

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN CÂY THỦY TÙNG (*Glyptostrobos pensilis* (Staunton ex D.Don) K. Koch) SỬ DỤNG CHỈ THỊ ISSR

Giang Thị Thanh¹, Lưu Thế Trung¹, Trần Văn Ninh¹,
Ngô Văn Cẩm¹, Nguyễn Đức Kiên², Nguyễn Thị Huyền²,
Trần Thị Thu Hà², Nguyễn Thị Việt Hà², Lê Thị Thủy², Lê Sơn²

¹Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên

²Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Thủy tùng (*Glyptostrobos pensilis* Staunton ex D.Don) K. Koch là loài thực vật nguy cấp và quý hiếm chỉ phân bố ở Việt Nam và phía Nam Trung Quốc. Việc đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen của các quần thể Thủy tùng có ý nghĩa quan trọng trong việc bảo tồn và phát triển loài này trong tương lai. Sự biến đổi di truyền trong và giữa hai quần thể Thủy tùng (Ea H'Leo và Krông Năng) đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng chỉ thị ISSR. Kết quả thu được tổng cộng 245 phân đoạn, trong đó phân đoạn đa hình chiếm 80,81% cho thấy biến thể di truyền trong quần thể Thủy tùng ở mức tương đối cao so với một số thực vật hạt trần có nguy cơ tuyệt chủng khác. Mức độ đa dạng di truyền của Thủy tùng ở mức trung bình: $N_a = 1,767$; $N_e = 1,379$; $I = 0,365$ và $h = 0,233$. Sự khác biệt di truyền giữa hai quần thể không lớn (6%) và giữa các cá thể trong cùng quần thể là rất lớn (94%) khi phân tích AMOVA đồng nhất với chỉ số khác biệt di truyền $G_{ST} = 0.0480$ và tần số trao đổi gen $N_m = 9,9077$ chỉ ra rằng sự khác biệt di truyền giữa hai quần thể nghiên cứu là thấp, có thể hai quần thể này được phân tách từ một quần thể duy nhất ban đầu.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, ISSR, *Glyptostrobos pensilis* Staunton ex D.Don K. Koch

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY *Glyptostrobos Pensilis* (Staunton Ex D.Don) K. Koch USING ISSR MARKERS

Giang Thi Thanh¹, Luu The Trung¹, Tran Van Ninh¹, Ngo Van Cam¹, Nguyen Duc Kien²,
Nguyen Thi Huyen², Tran Thi Thu Ha², Nguyen Thi Viet Ha², Le Thi Thuy², Le Son²

¹Forest Science Institute of Central Highlands and South of Central Vietnam

²Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology

Glyptostrobos pensilis (Staunton ex D.Don) K. Koch is an endangered and rare plant species only distributed in Vietnam and Southern China. Assessing the genetic diversity of *G. pensilis* populations is important in preserving and developing this species in the future. Genetic variation within and between two *G. pensilis* populations (Ea H'Leo and Krong Nang) was studied using the ISSR marker. The results obtained a total of 245 bands, of which polymorphic bands accounted for 80.81%, showing that genetic variation in the *G. pensilis* population is at a relatively high level compared to some endangered gymnosperms other. The genetic diversity of *G. pensilis* is average: $N_a = 1.767$; $N_e = 1.379$; $I = 0.365$ and $h = 0.233$. The genetic difference between the two populations is not large (6%) and between individuals in the same population is very large (94%) when analyzed by AMOVA. The genetic differentiation index $G_{ST} = 0.0480$ and the genetic exchange frequency $N_m = 9.9077$ indicate that the existence of genetic differences between the two studied populations is low and the differences dominate in the population.

Keywords: Genetic diversity, ISSR, *Glyptostrobos pensilis* (Staunton ex D.Don) K. Koch

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D.Don) K. Koch) thuộc họ Hoàng đàn (Cupressaceae), là loài cây gỗ quý có giá trị cao về cả mặt khoa học lẫn kinh tế và được xếp vào danh mục thực vật nguy cấp, quý hiếm theo Nghị định 06/2019/NĐ-CP của Chính phủ. Hiện nay, loài cây này chỉ phân bố ở Đắk Lắk với số lượng cá thể ít tại một số mảnh rừng thứ sinh bị phân cắt (Averyanov *et al.*, 2009), tập trung ở xã Ea Ral (Huyện Ea H'Leo) và rừng đặc dụng Tráp Ksor (Huyện Krông Năng). Loài cây này có nguy cơ tuyệt chủng trong tự nhiên và hiện đang bị khai thác quá mức do gỗ không bị mối mọt, cong vênh, thớ gỗ mịn và có mùi thơm (Sách Đỏ Việt Nam, 2007).

