

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN CÂY MÙ U (*Calophyllum inophyllum* L.) TẠI MỘT SỐ TỈNH VÙNG NAM BỘ

Lê Sơn¹, Trần Hữu Biễn², Phùng Văn Tĩnh², Nguyễn Trọng Tài², Nguyễn Thị Huyền¹,
Trần Thị Thu Hà¹, Lê Thị Thủy¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹, Hà Thị Huyền Ngọc¹

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

² Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm Lâm nghiệp Đông Nam Bộ

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây Mù u tại một số tỉnh Nam Bộ là cơ sở để lưu giữ và phát triển, phục vụ cho việc khai thác nguồn gen loài cây này với hiệu quả cao. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 80 mẫu Mù u thu thập tại Bến Tre, Trà Vinh, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau bằng 5 chỉ thị ISSR đã thu được 43 phân đoạn DNA, trong đó có 27 phân đoạn đa hình chiếm trung bình 63,72%. Các chỉ số đa dạng di truyền trung bình của Mù u thu được lần lượt đạt $h = 0,2167$, $I = 0,329$ và $PPB = 63,72\%$. Trong đó, quần thể Mù u tại tỉnh Bến Tre và Trà Vinh có mức đa dạng di truyền cao hơn so với các quần thể được nghiên cứu. Có sự sai khác về di truyền giữa các quần thể Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ với $G_{ST} = 0,2490$ (24,90%) và giá trị $Nm = 1,5083$. Khoảng cách di truyền giữa 5 quần thể Mù u được nghiên cứu nằm trong khoảng từ 0,069 đến 0,190 và mức độ tương đồng dao động trong khoảng từ 0,827 (82,70%) đến 0,934 (93,40%). Các quần thể Mù u tại tỉnh Bến Tre, Trà Vinh và Sóc Trăng có tính đa dạng di truyền cao hơn các quần thể tại tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau, do đó cần tập trung nghiên cứu và phát triển nguồn gen của các quần thể Mù u này.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử ISSR, DNA, đa dạng di truyền, Mù u

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF *Calophyllum inophyllum* L. IN SOME SOUTHERN PROVINCES

Le Son¹, Tran Huu Bien², Phung Van Tinh², Nguyen Trong Tai², Nguyen Thi Huyen¹,
Tran Thi Thu Ha¹, Le Thi Thuy¹, Nguyen Thi Viet Ha¹, Ha Thi Huyen Ngoc¹

¹ Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology

² Centre for Forest Research and Experiment of South Western Vietnam

SUMMARY

The aim of this study is evaluating the genetic diversity of *Calophyllum inophyllum* L. of some Southern provinces in order to build up the genetic conservation and development strategies for this multi- purposes species. Five ISSR markers were used to amplify the genomic DNA of 80 samples of *C. inophyllum* L. that were collected from Ben Tre, Tra Vinh, Soc Trang, Bac Lieu and Ca Mau. The results showed a total of 43 DNA segments were obtained, in which 27 polymorphic segments accounting for an average of 63.72%. The average genetic diversity indexes of *C. inophyllum* L. samples obtained were $h = 0.2167$, $I = 0.329$ and $PPB = 63.72\%$, respectively. In which, *C. inophyllum* L. populations in Ben Tre and Tra Vinh provinces have higher values than studied populations. There was genetic difference between populations of *C. inophyllum* L. in 5 provinces in the South with $G_{ST} = 0.2490$ (24.90%) and $Nm = 1.5083$. The genetic distance between the 5 studied populations of *C. inophyllum* L. ranges from 0.069 to 0.190 and the degree of similarity ranges from 0.827 (82.70%) to 0.934 (93.40%). Ben Tre, Tra Vinh and Soc Trang populations had higher genetic diversity than that in Bac Lieu and Ca Mau provinces. Therefore, research and development should be focused on research and development genetic resources of these populations the species.

Keywords: *Calophyllum inophyllum* L., DNA, genetic diversity, ISSR markers

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mù u (*Calophyllum inophyllum* L.) thuộc chi Công hay còn gọi là chi Mù u (*Calophyllum*). Các loài thuộc chi Mù u thường phân bố nhiều ở Australasia, Madagascar, Đông Phi, Nam Á và Đông Nam Á, các đảo Thái Bình Dương, Caribe và Châu Mỹ Latin (Prabakaran and John Britto, 2012). Ở Việt Nam, loài cây này mọc hoang và được trồng ở các tỉnh miền Trung, miền Nam như Quảng Bình đến Phan Thiết, Vĩnh Long, Mỹ Tho, Bến Tre, Trà Vinh, Cà Mau...

Là một trong những loài cây có giá trị kinh tế quan trọng, đa mục đích thuộc vùng ven biển nhiệt đới, các bộ phận của cây Mù u đều có thể sử dụng được gồm thân, rễ, lá, hạt quả (Shinde *et al.*, 2012; Prabakaran and John Britto, 2012). Đặc biệt, dầu Mù u chứa một số hoạt chất quan trọng với thành phần dược tính cao như: leucocyanidin, tanin, acid hữu cơ, phytosterol, saponin triterpen, coumarin, glycerid, calophyllolid, mophyllolid, acid calophyllic, saponin, acid hydrocyanic. Dầu Mù u dùng trong lĩnh vực y dược khá phổ biến, có tác dụng điều trị thấp khớp, loét dạ dày, bệnh ngoài da. Trong những năm gần đây, còn biết đến như là loài dược liệu quan trọng về điều trị bệnh HIV (Chopra *et al.*, 1956; Spino *et al.*, 1998; Rajesh Gunaga and Vasudeva, 2011), chứa một số hoạt chất hóa học có khả năng ức chế ung thư, chữa bệnh ngoài da, thấp khớp, đau khớp và xuất

huyết não, điều trị vết thương (Sanjaykumar *et al.*, 2012).

