*Dendrocalamus* Nees) Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM DỰA TRÊN CHỈ THỊ PHÂN TỬ ISSR

Nguyễn Hoàng Nghĩa¹, Nguyễn Văn Thọ², Nguyễn Viễn², Phạm Quang Tiến²,
Lê Thị Mai Linh³, Nguyễn Thị Hồng Mai³

¹ Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

² Trung tâm Khoa học Lâm nghiệp vùng Trung tâm Bắc bộ

³ Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Mười hai (12) mẫu lá của 2 loài (Luồng *Dendrocalamus. barbatus*, Mạ hóc-*D. sikkimensis*) thuộc Chi Luồng (*Dendrocalamus* Nees) thu từ 7 tỉnh miền núi phía Bắc đã được phân tích đánh giá mức độ di truyền của loài và xuất xứ bằng chỉ thị phân tử ISSR nhằm đưa ra giải pháp hợp lý cho việc bảo tồn và khai thác phát triển nguồn gen các loài này trong thời gian tới. Trong 10 mồi nghiên cứu có 08 mồi cho tính đa hình có thể sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền, còn lại 2 mồi ISSR 4 và ISSR 10 không có tính đa hình. Các mẫu nghiên cứu được chia thành 2 nhóm lớn tương ứng với 2 loài với mức độ tương đồng di truyền 51 - 88%. Trong 6 mẫu Mạ hóc (*D. sikkimensis*) được thu ở 5 tỉnh, mẫu M3 thu tại Phú Thọ tách biệt hẳn so với 5 mẫu còn lại và có tương đồng di truyền từ 64 - 69%, hai mẫu Mạ hóc mọc tự nhiên M1 và M4 thu tại Bắc Cạn tạo thành nhóm riêng và tương đồng với các mẫu còn lại từ 59 - 78% và giữa hai mẫu này cũng tương đồng đến 76%. Tuy nhiên, hai mẫu thu M5 và M6 cách xa hàng trăm ki-lô-met lại rất gần gũi nhau với tương đồng 86%. Còn 6 mẫu Luồng (*D. barbatus*) thu ở 6 tỉnh, mẫu L6 tách biệt hẳn với các mẫu còn lại và có tương đồng di truyền là 55 - 71%, mẫu L4 cũng khác biệt hẳn với các loài thu ở các tỉnh vùng Tây Bắc và có tương đồng di truyền là 55 - 77%. Các mẫu L1, L2, L3 và L5 khá gần gũi về mặt di truyền với tương đồng di truyền từ 71 - 88%, đặc biệt hai mẫu L2 và L3 có tương đồng di truyền lên đến 88%, điều này chứng tỏ Luồng ở 4 tỉnh vùng Tây Bắc có cùng một nguồn gốc hoặc quan hệ gần gũi và khác hẳn 2 mẫu Luồng có nguồn gốc từ Thanh Hóa.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, ISSR, Luồng, Mạ hóc

Evaluation of genetic diversity of two bamboo species of *Dendrocalamus* from Northern Vietnam by ISSR markers

Key words: *Dendrocalamus barbatus*, *Dendrocalamus sikkimensis*, ISSR, genentic diversity

12 leaf samples of *Dendrocalamus barbatus* and *Dendrocalamus sikkimensis* collected from seven provenances were genetically analyzed by molecular markers (ISSR marker) in order to suggest suitable measures for genetic conservation of these two species in the future. Among ten ISSR markers used, eight of them gave polymorphic DNA bands while the other two (ISSR4 and ISSR10) did not. The samples are divided into two group belonging to two species of *Dendrocalamus*

respectively with similarities, from 51% to 88%. Among six samples of *D. sikkimensis* collected from five provinces, one sample (M3, Phu Tho provenance) is genetically separated far from others with asimilarities, from 56% to 70%. Two samples collected natural forest of Ba Be National Park (M1, M4, Bac Can provenance) formed a different group far from the rest of samples from 22% to 29%, particularly these two sample are distinguished together with difference of 24%. However, sample M1 (Bac Can provenance) and sample M6 (Lai Chau provenance) collected at a distance of few hundred kilometers are only different to be 14%. Six samples of *D. barbatus* collected from six provinces, sample L6 (Tho Xuan district, Thanh Hoa province) is clearly separated from others with similarities, from 55% to 70%. Sample L4 (Cau Hai, Phu Tho province, originating from Ngoc Lac district, Thanh Hoa province) is also isolated Northern West region with similarities, from 55% to 77%. Other of samples L1, L2, L3 and L5 have quite high similarities, from 71% to 88%, particular sample L2 and L3 gave high similarity of 88%. The fact is that some samples of *D. barbatus* from four provinces in Northern West region have low genetic difference as they have same origin and differ from two samples from or origin from Thanh Hoa province.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Luồng (*Dendrocalamus* Nees) là nhóm các loài tre kích thước lớn, có giá trị kinh tế cao, phân bố chủ yếu ở Nam Trung Quốc, Bắc Việt Nam, Ấn Độ, Ma-lai-xia và Pa-pua Niu Ghi-nê. Hiện nay thế giới có khoảng 60 loài thuộc chi Luồng, ở Việt Nam có khoảng 30 loài. Đa số các loài thuộc chi Luồng ở Việt Nam thường có phân bố, gây trồng trong phạm vi hẹp và đã suy giảm nguồn gen nhanh chóng cùng với việc suy giảm rừng tự nhiên và quá trình công nghiệp hóa, hiện đại hóa đất nước. Trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu cơ bản (Mã số: 106 - NN.03 - 2015.50), hai loài tre thuộc chi Luồng được gây trồng và phân bố rộng là Luồng (*Dendrocalamus barbatus* Hsuesh & D.Z. Li) và Mạ hóc (*Dendrocalamus sikkimensis* Gamble ex Oliv.) được xem xét đánh giá mức độ đa dạng di truyền.

