

# ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VƯỜN GIỐNG BẠCH ĐÀN PELLITA (*Eucalyptus pellita* F. Muell) TẠI VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ VI VỆ TINH

Lê Sơn<sup>1</sup>, Trần Hồ Quang<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Kiên<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*

<sup>2</sup>*Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

## TÓM TẮT

Bạch đàn pellita là một trong những loài cây trồng rừng chủ lực ở khu vực Đông Nam Á do có sinh trưởng nhanh và đặc biệt là tính chống chịu cao với bệnh chết héo do nấm *Ceratocystis* gây ra. Ngoài việc được sử dụng trong trồng rừng thuần loài thì nó còn được sử dụng là các cây bố mẹ trong nghiên cứu chọn giống. Tuy nhiên, mức độ đa dạng di truyền của các vườn giống này lại chưa được đánh giá. Nghiên cứu này sử dụng 8 chỉ thị vi vệ tinh để phân tích 12 lô hạt, thuộc 7 xuất xứ thu từ vườn giống Bàu Bàng nhằm xác định mức độ đa dạng di truyền của quần thể chọn giống cho loài cây này. Kết quả phân tích cho thấy, các chỉ số về đa dạng di truyền của vườn giống ở mức độ trung bình với tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (*He*) đạt 0,54 và tỷ lệ dị hợp tử quan sát (*Ho*) đạt 0,63. Giá trị hệ số giao phối cận huyết đạt giá trị âm ở tất cả các lô hạt nghiên cứu (*F* trung bình đạt -0,18) và hệ số trao đổi gen cao (*Nm* = 6,14) chứng tỏ vườn giống có mức độ thụ phấn chéo cao. Mặc dù đã qua tía thưa di truyền và kiểu hình nhưng vườn giống vẫn đảm bảo mức độ đa dạng di truyền cần thiết để cung cấp nguồn vật liệu cho nghiên cứu chọn tạo và phát triển loài cây này trong thời gian tới.

**Từ khóa:** Bạch đàn pellita, chỉ thị vi vệ tinh, đa dạng di truyền, vườn giống

## EVALUATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF *Eucalyptus pellita* F. Muell SEEDLING SEED ORCHARD IN VIETNAM BY MICROSATELLITE MARKERS

Le Son<sup>1</sup>, Tran Ho Quang<sup>2</sup>, Nguyen Duc Kien<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology*

<sup>2</sup>*Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology*

## SUMMARY

*Eucalyptus pellita*, known for its rapid growth and resistance to *Ceratocystis* wilt disease, is a dominant species in Southeast Asian plantations. It also serves as a parental tree in breeding programs. In Vietnam, two second-generation *E. pellita* seed orchards were planted in Bau Bang and Pleiku in the past decades. To assess the genetic diversity of these orchards, 12 seedlots from 7 origins in SSO Bau Bang were analysed using 8 microsatellite markers. Results indicated a moderate level of genetic diversity, with expected heterozygosity (*He*) of 0.54 and observed heterozygosity (*Ho*) of 0.63. Negative inbreeding coefficients (average *F* = -0.18) and a high value of the gen flow index (*Nm* = 6.14) suggested high levels of outcrossing. Despite genetic and phenotypic thinning, the orchards maintained sufficient genetic diversity for future breeding and development programs for this species.