Trong nhiều năm trở lại đây, chịu nhiều áp lực của việc gia tăng dân số và phát triển kinh tế nhanh nên cây Thủy tùng bị suy giảm và đang bị đe dọa tuyệt chủng do nơi sống bị hẹp dần và số cá thể trong tự nhiên còn lại quá ít, chủ yếu được phát hiện tại một số mảnh rừng thứ sinh còn sót lại ở tỉnh Đắk Lắk. Bên cạnh đó, khả năng tái sinh tự nhiên của loài cây này rất thấp hoặc không có tái sinh tự nhiên (Nguyễn Huy Sơn *et al.*, 2006) cũng làm tăng nguy cơ tuyệt chủng của loài cây này. Do đó, công tác bảo tồn, phục hồi và phát triển nguồn gen Thủy tùng ở Việt Nam là việc làm cấp thiết trong thời gian tới.

Để góp phần cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Thủy tùng, việc đánh giá mức độ

đa dạng di truyền các quần thể và cá thể Thủy tùng còn lại có ý nghĩa quan trọng trong việc nâng cao hiểu biết về loài cây này, từ đó góp phần đưa ra các giải pháp bảo tồn và phục hồi. Hiện nay, các kỹ thuật sinh học phân tử sử dụng các chỉ thị ISSR, SSR... để đánh giá đa dạng di truyền cho nhiều đối tượng cây trồng đang được sử dụng rộng rãi, nhanh và có hiệu quả cao (White *et al.*, 2007). Đặc biệt là các loài thông đang có nguy cơ bị đe dọa và quý hiếm, trong đó có loài Thủy tùng (Ledig *et al.*, 2005; Nguyen Minh Tam *et al.*, 2009).

Trong khuôn khổ bài viết này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu sử dụng các chỉ thị ISSR để đánh giá mức độ đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền của các cá thể tại 2 quần thể Thủy tùng tại Đắk Lắk. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần trong việc đưa ra một số giải pháp phục vụ cho công tác bảo tồn và phục hồi loài cây này tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu lá của 163 mẫu Thủy tùng được thu tại 2 địa điểm tại tỉnh Đắk Lắk được trình bày ở bảng 1. Số lượng mẫu của 2 quần thể Ea Ral - Ea H'Leo, Tráp Ksor - Ea Hồ - Krông Năng lần lượt là 144 và 19 mẫu. Mẫu lá được thu cho vào túi nilong và vận chuyển tới phòng thí nghiệm Sinh học phân tử (Viện Nghiên cứu Giống và CNSH Lâm nghiệp), bảo quản ở 4°C cho đến khi tách chiết DNA.

Bảng 1. Danh sách mẫu Thủy tùng được nghiên cứu

STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
1	E1	Ea Ral, Ea H'Leo	83	E87	Ea Ral, Ea H'Leo
2	E2	Ea Ral, Ea H'Leo	84	E88	Ea Ral, Ea H'Leo
3	E3	Ea Ral, Ea H'Leo	85	E89	Ea Ral, Ea H'Leo
4	E4	Ea Ral, Ea H'Leo	86	E91	Ea Ral, Ea H'Leo
5	E5	Ea Ral, Ea H'Leo	87	E92	Ea Ral, Ea H'Leo
6	E6	Ea Ral, Ea H'Leo	88	E93	Ea Ral, Ea H'Leo
7	E7	Ea Ral, Ea H'Leo	89	E94	Ea Ral, Ea H'Leo

STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
8	E8	Ea Ral, Ea H'Leo	90	E95	Ea Ral, Ea H'Leo
9	E10	Ea Ral, Ea H'Leo	91	E96	Ea Ral, Ea H'Leo
10	E11	Ea Ral, Ea H'Leo	92	E97	Ea Ral, Ea H'Leo
11	E12	Ea Ral, Ea H'Leo	93	E98	Ea Ral, Ea H'Leo
12	E13	Ea Ral, Ea H'Leo	94	E99	Ea Ral, Ea H'Leo
13	E14	Ea Ral, Ea H'Leo	95	E100	Ea Ral, Ea H'Leo
14	E15	Ea Ral, Ea H'Leo	96	E101	Ea Ral, Ea H'Leo
15	E16	Ea Ral, Ea H'Leo	97	E102	Ea Ral, Ea H'Leo
16	E17	Ea Ral, Ea H'Leo	98	E104	Ea Ral, Ea H'Leo
17	E18	Ea Ral, Ea H'Leo	99	E105	Ea Ral, Ea H'Leo
18	E19	Ea Ral, Ea H'Leo	100	E106	Ea Ral, Ea H'Leo
19	E20	Ea Ral, Ea H'Leo	101	E107	Ea Ral, Ea H'Leo
20	E21	Ea Ral, Ea H'Leo	102	E108	Ea Ral, Ea H'Leo
21	E22	Ea Ral, Ea H'Leo	103	E109	Ea Ral, Ea H'Leo
22	E23	Ea Ral, Ea H'Leo	104	E110	Ea Ral, Ea H'Leo
23	E24	Ea Ral, Ea H'Leo	105	E111	Ea Ral, Ea H'Leo
24	E25	Ea Ral, Ea H'Leo	106	E112	Ea Ral, Ea H'Leo
25	E26	Ea Ral, Ea H'Leo	107	E113	Ea Ral, Ea H'Leo
26	E27	Ea Ral, Ea H'Leo	108	E114	Ea Ral, Ea H'Leo
27	E28	Ea Ral, Ea H'Leo	109	E115	Ea Ral, Ea H'Leo
28	E29	Ea Ral, Ea H'Leo	110	E116	Ea Ral, Ea H'Leo
29	E30	Ea Ral, Ea H'Leo	111	E117	Ea Ral, Ea H'Leo
30	E32	Ea Ral, Ea H'Leo	112	E118	Ea Ral, Ea H'Leo
31	E33	Ea Ral, Ea H'Leo	113	E119	Ea Ral, Ea H'Leo
32	E34	Ea Ral, Ea H'Leo	114	E120	Ea Ral, Ea H'Leo
33	E35	Ea Ral, Ea H'Leo	115	E121	Ea Ral, Ea H'Leo
34	E36	Ea Ral, Ea H'Leo	116	E122	Ea Ral, Ea H'Leo
35	E37	Ea Ral, Ea H'Leo	117	E123	Ea Ral, Ea H'Leo
36	E38	Ea Ral, Ea H'Leo	118	E124	Ea Ral, Ea H'Leo
37	E39	Ea Ral, Ea H'Leo	119	E125	Ea Ral, Ea H'Leo
38	E40	Ea Ral, Ea H'Leo	120	E126	Ea Ral, Ea H'Leo
39	E41	Ea Ral, Ea H'Leo	121	E129	Ea Ral, Ea H'Leo
40	E42	Ea Ral, Ea H'Leo	122	E130	Ea Ral, Ea H'Leo
41	E43	Ea Ral, Ea H'Leo	123	E131	Ea Ral, Ea H'Leo
42	E44	Ea Ral, Ea H'Leo	124	E132	Ea Ral, Ea H'Leo
43	E45	Ea Ral, Ea H'Leo	125	E133	Ea Ral, Ea H'Leo
44	E46	Ea Ral, Ea H'Leo	126	E134	Ea Ral, Ea H'Leo
45	E47	Ea Ral, Ea H'Leo	127	E135	Ea Ral, Ea H'Leo

STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
46	E48	Ea Ral, Ea H'Leo	128	E136	Ea Ral, Ea H'Leo
47	E49	Ea Ral, Ea H'Leo	129	E137	Ea Ral, Ea H'Leo
48	E50	Ea Ral, Ea H'Leo	130	E138	Ea Ral, Ea H'Leo
49	E51	Ea Ral, Ea H'Leo	131	E139	Ea Ral, Ea H'Leo
50	E52	Ea Ral, Ea H'Leo	132	E140	Ea Ral, Ea H'Leo
51	E53	Ea Ral, Ea H'Leo	133	E141	Ea Ral, Ea H'Leo
52	E54	Ea Ral, Ea H'Leo	134	E142	Ea Ral, Ea H'Leo
53	E56	Ea Ral, Ea H'Leo	135	E143	Ea Ral, Ea H'Leo
54	E57	Ea Ral, Ea H'Leo	136	E144	Ea Ral, Ea H'Leo
55	E58	Ea Ral, Ea H'Leo	137	E145	Ea Ral, Ea H'Leo
56	E60	Ea Ral, Ea H'Leo	138	E146	Ea Ral, Ea H'Leo
57	E61	Ea Ral, Ea H'Leo	139	E147	Ea Ral, Ea H'Leo
58	E62	Ea Ral, Ea H'Leo	140	SP1 - 118	Ea Ral, Ea H'Leo
59	E63	Ea Ral, Ea H'Leo	141	SP4 - C130	Ea Ral, Ea H'Leo
60	E64	Ea Ral, Ea H'Leo	142	RT07	Ea Ral, Ea H'Leo
61	E65	Ea Ral, Ea H'Leo	143	EBM01	Ea Ral, Ea H'Leo
62	E66	Ea Ral, Ea H'Leo	144	EBM02	Ea Ral, Ea H'Leo
63	E67	Ea Ral, Ea H'Leo	145	T1	Ea Hồ, Krông Năng
64	E68	Ea Ral, Ea H'Leo	146	T2	Ea Hồ, Krông Năng
65	E69	Ea Ral, Ea H'Leo	147	T3	Ea Hồ, Krông Năng
66	E70	Ea Ral, Ea H'Leo	148	T4	Ea Hồ, Krông Năng
67	E71	Ea Ral, Ea H'Leo	149	T5	Ea Hồ, Krông Năng
68	E72	Ea Ral, Ea H'Leo	150	T6	Ea Hồ, Krông Năng
69	E73	Ea Ral, Ea H'Leo	151	T7	Ea Hồ, Krông Năng
70	E74	Ea Ral, Ea H'Leo	152	T8	Ea Hồ, Krông Năng
71	E75	Ea Ral, Ea H'Leo	153	T9	Ea Hồ, Krông Năng
72	E76.1	Ea Ral, Ea H'Leo	154	T10	Ea Hồ, Krông Năng
73	E76.2	Ea Ral, Ea H'Leo	155	T11	Ea Hồ, Krông Năng
74	E77	Ea Ral, Ea H'Leo	156	T12	Ea Hồ, Krông Năng
75	E78	Ea Ral, Ea H'Leo	157	T13	Ea Hồ, Krông Năng
76	E79	Ea Ral, Ea H'Leo	158	T14	Ea Hồ, Krông Năng
77	E80	Ea Ral, Ea H'Leo	159	T15	Ea Hồ, Krông Năng
78	E81	Ea Ral, Ea H'Leo	160	T16	Ea Hồ, Krông Năng
79	E83	Ea Ral, Ea H'Leo	161	T17	Ea Hồ, Krông Năng
80	E84	Ea Ral, Ea H'Leo	162	T127	Ea Hồ, Krông Năng
81	E85	Ea Ral, Ea H'Leo	163	T57 - BM	Ea Hồ, Krông Năng
82	E86	Ea Ral, Ea H'Leo			

