

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY MẬT NHÂN (*Eurycuma longifolia* Jack) TẠI MỘT SỐ QUẦN THỂ TỰ NHIÊN THUỘC NAM TRUNG BỘ VÀ TÂY NGUYÊN

Nguyễn Thị Huyền¹, Phạm Tiến Bằng², Lê Thị Thủy¹,
Trần Thị Thu Hà¹, Nguyễn Thị Việt Hà², Hà Thị Huyền Ngọc¹,
Mai Thị Phương Thúy¹, Ngô Văn Cầm³, Lê Sơn¹

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

² Trung tâm Lâm nghiệp nhiệt đới - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

³ Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Mật nhân (*Eurycuma longifolia* Jack) là loại thảo dược quý có tác dụng điều trị nhiều bệnh như giúp tăng cường chức năng sinh lý, cải thiện chứng trầm cảm sau sinh, các chứng bệnh về đường ruột, trị sốt rét, giảm đau đầu và đau bụng,... nên nhu cầu sử dụng loài cây này càng lớn. Sự khai thác quá mức và môi trường sống tự nhiên bị đe dọa đã làm ảnh hưởng đến tính đa dạng của cây Mật nhân. Vì vậy, đánh giá đa dạng di truyền để đưa ra các phương án bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây này là việc làm cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 10 cặp mồi ISSR để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 94 mẫu cây Mật nhân thu ở 13 quần thể tại Nam Trung Bộ và Tây Nguyên. Kết quả thu được 65 phân đoạn ISSR-PCR trong đó có 50,18% phân đoạn đa hình. Trong các quần thể nghiên cứu, quần thể Bình Thuận có mức độ đa dạng di truyền cao nhất ($h = 0,248$), trong khi quần thể Đà Nẵng có mức độ đa dạng di truyền thấp nhất ($h = 0,058$). Phân tích mối quan hệ di truyền cho thấy, 13 quần thể được chia thành nhiều nhóm với hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,779 đến 0,944 và khoảng cách di truyền từ 0,058 đến 0,248. Trong đó, quần thể Lâm Đồng và Quảng Nam có khoảng cách di truyền xa hơn so với các quần thể còn lại. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng di truyền tương đối cao trong các quần thể Mật nhân ở các tỉnh Nam Trung Bộ và Tây Nguyên, cần nghiên cứu bảo tồn, khai thác và phát triển nguồn gen có giá trị này trong tương lai.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, *Eurycuma longifolia* Jack, ISSR

Keywords: *Eurycuma longifolia* Jack, genetic diversity, ISSR

Evaluation of genetic diversity of *Eurycuma longifolia* Jack in some natural populations in the South Central and Central Highlands

Eurycuma longifolia Jack, a precious herb, has the effect of treating many diseases such as enhancing physiological function, improving postpartum depression, intestinal diseases, treating malaria, reducing headache and abdominal pain, ect., so the human demand for this plant is great. Over exploitation by people and threatened natural environment affected the genetic diversity of *Eurycuma longifolia* Jack. In this research, 10 ISSR primers were used to evaluate the genetic diversity of 94 samples that collected in South Central and Central Highlands. The results showed that there were 65 bands produced in which 50.18% were polymorphic. Genetic

diversity was highest in Binh Thuan population ($h = 0.248$) and lowest in Da Nang population ($h = 0.058$). Thirteen populations were classified into 5 main groups with genetic similarity coefficient ranged from 0.779 to 0.944 and genetic distance ranged from 0.058 to 0.248. Lam Dong and Quang Nam populations have a longer genetic distance than the rest. Overall, *Eurycuma longifolia* Jack had the high genetic diversity, therefore, studies to conserve, exploit and develop this valuable genetic resource should be conducted in the future.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mật nhân (*Eurycuma longifolia* Jack) hay còn gọi là cây bá bệnh, là cây bản địa phân bố nhiều ở Malaysia, Indonesia; phân bố ít hơn ở Thái Lan, Việt Nam, Lào và Ấn Độ. Mật nhân có hoa thuộc họ Thanh thất (Simaroubaceae), là loại cây bụi thân mảnh thường mọc dưới tán rừng thấp trên đất sỏi, ưa chua và thoát nước tốt (Samy *et al.*, 2005). Đây là loại thảo dược quý, các bộ phận của cây gồm lá, quả, thân, đặc biệt là rễ có tác dụng điều trị nhiều bệnh như giúp tăng cường chức năng sinh lý, cải thiện chứng trầm cảm sau sinh, giảm sốt, trị giun sán đường ruột, tiêu chảy, khó tiêu, vàng da, trị bệnh lý, trị sốt rét, giảm đau đầu và đau bụng... (Đỗ Tất Lợi, 2004; Võ Văn Chi, 2012). Ngoài ra, Mật nhân còn được dùng ở dạng thương mại làm chất bổ sung trong thực phẩm và thức uống. Ở Việt Nam, cây Mật nhân tập trung nhiều ở các tỉnh thuộc Nam Trung Bộ và Tây Nguyên. Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng loài cây này ngày càng lớn cùng với sự khai thác của người dân tăng lên dẫn đến nguồn cây Mật nhân cạn kiệt, số lượng cây và chất lượng thu được bị giảm sút, có nguy cơ đe dọa ở ngoài rừng tự nhiên. Do đó, việc đánh giá đa dạng di truyền để có phương án bảo tồn nguồn gen loài cây này là việc làm cần thiết.