**Keywords:** *Eucalyptus pellita* F. Muell, genetic diversity, microsatellite, SSO

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn pellita (*Eucalyptus pellita* F. Muell) có nguyên sản ở vùng Queensland, Australia. Bạch đàn pellita có phân bố tự nhiên ở vĩ độ 7 - 19° Nam, tập trung chủ yếu ở 14 -15° vĩ độ Nam (Harwood, 1998). Đây là loài cây có sinh trưởng tốt trên các lập địa đất tốt, tầng đất sâu, có khả năng chịu hạn và chống chịu sâu bệnh tốt, đặc biệt thích nghi với các lập địa có độ cao dưới 800 m so với mực nước biển ở khu vực Duyên hải miền Trung và Đông Nam Bộ. Bạch đàn pellita là loài cây có tỷ trọng gỗ cao, màu sắc gỗ đẹp, có nhiều tiềm năng cho trồng rừng cung cấp gỗ đồ mộc và mỹ nghệ. Ngoài ra, Bạch đàn pellita được ghi nhận là có tính chống chịu cao với một số loại nấm bệnh phổ biến trên một số loại bạch đàn được trồng phổ biến khác, do đó nó được chọn để trồng thay thế cho các rừng trồng keo bị nhiễm bệnh chết héo do nấm *Ceratocystis* gây ra tại Indonesia (Tarigan *et al.*, 2011). Các xuất xứ có triển vọng của loài này cho trồng rừng ở nước ta là Kuranda, Helenvale, Bloomfield và Kiriwo cho vùng Nam Bộ và Duyên hải miền Trung (Lê Đình Khả, 2003). Khảo nghiệm loài/xuất xứ các giai đoạn trước tại Đông Hà (Quảng Trị) cũng như trồng thử tại Bàu Bàng (Bình Dương) đã cho thấy Bạch đàn pellita là một trong những loài có sinh trưởng nhanh nhất tại các tỉnh miền Trung và miền Nam nước ta (Lê Đình Khả *et al.*, 2001). Vì thế trong giai đoạn 2000 - 2005, hai khảo nghiệm hậu thế đã được xây dựng cho loài này tại Bàu Bàng (Bình Dương) và Pleiku (Gia Lai) vào năm 2002 với nguồn vật liệu di truyền tương đối giống nhau, các khảo nghiệm hậu thế này sau đó được chuyển hóa thành vườn giống hữu tính để cung cấp nguồn nguyên liệu cho chọn giống và trồng rừng. Vườn giống trồng từ cây hạt thụ phấn tự do thuộc 9 - 10 xuất xứ Bạch đàn pellita được lấy từ các xuất xứ có triển vọng ở Australia và Indonesia và cây trội được chọn lọc tại khảo nghiệm xuất xứ tại Bàu Bàng (Bình Dương). Mặc dù các cây mẹ được ghi nhận có nguồn gốc xuất xứ khác nhau nhưng mối quan

hệ di truyền giữa các cây mẹ cũng như mức độ đa dạng di truyền của vườn giống vẫn chưa được xác định. Trong khi, đa dạng di truyền quần thể chọn giống lại là một chỉ tiêu quan trọng cần được đánh giá trong chương trình cải thiện giống, đề trên cơ sở đó, xây dựng các chiến lược chọn giống phù hợp. Mục tiêu chọn giống dài hạn là duy trì sự cân bằng giữa tăng thu di truyền và duy trì mức độ biến dị di truyền tương ứng. Vườn giống có mục đích cung cấp hạt giống có chất lượng di truyền được cải thiện cho trồng rừng kinh tế. Thông thường, vườn giống được xây dựng với các nguồn hạt giống từ nhiều xuất xứ khác nhau, do vậy việc đánh giá biến dị di truyền trong và giữa các xuất xứ là việc làm có ý nghĩa.

Chỉ thị vi vệ tinh (Microsatellite hay còn gọi là SSR) là chỉ thị được phát triển dựa vào sai khác của những đoạn DNA lặp lại một cách có trật tự, gồm những đơn vị lặp lại từ 1 - 6 nucleotid theo kiểu lặp lại ngắn và vài chục lần đã được giới thiệu bởi Weber và May (1989), sau đó được tìm thấy nhiều trên các đối tượng thực vật (Butcher *et al.*, 1999; Morgante và Salamini, 2003). Từ khi chỉ thị vi vệ tinh được Morgante và Olivieri tìm thấy nhiều trong thực vật năm 1993, nó đã được phát triển cho các loài cây rừng. Năm 1994, Smith và Devey lần đầu phát triển microsatellite cho *Pinus radiata*, nó thể hiện đa hình cao với 6 alen được phát hiện và dị hợp tử quan sát được là 0,6 - 0,65. Sau đó, các nhà khoa học đã phát triển chúng cho nhiều cây lâm nghiệp bao gồm cả cây lá kim và cây lá rộng như: các loài thông (Echt và Marquardt, 1997; Echt *et al.*, 1996; Karhu *et al.*, 2000), các loài sồi (Dow *et al.*, 1995), các loài bạch đàn (Byrne *et al.*, 1996; Steane *et al.*, 2001), Keo tai tượng (Butcher and Moran, 2000) và một số loài cây rừng nhiệt đới khác (Chase *et al.*, 1996; Ujino *et al.*, 1998).

Tại Việt Nam, ngoài việc sử dụng để trồng rừng thì Bạch đàn pellita còn được sử dụng làm cây lai bố/mẹ trong các phép lai khác loài

với bạch đàn uro (*E. urophylla*), một số dòng bạch đàn lai UP đã được chọn lọc và được công nhận là giống quốc gia, giống tiến bộ kỹ thuật và giống cây trồng lâm nghiệp mới do có khả năng sinh trưởng nhanh và thích nghi với nhiều dạng lập địa (Hà Huy Thịnh *et al.*, 2015). Do đó, việc đánh giá đa dạng di truyền ở mức độ quần thể và mối quan hệ di truyền giữa các xuất xứ có ý nghĩa quan trọng trong chương trình cải thiện giống cho các loài bạch đàn ở nước ta.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Mẫu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 12 lô hạt thu từ 12 cây mẹ đại diện cho 7 xuất xứ có trong vườn giống Bạch đàn pellita thế hệ 2 (trồng năm 2002, đã được tía thừa 2 lần) tại Bàu Bàng, gieo ươm tại vườn ươm và thu mẫu lá ngẫu nhiên của 10 cây con/lô hạt (bảng 1) để phân tích mức độ đa dạng di truyền của vườn giống.