Như vậy, việc nghiên cứu và phát triển nguồn gen cây Mù u tại nước ta là việc làm cần thiết và có ý nghĩa lớn với mục tiêu khai thác và nâng cao chất lượng dầu tại một số tỉnh vùng Nam Bộ nước ta. Hiện nay, việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền, cấu trúc quần thể và quan hệ di truyền đã được triển khai với sự hỗ trợ đắc lực của các chỉ thị phân tử. Trong đó, các chỉ thị ISSR đã được sử dụng rộng rãi khi đánh giá đa dạng di truyền ở mức độ quần thể, loài và xuất xứ cho các loài cây bản địa nói chung và cây Mù u nói riêng (Deng *et al.*, 2017; Palanikumar *et al.*, 2019). Xuất phát từ thực tiễn đó, việc nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây Mù u tại một số tỉnh Nam Bộ là rất cần thiết. Kết quả của nghiên cứu về mức độ đa dạng di truyền của cây Mù u là cơ sở để bảo tồn và phát triển, từ đó phục vụ cho việc khai thác nguồn gen loài cây này đạt giá trị kinh tế và hiệu quả cao hơn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

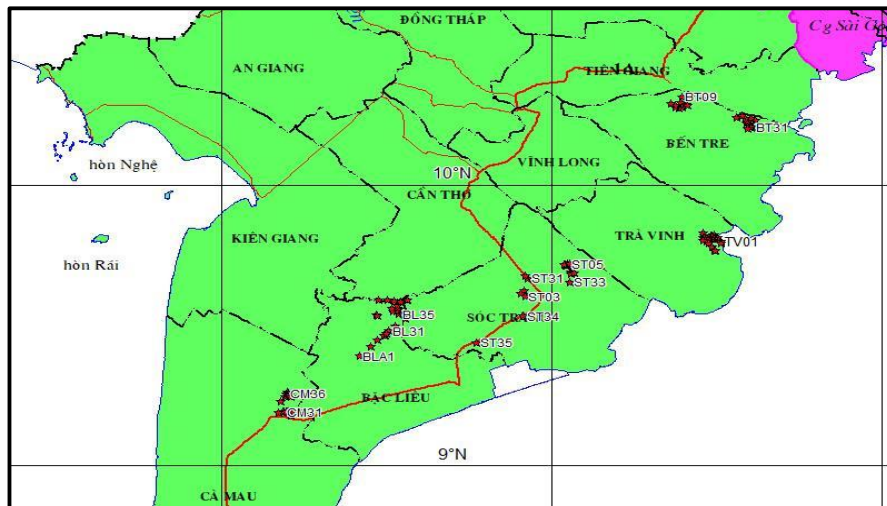
2.1. Vật liệu nghiên cứu

80 mẫu lá Mù u thu tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ (Bến Tre, Sóc Trăng, Cà Mau, Trà Vinh và Bạc Liêu) được sử dụng cho mục tiêu phân tích đa dạng di truyền. Dựa vào vị trí phân bố, các mẫu Mù u tại 5 tỉnh được kí hiệu và trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Danh sách mẫu lá Mù u được nghiên cứu

STT	Tỉnh	Số lượng	Địa điểm thu mẫu
1	Bến Tre	16	Áp Giồng Tre, xã Phú Long, huyện Bình Đại (BT31)
			Áp 1, xã Phú Long, huyện Bình Đại (BT3)
			Xã Định Trung, huyện Bình Đại (BT4)
			Xã Lộc Thuận, huyện Bình Đại (BT5, BT6, BT33)
			Xã Phú Vang, huyện Bình Đại (BT34, BT35)
			Xã Vang Quới Đông, huyện Bình Đại (BT36)
			Xã Quới Sơn, huyện Châu Thành (BT9)
			Xã An Phước, huyện Châu Thành (BT12, BT37, BT38)
			Xã Phước Thạnh, huyện Châu Thành (BT13)
			Xã Hữu Định, huyện Châu Thành (BT14, BT15)

STT	Tỉnh	Số lượng	Địa điểm thu mẫu
2	Sóc Trăng	15	Xã Phú Hữu, huyện Long Phú (ST17)
			Ấp Ngọn, xã Hậu Thạnh, huyện Long Phú (ST5, ST9, ST13)
			Ấp Phó, xã Hậu Thạnh, huyện Long Phú (ST14, ST16)
			Xã Châu Khánh, huyện Long Phú (ST33)
			Xã An Ninh, huyện Châu Thành (ST2, ST3)
			Xã An Hiệp, huyện Châu Thành (ST31, ST32)
			Xã Thuận Hòa, huyện Châu Thành (ST1)
			Xã Đại Tâm, huyện Mỹ Xuyên (ST34, ST35)
			Xã Vĩnh Quới, TX. Ngã Năm (ST39)
3	Cà Mau	14	Xã An Xuyên, TP. Cà Mau (CM13, CM34, CM35, CM36, CM37, CM38)
			P. Tân Thành, TP. Cà Mau (CM2, CM4, CM7, CM31, CM33, CM40)
			Xã Tân Thành, TP. Cà Mau (CM32)
			Xã Tân Lộc, huyện Thới Bình (CM39)
4	Trà Vinh	18	Xã Mỹ Long Nam, huyện Cầu Ngang (TV1, TV6)
			Xã Mỹ Long Bắc, huyện Cầu Ngang (TV19, TV32, TV33, TV34)
			Xã Vĩnh Kim, huyện Cầu Ngang (TV21, TV22)
			Xã Mỹ Hòa, huyện Cầu Ngang (TV23, TV24, TV25, TV27, TV35)
			Thị trấn Cầu Ngang, huyện Cầu Ngang (TV28)
			Xã Hiệp Mỹ Đông, huyện Cầu Ngang (TV29)
			Thị trấn Mỹ Long, huyện Cầu Ngang (TV31)
			Xã Hiệp Mỹ Tây, huyện Cầu Ngang (TV36, TV37)
5	Bạc Liêu	17	Ấp Mỹ 1, xã Vĩnh Phú Đông, huyện Phước Long (BL1, BL2, BL4)
			Ấp Phước Thuận 1, TT Phước Long, huyện Phước Long (BL32)
			Xã Ninh Quới, huyện Hồng Dân (BL6, BL7, BL10, BL35, BL36, BL41, BL42, BL43)
			Ấp Ninh Phước, xã Ninh Quới, huyện Hồng Dân (BL31)
			Ấp Ninh Bình, Ninh Quới, huyện Hồng Dân (BL9)
			Quản Lộ Phụng Hiệp, huyện Phước Long (BLA1, BLA2, BLA3)
Tổng		80 mẫu	