Hiện nay, việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trên cơ sở phân tích AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism),

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic), SSR (Simple Sequence Repeat)... để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể đã được áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng (White *et al.*, 2007). Trong đó, kỹ thuật ISSR đã được sử dụng rộng rãi do có ưu điểm là tương đối đơn giản, hiệu quả cao và tiết kiệm thời gian trong việc đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen thực vật.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây Mật nhân tại một số tỉnh thuộc Nam Trung Bộ và Tây Nguyên bằng việc sử dụng chỉ thị phân tử ISSR, từ đó cung cấp những thông tin về nguồn gen của loài cây này làm cơ sở đưa ra những giải pháp hợp lý phục vụ cho công tác bảo tồn, phát triển và sử dụng bền vững nguồn gen cây thảo dược quý này tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Tổng cộng 94 mẫu lá Mật nhân được thu thập từ các rừng tự nhiên ở một số tỉnh thuộc khu vực Nam Trung Bộ và Tây Nguyên sử dụng nghiên cứu. Các mẫu sau khi thu thập tại hiện trường được bảo quản lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết thu DNA. Dựa vào vị trí phân bố, các mẫu Mật nhân được chia thành 13 quần thể và được ký hiệu trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Danh sách các mẫu Mật nhân được sử dụng nghiên cứu

STT	Quản thể	Ký hiệu	Số lượng mẫu	Địa điểm
1	Bình Định	BD	2	Huyện An Lão, tỉnh Bình Định (BD1.1 - BD1.2)
			3	Huyện Vĩnh Thạnh, tỉnh Bình Định (BD2.1 - BD2.3)
2	Bình Thuận	BT	7	Huyện Hàm Thuận Bắc, tỉnh Bình Thuận (BT1.1 - BT1.3, BT3.1 - BT3.4)
			3	Huyện Tuy Phong, Bình Thuận (BT2.1 - BD2.3)
3	Đắk Lắk	DL	5	Huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk (DL1.1 - DL1.5)
			2	Huyện Lắk, tỉnh Đắk Lắk (DL3.1 - DL3.2)
4	Đắk Nông	DN	1	Huyện Đắk Glong, tỉnh Đắk Nông (DN1)
			3	Thành phố Gia Nghĩa, tỉnh Đắk Nông (DN2.1 - DN2.3)
			3	Xã Quảng Sơn, Huyện Đắk Glong, tỉnh Đắk Nông (DN3.1 - DN3.3)
5	Đà Nẵng	DNA	2	Huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng (DNA1.1 - DNA1.2)
6	Gia Lai	GL	4	Huyện Chư Pah, tỉnh Gia Lai (GL1.1 - GL1.4)
			5	Huyện Đắk Đoa, tỉnh Gia Lai (GL2.1 - GL2.5)
			5	Xã Hà Ra, Huyện Mang Yang, tỉnh Gia Lai (GL3.1 - GL3.5)
			2	Huyện Mang Yang, tỉnh Gia Lai (GL4.1 - GL4.2)
			5	Huyện Kbang, tỉnh Gia Lai (GL5, GL6.1 - GL6.2, GL7.1 - GL7.2)
7	Khánh Hòa	KH	4	Thị xã Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa (KH1.1 - KH1.4)
			2	Huyện Khánh Sơn, tỉnh Khánh Hòa (KH2.2 - KH2.2)
8	Kon Tum	KT	3	Huyện Kon Rẫy, tỉnh Kon Tum (KT1.1 - KT1.3)
			2	Huyện Kon Plông, tỉnh Kon Tum (KT2.1 - KT2.2)
			2	Huyện Đắk Glei, tỉnh Kon Tum (KT3.1 - KT3.2)
9	Lâm Đồng	LD	2	Huyện Đam Rông, tỉnh Lâm Đồng (LD1.1 - LD1.2)
			2	Huyện Đạ Huoai, tỉnh Lâm Đồng (LD2.1 - LD2.2)
10	Ninh Thuận	NT	3	Huyện Bác Ái, tỉnh Ninh Thuận (NT1.1 - NT1.3)
			1	Huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận (NT2)
11	Phú Yên	PY	5	Huyện Sông Hinh, tỉnh Phú Yên (PY1.1 - PY1.5)
			4	Huyện Sông Cầu, tỉnh Phú Yên (PY2.1 - PY2.4)
12	Quảng Ngãi	QN	2	Huyện Ba Tơ, tỉnh Quảng Ngãi (QN1.1 - QN1.2)
			3	Huyện Sơn Hà, tỉnh Quảng Ngãi (QN2.1 - QN2.3)
13	Quảng Nam	QNA	2	Huyện Đông Giang, tỉnh Quảng Nam (QNA1.1 - QNA1.2)
			3	Huyện Nam Giang, tỉnh Quảng Nam (QNA2.1 - QNA2.3)
			2	Huyện Phước Sơn, tỉnh Quảng Nam (QNA3.1 - QNA3.2)
Tổng			94	