**Bảng 1.** Danh sách các cây mẹ và nguồn gốc xuất xứ Bạch đàn pellita nghiên cứu

TT	Lô hạt	Ký hiệu	Xuất xứ
1	Bupul muting IND 73 - 4	Bupul 73 - 4	Bupul - Indonesia
2	Cây mẹ chọn tại Bàu Bàng 1081 - 10	Bau Bang 1081 - 10	SSO Bàu Bàng - Việt Nam
3	Cây mẹ chọn tại Bàu Bàng 1094 - 1	Bau Bang 1094 - 1	
4	Kiriwo PNG 615 - 5	Kiriwo 615 - 5	Kiriwo - PNG
5	Kiriwo PNG 586 - 6	Kiriwo 586 - 6	
6	Serisa PNG 185 - 9	Serisa 185 - 9	Serisa - PNG
7	Serisa PNG 503 - 7	Serisa 503 - 7	
8	Atherton QLD	Artheron 7210 - 2	SSO Artheron - Australia
9	Cardwell QLD 796 - 3	Cardwell 796 - 3	SSO Cardwell - Australia
10	Cardwell QLD 881 - 1	Cardwell 881 - 1	
11	Melville PNGIND NT 938 - 6	Melville 938 - 6	SSO Melville - Australia
12	Melville PNGIND NT 1002 - 8	Melville 1002 - 8	

Ghi chú: IND: Indonesia, PNG: Papua New Guinea; QLD: Queensland - Australia, NT: Northern Territory - Australia.

#### 2.1.2. Chỉ thị Microsatellite

Tám chỉ thị Microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu này, đây là các môi đa hình đã được sử dụng cho các nghiên cứu trước đây trên một

số loài bạch đàn (Nevill *et al.*, 2008, Sơn *et al.*, 2010, Quang *et al.*, 2013). Các môi SSR này được gắn huỳnh quang với các màu xanh da trời (FAM) và xanh lá cây (HEX) (bảng 2).

**Bảng 2.** Trình tự và đặc điểm 8 môi cặp SSR được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên môi	Trình tự	Nhiệt độ gắn môi/Màu của môi
1	EMBRA12	F-AGGATTTGTGGGGCAAGT R- GTTCCCCATTTTCATGTCC	56/FAM
2	EMBRA28	F-CAAGACATGCATTTTCGTAGT R-ACTCTTGATGTGACGAGACA	56/FAM
3	EMBRA 29	F-CTTCGCTCACATCAGTCTC R-CAATCGAGTCAATAACATTCA	56/FAM
4	EMBRA38	F-GGTTCTCTAGTGAAAATGTGCG R- ATACATCCATCAAAGCACAA	56/FAM
5	EMBRA 40	F-AAAGTATCTCCACGCTTCAT R-TCCCAATCATGATCTTCAG	56/HEX
6	EMBRA41	F-ATGATTTTGTGCGTGGAC R- TCAGGTGAAAGGATGGAG	56/HEX
7	EMBRA42	F-GAGTAAAAATTGGTTTTGAGTG R- CCCTCTTTTCATTTTGTCTT	56/HEX
8	EMBRA56	F-TCATTGACATGCTGACTGT R- ACTAACAGTTGAAAAGGTAAAGC	56/HEX

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thu và bảo quản mẫu lá

Lá cây Bạch đàn *pellita* bánh tẻ sạch bệnh được thu tại vườn ươm, được bảo quản lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm sinh học phân tử của Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp. Mẫu lá được bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}$  cho tới khi sử dụng để tách chiết DNA.

### 2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA tổng số cho mẫu lá được theo phương pháp CTAB (Gawel và Jarret, 1991) có cải tiến bổ sung một số hoá chất để làm giảm lượng polysaccharise và tanin trong lá.

### 2.2.3. Phương pháp xác định hàm lượng và độ sạch của DNA

Hàm lượng và độ tinh sạch của DNA tách chiết được xác định bằng máy đo quang phổ NanoDrop và điện di trên gel agarose 0,8%.

### 2.2.4. Phản ứng PCR

Kỹ thuật PCR với các chỉ thị Microsatellite được tiến hành với tổng thể tích là 20  $\mu$ l/phản ứng gồm những thành phần được miêu tả tại bảng 3 sau đây.