Trong các chỉ thị được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền như AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphosm) SSR (Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic), ISSR (Inter Simple Sequence

Repeat) thì chỉ thị ISSR được sử dụng rộng rãi hơn cả để đánh giá đa dạng di truyền với ưu điểm là nhanh hơn, đơn giản hơn, tỷ lệ đa hình cao, tiết kiệm chi phí hơn so với các kỹ thuật khác (Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). Trên thế giới, có một số tác giả sử dụng chỉ thị phân tử này để đánh giá đa dạng di truyền của các loài thuộc chi Luồng như Yang và đồng tác giả (2012) đã đánh giá đa dạng gen của 12 quần thể loài *Dendrocalamus membranaceus* ở tỉnh Vân Nam (Trung Quốc), Tian và đồng tác giả (2012) đã đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 7 quần thể *Dendrocalamus giganteus* ở Vân Nam (Trung Quốc). Ở Việt Nam, việc sử dụng các chỉ thị phân tử ISSR để đánh giá đa dạng di truyền được nhiều tác giả sử dụng như nghiên cứu đa dạng di truyền trên cây Cọ khẹt, cây gỗ Trắc đỏ, cây Sơn tra (Vũ Thị Thu Hiền *et al.*, 2011; Vũ Thị Thu Hiền và Đinh Thị Phòng, 2011; Vũ Thị Thu Hiền *et al.*, 2016); tuy nhiên trên các loài tre chưa có các nghiên cứu nào về đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị ISSR, mới có nghiên cứu của Vũ Thị Thu Hiền và đồng tác giả (2012) sử dụng các chỉ thị phân tử *trnL-trnF*, *psbA-trnH* và *matK* để làm rõ tên

khoa học của 2 loài thuộc chi Tre. Vì vậy trong nghiên cứu này 12 mẫu lá Luồng Thanh Hóa (*Dendrocalamus barbatus* Hsueh & D.Z. Li) và Mạ hóc (*Dendrocalamus sikkimensis* Gamble ex Oliv.) ở 7 tỉnh miền núi phía Bắc lần đầu tiên được sử dụng chỉ thị phân tử ISSR để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 2 loài Tre thuộc chi Luồng (*Dendrocalamus* Nees).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mười hai (12) mẫu lá non của 2 loài (Luồng *D. barbatus* và Mạ hóc-*D. sikkimensis*) thuộc chi Luồng thu ở 7 tỉnh miền núi phía Bắc. Các mẫu được làm khô bằng Silicagel và bảo quản trong tủ -20°C cho đến khi sử dụng (bảng 1).

Bảng 1. Thông tin mẫu được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên Việt Nam/Tên khoa học	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ thu mẫu	Độ cao (m)
1	Luồng cao phong <i>Dendrocalamus barbatus</i> Hsueh & D.Z. Li	L1	Xã Bình Thanh, Cao Phong, Hòa Bình	104° 42' 42" E và 21° 02' 55,3" N	120
2	Luồng sớp cộp (<i>Dendrocalamus barbatus</i> Hsueh & D.Z. Li)	L2	Thị trấn Sớp Cộp, Sớp Cộp, Sơn La	103° 35' 53,3" E và 20° 57' 22,4" N	710
3	Luồng mừng nhé <i>Dendrocalamus barbatus</i> Hsueh & D.Z. Li	L3	Xã Sen Thượng, Mừng Nhé, Điện Biên	102° 19'58,7" E và 22° 23' 05,1" N	548
4	Luồng cầu hai (<i>Dendrocalamus barbatus</i> Hsueh & D.Z. Li)	L4	Cầu Hai, xã Chân Mộng, Đoàn Hùng, Phú Thọ. Nguồn gốc Ngọc Lặc-Thanh Hóa	105° 11' 55,02" E và 21° 31' 53,82" N	50
5	Luồng phong thổ <i>Dendrocalamus barbatus</i> Hsueh & D.Z. Li	L5	Xã Lân Nhi Thàng, Phong Thổ, Lai Châu	103° 20'33,7" E và 22° 29' 54,2" N	900
6	Luồng thợ xuân <i>Dendrocalamus barbatus</i> Hsueh & D.Z. Li	L6	Thị trấn Thợ Xuân, Thợ Xuân, Thanh Hóa	105° 26'45,9" E và 19° 54' 43,1" N	80
7	Mạ thóc ba bề <i>Dendrocalamus sikkimensis</i> Gamble ex Oliv.	M1	Vườn quốc gia Ba Bể, Ba Bể, Bắc Cạn	105° 37' 54,2" E và 22° 23' 53,5" N	243
8	Mạ hóc nậm pồ <i>Dendrocalamus sikkimensis</i> Gamble ex Oliv.	M2	Xã Chà Cang, Nậm Pồ, Điện Biên	102° 50'03,7" E và 21° 59' 26,4" N	528
9	Mạ hóc cầu hai <i>Dendrocalamus sikkimensis</i> Gamble ex Oliv.	M3	Vườn Sưu tập thực vật Cầu Hai, xã Chân Mộng, Đoàn Hùng, Phú Thọ	105° 11' 55,2" E và 21° 31' 54,12" N	50
10	Mạ thóc ba bề <i>Dendrocalamus sikkimensis</i> Gamble ex Oliv.	M4	Vườn quốc gia Ba Bể, Ba Bể, Bắc Cạn	105° 37' 54,2" E và 22° 23' 53,5" N	243
11	Mạ hóc thuận châu <i>Dendrocalamus sikkimensis</i> Gamble ex Oliv.	M5	Xã Bó Mười, Thuận Châu-Sơn La	103° 55' 40,3" E và 21° 26' 43,5" N	370
12	Mạ hóc phong thổ <i>Dendrocalamus sikkimensis</i> Gamble ex Oliv.	M6	TT Phong Thổ, Phong Thổ, Lai Châu	103° 16'10,1" E và 22° 30' 41,4" N	243