Các môi ISSR sử dụng trong nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen Mật nhân có trình tự nucleotide được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Danh sách mỗi ISSR được sử dụng trong nghiên cứu này

Thứ tự	Tên mỗi ISSR	Trình tự mỗi 5'-3'
1	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
2	UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG
3	UBC823	TG TG TG TG TG TG TG TGGA
4	UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG
5	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
6	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTCTG
7	UBC855	ACACACACACACACACT
8	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
9	ISCS14	AGTGAGTGAGTGAGTGAGTGA
10	ISCS34	TGTGTGTGTGTGTGTGRC

2.1. Phương pháp nghiên cứu

*** Tách chiết DNA tổng số**

Quy trình tách DNA tổng số theo phương pháp CTAB của Doyle JJ. và Doyle JL. (1987) có cải tiến một số bước, cụ thể như sau: 200 mg mẫu lá sau khi nghiền mịn bằng nitor lỏng được đựng trong ống eppendorf 2 ml, bổ sung 800µl đệm chiết (EDTA 0,5M pH8, 100 mM Tris HCl pH8, 500 mM NaCl, 2% CTAB, 1% PVP và 0,1% β-mecaptoethanol). Ủ hỗn hợp dịch chiết và mẫu trong 65°C trong vòng 2 giờ. Ly tâm 20.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút, dùng pipet hút phần dịch sang ống eppendorf 2 ml mới, bổ sung thêm 30µl Rnase và đảo đều nhẹ tay, ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Tiếp tục bổ sung 700µl Chloroform:Isoamylalcohol (tỷ lệ thể tích 24:1), lắc đều và ly tâm 20.000 vòng/phút trong 10 phút, dùng pipet hút phần dịch nổi, tiếp theo ủ ở -20°C trong 60 phút, ly tâm 20.000 vòng/phút trong 10 phút rồi thu tua DNA. Rửa tua bằng Ethanol 70° lạnh kết hợp với ly tâm, thực hiện 2 lần. Để DNA ở nhiệt độ phòng trong 5 phút rồi hòa tan bằng 100µl đệm 1x TE và bảo quản trong tủ lạnh -20°C.

DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và quan sát bằng máy soi gel sử dụng tia

UV. Nồng độ DNA tổng số được xác định bằng máy đo quang phổ hấp thụ Nano drop. DNA có chất lượng tốt với nồng độ ≥ 20ng/µl và độ tinh sạch từ 1,8 - 2,0 được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

*** Phản ứng PCR - ISSR**

Phản ứng khuếch đại gen được thực hiện trên máy PCR system 9700 với thể tích 20µl bao gồm 7µl nước deion, 10µl Master Mix 2X, 1µl primer 10µM và 2µl DNA (20ng/µl). Phản ứng ISSR-PCR được thực hiện qua các bước như sau: Biến tính 4 phút ở 94°C; 35 chu kỳ gia nhiệt gồm 45 giây ở 94°C, 60 giây ở 56°C và 45 giây ở 72°C; cuối cùng là 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được giữ ở tủ lạnh 4°C và được kiểm tra trên gel agarose 1,8% trong dung dịch đệm 1 × TAE được nhuộm bằng Redsafe với tỷ lệ thể tích 5µl/100 ml đệm, chạy ở hiệu điện thế 90V trong vòng 70 phút. Kích thước các băng được so sánh theo thang DNA chuẩn 1kb (Thermo Scientific) và quan sát bằng máy soi gel sử dụng tia UV.