**Bảng 3.** Thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích sử dụng ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	10,9
10X PCR bufer	2,0
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,8
dNTP 5 mM	0,8
Primer 10 mM	1,0
Taq Polymerase 1 U/ $\mu$ l	1,5
DNA 30 ng/ $\mu$ l	2,0
Tổng thể tích phản ứng	20,0

Chu trình phản ứng PCR gồm: biến tính DNA ở  $94^{\circ}$ C trong 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ (biến tính ở  $92^{\circ}$ C trong 1 phút, gắn mồi ở  $56^{\circ}$ C trong 1 phút, kéo dài chuỗi phản ứng ở  $72^{\circ}$ C trong 1 phút) và cuối cùng là  $72^{\circ}$ C trong 10 phút, kết

thúc chu trình phản ứng bằng bước duy trì sản phẩm PCR ở  $12^{\circ}$ C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel điện di agarose 1,5% và sau đó được phân tích trình tự đoạn (fragment analysis) trên máy điện di mao quản ABI 3030 bằng phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977).

## 2.3. Thu thập và phân tích số liệu

Các số liệu thô sau khi thu thập được hiệu chỉnh, ghép nhóm và được phân tích bằng chương trình GenAlex (Peakall *et al.*, 2006). Các thông số đa dạng di truyền phân tích gồm: Mức độ đa hình ( $P\%$ ), số lượng các alen khác biệt ( $N_a$ ), số lượng các alen hữu hiệu ( $N_e$ ), tần số dị hợp tử quan sát ( $H_o$ ), tần số dị hợp tử mong đợi ( $H_e$ ), hệ số giao phối cận huyết ( $F$ ).

Các chỉ số và thông số đa dạng di truyền được tính toán theo các công thức sau đây:

- Số alen có hiệu lực:  $N_e = 1/(p^2 + q^2)$

- Hệ số dị hợp tử mong đợi:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p^2$$

Trong đó: p là số alen đa hình

q là số alen đơn hình

- Chỉ số sai khác di truyền giữa các quần thể:

$$F_{ST} = 1 - (HS/HT)$$

Trong đó: HS là chỉ số đa dạng gen trung bình trong từng quần thể

HT là chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các xuất xứ

- Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể:

$$Nm = 0,5(1 - GST)/GST$$

Hệ số giao phối cận huyết ( $F$ ) được tính theo công thức:  $F = 1 - (H_o/H_e)$ . Theo đó, khi  $F$  có giá trị dương sẽ thể hiện sự thiếu hụt về tỷ lệ dị hợp tử quan sát ( $H_o$ ) so với tỷ lệ dị hợp tử mong đợi của quần thể/xuất xứ tức là có hiện tượng tự thụ phấn trong quần thể nghiên cứu, khi  $F$  mang giá trị âm thì ngược lại.

Cấu trúc quần thể được phân tích bằng phương pháp AMOVA (phân tích biến dị mức độ phân tử) bằng phần mềm GelAlex (Peakall *et al.*, 2006). Cây quan hệ di truyền được xây dựng bằng phần mềm MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) theo phương pháp nhóm cặp không trọng số (UPGMA) theo phương pháp NJ (Neighbor Joining) với hệ số bootstrap 1000.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đa dạng di truyền ở mức độ vườn giống và quần thể

Số lượng alen trung bình của vườn giống đạt 5,23 alen, với giao động từ 4,75 alen (Bầu Bàng) đến 6,00 alen (lô hạt Cardwell 881 - 1). Kết quả phân tích cũng cho thấy, số lượng alen hữu hiệu ( $N_e$ ) của các lô hạt trong vườn giống dao động trong khoảng 3 alen, trong đó lô hạt Kiriwo PNG 615 - 5 có số lượng alen hữu hiệu cao nhất 4,08 alen, còn lô hạt Bầu Bàng 1081 - 10 có số lượng alen hữu hiệu thấp nhất 3,04 alen. Số lượng alen hữu hiệu trong vườn giống phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Sơn và đồng tác giả (2010) cho đại diện trung bình của Bạch đàn pellita là 3,86 alen. Theo White và đồng tác giả (2007), đối với cây rừng nói chung, một quần thể được coi là có tính đa dạng di truyền nếu số lượng alen trung bình đạt từ 1,75 trở lên. Do đó, vườn giống Bạch đàn pellita đảm bảo được mức độ đa dạng di truyền cần thiết về chỉ tiêu này.