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá tươi, sử dụng khoảng 100 mg cho mỗi mẫu. Lá được nghiền mịn thành bột trong niơ lỏng và DNA được chiết xuất bằng phương pháp Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (J.J. Doyle and J.L. Doyle, 1990). DNA được chạy kiểm tra điện di trên gel agarose 0,8% trong đệm TAE 1X ở hiệu điện thế 120V trong 15 phút. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được đo bằng máy quang phổ hấp thụ NanoDrop ND - 1000.

Phản ứng khuếch đại các vùng gen lục lạp

Trước khi phân tích bằng chỉ thị ISSR, chúng tôi lựa chọn một số mẫu DNA đã được tách chiết làm khuôn để nhân bản tại các vùng gen lục lạp gồm *RbcL* và *MatK* (bảng 2) để hạn chế

sự sai sót trong việc lựa chọn các mẫu nghiên cứu dựa trên các đặc điểm hình thái đặc biệt với một số mẫu được ghép trên gốc ghép là cây Bụt mọc (*Taxodium distichum*). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 50 μ l bao gồm 25 μ l Dream Taq Hot Start Mastermix, 2 μ l mỗi xuôi (F) 10 μ M, 2 μ l mỗi ngược (R) 10 μ M, 5 μ l DNA tổng số, 16 μ l nước deion. Chương trình chạy PCR được tiến hành theo chu trình nhiệt: 4 phút ở 94°C, 36 chu kỳ (1 phút 30 giây ở 94°C, 60 giây ở T_m (nhiệt độ gắn mồi), 1 phút 30 giây ở 72°C và ở 72°C trong 10 phút).

Sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,8% và tinh sạch sản phẩm PCR bằng GeneJET PCR Purification Kit. Sản phẩm tinh sạch sẽ được đọc trình tự các vùng gen với cả chiều xuôi và ngược.

Bảng 2. Trình tự mồi lục lạp sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Nhiệt độ gắn mồi (T_m)	
1	<i>RbcL</i>	<i>RbcL - IF1</i>	CGAATTCCTCCTGCTTATTC	50,8°C
		<i>RbcL - R</i>	TCACAAGCAGCAGCTAGTTCAGGACTC	61,9°C
2	<i>MatK</i>	<i>445mF</i>	AAGGAATGGATGGATGGAATAGTCT	55,6°C
		<i>1209mR</i>	CACCCTGAGATGTCACAAAA	52,6°C

Phản ứng PCR - ISSR

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 10 chỉ thị ISSR với các thông tin cụ thể được thể hiện ở bảng 3. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 20 μ l gồm 10 μ l Dream Taq Hot Start Mastermix, 2 μ l mồi ISSR 10 μ M, 2 μ l DNA tổng số và 6 μ l nước deion. Các bước PCR - ISSR được tiến hành như sau: 94°C trong 5 phút; lặp lại 35 chu kỳ gồm 94°C trong 30

giây, T_m trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; kết thúc 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được chạy kiểm tra trên gel agarose 1,8% trong bộ đệm TAE 1X để phân tách các băng và sử dụng thang 1 kb (Thermo Scientific) làm chuẩn. Bản gel được quan sát bằng máy soi gel sử dụng tia UV và chụp ảnh lưu giữ.

Bảng 3. Trình tự mồi ISSR được sử dụng thực hiện phản ứng PCR (Wu *et al.*, 2011; Trần Trị Liễu *et al.*, 2015)

STT	Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Nhiệt độ gắn mồi (T _m)
1	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48,8°C
2	UBC811	GAGAGAGAGAGA GAGAC	46,8°C
3	UBC818	CACACACACACA CACAG	51,0°C
4	UBC823	TGTGTGTGTGTGTGTGGA	54,2°C
5	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	50,0°C
6	UBC843	CTCTCTCTCTCTCTGA	48,6°C
7	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTCTG	53,9°C
8	UBC855	ACACACACACACACACG	51,4°C
9	UBC856	ACACACACACACACACYA	52,8°C
10	UBC881	GGG TGGGGT GGGGTG	59,3°C

Phân tích số liệu

Các đoạn trình tự gen lục lạp *RbcL* và *MatK* sau khi giải trình tự được đối chiếu theo 2 chiều nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do quá trình đọc bằng phần mềm BioEdit 7.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) và tiến hành phân tích mức độ sai khác cũng như mối quan hệ các mẫu được phân tích và so sánh với trình tự hiện có trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI).