*** Phân tích số liệu**

Phân tích số liệu bằng phần mềm NTSYSpc 2.0 theo quy ước: 1 - phân đoạn DNA xuất hiện và 0 - phân đoạn DNA không xuất hiện khi phân tích sản phẩm PCR-ISSR. Sau đó, các số liệu sẽ được phân tích dựa trên phần

mềm GENALEx 6.5 để xác định các thông số đa dạng di truyền như hệ số đa dạng di truyền theo Nei (h), số alen quan sát được (N_a), phần trăm các phân đoạn đa hình ($PPB\%$), khoảng cách di truyền, mức độ tương đồng... Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu theo phương pháp Nei và Li (1979) kiểu phân nhóm UPGMA trên phần mềm MEGA X.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đa dạng di truyền trong các quần thể Mật nhân tại Nam Trung Bộ và Tây Nguyên

Kết quả phân tích quan hệ di truyền của 94 mẫu Mật nhân cho thấy, các mẫu thu ở các địa điểm khác nhau trong cùng một tỉnh về cơ bản có quan hệ di truyền gần gũi hơi so với các mẫu thu từ các tỉnh khác (trừ một số địa điểm khác tỉnh nhưng có khoảng cách địa lý gần

nhau). Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tạm thời ghép các quần thể tự nhiên theo địa danh tỉnh để có cái nhìn tổng quát về tính đa dạng của loài giữa các tỉnh thuộc khu vực Nam Trung Bộ và Tây Nguyên.

Kết quả phân tích 94 mẫu Mật nhân thuộc 13 quần thể tự nhiên tại Nam Trung Bộ và Tây Nguyên với 10 chỉ thị ISSR thu được 65 phân đoạn DNA với kích thước dao động từ 50bp đến 1.350bp, trong đó phân đoạn đa hình trung bình chiếm 50,18%.

Kết quả phân tích các chỉ số: Số lượng alen quan sát được (N_a), số lượng các alen có hiệu lực (N_e), chỉ số di truyền của Shannon (I), chỉ số đa dạng di truyền theo Nei (h) và phần trăm phân đoạn đa hình ($PPB\%$) trong các quần thể nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Các chỉ số đa dạng di truyền của 13 quần thể Mật nhân phân tích với chỉ thị ISSR.

Quần thể	Chỉ số đa dạng di truyền				
	N_a	N_e	I	h	PPB (%)
Bình Định	1,031	1,371	0,299	0,207	49,23
Bình Thuận	1,415	1,420	0,373	0,248	70,77
Đắk Lắk	1,077	1,289	0,273	0,180	52,31
Đắk Nông	1,400	1,391	0,362	0,239	69,23
Đà Nẵng	0,369	1,123	0,085	0,062	12,31
Gia Lai	1,354	1,408	0,353	0,236	67,69
Khánh Hòa	0,908	1,295	0,253	0,171	44,62
Kon Tum	0,954	1,339	0,281	0,192	47,69
Lâm Đồng	0,831	1,246	0,204	0,140	33,85
Ninh Thuận	1,015	1,354	0,290	0,200	47,69
Phú Yên	1,400	1,374	0,346	0,226	69,23
Quảng Ngãi	0,800	1,279	0,235	0,160	40,00
Quảng Nam	1,077	1,350	0,283	0,195	47,69
Trung bình	1,049	1,326	0,280	0,189	50,18
SE	0,034	0,013	0,010	0,007	4,61

Các chỉ số đa dạng di truyền I , h và phần trăm phân đoạn đa hình PPB trong 13 quần thể nghiên cứu dao động tương ứng từ 0,085 (Đà

Nẵng) đến 0,373 (Bình Thuận), từ 0,062 (Đà Nẵng) đến 0,248 (Bình Thuận) và từ 12,31% (Đà Nẵng) đến 70,77% (Bình Thuận). Mức độ

đa dạng di truyền cao nhất ở quần thể Bình Thuận ($I = 0,373$; $h = 0,248$; $PPB = 70,77\%$) và thấp nhất là ở quần thể Đà Nẵng. Như vậy, kết quả dù tính theo phương pháp nào cũng vẫn phản ánh đúng về tính đa dạng nguồn gen di truyền của các quần thể được nghiên cứu.

So sánh mức độ đa dạng di truyền nguồn gen của Mật nhân với một số cây có tác dụng chữa bệnh được nghiên cứu bằng chỉ thị ISSR cho thấy Mật nhân có mức độ đa dạng di truyền nguồn gen tương đương so với quần thể Ba kích (*Morinda officinalis* F. C. How) ($I = 0,245$ và $PPB = 55,80\%$) (Hoàng Đăng Hiếu *et al.*, 2016).