Vườn giống Bạch đàn pellita có giá trị đa dạng di truyền hay tỷ lệ dị hợp tử mong đợi

( $H_e$ ) đạt trung bình là 0,54 và biến động từ 0,43 (các lô hạt Bầu Bàng 1081 - 10, Kiriwo 586 - 6 và Artheton 7210 - 2) đến 0,66 (Kiriwo 615 - 5) (bảng 4). Tỷ lệ dị hợp tử quan sát ( $H_o$ ) của các lô hạt nghiên cứu giao động từ 0,56 (lô hạt Bầu Bàng 1081 - 10) đến 0,72 (các lô hạt Kiriwo 615 - 5 và Cardwell 881 - 4) với giá trị trung bình đạt 0,63. Các giá trị về đa dạng di truyền của vườn giống bao gồm tỷ lệ dị hợp tử mong đợi và tỷ lệ dị hợp tử quan sát đều lớn hơn 0,5 nên phản ánh tính đa dạng di truyền tương đối cao của vườn giống do được sử dụng nguồn giống từ 7 xuất xứ khác nhau. Mức độ dao động thấp giữa các lô hạt về các chỉ tiêu tỷ lệ dị hợp tử thể hiện sự phân bố về đa dạng di truyền đều giữa các lô hạt và không tập trung phần lớn vào một lô hạt cụ thể nhất định nào.

Tỷ lệ dị hợp tử quan sát được tại các locus nghiên cứu cao hơn tỷ lệ dị hợp tử mong đợi tuân theo định luật Hardy-Weinberg, thể hiện ở giá trị  $F$  với dao động từ -0,42 đến -0,05 với giá trị trung bình là -0,18 (bảng 4) cho cả 12 lô hạt nghiên cứu. Theo Alendorf và Luikart (2007), khi giá trị  $F$  tính được của một quần thể có giá trị âm thì có thể nhận định khả năng hiện tượng giao phối cận huyết trong quần thể này là rất thấp. Do đó, có thể cho rằng tỷ lệ thụ phấn chéo của vườn giống là tương đối cao, vì mức độ đa dạng di truyền (thể hiện ở chỉ tiêu tỷ lệ dị hợp tử) được đảm bảo.

**Bảng 4.** Mức độ đa hình của các lô hạt Bạch đàn pellita

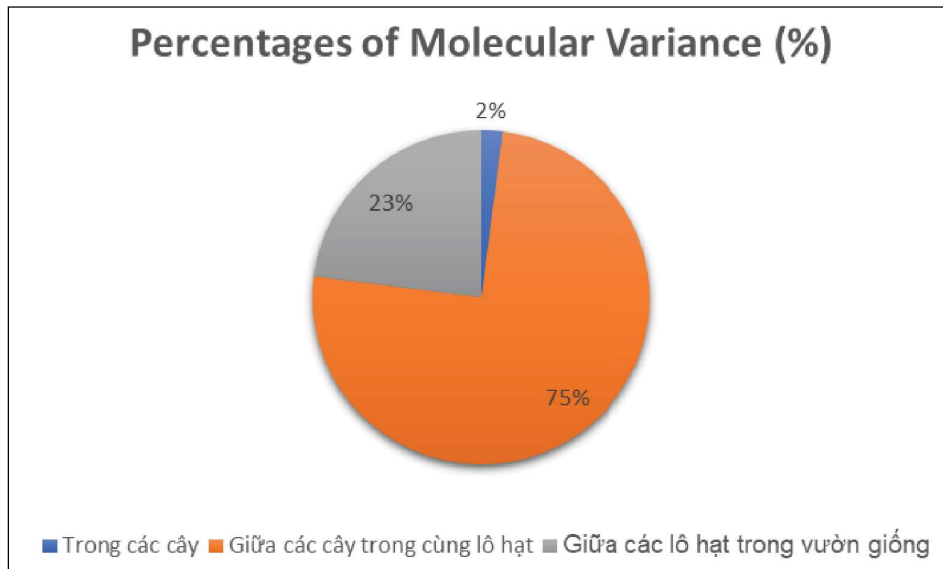
Lô hạt	$P$ (%)	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$F$
Bupul 73 - 4	100,00	4,75 ± 0,41	3,10 ± 0,20	0,58 ± 0,12	0,48 ± 0,11	-0,42
Bầu Bàng 1081 - 10	87,50	4,00 ± 0,54	3,04 ± 0,29	0,56 ± 0,16	0,43 ± 0,12	-0,09
Bầu Bàng 1094 - 1	100,00	5,00 ± 0,50	3,59 ± 0,43	0,69 ± 0,17	0,60 ± 0,19	-0,15
Kiriwo 615 - 5	100,00	5,13 ± 0,58	4,08 ± 0,33	0,72 ± 0,13	0,66 ± 0,10	-0,15
Kiriwo 586 - 6	87,50	5,00 ± 0,66	3,28 ± 0,35	0,59 ± 0,19	0,43 ± 0,11	-0,42
Serisa 185 - 9	100,00	5,13 ± 0,30	3,19 ± 0,22	0,59 ± 0,10	0,53 ± 0,09	-0,11
Serisa 503 - 7	100,00	5,13 ± 0,64	4,00 ± 0,44	0,62 ± 0,18	0,56 ± 0,11	-0,11