Hình 1. Vị trí thu mẫu lá Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ



Hình 2. Mẫu lá Mù u được sử dụng nghiên cứu

Để đánh giá mức độ đa dạng di truyền nguồn gen của 80 mẫu Mù u, sử dụng 5 chỉ thị ISSR (mỗi) là các chỉ thị đã được chọn lọc theo Palanikumanran và đồng tác giả (2019) và qua

quá trình sàng lọc (có mức độ đa hình cao) trong số 10 chỉ thị ban đầu với số mẫu nhỏ (3 mẫu) với trình tự và nhiệt độ gắn mỗi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Danh sách chỉ thị ISSR sử dụng trong nghiên cứu này

STT	Chỉ thị	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Tài liệu tham khảo
1	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	54.9	Isshiki <i>et al.</i> , 2008
2	UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	56.0	
3	ISCS34	TGTGTGTGTGTGTGRC	54.5	
4	UBC855	ACACACACACACACT	51.4	
5	UBC881	GGG TGGGGT GGGGTG	59.3	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

Sử dụng phương pháp CTAB của Doyle JJ. và Doyle JL. (1987) được cải tiến một số bước. Quy trình tách chiết DNA tổng số cho mẫu Mù u gồm các bước như sau:

- Lấy 50 mg mẫu lá Mù u tươi, bánh tẻ để tách mẫu, sử dụng máy nghiền chuyên dụng để nghiền mẫu mịn bằng nitơ lỏng -196°C.
- Sử dụng dụng cụ chuyên dụng chuyển mẫu sau khi nghiền mịn vào ống eppendorf 2 ml và bổ sung đệm chiết CTAB (EDTA 0,5M pH8,

100mM Tris HCl pH8, 500mM NaCl, 2% CTAB, 1% PVP và 0,2% β-mecaptoethanol) vào rồi đảo đều mẫu với đệm chiết.

- Ủ mẫu và đệm chiết ở nhiệt độ 58°C trong thời gian 45 đến 50 phút, sau mỗi 15 phút đảo lại hỗn hợp ủ.
- Tiến hành ly tâm hỗn hợp mẫu và đệm ở 12.000 vòng/phút trong 20 phút, sau đó dùng pipet hút dịch nổi ở phía trên sang ống eppendorf 2 ml mới.
- Bổ sung thêm 30 μl RNase vào dịch chiết, lắc đều hỗn hợp và ủ ở 37°C trong 30 phút.

- Bổ sung Chlorofom: Isoamylalcohol (24:1) theo tỷ lệ 1:1 vào dịch chiết, lắc đều hỗn hợp và cho vào ly tâm 20 phút 12.000 vòng/phút.
- Dùng pipet hút dịch nổi phía trên chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml mới và bổ sung Isopropanal lạnh với tỷ lệ thể tích gấp 1,5 lần. Lắc đều hỗn hợp và tiến hành ủ lạnh ở -20°C trong vòng 60 phút.
- Sau đó, tiến hành ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 20 phút để thu kết tủa.
- Rửa tủa bằng ethanol 70° lạnh ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút, lặp lại 2 lần bước này.
- Làm khô tủa DNA và bổ sung thêm 100 µl TE 1X, bảo quản ở tủ lạnh -20°C để phục vụ cho thí nghiệm tiếp theo.

DNA tổng số thu được, tiến hành kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và quan sát kết quả bằng máy soi gel sử dụng tia UV. Đồng thời kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số các mẫu Mù u thu được bằng máy đo quang phổ hấp thụ Nano drop. Mẫu DNA tổng số đủ điều kiện cho thí nghiệm tiếp theo phải có nồng độ ≥ 20 ng/µl và độ tinh sạch đạt trong khoảng từ 1,8 đến 2,0.

2.2.2. Chuỗi phản ứng trùng hợp bằng chỉ thị ISSR

Sau khi tách chiết thu DNA tổng số, tiến hành thực hiện chuỗi phản ứng trùng hợp trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Phản ứng với tổng thể tích 15 µl gồm 7,5 µl Mastermix 2X, 1 µl mỗi ISSR 10 µM, 1 µl DNA tổng số và 5,5 µl nước deion. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm 94°C trong 4 phút (94°C: 45 giây, nhiệt độ gắn mỗi của từng chỉ thị: 60 giây, 72°C: 45 giây); lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 7 phút; 12°C.

Kết thúc chuỗi phản ứng PCR, sản phẩm thu được kiểm tra trên gel agarose 1,8% trong dung dịch đệm TAE 1X và nhuộm bằng Redsafe. Chạy bản gel ở hiệu điện thế 75V trong vòng 60 phút và tiến hành quan sát trên máy soi gel sử dụng tia UV. Đọc kết quả kích thước các băng so sánh theo thang DNA chuẩn 1Kb của Thermo Scientific.

2.2.3. Thu thập và xử lý số liệu

Tiến hành thu thập số liệu theo quy ước là 1 = phân đoạn DNA xuất hiện và 0 = phân đoạn DNA không xuất hiện khi điện di sản phẩm PCR.