Kết quả phân tích ở bảng 3 cũng chỉ ra rằng, các thông số N_e (số lượng alen có hiệu lực) và N_a (số lượng alen quan sát được) của quần thể Bình Thuận đạt giá trị cao nhất ($N_e = 1,420$ và $N_a = 1,415$) và thấp nhất ở quần thể Đà Nẵng ($N_e = 1,123$ và $N_a = 0,369$). Như vậy, kết quả của các thông số này cũng phù hợp với kết quả phân tích của các chỉ số đa dạng di truyền h , I và PPB cho giá trị cao nhất vẫn là quần thể Bình Thuận và thấp nhất ở quần thể Đà Nẵng.

3.2. Phân tích biến đổi di truyền giữa 13 quần thể Mật nhân nghiên cứu

Phân tích AMOVA, kết quả cho thấy mức độ sai khác về phân tử giữa các mẫu ở 13 quần thể nghiên cứu tương đối thấp (18%) trong khi mức độ sai khác về mặt phân tử giữa các mẫu trong các quần thể cao (82%).

Bảng 4. Kết quả phân tích AMOVA mẫu Mật nhân ở 13 quần thể nghiên cứu

AMOVA	Tỷ lệ
Giữa các quần thể	18%
Giữa các mẫu trong quần thể	82%
PhiPT	0,185; $p \leq 0,001$

3.3. Phân tích khoảng cách di truyền và mức độ tương đồng di truyền

Kết quả phân tích khoảng cách di truyền và mức độ tương đồng giữa 13 quần thể Mật nhân được nghiên cứu cho thấy, khoảng cách di truyền giữa các quần thể là không cao (chỉ từ 0,058 đến 0,250) và có mức độ tương đồng đạt từ 0,779 (77,9%) đến 0,944 (94,4%) (bảng 5).

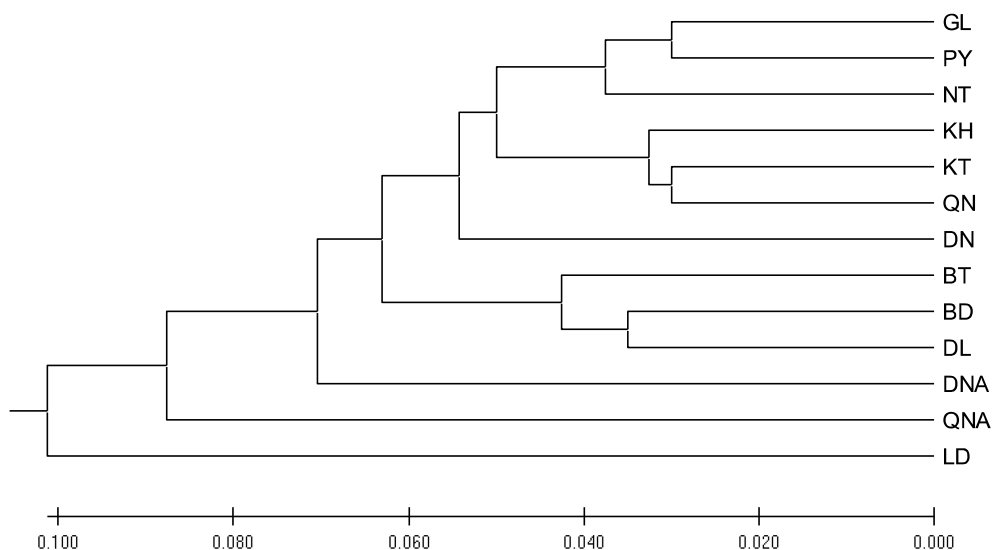
Bảng 5. Khoảng cách di truyền (trên vạch) và mức độ tương đồng di truyền (dưới vạch) của 13 quần thể Mật nhân nghiên cứu