Lô hạt	P (%)	Na	Ne	Ho	He	F
Artheton 7210 - 2	100,00	5,13 ± 0,64	3,29 ± 0,37	0,59 ± 0,19	0,43 ± 0,11	-0,19
Cardwell 796 - 3	100,00	4,75 ± 0,50	3,23 ± 0,34	0,69 ± 0,15	0,56 ± 0,12	-0,05
Cardwell 881 - 1	100,00	6,00 ± 0,71	3,74 ± 0,55	0,72 ± 0,18	0,64 ± 0,09	-0,17
Melville 938 - 6	100,00	5,75 ± 0,75	3,79 ± 0,57	0,64 ± 0,17	0,54 ± 0,08	-0,17
Melville 1002 - 8	10,000	5,75 ± 0,56	3,54 ± 0,46	0,62 ± 0,17	0,59 ± 0,10	-0,08
<b>Trung bình</b>	<b>97,92</b>	<b>5,23 ± 0,17</b>	<b>3,49 ± 0,11</b>	<b>0,63 ± 0,05</b>	<b>0,54 ± 0,03</b>	<b>-0,18</b>

Ghi chú: P: tỷ lệ đa hình; Na: trung bình alen/quần thể; Ne: số alen hữu hiệu; He: Tỷ lệ dị hợp tử mong đợi hay mức độ đa dạng gen; Ho: Tỷ lệ dị hợp tử quan sát; F: hệ số giao phối cận huyết (inbreeding coefficient).

Kết quả phân tích AMOVA cho thấy mức độ biến dị phân tử giữa các cây cá thể trong lô hạt chiếm 75% trong tổng số mức độ biến dị (hình 1) và cho thấy các cây có nguồn gen khá phong phú, với mức độ alen khác nhau. Trong khi đó, mức độ biến dị phân tử giữa các lô hạt là

23%, cho thấy các cây trong cùng một lô hạt chia sẻ cùng một số lượng alen chung. Việc các cây mẹ được trồng cùng nhau trong vườn giống sẽ tạo điều kiện cho sự chia sẻ các alen chung thông qua quá trình giao phấn chéo là nguyên nhân giải thích cho hiện tượng này.



**Hình 1.** Kết quả phân tích AMOVA (mức độ biến dị phân tử) giữa các lô hạt trong vườn giống

Xét ở cấp độ quần thể, mức độ biến dị phân tử giữa các xuất xứ đạt 22,3% và giữa các cây trong cùng một xuất xứ đạt 77,7% (bảng 5). Theo Rao và Hodgkin (2002), khi giá trị tỷ lệ sai khác giữa các cá thể trong cùng 1 quần thể cao hơn so với tỷ lệ sai khác giữa các quần thể thì loài hoặc quần thể hoặc loài đó chủ yếu dựa trên giao phối chéo. Kết quả này lần nữa khẳng định mức độ thụ phấn chéo cao của vườn giống

Bạch đàn pellita nghiên cứu. Nghiên cứu của Harwood và đồng tác giả (2004) cho thấy, với các lô hạt Keo tai tượng có tỷ lệ thụ phấn chéo cao thì sinh trưởng nhanh hơn so với các lô hạt có tỷ lệ tự thụ phấn cao trên cùng 1 điều kiện lập địa, vì vậy, với việc có tỷ lệ thụ phấn chéo là cao các lô hạt thu từ vườn giống sẽ đảm bảo được chất lượng di truyền cần thiết để phục vụ cho các chương trình trồng rừng.