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA

DNA tổng số được tách từ các mẫu lá theo phương pháp của Doyle & Doyle, 1987; 1990 có

cải tiến cho phù hợp với việc tách chiết DNA tổng số của các mẫu: Cân 200mg mẫu lá được nghiền trong Nito lỏng bằng cối chày sứ đã qua khử trùng ở 121°C, 1 atmosphere trong 15 phút.

Mẫu nghiên cứu được chiết trong 400µl dung dịch chiết (100mM Tris-HCL, 50mM EDTA, 1% SDS, pH: 8,0) và ủ ở 65°C trong 15 - 30 phút. Mẫu chiết sau đó được bổ sung 160µl KAC và 600µl Chloroform: isoamylalcohol (24:1) trong 10 phút. Tủa ADN bằng Isopropanol. Hoà tan ADN thu được bằng 50µl nước khử trùng. Loại bỏ ARN bằng RNase 0,1 µg/µl ở 37°C trong 40 phút. Lưu giữ ADN tổng số thu được ở -20°C.

Phản ứng PCR-ISSR

Được thực hiện với 10 môi ISSR được tổng hợp tại Invitrogen (Shanghai Invitrogen Biotechnology Co.Ltd.) theo các trình tự mỗi đã được công bố

tại University of British Columbia Nucleic Acid-Protein Service Unit và UBC Primer Set #9 (bảng 2). Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Applied Biosystems (ABI) 2720 Thermal Cycler. Hỗn hợp phản ứng được thực hiện bao gồm: 20ng DNA khuôn, 1,0U Taq polymerase, 2,0mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 1,0mM primer, 10x PCR buffer, và nước deion khử trùng. PCR được thực hiện với chu trình nhiệt 94°C - 5 phút; 40 chu kỳ với 94°C - 45s, 43°C - 1 phút, và 72°C - 2 phút; 72°C - 10 phút. Phản ứng PCR được lặp lại ít nhất 2 lần với mỗi mẫu DNA. Sau đó, sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và các phân đoạn được hiển thị nhờ ethidium bromide dưới điều kiện UV.

Bảng 2. Trình tự Nucleotide của 10 môi ISSR được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu môi	Trình tự 5'-3'	STT	Ký hiệu môi	Trình tự 5'-3'
1	ISSR1	(GA)8T	6	ISSR6	(AG)8GYA
2	ISSR2	(GA)8C	7	ISSR7	(GA)8YT
3	ISSR3	(CT)8G	8	ISSR8	(GA)8YC
4	ISSR4	(CT)8T	9	ISSR9	(AC)8YG
5	ISSR5	(AG)8YC	10	ISSR10	(TC)8G

Phân tích số liệu ISSR:

Số liệu của nghiên cứu được ghi nhận dưới dạng nhị phân trong đó: (1)-phân đoạn DNA xuất hiện và (0)-sự vắng mặt của các phân đoạn DNA. Sau đó, các số liệu này sẽ được phân tích dựa trên phần mềm POPGENE 1.32 để xác định các chỉ số đa dạng di truyền như phần trăm các phân đoạn đa hình (PPB), số alen quan sát được (Na), số alen có ý nghĩa (Ne), hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các loài, hệ số đa dạng Shannon (I). Phân nhóm dựa trên hệ số tương đồng Jaccard, kiểu phân nhóm UPGMA trên phần mềm NTSYSpc 2.1.