BD	BT	DL	DN	DNA	GL	KH	KT	LD	NT	PY	QN	QNA	
-	0,087	0,072	0,134	0,127	0,080	0,136	0,163	0,249	0,138	0,129	0,125	0,156	BD
0,917	-	0,078	0,126	0,187	0,104	0,151	0,157	0,201	0,153	0,110	0,167	0,192	BT
0,931	0,925	-	0,122	0,129	0,074	0,103	0,130	0,212	0,143	0,105	0,106	0,156	DL
0,874	0,882	0,885	-	0,150	0,083	0,103	0,118	0,192	0,129	0,125	0,095	0,221	DN
0,881	0,830	0,879	0,861	-	0,097	0,147	0,138	0,217	0,160	0,136	0,124	0,247	DNA
0,923	0,901	0,929	0,920	0,908	-	0,058	0,087	0,150	0,069	0,060	0,058	0,141	GL
0,873	0,859	0,903	0,902	0,863	0,944	-	0,072	0,139	0,151	0,103	0,058	0,170	KH
0,849	0,855	0,878	0,889	0,871	0,917	0,930	-	0,155	0,135	0,115	0,062	0,201	KT
0,780	0,818	0,809	0,825	0,805	0,861	0,870	0,856	-	0,250	0,240	0,224	0,207	LD
0,871	0,858	0,867	0,879	0,852	0,933	0,860	0,873	0,779	-	0,080	0,107	0,129	NT
0,879	0,896	0,900	0,883	0,873	0,942	0,902	0,891	0,787	0,923	-	0,066	0,143	PY
0,883	0,846	0,899	0,909	0,884	0,944	0,944	0,940	0,799	0,899	0,936	-	0,167	QN
0,856	0,825	0,856	0,802	0,781	0,868	0,844	0,818	0,813	0,879	0,867	0,847	-	QNA

Kết quả chỉ ra rằng, quần thể Lâm Đồng (Tây Nguyên) có khoảng cách di truyền lớn nhất với quần thể Ninh Thuận (0,250), quần thể Bình Định (0,249) và quần thể Phú Yên (0,240), cả 3 quần thể này đều thuộc khu vực Nam Trung Bộ; quần thể Quảng Nam có khoảng cách di truyền với quần thể Đà Nẵng là 0,247. Khoảng cách di truyền nhỏ nhất (0,058) là giữa các quần thể Gia Lai, Khánh Hòa và quần thể Quảng Ngãi. Tương tự, khi so sánh mức độ tương đồng di truyền thì các quần thể Gia Lai, Khánh Hòa và Quảng Ngãi là giống nhau nhiều nhất (0,944) và mức độ tương đồng ít nhất là giữa quần thể Lâm Đồng với Ninh Thuận (0,779), Bình Định (0,780) và Phú Yên (0,787).

Tiến hành phân tích UPGMA trên phần mềm MEGA X, xây dựng cây quan hệ di truyền của các quần thể, kết quả cho thấy 13 quần thể Mặt

nhân nghiên cứu được chia thành 2 nhánh lớn, ở nhánh thứ nhất là quần thể Lâm Đồng (Tây Nguyên) và nhánh thứ hai bao gồm 12 quần thể còn lại (hình 1). Với nhánh thứ hai được chia làm hai nhánh nhỏ, quần thể Quảng Nam nằm ở một nhánh và nhánh còn lại chia tiếp thành hai nhóm nhỏ hơn. Trong đó, quần thể Đà Nẵng ở một nhóm và nhóm còn lại chứa các quần thể khác được chia thành nhiều nhánh nhỏ hơn nữa (hình 1). Kết quả này cũng tương ứng với khoảng cách di truyền giữa các quần thể ở bảng 5, trong đó các quần thể có khoảng cách di truyền nhỏ như quần thể Bình Định và Đắk Lắk (0,072), quần thể Kon Tum và Quảng Ngãi (0,062), quần thể Gia Lai và Phú Yên (0,060) phân bố thành 1 nhóm và quần thể Lâm Đồng (Tây Nguyên) có khoảng cách di truyền lớn nhất so với các quần thể còn lại.



Hình 1. Cây quan hệ di truyền của 13 quần thể Mặt nhân nghiên cứu

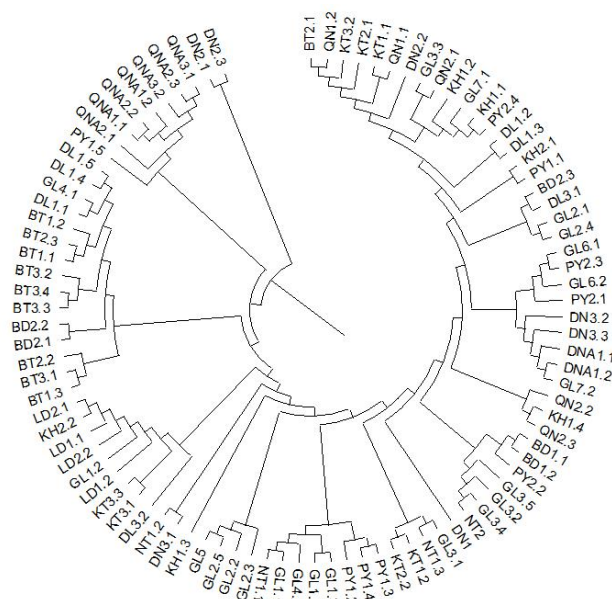
phân tích UPGMA cho 94 mẫu trong 13 quần thể Mặt nhân cũng chỉ ra mối quan hệ giữa các mẫu được nghiên cứu (hình 2).