**Bảng 5.** Kết quả phân tích AMOVA giữa các xuất xứ có trong vườn giống

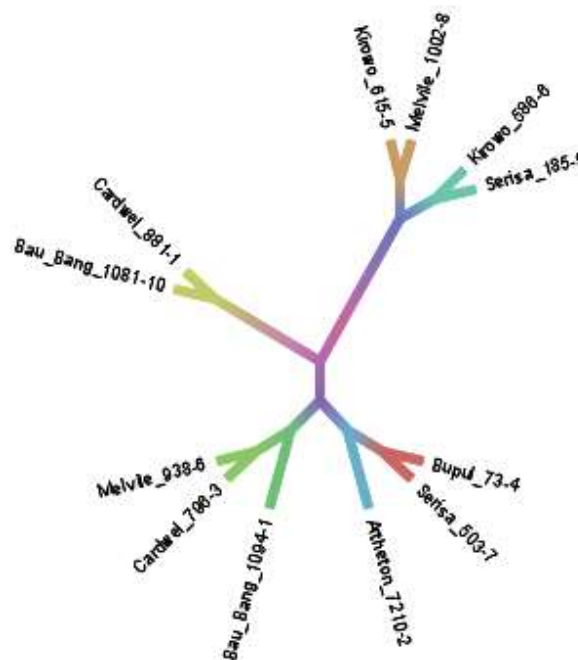
Mức độ biến dị về phân tử	Tỷ lệ sai khác (%)	Fst	Mức độ trao đổi gen (Nm)
Giữa các cá thể trong xuất xứ	77,2	0,134	6,14
Giữa các xuất xứ	22,3		
<b>Tổng cộng</b>	<b>100,0</b>		

Mức độ khác biệt di truyền trong 7 xuất xứ của vườn giống ( $F_{st} = 0,134$ ) (bảng 5) cao hơn hẳn nghiên cứu gần đây của Payn và đồng tác giả (2008) ( $F_{st} = 0,031$ ) cho Bạch đàn uro tại vườn ươm, và tương đương các loài bạch đàn khác (*E. morrisbyi*,  $F_{st} = 0,19$  (Jones *et al.* 2005); *E. benthamii*,  $F_{st} = 0,105$  (Butcher *et al.*, 2005)) cho thấy mức độ đa dạng di truyền của vườn giống Bạch đàn pellita cao. Mặc dù vậy, hệ số trao đổi gen (Nm) giữa các lô hạt là tương đối cao (Nm = 6,14) thể hiện sự trao đổi hạt phần cao giữa các xuất xứ có trong vườn giống.

**3.2. Mối quan hệ di truyền giữa các lô hạt**

Mối quan hệ di truyền giữa 12 lô hạt từ 7 xuất xứ được tính toán bằng phương pháp của Nei (1978) (hình 2). Kết quả phân tích cho thấy, các lô hạt đại diện cho vườn giống Bạch đàn pellita được chia thành 3 nhóm nhỏ với khoảng cách di truyền dao động từ 0,01 đến 0,065 nằm ở mức độ khác biệt từ thấp đến dưới trung bình (Young *et al.*, 2000). Trong đó nhóm 1 gồm 4 lô hạt: Kiriwo 615 - 5, Melville 1002 - 8, Kiriwo 586 - 6 và Serisa 185 - 9; nhóm thứ 2 bao gồm 6 lô hạt: Melville 938 - 6, Cardwell 796 - 3, Bàu Bàng 1094 - 1, Antherton 7210 - 2, Serisa 503 - 7 và Bupul 73 - 4, nhóm còn lại gồm 2 lô hạt Bàu Bàng 1081 - 10 và Cardwell 891 - 1. Sơ đồ hình cây cũng cho thấy tuy về mặt địa lý, các xuất xứ có vị trí địa lý gần nhau, nhưng về mặt di truyền, một số xuất xứ nằm hẳn ở nhóm khác. Kết quả này có thể giải thích rằng các xuất xứ nằm riêng rẽ trong cây phân loại có một số alen khác và đặc trưng, hoặc có quan hệ di truyền gần gũi do có chung một nguồn gốc xuất xứ ban đầu do các xuất xứ

từ Australia (SSO Melville) và Việt Nam (SSO Bàu Bàng) được thu từ các vườn giống thế hệ 1 được xây dựng chủ yếu từ các xuất xứ tự nhiên thu từ PNG và Indonesia trong các giai đoạn trước. Nên chúng có thể có cùng 1 nguồn gốc xuất xứ. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của House và Bell (1994) cho Bạch đàn uro khi các tác giả xác định được một số nguồn giống có vị trí xa nhau lại có quan hệ di truyền gần gũi.



**Hình 2.** Mối quan hệ di truyền giữa các lô hạt Bạch đàn peiilta nghiên cứu

**IV. KẾT LUẬN**

Kết quả đánh giá mức độ đa dạng di truyền của vườn giống Bạch đàn pellitia qua việc phân tích 12 lô hạt từ 7 xuất xứ có trong vườn giống với 8 chỉ thị SSR cho thấy:

- Số lượng alen trung bình của vườn giống đạt 5,23; tỷ lệ dị hợp tử mong đợi hay mức độ đa dạng di truyền đạt trung bình 0,54.
- Mức độ biến dị phân tử giữa các cây trong vườn giống (75%), và giữa các cây trong cùng một xuất xứ tương đối cao (23%) thể hiện tính đa dạng nguồn gen hiện có trong vườn giống.
- Hệ số giao phối cận huyết của các xuất xứ trong vườn giống đạt giá trị âm (-0,18) chứng tỏ hiện tượng tự thụ phấn là ít gặp trong các lô hạt được thu từ vườn giống.