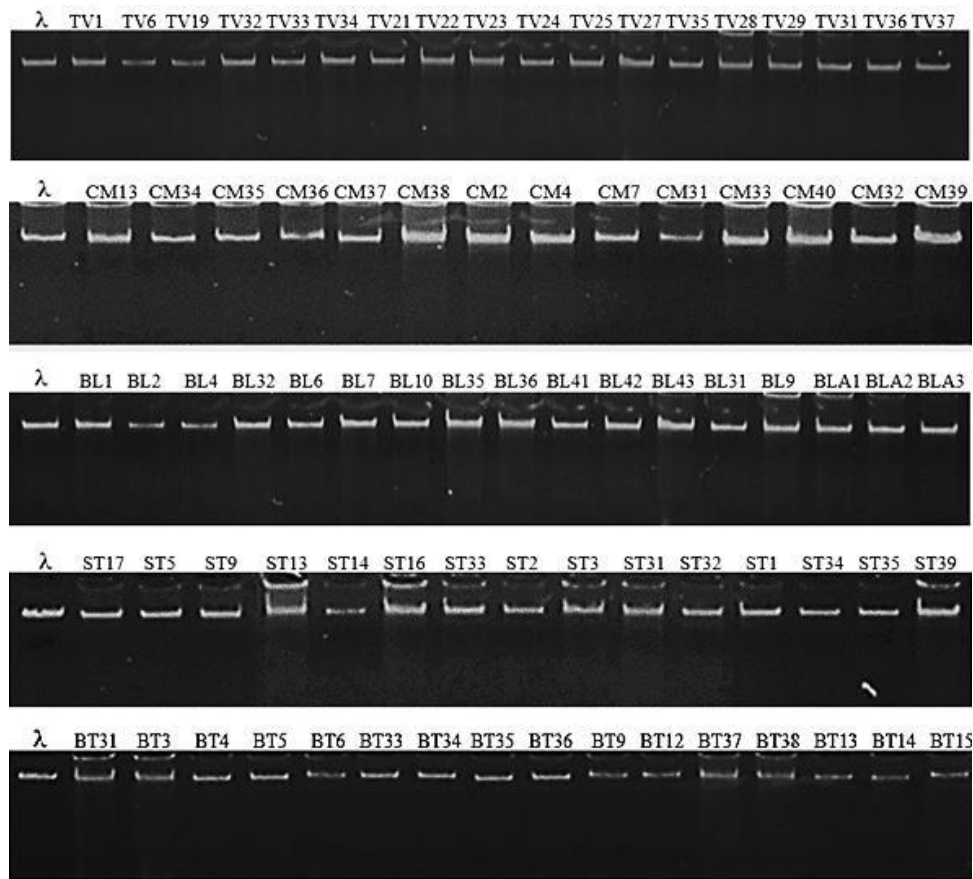
Sử dụng các phần mềm GenAlEx 6.5 (Peakall *et al.*, 2006), POPGENE (Yeh *et al.*, 1999) để tính toán mức độ đa dạng di truyền và các chỉ số đa dạng di truyền của các mẫu Mù u được nghiên cứu. Phân tích tọa độ chính (Principal Coordinates Analysis - PCoA) thể hiện mức độ khác biệt di truyền giữa các quần thể nghiên cứu.

Thiết lập ma trận khoảng cách di truyền để phân tích thành phần tọa độ (PCoA) và lập cây quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) theo phương pháp NJ (Neighbor Joining) với hệ số bootstrap 1000.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA tổng số mẫu Mù u

Kết quả tách chiết DNA tổng số của 80 mẫu Mù u tại 5 tỉnh Bến Tre (BT), Sóc Trăng (ST), Cà Mau (CM), Trà Vinh (TV) và Bạc Liêu (BL và BLA) được kiểm tra thể hiện như hình 3. Từ kết quả thu được, nhận thấy DNA tổng số các mẫu Mù u có băng chính, sáng và rõ nét, không bị đứt gãy.



Hình 3. Kết quả điện di DNA tổng số của 80 mẫu Mù u nghiên cứu

Sau đó, kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số thu được trên máy đo Nano drop. Kết quả được trình bày cụ thể ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của 80 mẫu Mù u

STT	Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	Độ tinh sạch 260/280	STT	Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	Độ tinh sạch 260/280
1	BT31	121,35	1,86	41	CM31	166,92	1,89
2	BT31	105,46	1,83	42	CM33	116,45	1,86
3	BT4	117,42	1,84	43	CM40	164,38	1,89
4	BT5	142,33	1,80	44	CM32	131,98	1,91
5	BT6	120,47	1,80	45	CM39	129,89	1,87
6	BT33	115,11	1,86	46	TV1	117,6	1,98
7	BT34	137,46	1,81	47	TV6	106,75	1,83
8	BT35	131,88	1,84	48	TV19	214,19	1,87
9	BT36	98,26	1,85	49	TV32	198,93	1,87
10	BT9	90,33	1,89	50	TV33	237,33	1,82
11	BT12	96,13	1,83	51	TV34	266,54	1,81
12	BT37	96,98	1,98	52	TV21	219,74	1,85

STT	Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	Độ tinh sạch 260/280	STT	Mẫu	Nồng độ (ng/μl)	Độ tinh sạch 260/280
13	BT38	146,80	1,92	53	TV22	221,96	1,89
14	BT13	83,14	1,86	54	TV23	216,95	1,84
15	BT14	115,12	1,83	55	TV24	151,47	1,84
16	BT15	92,16	1,89	56	TV25	109,14	1,82
17	ST17	100,99	1,93	57	TV27	232,90	1,85
18	ST5	144,73	1,91	58	TV35	214,19	1,88
19	ST9	122,40	1,89	59	TV28	220,92	1,82
20	ST13	121,78	1,83	60	TV29	144,40	1,85
21	ST14	165,34	1,80	61	TV31	120,67	1,80
22	ST16	143,93	1,80	62	TV36	112,71	1,89
23	ST33	132,12	1,83	63	TV37	165,37	1,91
24	ST2	120,14	1,84	64	BL1	143,62	1,86
25	ST33	157,27	1,93	65	BL2	184,52	1,85
26	ST31	154,06	1,83	66	BL4	165,03	1,82
27	ST32	107,17	1,82	67	BL32	143,54	1,90
28	ST1	156,52	1,86	68	BL6	205,24	1,84
29	ST34	164,73	1,87	69	BL7	140,60	1,86
30	ST35	108,41	1,97	70	BL10	180,96	1,99
31	ST39	145,85	1,85	71	BL35	159,88	1,88
32	CM13	129,36	1,84	72	BL36	153,12	1,87
33	CM34	109,75	1,92	73	BL41	179,65	1,87
34	CM35	119,81	1,82	74	BL42	131,12	1,84
35	CM36	110,46	1,81	75	BL43	201,45	1,87
36	CM37	93,25	1,92	76	BL31	225,15	1,88
37	CM38	127,92	1,81	77	BL9	210,58	1,85
38	CM2	147,11	2,00	78	BLA1	172,42	1,86
39	CM4	158,05	1,88	79	BLA2	229,85	1,86
40	CM7	168,66	1,91	80	BLA3	178,92	1,90