Dựa vào hình 2, cho thấy toàn bộ mẫu thu từ 3 địa điểm Đông Giang (QNA1), Nam Giang (QNA2) và Phước Sơn (QNA3) trong cùng

quần thể Quảng Nam có quan hệ gần gũi về mặt di truyền và cùng nằm trên một nhánh. Ngoài ra, các mẫu thu ở Đam Rông (LD1) và Đạ Huoai (LD2) thuộc quần thể Lâm Đồng đều nằm cùng trong một nhánh nhưng xen lẫn với các mẫu thu từ quần thể khác. Tương tự, ở

các mẫu thu ở Hàm Thuận Bắc (BT1, BT3) và Tuy Phong (BT2) thuộc quần thể Bình Thuận cùng nằm trên một nhánh (trừ mẫu BT2.1) và

xen lẫn với các mẫu ở một số quần thể như Bình Định, Đắc Lắc.

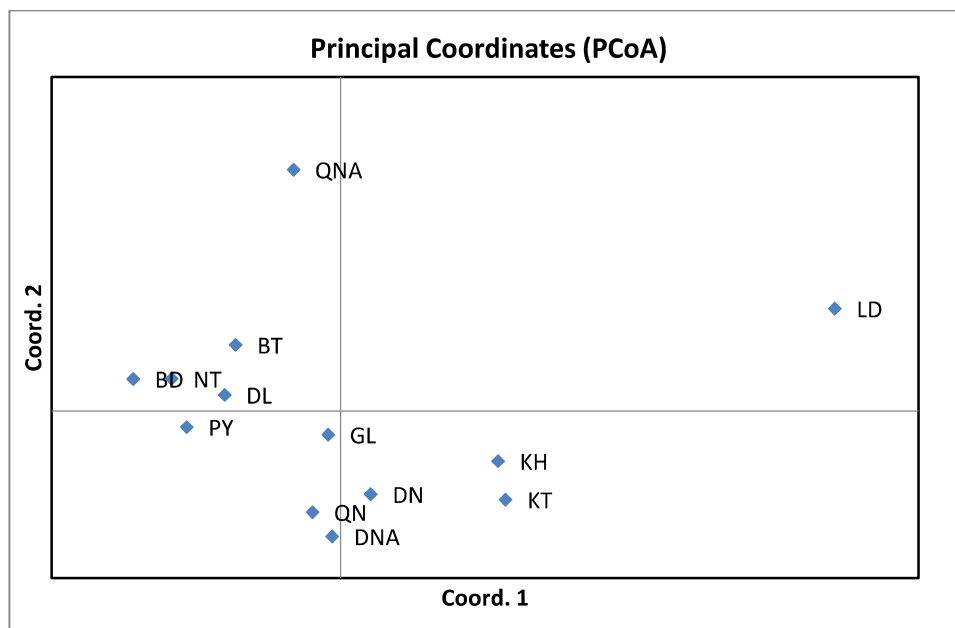


Hình 2. Cây quan hệ di truyền của 94 mẫu Mật nhân nghiên cứu

Ở quần thể Gia Lai, các mẫu thu ở mỗi địa điểm đều tạo thành các nhóm nhỏ nằm cùng nhánh với các mẫu thuộc quần thể khác. Mẫu thu tại Mang Yang (GL3, GL4) ở cùng nhánh với mẫu thuộc Ninh Thuận, Quảng Ngãi; với mẫu thu tại Kbang (GL5, GL6, GL7) nằm cùng nhánh các mẫu thuộc quần thể Phú Yên, Khánh Hòa và Đà Nẵng. Đối với quần thể Phú Yên, mẫu thu tại Sông Hình (PY1) đều có mặt ở cùng nhóm với quần thể Quảng Nam; Chư Pa, Mang Yang (quần thể Gia Lai); Bắc Ái (quần thể Ninh Thuận) và Khánh Sơn (quần thể Khánh Hòa). Mẫu thu tại Sông Cầu (PY2) thì có mặt cùng nhóm với mẫu thuộc An Lão (Bình Định); Kbang, Mang Yang (Gia Lai); Thuận Bắc (Ninh Thuận) và Ninh Hòa (Khánh Hòa). Có thể thấy, Gia Lai và Phú Yên là hai quần thể có các mẫu nằm trên nhiều nhánh cùng với các mẫu thuộc quần thể khác ở cây quan hệ di truyền (hình 3). Ngoài ra, ở các quần thể còn lại thì các mẫu thu tại các địa điểm này cũng đều nằm tại các nhánh nhỏ

khác nhau trên cây quan hệ di truyền. Như vậy, với các mẫu Mật nhân cùng một quần thể nhưng thu tại các địa điểm khác nhau thì có khoảng cách di truyền lớn và có tính đa dạng di truyền cao. Từ các kết quả phân tích, nhận thấy mẫu thu được Sông Hình và Sông Cầu (thuộc quần thể Phú Yên) có tính đa dạng di truyền cao hơn so với các mẫu còn lại và cần tập trung nghiên cứu để phát triển, khai thác và bảo tồn nguồn gen cây Mật nhân hiện có.