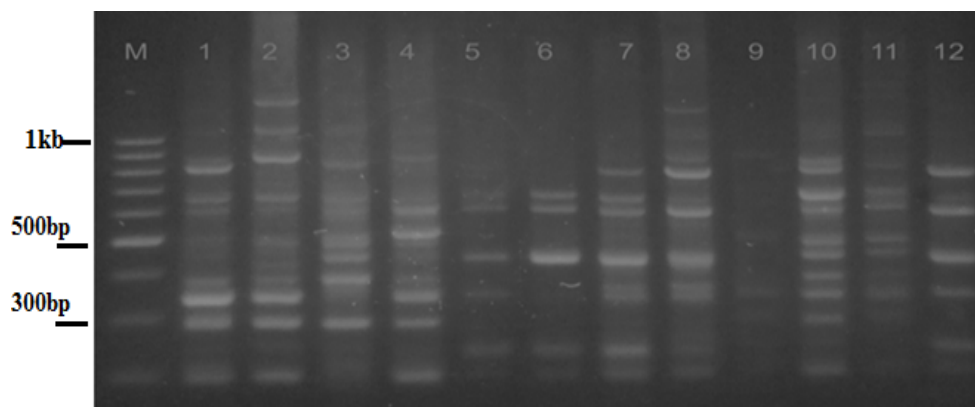
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích sự đa hình chỉ thị ISSR của các mẫu nghiên cứu

DNA được tách chiết và tinh sạch. Sau đó, kiểm tra độ tinh sạch và xác định hàm lượng thông qua máy đo quang phổ hấp thụ ở các bước sóng 260nm và 280nm. Đồng thời, các mẫu DNA cũng được điện di trên gel agarose 0,8% để đánh giá độ tinh sạch và chất lượng DNA, chất lượng DNA đảm bảo tiêu chuẩn (OD260/OD280 > 1) để tiến hành các phản ứng PCR-ISSR.

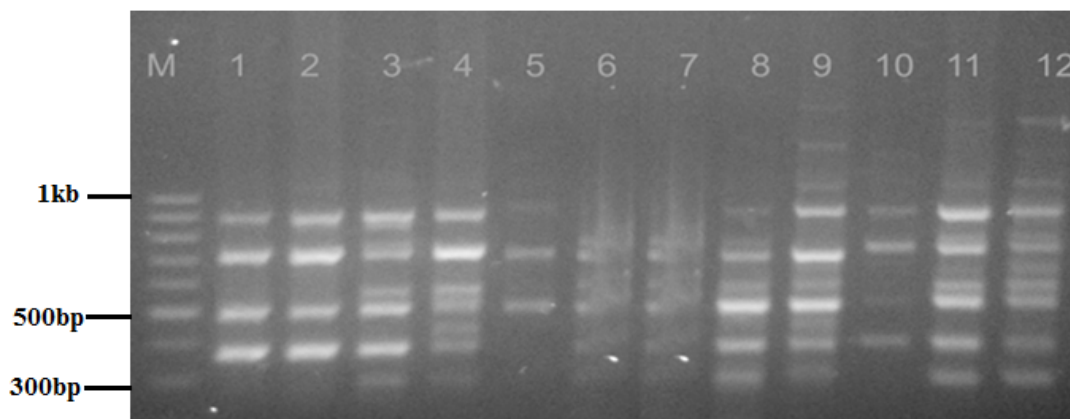
Sau khi tách chiết, tinh sạch và pha về nồng độ chuẩn cho các phản ứng PCR, DNA của 12 mẫu Luồng đã được phân tích với 10 môi ISSR. Đánh giá tính đa hình thông qua giá trị PIC, khoảng cách di truyền được xác định

thông qua hệ số tương đồng và biểu đồ hình cây. Sản phẩm PCR-ISSR với các môi khác nhau được điện di trên gel agarose 1,8% để phân tích tính đa hình DNA của 12 mẫu nghiên cứu (hình 1, 2).



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-ISSR trên gen agarose 1,8% của 12 mẫu với môi ISSR6

M: Thang chuẩn DNA kích thước 100 bp, 1 - 13: Thứ tự mẫu M1, M2, M3, M4, L1, L2, L3, L4, L5, M5, M6, L6.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-ISSR trên gen agarose 1,8% của 12 mẫu với môi ISSR1. M: Thang chuẩn DNA kích thước 100 bp, 1 - 13: Thứ tự mẫu M1, M2, M3, M4, L1, L2, L3, L4, L5, M5, M6, L6.

Tính đa hình thể hiện ở sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn khi so sánh giữa các mẫu khác nhau trong cùng 1 môi. Kết quả được thể hiện trên bảng 3. Như vậy, tổng số phân đoạn DNA của 12 mẫu khi phân tích với 10 môi ngẫu nhiên là 99 phân đoạn. Trong đó, có 89 phân đoạn cho tính đa

hình (chiếm 89,9%). Trong số 10 môi nghiên cứu, môi ISSR4, ISSR10 không cho tính đa hình giữa các mẫu, môi ISSR1, ISSR2, ISSR6, ISSR8 cho mức độ đa hình cao nhất với phân đoạn thu được từ 13 - 16 phân đoạn DNA với tỷ lệ đa hình đạt từ 90 - 100%.