- Các lô hạt có trong vườn giống có thể ghép thành 3 nhóm chính với khoảng cách di truyền từ 0,01 đến 0,065 thể hiện sự khác biệt tương đối nhỏ giữa chúng.

Như vậy, vườn giống Bạch đàn pellita mặc dù đã được tía thưa 2 lần nhưng về cơ bản vẫn đảm bảo tính đa dạng di truyền cần thiết để cung cấp nguồn vật liệu cho trồng rừng cũng như nghiên cứu cải thiện giống cho loài cây này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Butcher, P. A., Glaubitz, J. C., Moran, G. F., 1999. Application for microsatellite markers in the domestication and conservation of forest trees. *Forest Genetic Resources* 27, 34 - 42.
2. Butcher, P. A., Moran, G. F., 2000. Genetic linkage mapping in *Acacia mangium* 2. Development of an integrated map from two outbred pedigrees using RFLP and microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 594-605.
3. Butcher, P. A., Skinner, A. K., Gardiner, C. A., 2005. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. *Conservation Genetics* 6, 213 - 226.
4. Byrne, M., Marquez-Garcia, M. I., Uren, T., Smith, D. S., Moran, G. F., 1996. Conservation of genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany* 44, 331 - 341.
5. Chase, M., Kesseli, R., Bawa, K., 1996. Microsatellite Markers for Population and Conservation Genetics of Tropical Trees. *American Journal of Botany* 83, 51 - 57.
6. Dow, B. D., Ashley, M. V., Howe, H. F., 1995. Characterization of highly variable (GA/CT)<sub>n</sub> microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 137 - 141.
7. Echt, C. S., Marquardt, P., 1997. Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome* 40, 9 - 17.
8. Echt, C. S., May-Marquardt, P., Hseih, M., Zahorchak, R., 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39, 1102 - 1108.
9. Gawel, N. J., Jarret, R. L., 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 262 - 266.
10. Harwood, C. 1998. *Eucalyptus pellita*: an Annotated Bibliography. CSIRO Forestry and Forest Products. Canberra, Australia.
11. Harwood, C., Thinh, H.H., Quang, T. H., Sardabi, H., Williams, E. 2004. The Effect of Inbreeding on Early Growth of *Acacia mangium* in Vietnam. *Silvae Genetica* 53, 65 - 69.
12. House, A. P. N., Bell, J. C., 1994. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* ST. Blake. *Silvae Genetica* 43, 167 - 179.
13. Karhu, A., Dieterich, J. H., Savolainen, O., 2000. Rapid Expansion of Microsatellite Sequences in Pine. *Molecular Biology and Evolution* 17, 259 - 265.
14. Morgante, M., Salamini, F., 2003. From plant genomics to breeding practice. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 214-219.
15. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583 - 590.



16. Nevill, P. G., Reed, A., Bossinger, G., Vaillancourt, R. E., Larcombe, M., Ades, P. K., 2008. Cross-species amplification of *Eucalyptus* microsatellite loci. *Molecular Ecology Resources* 8, 1277 - 1280.
17. Payn, K. G., Dvorak, W. S., Janse, B. J. H., Myburg, A. A., 2008. Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genetics & Genomes* 4, 519 - 530.
18. Rao, R.V., Hodgkin, T., 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:1 - 19 doi:10.1023/A:1013359015812.
19. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 74(12): 5463 - 7.
20. Son, L., Henson, M., Shepherd, M., 2010. Sự khác biệt về di truyền giữa 3 loài bạch đàn *Eucalyptus pellita*, *E. resinifera* và *E. scias*. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp.
21. Steane, D. A., Vaillancourt, R. E., Russell, J., Powell, W., Marshall, D., Potts, B. M., 2001. Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silvae Genetica* 50, 89 - 91.
22. Tarigan, M., Roux, J., Van Wyk, M., Tjahjono, B., Wingfield, M.J. 2011. A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany*, Volume 77, Issue 2, 292 - 304,
23. Ujino, T., Kawahara, T., Tsumura, Y., Nagamitsu, T., Yoshimaru, H., Ratnam, W., 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other *Dipterocarpaceae* species. *Heredity* 81, 422 - 428.
24. Weber, J. L., May, P. E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44, 388 - 396.
25. Young, A., Boshier, D. and Boyle, T. 2000. *Forest Conservation Genetics principles and practice*. CSIRO publishing.

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

**Ngày nhận bài:** 25/08/2024

**Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa:** 05/09/2024; 10/09/2024

**Ngày duyệt đăng:** 19/09/2024