Tương tự, khi phân tích PCoA cho thấy quần thể Lâm Đồng (LD) và quần thể Quảng Nam (QN) được phân bố khá riêng biệt so với các quần thể còn lại (hình 3). Kết quả này đồng nhất với kết quả phân tích mối quan hệ di truyền (bảng 5) và cây quan hệ di truyền (hình 1). Như vậy, quần thể Mật nhân ở Lâm Đồng và Quảng Nam có khoảng cách di truyền xa hơn so với các quần thể còn lại, cần được phát triển, bảo tồn nguồn gen và duy trì ít nhất 2 quần thể đặc trưng ở 2 địa điểm trở lên của mỗi tỉnh.



Hình 3. Kết quả phân tích PCoA của 13 quần thể Mật nhân nghiên cứu

IV. KẾT LUẬN

Đánh giá đa dạng di truyền của Mật nhân tại các tỉnh thuộc Nam Trung Bộ và Tây Nguyên nhận thấy đây là loài có mức độ đa dạng di truyền cao (với giá trị trung bình $h = 0,189$ và $I = 0,280$), trong đó mức độ sai khác về mặt di truyền giữa các mẫu trong quần thể chiếm 82% và khoảng cách di truyền giữa các quần thể là không đáng kể. Do đó, để đảm bảo tính đa dạng di truyền của loài cây này, việc chọn lọc được số lượng cá thể đủ lớn để trồng các vườn bảo tồn là cần thiết để có thể khai thác và phát triển nguồn gen một cách tối ưu.

Từ các kết quả nghiên cứu, với điều kiện còn hạn chế, thì việc bảo tồn nguồn gen cây Mật nhân có thể tập trung vào một số quần thể sau:

- Quần thể thuộc tỉnh Lâm Đồng (Tây Nguyên) và tỉnh Quảng Nam (Nam Trung Bộ) có khoảng cách di truyền xa hơn hẳn so với các quần thể khác, nên việc nghiên cứu bảo tồn nguồn gen Mật nhân thuộc 2 tỉnh này phải duy trì ít nhất 2 quần thể đặc trưng ở 2 địa điểm khác nhau trở lên của mỗi tỉnh.

- Quần thể tỉnh Bình Thuận (Nam Trung Bộ), quần thể tại Sông Hinh và Sông Cầu thuộc tỉnh Phú Yên có tính đa dạng di truyền cao nhất trong các quần thể được nghiên cứu, nên đây là các quần thể cần được tập trung nghiên cứu, phát triển và bảo vệ nguồn gen trong thời gian sắp tới.

Trong tương lai, việc mở rộng phạm vi nghiên cứu các quần thể Mật nhân là hết sức cần thiết để có thể đánh giá một cách đầy đủ mức độ đa dạng di truyền nhằm phục vụ cho công tác khai thác và bảo tồn nguồn gen của loài cây này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần kết quả của đề tài “Nghiên cứu bảo tồn, phát triển và sử dụng bền vững nguồn gen Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack.) tại Nam Trung Bộ và Tây Nguyên làm nguyên liệu sản xuất thuốc”. Xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học.
2. Doyle JJ. and Doyle JL., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11 - 15.
3. Hoàng Đăng Hiếu, Chu Thị Thu Hà, Phạm Bích Ngọc, Lâm Đại Nhân, Nguyễn Thị Thúy Hương, Chu Hoàng Hà, 2016. “Sử dụng chỉ thị ISSR trong việc đánh giá đa dạng di truyền ở quần thể Ba kích tại Quảng Ninh”, *Tạp chí Sinh học*, 38(1): 89 - 95.
4. Nei M. and Li WH., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci.* 76 (10): 5269 - 5273.
5. Samy J., Sugumaran M., Kate LW., 2005. *Herbs of Malaysia*. Times Editions. Trang 104 - 105.
6. Võ Văn Chi, 2012. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học.
7. White TL., Adams WT., Neale DB., 2007. *Forest genetics*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA.

Email tác giả liên hệ: nguyenhuyen215.ht@gmail.com

Ngày nhận bài: 10/06/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 19/07/2021

Ngày duyệt đăng: 20/07/2021