Bảng 3. Kết quả phân tích sự đa hình các phân đoạn DNA của 8 chỉ thị ISSR

TT	Tên môi	Kích thước nhân lên (bp)	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình (NPB)	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (PPB)	h+ SD	I + SD
1	ISSR1	300 - 1500	13	13	100	0,3928 ± 0,0895	0,5782 ± 0,1000
2	ISSR2	400 - 1500	13	12	92,3	0,3583 ± 0,0941	0,5397 ± 0,1062
3	ISSR3	400 - 1600	9	8	90	0,3197 ± 0,1053	0,4942 ± 0,1218
4	ISSR5	270 - 1000	12	11	91,6	0,3863 ± 0,1003	0,5699 ± 0,1147
5	ISSR6	200 - 1000	16	14	0,87	0,3533 ± 0,1244	0,5291 ± 0,1529
6	ISSR7	300 - 1200	11	11	100	0,3406 ± 0,0926	0,5192 ± 0,1096
7	ISSR8	200 - 1300	15	14	93,3	0,2926 ± 0,0858	0,4642 ± 0,0997
8	ISSR9	300 - 1500	10	10	100	0,4180 ± 0,0644	0,6072 ± 0,0683
Tổng quần thể			99	89			
Trung bình			12,3	11,62	94,27	0,3751±0,0742	0,5600 ± 0,0822

h. hệ số đa dạng di truyền Nei dựa theo các môi nghiên cứu; *I*. hệ số Shannon thể hiện mức độ đa dạng loài trong quần thể; *SD*. độ lệch chuẩn.

3.2. Kết quả đánh giá đa dạng di truyền của các mẫu thuộc chi Luồng

Các kết quả được xử lý bằng phần mềm POPGENE 32 cho thấy: Do các quần thể chỉ có 1 mẫu duy nhất nên không thể đánh giá được các thông số như hệ số gen dị hợp tử mong đợi (*He*) và phần trăm phân đoạn đa hình (PPB), chỉ số sai khác di truyền *Gst* giữa các quần thể, chỉ số trao đổi gen *Nm* giữa các quần thể. Xét ở mức độ loài hệ số đa dạng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu Nei và Shannon cao nhất ở chỉ thị môi ISSR5 với *h* = 0,3863, *I* = 0,5699 và thấp nhất là ISSR8 với *h* = 0,2926 và *I* = 0,4642 với số phân đoạn

đa hình ở các mẫu đều đạt 90 - 100% và số alen quan sát được (*Na*) đều đạt 2,0000 và số alen có ý nghĩa *Ne* đạt từ 1,3557 đến 1,9402. Trong đó các mẫu thuộc loài Mạ hóc (*Dendrocalamus sikkimensis*), có chỉ số *Ne*, *h*, *I* đều cao hơn so với các mẫu thuộc loài Luồng (*Dendrocalamus barbatus*). Chứng tỏ các mẫu thuộc *D. barbatus* có sự đa dạng thấp hơn, trong đó có mẫu L5 và L1 thu ở Lai Châu và Hòa Bình có mức độ đa dạng kém nhất. Với chỉ số đa dạng di truyền Nei giữa các mẫu chỉ đạt 0,3751 tức chỉ 3,75% đa dạng gen giữa các mẫu của 2 loài nghiên cứu. Như vậy cho thấy các mẫu này có mức độ đa dạng di truyền rất thấp.

Bảng 4. Các chỉ số đa dạng di truyền của các mẫu nghiên cứu

Tên mẫu	Na	Ne	h	I	Ht	Hs
M1	2,0000	1,5926	0,3721	0,5591	0,3747	0,3538
M2	2,0000	1,6842	0,4062	0,5962	0,3973	0,3529
M3	2,0000	1,9402	0,4846	0,6777	0,4900	0,4493
M4	2,0000	1,8049	0,4460	0,6381	0,4480	0,4413
M5	2,0000	1,8335	0,4546	0,6470	0,4531	0,4123
M6	2,0000	1,7066	0,4141	0,6046	0,4121	0,3810
L1	2,0000	1,3557	0,2624	0,4318	0,2631	0,2547
L2	2,0000	1,4494	0,3100	0,4888	0,3177	0,3113
L3	2,0000	1,5994	0,3748	0,6420	0,3762	0,3710
L4	2,0000	1,8174	0,4498	0,6420	0,4535	0,4343
L5	2,0000	1,3751	0,2728	0,4445	0,2838	0,2712
L6	2,0000	1,4504	0,3105	0,4894	0,3153	0,3077
Trung bình	2,0000	1,6214	0,3751	0,5600	0,3772	0,3577
SD	0,00	0,1925	0,0742	0,0822	0,0053	0,0042

Na: số alen quan sát được; *Ne*: số alen có ý nghĩa; *h*: hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các mẫu; *I*: hệ số Shannon; *SD*: độ lệch chuẩn; *H_T*: chỉ số đa dạng nguồn gen; *H_S*: chỉ số đa dạng gen trung bình.

3.3. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu nghiên cứu

Cây phân loại được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA (giá trị tương quan kiểu hình theo phương pháp của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA có giá trị cao nhất $r = 0,91742$) trong đó 12 mẫu thuộc 2 loài nghiên cứu của Mạ hóc và Luồng được chia ra làm 2 nhánh riêng biệt với hệ số tương đồng nằm trong khoảng từ 51% đến 88%.