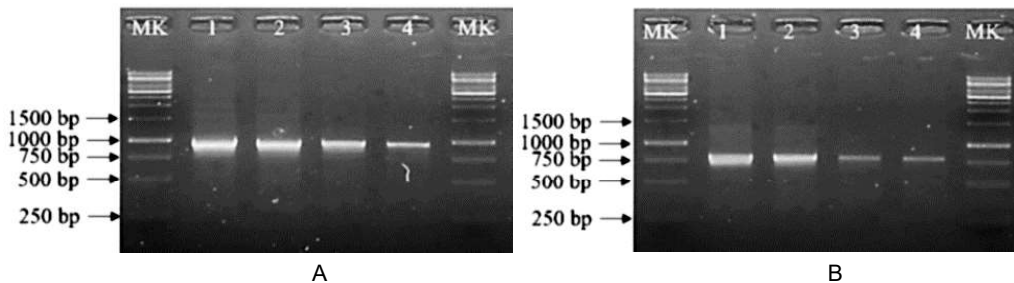
Các đoạn khuếch đại từ việc sử dụng chỉ thị ISSR được tính điểm theo ma trận dạng nhị phân trong đó: 0 - phân đoạn DNA không xuất hiện và 1 - phân đoạn DNA xuất hiện. Phần mềm POPGENE v1.32 (Yeh *et al.*, 1997) được sử dụng để xác định các chỉ số đa dạng di truyền cho từng quần thể nghiên cứu như số alen quan sát được (*N_a*), số alen có ý nghĩa (*N_e*), hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các loài (*h*), hệ số đa

dạng Shannon (*I*), phần trăm các phân đoạn đa hình (*PPB*), chỉ số sai khác di truyền giữa các quần thể (*G_{ST}*) và chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể (*N_m*). Phân tích phương sai phân tử (AMOVA) và phân tích tọa độ chính (PCoA) được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GenAlEx v6.51b2 (Peakall *et al.*, 2006). Xây dựng cây quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGA × (Kumar *et al.*, 2018) theo phương pháp nhóm cặp không trọng số UPGMA và giá trị Bootstrap với số lần lặp lại 1000 lần.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khuếch đại vùng gen lục lạp

Lựa chọn mỗi quần thể nghiên cứu 2 mẫu DNA tiến hành khuếch đại vùng gen *RbcL* và *MatK*. Tại vùng gen *RbcL* cho kích thước khoảng 900 bp và vùng *MatK* có kích thước khoảng 750 bp (hình 1).



Hình 1. Kết quả khuếch đại vùng gen (A. Vùng gen *RbcL*, B. Vùng gen *MatK*)

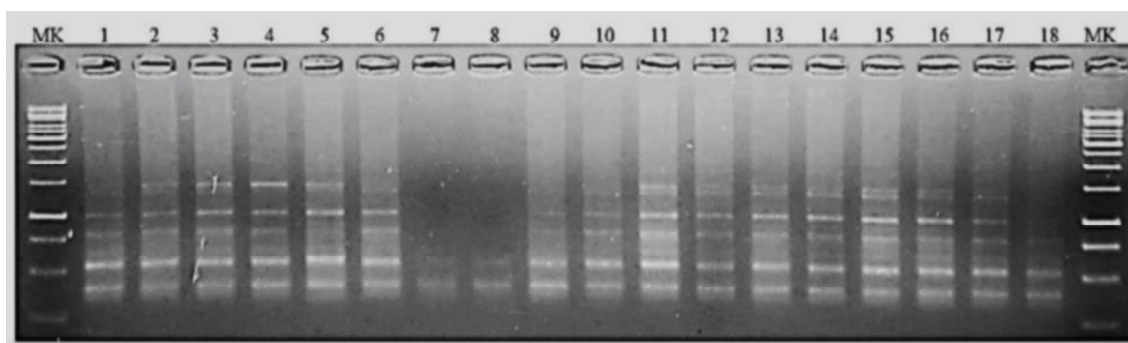
Tại vùng gen *RbcL*, kết quả cho thấy 4 mẫu được phân tích có rất ít sự sai khác về trình tự vùng gen phân tích nên có mức độ tương đồng cao về mặt di truyền, dao động trong khoảng 99,6 - 99,9%. Khi tiến hành so sánh trình tự thu được với ngân hàng gen thu được kết quả tương đồng đến 98,03% loài *G. pensilis* (JF725918.1) được phân tích tại vùng gen *RbcL*.