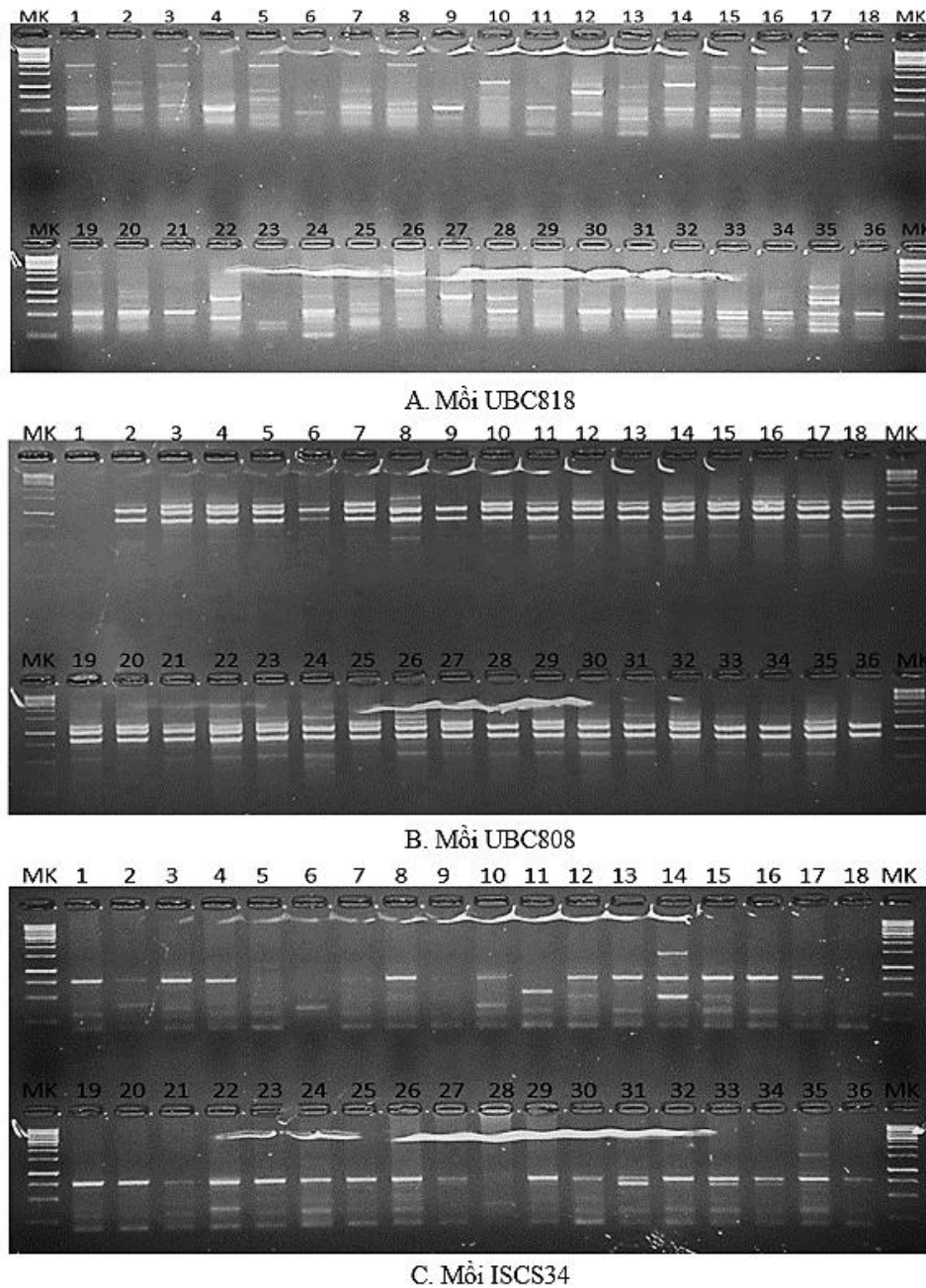
Từ kết quả hình 3 và bảng 3, nhận thấy DNA tổng số của 80 mẫu Mù u thu tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ (Bến Tre, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Cà Mau và Trà Vinh) có xuất hiện băng chính sáng và rõ nét, không bị đứt gãy, có nồng độ > 20 ng/μl và độ tinh sạch OD_{260/280} đạt trong khoảng 1,8 - 2,0. Như vậy, DNA tổng số thu của các mẫu Mù u đảm bảo chất lượng và đủ điều kiện sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Chuỗi phản ứng trùng hợp PCR-ISSR

Kết thúc chuỗi phản ứng trùng hợp, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose và quan

sát dưới đèn cực tím, qua đó xác định được 43 phân đoạn DNA nhân bản với kích thước dao động từ 100bp đến 2.000bp. Trong đó, có 27 phân đoạn đa hình chiếm trung bình 63,72% và có 16 phân đoạn đơn hình chiếm 36,28%.

Với 5 chỉ thị ISSR nghiên cứu, mỗi chỉ thị đều tạo ra các dải khuếch đại nhưng có khả năng tái tạo của từng chỉ thị là khác nhau. Một số hình ảnh mô tả kết quả PCR của các mẫu Mù u nghiên cứu được trình bày dưới đây.



Hình 4. Kết quả PCR-ISSR một số mẫu Mù u nghiên cứu

Ghi chú: MK- DNA ladder 1kb; 1 - 36: sản phẩm PCR của mẫu nghiên cứu.

3.3. Kết quả đánh giá mức độ đa dạng di truyền các mẫu Mù u

3.3.1. Phân tích đa dạng di truyền mẫu Mù u tại các tỉnh vùng Nam Bộ

Các thông số về mức độ đa dạng di truyền như số lượng alen quan sát được (N_a), số lượng

alen có hiệu lực (N_e), chỉ số Shannon (I), hệ số đa dạng di truyền Nei (h), tỷ lệ phân đoạn đa hình (PPB) của các mẫu Mù u thuộc 5 tỉnh được tính toán và so sánh với nhau. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 4 dưới đây:

Bảng 4. Các thông số đa dạng di truyền mẫu Mù u tại 5 tỉnh nghiên cứu

STT	Tỉnh	Chỉ số đa dạng di truyền				
		Na	Ne	I	h	PPB (%)
1	Bến Tre	1,837	1,425	0,408	0,2642	83,72
2	Sóc Trăng	1,605	1,329	0,306	0,2009	60,47
3	Trà Vinh	1,721	1,402	0,372	0,2447	72,09
4	Cà Mau	1,535	1,311	0,283	0,1874	53,49
5	Bạc Liêu	1,488	1,330	0,274	0,1865	48,84
TB		1,637	1,359	0,329	0,2167	63,72
SE		0,042	0,024	0,019	0,013	6,35