Nhóm I bao gồm 06 mẫu của loài Mạ hóc *Dendrocalamus sikkimensis* Gamble ex Oliv, với mức độ tương đồng di truyền từ 56 - 86%, đây là các mẫu được thu từ các bụi Mạ hóc mọc tự nhiên ở các tỉnh Bắc Cạn, Điện Biên, Sơn La, Lai Châu trừ mẫu M3 là từ bụi trồng và được thu ở Cầu Hai-Phú Thọ. Trong nhóm này lại phân chia ra làm 2 phân nhóm Ia và Ib, phân nhóm Ib bao gồm duy nhất một mẫu Mạ hóc M3 thu trên địa bàn Cầu Hai tỉnh Phú Thọ tương đồng di truyền 56 - 70% và tương đồng với các mẫu thuộc loài Luồng Thanh Hóa từ 54 - 67%. Phân nhóm Ia gồm 5 mẫu, cũng được phân thành 2 nhóm nhỏ hơn, nhóm thứ nhất gồm 2 mẫu M5 (thu ở Thuận Châu, tỉnh Sơn La) và M6 (thu ở Phong Thổ, tỉnh Lai Châu) có quan hệ di truyền rất gần nhau, hệ số tương đồng di truyền khoảng 86% mặc dù về mặt địa lý cách nhau hàng trăm ki-lô-mét, điều này chứng tỏ Mạ hóc ở 2 điểm này có thể có chung nguồn gốc. Đây là hai mẫu có quan hệ di truyền gần gũi nhau nhất trong số 6 mẫu DNA của loài Mạ hóc. Nhánh nhỏ thứ 2 gồm 3 mẫu được thu ở tỉnh Điện Biên và Bắc Cạn, đặc biệt 2 mẫu thu ở Vườn quốc gia Ba Bể, tỉnh Bắc Cạn (mẫu M1 và M4) rất gần về mặt địa lý, chỉ cách nhau vài trăm mét nhưng về mặt di truyền không phải là quá gần gũi, hệ số tương đồng di truyền khoảng 76%. Ngoài ra, biểu đồ hình 3 cũng cho thấy mẫu M2 (thu ở huyện Nậm Pồ tỉnh Điện Biên) rất xa về mặt địa lý với 2 mẫu ở Ba Bể (Bắc Cạn) nhưng về mặt di truyền không có sự khác biệt lớn,

hệ số tương đồng di truyền khoảng 72 - 75%, tất cả 3 mẫu này đều thu ở các bụi Mạ hóc mọc tự nhiên.

Nhóm II bao gồm 06 mẫu thuộc loài Luồng (*Dendrocalamus barbatus* Hsueh & D.Z. Li) được thu tại tỉnh Hòa Bình, Sơn La, Điện Biên, Lai Châu, Phú Thọ và Thanh Hóa với mức độ tương đồng di truyền từ 55 - 88%, về mặt đa dạng di truyền nhóm II lại chia ra thành 2 phân nhóm, Phân nhóm IIb bao gồm duy nhất 1 mẫu L6 (Luồng Thọ Xuân) tương đồng với các mẫu còn lại là 55 - 70%. Điều đáng ngạc nhiên là hai mẫu L2 và L3 giống nhau nhất, lên đến 88% về mặt di truyền mặc dù hai mẫu này được thu từ 2 điểm cách nhau hàng trăm ki-lô-mét là Sốp Cộp-Sơn La (mẫu L2) và Mường Nhé-Điện Biên (mẫu L3). Mẫu Luồng Thanh Hóa thu ở Phong Thổ-Lai Châu tương đồng các mẫu thu ở các tỉnh vùng Tây Bắc như: Sốp Cộp-Sơn La (L2), Cao Phong-Hòa Bình (L1) và Mường Nhé-Điện Biên (L3) không lớn từ 76 - 82%, điều này chứng tỏ các mẫu thu ở 4 tỉnh Tây Bắc có nguồn gốc khá gần gũi. Số liệu bảng 5 cho ta thấy: mẫu Luồng được thu tại Cầu Hai-Phú Thọ (Luồng Cầu Hai) có nguồn gốc từ Ngọc Lặc-Thanh Hóa được di thực ra Cầu Hai-Phú Thọ từ đầu những năm 90 của thế kỷ 20 khác biệt lớn nhất đến 45% so với mẫu thu tại huyện Thọ Xuân-Thanh Hóa cách huyện Ngọc Lặc-Thanh Hóa chỉ vài chục ki-lô-mét, đây là hai mẫu khác biệt nhất trong số 6 mẫu Luồng phân tích. Như vậy, các mẫu Luồng có nguồn gốc từ Thanh Hóa khác biệt hẳn với các mẫu thu ở các tỉnh vùng Tây Bắc (Hòa Bình, Sơn La, Điện Biên, Lai Châu), điều đó chứng tỏ Luồng ở vùng Tây Bắc có cùng một nguồn gốc hoặc gần gũi nhau và có sự khác biệt hẳn về đa dạng di truyền đối với Luồng ở Thanh Hóa.