Đối với vùng gen *MatK*, kết quả cho thấy 4 mẫu được phân tích có sự khác biệt về trình tự tại một số vị trí bị mất đoạn hay tại một số vị trí bị thay thế ở cuối trình tự. Mức độ tương đồng của 4 mẫu nghiên cứu cao (90%), dao động trong khoảng 98,5 - 99,6% và khi so sánh với ngân hàng gen thu được kết quả tương đồng

89,85% *G. pensilis* (JN657263.1) được phân tích tại vùng gen *MatK*.

3.2. Kết quả khuếch đại của chỉ thị ISSR

DNA tổng số sử dụng cho phản ứng ISSR được tinh sạch và pha loãng để làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen với 10 mỗi ISSR. Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose theo phương pháp điện di đã thu được 245 băng, trong đó có 198 phân đoạn đa hình chiếm tỷ lệ 80,81% (bảng 3). Các phân đoạn được nhân lên có kích thước dao động từ 300 - 2.100 bp, số phân đoạn mỗi chỉ thị đạt từ 8 - 13 với trung bình đạt 11. Hình 2 là kết quả khuếch đại của một số mẫu sử dụng mỗi ISSR trên bản gel agarose thông qua chạy điện di.



Hình 2. Kết quả khuếch đại sử dụng mỗi UBC 856 (MK: marker 1 Kb, 1 - 18: Mẫu DNA Thủy tùng đại diện)

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền của 2 quần thể Thủy tùng

Bảng 4 trình bày đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng được nghiên cứu bằng chỉ thị ISSR, trong đó quần thể Ea H'Leo thể hiện sự đa

dạng di truyền cao hơn so với quần thể Krông Năng. Giá trị trung bình của các chỉ số đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng lần lượt là $Na = 1,767$; $Ne = 1,379$; $I = 0,365$; $h = 0,233$ và $PPB = 80,81\%$.

Bảng 4. Thông số đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng nghiên cứu

Quần thể	Số mẫu	Chỉ số đa dạng di truyền				
		<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>h</i>	<i>PPB</i> (%)
Ea H'Leo	144	2,000 + 0,000	1,417 + 0,049	0,409 + 0,030	0,260 + 0,023	94,05
Krông Năng	19	1,533 + 0,117	1,341 + 0,053	0,321 + 0,039	0,207 + 0,028	67,06
Trung bình		1,767 + 0,063	1,379 + 0,036	0,365 + 0,025	0,233 + 0,018	80,81

Na - số alen quan sát được; *Ne* - số alen có ý nghĩa; *h* - hệ số đa dạng di truyền Nei; *I* - hệ số Shannon; *PPB* - phần trăm đa hình

Số alen quan sát được (N_a) của quần thể Ea H'Leo là cao nhất đạt 2,000 trong khi quần thể Krông Năng có số alen thấp hơn là 1,533. Bên cạnh đó, số alen có ý nghĩa (N_e) nằm trong khoảng 1,347 (Krông Năng) đến 1,417 (Ea H'Leo) và có thể thấy ở cả hai quần thể nghiên cứu N_a luôn lớn hơn N_e . Hệ số đa dạng di truyền Nei của hai quần thể nằm từ 0,207 - 0,260, hệ số Shannon nằm từ 0,321 - 0,409.

Kết quả phân tích cấu trúc quần thể Thủy tùng (bảng 5) sử dụng phần mềm POPGENE nhận thấy hai quần thể nghiên cứu có tính đa dạng di truyền ở mức độ trung bình với chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình trong hai quần thể $H_S = 0,2334$, chiếm 95,23% đa dạng nguồn gen của hai quần thể $H_T = 0,2451$. Chỉ số sai khác di truyền G_{ST} giữa hai quần thể

được tính cho kết quả chỉ số G_{ST} đạt 0,0480 chứng tỏ chỉ có 4,80% (< 10%) sự sai khác di truyền giữa các mẫu nghiên cứu. Từ giá trị G_{ST} thu được, giá trị N_m được tính toán và đạt 9,9074 cho thấy giữa các mẫu và giữa hai quần thể Thủy tùng nghiên cứu có sự trao đổi gen lớn. Chỉ số này cao hơn kết quả nghiên cứu trước đây của Wu và đồng tác giả (2011) với loài Thủy tùng thuộc quần thể tự nhiên ($N_m = 0,1238$) và quần thể trồng ($N_m = 0,1055$) tại Trung Quốc sử dụng chỉ thị ISSR để đánh giá. Điều này có thể giải thích các cá thể Thủy tùng từ 2 quần thể tự nhiên có mối quan hệ tương đối gần gũi về mặt di truyền. Có thể 2 quần thể hiện nay còn tồn tại có thể được phân chia từ 1 quần thể ban đầu, được phân tách do các tác nhân mất rừng.