Kết quả phân tích tại bảng 4 cho thấy, hệ số di truyền Nei của 80 mẫu Mù u 5 tỉnh vùng Nam Bộ có giá trị nằm trong khoảng 0,1865 đến 0,2642 và đạt giá trị trung bình $h = 0,2167$; hệ số Shannon đạt giá trị trung bình là $I = 0,329$ và nằm trong khoảng 0,274 đến 0,408. Trong đó, hệ số di truyền và hệ số Shannon cao nhất tại tỉnh Bến Tre ($h = 0,2642$ và $I = 0,408$), tiếp theo là tỉnh Trà Vinh ($h = 0,2447$ và $I = 0,372$). Ngược lại, tại tỉnh Bạc Liêu ($h = 0,1865$ và $I = 0,274$) và tỉnh Cà Mau ($h = 0,1874$ và $I = 0,283$) có hệ số di truyền và hệ số Shannon thấp hơn so với các tỉnh được nghiên cứu.

Tương tự, với số alen quan sát được (Na) và số alen có hiệu lực (Ne) của các mẫu Mù u tại 5 tỉnh được nghiên cứu có giá trị trung bình đạt $Na = 1,637$ và $Ne = 1,359$. Trong đó, giá trị cao nhất thuộc tỉnh Bến Tre ($Na = 1,837$ và $Ne = 1,425$), tiếp đó là tỉnh Trà Vinh ($Na = 1,721$ và $Ne = 1,402$); giá trị thấp hơn thuộc về hai tỉnh Bạc Liêu ($Na = 1,488$ và $Ne = 1,330$) và Cà Mau ($Na = 1,535$ và $Ne = 1,311$).

Đối với tỷ lệ phân đoạn đa hình (PPB) giữa 5 tỉnh đạt giá trị trung bình PPB = 63,72% và nằm trong khoảng từ 48,84% (Bạc Liêu) đến

83,72% (Bến Tre), tương ứng với số phân đoạn đa hình đạt từ 21 phân đoạn đến 36 phân đoạn. Chứng tỏ, sự đa hình của các phân đoạn thuộc tỉnh Bến Tre và Trà Vinh ở mức cao hơn so với các tỉnh còn lại.

Từ các chỉ số đa dạng di truyền của mẫu Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ cho thấy tại tỉnh Bến Tre và tỉnh Trà Vinh có sự vượt trội về sự đa dạng di truyền hơn so với các tỉnh còn lại được nghiên cứu.

3.3.2. Biến đổi di truyền 5 quần thể Mù u thuộc vùng Nam Bộ

Kết quả phân tích AMOVA tại 5 quần thể Mù u vùng Nam Bộ về mức độ biến đổi phân tử giữa các tỉnh và giữa các mẫu trong cùng quần thể ở bảng 5 cho thấy, tổng mức độ thay đổi phân tử tương đối cao giữa các quần thể là 21% và giữa các mẫu trong cùng quần thể là 79% với $p \leq 0,001$ có ý nghĩa thống kê. Như vậy, kết quả này cho thấy sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các quần thể vùng Nam Bộ. Hiện nay, chưa có đánh giá đầy đủ nào về đa dạng di truyền đối với cây Mù u ở nước ta.

Bảng 5. Kết quả phân tích AMOVA tại 5 quần thể Mù u vùng Nam Bộ

AMOVA	Tổng sự biến đổi (%)
Giữa các quần thể	21%
Trong cùng quần thể	79%
<i>PhiPT</i>	0,214; $p \leq 0,001$

3.3.3. Phân tích mối quan hệ di truyền giữa 5 quần thể Mù u vùng Nam Bộ được nghiên cứu

Qua phân tích phần mềm POPGENE, các chỉ số đa dạng di truyền giữa 5 tỉnh vùng Nam Bộ được nghiên cứu gồm chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các nguồn giống (H_T), chỉ số đa dạng gen trung bình trong nguồn giống (H_S), chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các nguồn giống (G_{ST}), chỉ số trao đổi gen giữa các nguồn giống (N_m) được tính toán và trình bày như bảng 6 sau đây.

Bảng 6. Các chỉ số đa dạng giữa 5 tỉnh vùng Nam Bộ được nghiên cứu

Các thông số	Trung bình
Số lượng mẫu	80
H_T	0,2886 ± 0,0253
H_S	0,2167 ± 0,0149
G_{ST}	0,2490
N_m	1,5083

Từ kết quả thu được cho thấy, chỉ số sai khác di truyền G_{ST} giữa 5 quần thể Mù u vùng Nam Bộ (Bến Tre, Bạc Liêu, Trà Vinh, Cà Mau, Sóc Trăng) được tính toán đạt $G_{ST} = 0,2490$ chứng tỏ có 24,90% (> 10%) sự sai khác di truyền giữa các quần thể nghiên cứu và tương đối cao. Dựa vào giá trị G_{ST} thì giá trị N_m được tính toán và đạt $N_m = 1,5083$ cho thấy tần số trao đổi gen giữa các quần thể Mù u được nghiên cứu là không lớn. Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy có sự sai khác về di truyền giữa các quần thể Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ.

Một số nghiên cứu đánh giá về di truyền của cây Mù u sử dụng chỉ thị ISSR đã được công bố, cho thấy có sự khác biệt di truyền giữa các khu vực nghiên cứu. Theo nghiên cứu của Deng và đồng tác giả (2017), các biến thể di truyền và cấu trúc quần thể của 8 quần thể Mù u tại Đài Loan và các đảo lân cận được kiểm tra bằng chỉ thị ISSR kết quả cho chỉ số $h = 0,2021$ (chỉ số đa dạng nguồn gen), $G_{ST} = 0,6385$ (chỉ số sai khác di truyền) và $N_m = 0,2832$. Phân tích

AMOVA cho thấy mức độ biến đổi phân tử giữa các khu vực là 47,87% ($p < 0,001$), của quần thể trong vùng là 14,53% ($p < 0,001$) và giữa các cá thể trong quần thể là 37,60 ($p < 0,001$). Kết quả cho thấy sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các đảo và giữa các mẫu trong đảo. Ở nghiên cứu của Palanikumar và đồng tác giả (2019) cũng sử dụng chỉ thị ISSR để phân biệt 30 thể hệ *Calophyllum inophyllum* L. được thu thập. Kết quả thu được có 2/10 chỉ thị sử dụng phát hiện là đa hình và số lượng locus dao động từ 8 - 11, với giá trị thông tin đa hình (PIC) trung bình là 0,45 và cao nhất là 0,58.