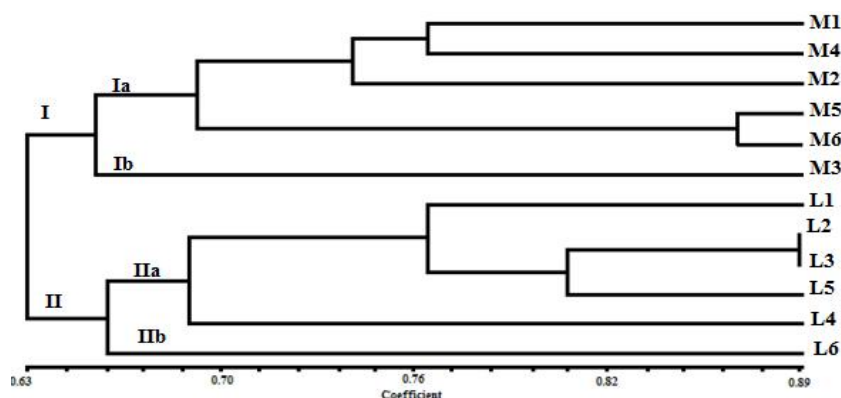
So sánh giữa 2 nhóm cho thấy mối quan hệ di truyền giữa 2 nhóm này dao động từ 0,51 - 0,76, tức 2 nhóm này có mức độ tương đồng di truyền từ 51 - 76%, trong đó tương đồng nhất

giữa mẫu L5 (Luồng Phong Thổ *Dendrocalamus barbatus* Hsueh & D.Z. Li) với nhóm các mẫu Mạ hóc *Dendrocalamus sikkimensis* Gamble ex Oliv (M1 - M6) từ 57 đến 76%, mẫu L1 (Luồng Cao Phong) với các mẫu Mạ hóc (M1 - M6) từ 54 - 71%, tương đồng thấp hơn giữa mẫu L4 (Luồng Cầu Hai) với các mẫu (M1 - M6) từ 51 - 64%, mẫu M1 tương đồng nhất với mẫu L1 (71%) và khác biệt nhất với L4 (59%), mẫu L2

tương đồng 67% với M3 và khác biệt nhất với M2 (58%), L3 tương đồng 68% với M4 và khác biệt với M2 (57%), L4 tương đồng 62% với M4 và khác biệt với M2 (54%), L5 tương đồng 74% với M1 và khác biệt với M3 (57%), L6 tương đồng nhất với mẫu M2 là 63% và khác biệt với M3 (56%). Điều đặc biệt là các mẫu tương đồng di truyền cao nhất đều xa nhau về mặt địa điểm thu mẫu.

Bảng 5. Hệ số tương đồng giữa các mẫu nghiên cứu giữa 2 loài Mạ hóc *Dendrocalamus sikkimensis* Gamble ex Oliv và loài Luồng (*Dendrocalamus barbatus* Hsueh & D.Z. Li)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
M1	1,00											
M2	0,75	1,00										
M3	0,70	0,56	1,00									
M4	0,76	0,72	0,69	1,00								
M5	0,78	0,64	0,67	0,67	1,00							
M6	0,71	0,67	0,64	0,64	0,86	1,00						
L1	0,71	0,69	0,54	0,66	0,62	0,67	1,00					
L2	0,68	0,58	0,67	0,63	0,63	0,66	0,82	1,00				
L3	0,67	0,57	0,64	0,68	0,66	0,63	0,75	0,88	1,00			
L4	0,59	0,51	0,54	0,62	0,64	0,55	0,65	0,70	0,77	1,00		
L5	0,74	0,60	0,57	0,67	0,67	0,76	0,76	0,77	0,72	0,64	1,00	
L6	0,63	0,63	0,56	0,60	0,62	0,61	0,67	0,70	0,65	0,55	0,68	1,00



Hình 3. Biểu đồ hình cây các mẫu các loài tre thuộc chi Luồng nghiên cứu theo hệ số của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA

IV. KẾT LUẬN

Phân tích đa dạng di truyền 12 mẫu Luồng (*D. barbatus* Hsueh & D.Z. Li.) và Mạ hóc (*D.sikkimensis* Gamble ex Oliv.) bằng chỉ thị phân tử ISSR và 10 môi ngẫu nhiên được sử

dụng. Số đoạn nhân lên tương ứng 99 phân đoạn, trong đó có 89 phân đoạn cho tính đa hình (chiếm 89,9%) và hệ số tương đồng di truyền khá cao từ 51%-88% hay sự đa dạng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu thấp. Môi

đa hình cao nhất là ISSR6, hai môi ISSR4 và ISSR10 không tính đa hình cho phân đoạn DNA nhân bản.

Cây phân loại được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA trong đó 12 mẫu thuộc 2 loài nghiên cứu của Mạ hốc và Luồng được chia ra làm 2 nhánh riêng biệt với hệ số tương đồng nằm trong khoảng từ 51 đến 88%.