Bảng 5. Các chỉ số đa dạng của hai quần thể Thủy tùng

Các thông số	Mean ± SD
Số lượng mẫu	163
H_T	0,2451 ± 0,0296
H_S	0,2334 ± 0,0262
G_{ST}	0,0480
N_m	9,9077

H_T - Chỉ số đa dạng nguồn gen của các quần thể, H_S - Chỉ số đa dạng gen trung bình trong quần thể, G_{ST} - Chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các quần thể, N_m - Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể.

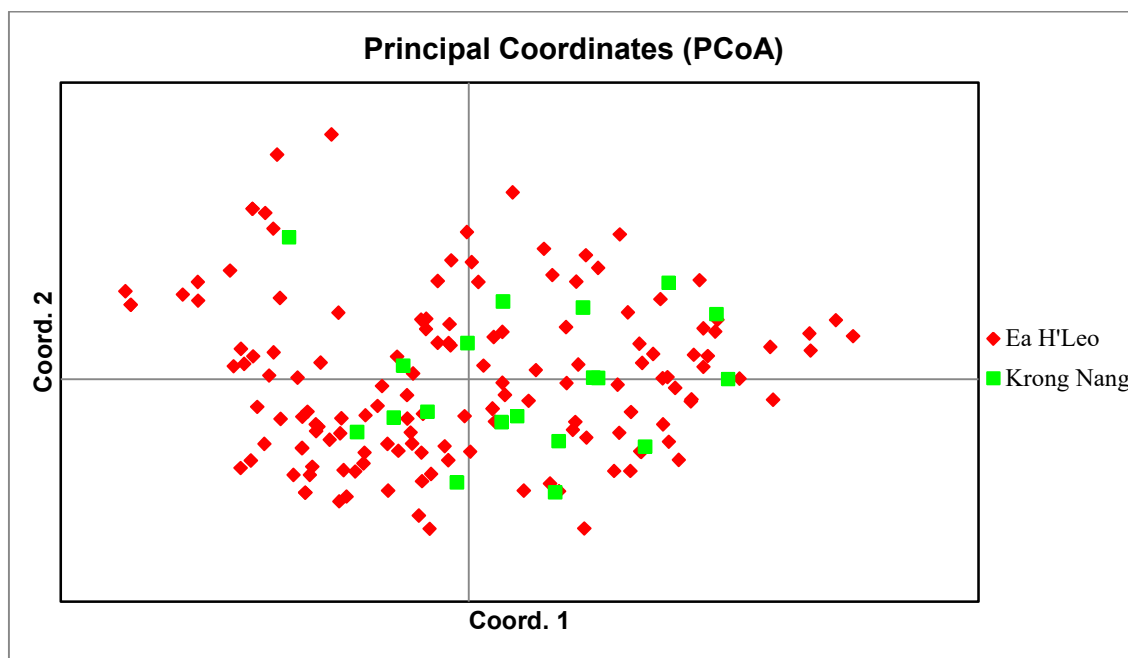
Kết quả phân tích AMOVA (bảng 6) cho thấy hầu hết các biến thể đều nằm trong cùng quần thể, chiếm tới 94%.

Bảng 6. Phân tích phương sai phân tử của mẫu Thủy tùng

AMOVA	Tỷ lệ
Giữa các quần thể	6%
Trong quần thể	94%
PhiPT	0,058, $p \geq 0,001$

Đối với các loài cây rừng nói chung, mức độ sai khác về mặt phân tử gián tiếp phản ánh hệ thống sinh sản của loài và thường đối với các loài có hình thức sinh sản qua thụ phấn chéo thì giá trị AMOVA giữa các cá thể trong cùng

một quần thể là rất cao (> 75%). Thủy tùng là loài cây sinh sản đơn tính được thụ phấn nhờ gió và kết quả phân tích cho thấy mức độ sai khác về mặt phân tử giữa các cá thể trong cùng quần thể rất cao, đạt 94%. Tuy nhiên, Thủy tùng phân bố rời rạc và nhiều cây bị chết, không xuất hiện cây tái sinh trong những năm gần đây và chất lượng hạt thu được kém. Vì vậy, trong thời gian tới, ngoài việc bảo tồn tại chỗ các cây hiện có thì cần duy trì đa dạng di truyền và cải thiện khả năng sinh sản của loài này thông qua việc trồng cây mới và xây dựng vườn thực vật tập hợp các cá thể từ các quần thể tự nhiên khác nhau.



Hình 4. Phân tích tọa độ di truyền của các mẫu Thuý tùng được nghiên cứu

Như vậy, kết quả phân tích các chỉ số đa dạng di truyền, cây phân loại và tọa độ phân bố di truyền của các mẫu Thuý tùng thuộc hai quần thể Krông Năng và Ea H'Leo đều cho kết quả tương tự nhau. Quần thể Ea H'Leo có sự đa dạng di truyền cao hơn và các mẫu của hai quần thể này có sự đan xen, chồng lấp lẫn nhau, thể hiện sự trao đổi nguồn gen lớn giữa mẫu trong cùng quần thể và giữa các mẫu ở cả hai quần thể.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này, sử dụng 4 chỉ thị ISSR để đánh giá đa dạng di truyền giữa các mẫu Thuý tùng (*Glyptostrobus pensilis*) thuộc hai quần thể Ea Ral (Ea H'Leo), Trấp Ksor (Krông Năng). Kết quả đánh giá thu được tổng số 245 phân đoạn, trong đó có 198 phân đoạn đa hình chiếm tỷ lệ 80,81% chứng tỏ chỉ thị ISSR rất có ý nghĩa trong đánh giá đa dạng di truyền giữa các mẫu Thuý tùng.

Mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu Thuý tùng thuộc hai quần thể nghiên cứu ở mức độ trung bình, khả năng trao đổi nguồn gen giữa

các mẫu và giữa hai quần thể là lớn, với mức độ tương đồng di truyền > 90% đồng nghĩa với sự khác biệt di truyền giữa hai quần thể là không lớn. Các giá trị trung bình của các chỉ số đa dạng di truyền của hai quần thể thu được lần lượt là $Na = 1,767$; $Ne = 1,379$; $I = 0,365$; $h = 0,233$ và $PPB = 80,81\%$.

Các mẫu Thuý tùng được nghiên cứu phân bố rải rác dẫn tới sự suy giảm số lượng loài và mất sự đa dạng nguồn gen do giảm không gian sống và giảm cơ hội thụ phấn nhờ gió. Bên cạnh đó, lý do làm giảm đa dạng di truyền là do tác động của con người vì đây là loài vừa có giá trị kinh tế cao vừa có giá trị khoa học cao. Hiện nay, công tác bảo tồn và phục hồi loài Thuý tùng tại Việt Nam còn gặp nhiều hạn chế nên chúng tôi đưa ra một số kiến nghị như sau:

- Duy trì tính đa dạng di truyền tại hai quần thể Ea H'Leo và Krông Năng nhằm ngăn chặn nguy cơ tuyệt chủng loài Thuý tùng trong tương lai. Cần ngăn chặn sự tàn phá và chia cắt môi trường sống của loài này do các hoạt

động khai thác của con người ảnh hưởng đến môi trường sống của chúng.

- Quản lý nghiêm ngặt hai quần thể Ea H'Leo và Krông Năng, duy trì số lượng cá thể hiện có và đưa các cây con vào trồng nhằm tạo ra các quần thể lớn hơn, đảm bảo duy trì tính đa dạng di truyền và khả năng tiến hóa của loài.

- Đặc biệt, việc xem xét lại môi trường sống thích hợp cho loài này rất là quan trọng. Trong đó, có việc tiến hành bảo tồn ở mức tối đa đối với các quần thể còn lại và tập trung các nghiên cứu nhân giống cũng như thụ phấn của loài này trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Averyanov LV, Loc PK, Hiep NT, Khang NS, Vinh NT, Duyen PT, 2009. Preliminary Observation of Native *Glyptostrobus pensilii* (Taxodiaceae) Stands in Vietnam. *Taiwania* 54(11): 1 - 21
2. Averyanov LV, Loc PK, Hiep NT, Khang NS, Vinh NT, Duyen PT, 2009. Preliminary Observation of Native *Glyptostrobus pensilii* (Taxodiaceae) Stands in Vietnam. *Taiwania* 54(11): 1 - 21.
3. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam. Phần II - Thực vật. NXB. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội. Trang 498 - 499.
4. Chính phủ Việt Nam, 2019. Nghị định 06/2019/NĐ-CP về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp của Thủ tướng Chính phủ, ngày 22 tháng 01 năm 2019. Ngày có hiệu lực : 10/03/2019.
5. Doyle JJ and Doyle JL, "Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue," *Focus*, Vol. 12, No. 1, 1990. pp. 13 - 15.
6. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C. & Tamura K, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
7. Ledig FT, Hodgskiss PD, Johnson DR, 2005. Genetic diversity, genetic structure, and mating system of Brewer spruce (Pinaceae), a relict of the Arcto - tertiary forest. *Amer J Bot* 92(12): 1975 - 1986.
8. Nguyen Minh Tam, Nguyen Thi Hoa, Nguyen T Phuong Trang, 2009. Genetic variation in threatened conifer *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* using ISSR markers implication for conservatison. *J Biol*: 66 - 72.
9. 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.
10. Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Tiến Hiệp, Đinh Thị Phòng, 2015. Tính đa dạng nguồn gen di truyền và cấu trúc quần thể loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) - loài đặc hữu hẹp ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 53(2) 169 - 179.
11. White TL, Adams WT, Neale DB, 2007. *Forest genetics*, CABI Publishing, Cambridge, MA, USA
12. Wu ZY, Liu JF, Hong W, Pan DM, Zheng SQ, 2011. Genetic diversity of natural and planted *Glyptostrobus pensilis* populations: a comparative study. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 22(4):873 - 879.
13. Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX, 1997. POPGENE, the User - Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*

Email tác giả liên hệ: giangthanh136@gmail.com

Ngày nhận bài: 12/06/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 02/07/2024

Ngày duyệt đăng: 10/07/2024