Kết quả đánh giá khoảng cách di truyền và mức độ tương đồng giữa 5 quần thể Mù u được nghiên cứu được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Khoảng cách di truyền (dưới vạch) và mức độ tương đồng (trên vạch) của 5 quần thể Mù u được nghiên cứu

Bến Tre	Sóc Trăng	Trà Vinh	Cà Mau	Bạc Liêu	
-	0,934	0,910	0,874	0,827	Bến Tre
0,069	-	0,906	0,885	0,830	Sóc Trăng
0,094	0,098	-	0,929	0,866	Trà Vinh
0,135	0,122	0,074	-	0,899	Cà Mau
0,190	0,186	0,144	0,106	-	Bạc Liêu

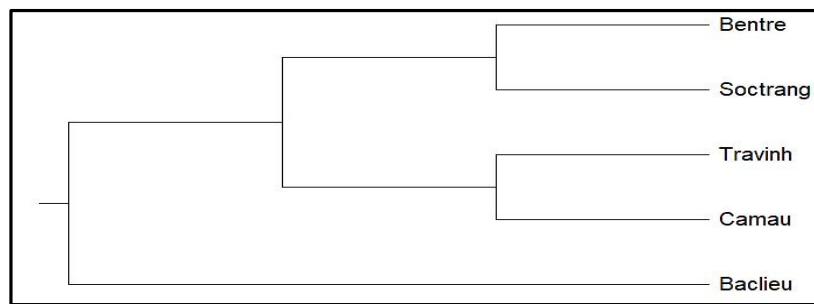
Kết quả phân tích khoảng cách di truyền giữa 5 quần thể Mù u được nghiên cứu, nhận thấy khoảng cách di truyền nằm trong khoảng từ 0,069 đến 0,190 là tương đối lớn. Trong đó, quần thể Bạc Liêu có khoảng cách di truyền xa hơn với quần thể Bến Tre (0,190), Sóc Trăng (0,186) và Trà Vinh (0,144) là tương đối lớn. Quần thể Sóc Trăng có khoảng cách di truyền gần với quần thể Bến Tre (0,069) và Trà Vinh (0,098); quần thể Trà Vinh có khoảng cách di truyền gần với quần thể Cà Mau (0,074) và quần thể Bến Tre (0,094). Như vậy, qua việc phân tích khoảng cách di truyền giữa các quần thể nhận thấy có sự tương quan với chỉ số sai khác di truyền giữa các quần thể. Khi chỉ số sai khác di truyền

giữa các quần thể lớn ($G_{ST} = 0,2490$ tương ứng 24,90%) thì khoảng cách di truyền giữa các quần thể Mù u là tương đối lớn.

Đối với mức độ tương đồng của 5 quần thể Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ dao động trong khoảng từ 0,827 (82,70%) đến 0,934 (93,40%). Trong đó, quần thể Bến Tre có mức độ tương đồng cao với quần thể Sóc Trăng (93,40%) và Trà Vinh (91,00%); quần thể Trà Vinh có mức độ tương đồng cao với quần thể Cà Mau (92,90%) và Sóc Trăng (90,60%). Ngược lại,

tại quần thể Bạc Liêu có mức độ tương đồng thấp với quần thể Bến Tre (82,70%), Sóc Trăng (83,00%) và Trà Vinh (86,60%). Có thể thấy mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền của 5 quần thể Mù u được nghiên cứu (Bảng 7) có mối liên hệ với nhau rất chặt chẽ.

Tiến hành xây dựng cây quan hệ di truyền giữa 5 quần thể Mù u được nghiên cứu dựa trên mức độ tương đồng di truyền theo phương pháp NJ (Neighbor Joining) với hệ số bootstrap 1.000 bằng phần mềm MEGA X (Hình 5).

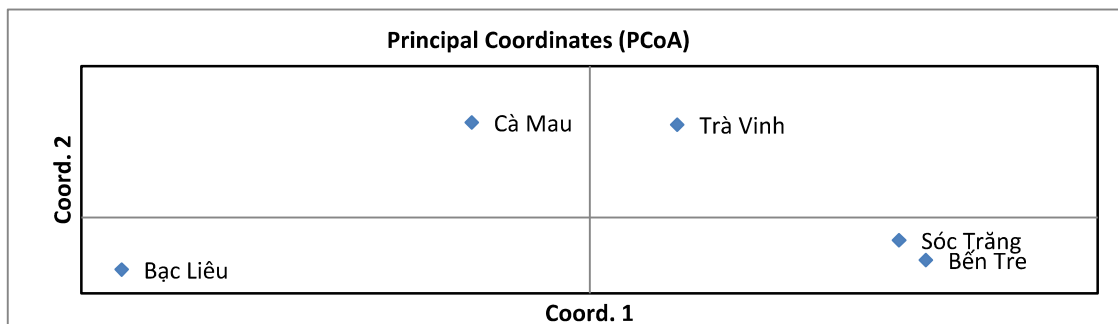


Hình 5. Cây quan hệ di truyền 5 quần thể Mù u tại vùng Nam Bộ

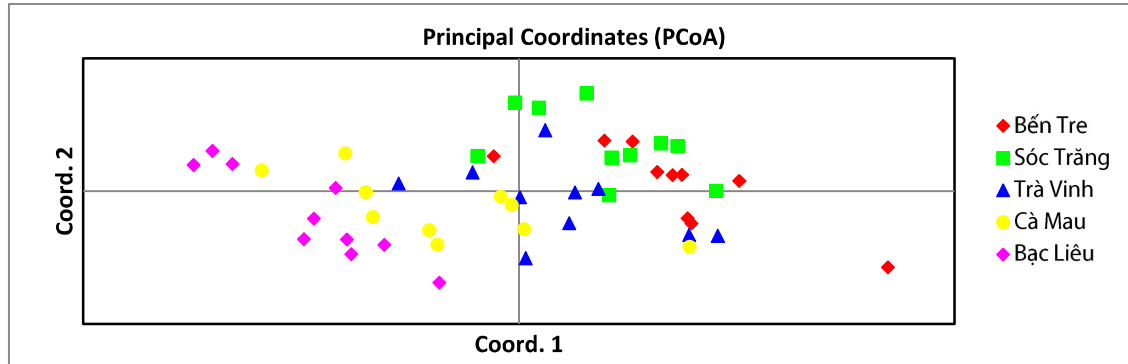
Dựa vào kết quả hình 5, nhận thấy 5 quần thể Mù u nghiên cứu được chia thành 2 nhánh lớn và có sự phân chia rõ ràng. Ở nhánh lớn thứ nhất có duy nhất quần thể Bạc Liêu và nhánh lớn thứ hai gồm 4 quần thể còn lại. Đối với nhánh lớn thứ 2 được chia làm 2 nhánh nhỏ hơn, trong đó nhánh nhỏ thứ nhất gồm quần thể Trà Vinh và Cà Mau; nhánh nhỏ thứ hai gồm quần thể Bến Tre và Sóc Trăng.