Trong 6 mẫu Mạ hốc được thu ở 5 tỉnh với tương đồng di truyền từ 56 - 86%, mẫu M3 tách biệt hẳn so với 5 mẫu còn lại và có tương đồng di truyền từ 56%-70%, các mẫu còn lại dao động từ 56 - 86% và phân thành 2 nhóm nhỏ. Mặt khác, sự đa dạng di truyền vẫn được thể hiện trong phạm vi địa lý hẹp thu mẫu: hai mẫu Mạ hốc mọc tự nhiên M1 và M4 tạo thành nhóm riêng và tương đồng loài còn lại 74% và giữa hai mẫu này cũng tương đồng đến 76%. Tuy nhiên, hai mẫu thu ở Thuận Châu-Sơn La (M5) và M6 (Phong Thổ-Lai Châu) lại rất gần gũi nhau, có hệ số tương đồng là 86% và tạo thành 1 nhánh trên cây phát sinh.

Đối với 6 mẫu Luồng thu ở 6 tỉnh với tương đồng di truyền khá cao từ 55 - 88%, mẫu L6 tách biệt hẳn với các mẫu còn lại và có tương đồng di truyền là 55 - 70%. Hơn nữa, mẫu L4 thu ở Cầu Hai (Phú Thọ) có nguồn gốc từ Ngọc Lặc (tỉnh Thanh Hóa) cũng khác biệt hẳn với các loài thu ở các tỉnh vùng Tây Bắc và có tương đồng di truyền là 55 - 77%. Các mẫu còn lại (L1, L2 L3 và L5) khá gần gũi về mặt di truyền với hệ số tương đồng di truyền lên tới 82% đặc biệt hai mẫu thu ở Sốp Cộp-Sơn La (L2) và Mường Nhé-Điện Biên (L3) có tương đồng di truyền lên đến 88%, điều này chứng tỏ Luồng ở 4 tỉnh vùng Tây Bắc (Hòa Bình, Sơn La, Điện Biên và Lai Châu) có cùng một nguồn gốc hoặc quan hệ gần gũi và khác hẳn 2 mẫu Luồng có nguồn gốc từ Thanh Hóa.

Các mẫu Luồng thu ở 6 tỉnh có mức độ tương đồng di truyền với các mẫu Mạ hốc từ 51 đến 74%, trong đó các mẫu có độ tương đồng di truyền lớn nhất lại là các mẫu ở các vùng địa lý khác nhau. Do đó cần có các nghiên cứu khác sâu hơn với số lượng mẫu lớn hơn giữa các loài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doyle J. J., Doyle J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
2. Liu L., Zhao L., Gong Y., Wang M., Chen L., Yang J., Wang Y., Yu E., Wang L., 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP marker. *Sci. Hortic.*, 116(3): 240 - 247.
3. Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70(12): 3321 - 3323
4. Tian B., Yang H.Q., Wong K.M., Liu A.Z. & Ruan Z.Y., 2012. ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 901 - 908.
5. Roxburgh W. 1798. *Plants of the coast of coromandel*. London: Printed by W. Bulmer and Co. for G. Nicol, Bookseller. 1: 58. Pl.: 80.
6. Wang Z., Liao L., Yuan X., Guo H., Guo A., Liu J., 2013. Genetic diversity analysis of cynodon dactylon (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.*, 46: 108 - 115.
7. Yang, Y., Wang, K., Pei, S. & Hao, J., 2004. Bamboo diversity and traditional uses in Yunnan, China. *Mountain Research and Development*, 24(2): 157 - 165.
8. Yang, H.Q., An, M. Y., Gu, Z.J. & Tian, B., 2012. Genetic diversity and differentiation of *Dendrocalamus membranaceus* (Poaceae: Bambusoideae), a declining bamboo species in Yunnan, China, as based on Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 4446 - 4457.

9. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. B. J., Ye Z. H., Mao J. X., 1997. POPGENE, the UserFriendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada
10. Vũ Thị Thu Hiền, Đinh Thị Phòng, 2011. Ứng dụng kỹ thuật DNA vào việc đánh giá mối quan hệ di truyền tập đoàn cây gỗ Trắc đỏ (*Dalbergia cochinchinensis*) ở Việt Nam đang có nguy cơ tuyệt chủng. Tạp chí Khoa học và Công nghệ 49 (3) 57 - 64.11. Vũ Thị Hiền, Đinh Thị Phòng, Trần Thị Việt Anh (2011). So sánh hiệu quả của hai chỉ thị ISSR và RAPD trong nghiên cứu đa dạng di truyền loài Cọ Khệt (*Dalbergia assamica*). Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4, trang: 591 - 597.
11. Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Khắc Khôi & Đinh Thị Phòng, 2012. Làm sáng tỏ tên khoa học cho một số loài thuộc chi Tre (*Bambusa* Schreb.) ở Việt Nam do biến đổi hình thái trên cơ sở giải mã trình tự gen *trnL-trnF*, *psbA-trnH* và *matK*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, tập 50, số 4: 463 - 473.
12. Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liệu, Đinh Thị Phòng, Phí Hồng Hải, La Ánh Dương, Vũ Đức Toàn, Delia Catacutan, Đàm Việt Bắc, 2016. Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các quần thể Sơn Tra (*Docynia indica* (Wall.) Decne) bằng chỉ thị ISSR. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp số 4, 2016: 4603 - 4614.

Email của tác giả chính: nhnghia53@gmail.com

Ngày nhận bài: 27/09/2017

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 24/11/2017

Ngày duyệt đăng: 04/12/2017