Như vậy, qua việc phân tích mối quan hệ di truyền 5 quần thể Mù u tại vùng Nam Bộ nhận thấy kết quả thu được có sự tương đồng với kết quả tại bảng 7 và có sự đồng nhất với nhau về mặt khoa học.

Kết quả phân tích PCoA cho 5 quần thể Mù u vùng Nam Bộ (Hình 6) và 80 mẫu Mù u (Hình 7) cho kết quả phân bố rõ ràng và đồng nhất với kết quả phân tích cây quan hệ di truyền ở hình 5 và phân tích khoảng cách di truyền ở bảng 7.



Hình 6. Kết quả phân tích PCoA của 5 quần thể Mù u được nghiên cứu



Hình 7. Kết quả phân tích PCoA của các mẫu Mù u nghiên cứu

IV. KẾT LUẬN

Phân tích đa dạng di truyền của 80 mẫu Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ bằng 5 chỉ thị ISSR, kết quả thu được gồm:

- Với 5 chỉ thị ISSR cho 43 phân đoạn DNA, trong đó có 27 phân đoạn đa hình chiếm trung bình 63,72%.
- Các chỉ số đa dạng di truyền trung bình của 80 mẫu Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam bộ được nghiên cứu lần lượt là $h = 0,2167$, $I = 0,329$ và $PPB = 63,72\%$. Trong đó, quần thể Mù u tại tỉnh Bến Tre và Trà Vinh có giá trị cao hơn so với các quần thể được nghiên cứu.
- Kết quả phân tích AMOVA tại 5 quần thể Mù u vùng Nam Bộ cho thấy sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các quần thể với tổng mức độ thay đổi phân tử tương đối cao giữa các

quần thể là 21% và giữa các mẫu trong cùng quần thể là 79% ($p < 0,001$).

- Có sự sai khác về di truyền giữa các quần thể Mù u tại 5 tỉnh vùng Nam Bộ với $G_{ST} = 0,2490$ (24,90%) và giá trị $Nm = 1,5083$. Chứng tỏ, giữa 5 quần thể nghiên cứu có sự sai khác về di truyền nhưng tần số trao đổi gen qua lại giữa 5 quần thể là không lớn.

- Khoảng cách di truyền giữa 5 quần thể Mù u được nghiên cứu nằm trong khoảng từ 0,069 đến 0,190 và mức độ tương đồng dao động trong khoảng từ 0,827 (82,70%) đến 0,934 (93,40%).

Từ kết quả thu được cho thấy, các quần thể Mù u tại tỉnh Bến Tre, Trà Vinh và Sóc Trăng có tính đa dạng di truyền cao hơn các quần thể Mù u ở điểm khác, do đó cần tập trung nghiên cứu và phát triển nguồn gen của các quần thể Mù u này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chopra R.N., Nayar S.L., Chopra I.C., 1956. Glossary of Indian Medicinal Plants, CSIR, New Delhi, pp.46.
2. Deng, S., Fu, C., Chang, K., Yang, C., & Huang, C., 2017. Population genetic variations of *Calophyllum inophyllum* in Taiwan and on nearby islands. Taiwan Journal of Forest Science, 32(2), 145 - 157.
3. Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19 (1), p. 11 - 15.
4. Isshiki S., Iwata N., Khan M.M.R., 2008. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related Solanum species. Scientia Horticulture 117: 186 - 190.
5. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. Jun 1; 35(6):1547 - 1549.

6. Palanikumar, B., Parthiban, K. T., Renganayaki, P. R., & Fernandez, C. C., 2019. Genetic Diversity Studies on *Calophyllum inophyllum* (Undi) Progenies Through Inter Simple Sequence Repeat Markers. *Agroforestry for Climate Resilience and Rural Livelihood*, 399.
7. Peakall, R. DNA P.E. Smouse, 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching DNA research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): p. 288 - 295.
8. Prabakaran K. and John Britto S., 2012. Biology, agroforestry and medicinal value of *Calophyllum inophyllum* L. (Clusiaceae): a review. *International Journal of Natural Products Research*. 1 (2). P. 24 - 33.
9. Rajesh Gunaga, Vasudeva R., 2011. Enhancement of seed germination through proper pre-sowing treatment in *Calophyllum inophyllum*, an important forest resource of the western ghats. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 24(3), p.413 - 414.
10. Sanjaykumar Dalvi, Swati Sonawane, and Raghunath Pokharkar, 2012. Preparation of Biodiesel of Undi seed with In-situ Transesterification. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, Issue 20, January-June 2012, p.175 - 182.
11. Shinde PP, Rane AD, Bhave SG, Gunaga RP and Narkhede SS, 2012. Variability and Genotype Selection in *Calophyllum inophyllum* for Quantity Fruit Yield in the Central West Coast of India. *Journal of Tree Science*, Volume 31, No.1&2, p:8 - 14.
12. Spino C, Dodier M, Sotheeswaran S., 1998. Anti-HIV coumarins from *Calophyllum seed oil*. *Bio-org. Med. Chem. Lett.*, 8, p.3475 - 3478.
13. Yeh FC, Yang RC, Boyle T., 1999. POPGENE Vers. 1.31: Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick user's guide. City Canada; Univ. of Alberta.

Email tác giả liên hệ: lesong@vafs.gov.vn

Ngày nhận bài: 11/05/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 09/06/2023

Ngày duyệt đăng: 12/06/2023