

## PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI THÔNG ĐO BẮC (*TAXUS CHINENSIS* (Pilg.) Rehder) BẰNG CHỈ THỊ PHẦN TỬ SSR PHỤC VỤ CÔNG TÁC BẢO TỒN

Vũ Đình Duy<sup>1</sup>, Bùi Thị Tuyết Xuân<sup>2</sup>, Nguyễn Minh Đức<sup>2</sup>, Nguyễn Minh Tâm<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bao tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Thông đo Bắc (*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd) là loài đang bị đe dọa tuyệt chủng và chi phân bố ở phía Bắc Việt Nam. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá hiện trạng phân bố và mức độ đa dạng di truyền của 6 quần thể tại 5 tỉnh phía Bắc Việt Nam: Cao Bằng, Hà Giang, Lào Cai, Hòa Bình và Sơn La. Mẫu lá hoặc vỏ cây thu thập từ 148 cá thể thuộc 6 quần thể đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền bằng kỹ thuật phân tử microsatellite (SSR). Trong số 6 cặp mồi SSR dùng để phân tích thì có 5-6 cặp mồi chỉ ra tính đa hình với giá trị PIC (Polymorphic Information Content - hàm lượng thông tin đa hình) dao động từ 0 (pt 30204) đến 0,626 (pt 15169), trung bình 0,456. Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra số allele trung bình cho một locus là 1,41 (1,31 - 1,5), tỷ số locus đa hình trung bình 34,62% (25,00 - 41,67%). Hệ số gen di hợp tự quan sát trung bình 0,107 (0,083 - 1,24) và hệ số gen di hợp tự kỳ vọng trung bình 0,121 (0,101 - 0,138). Mức độ đa dạng di truyền giữa các quần thể thấp vì vậy mức độ trao đổi di truyền giữa các quần thể cao. Hiện trạng quần thể đã phản ánh sự phân cắt và bị cô lập giữa các quần thể liên quan đến tác động của con người. Một số giải pháp áp dụng cho công tác bảo tồn và phát triển bền vững cũng đã được đề cập.

**Từ khóa:** Bảo tồn, đa dạng di truyền, microsatellite (SSR), *Taxus chinensis*, Thông đo Bắc

### MỞ ĐẦU

Loài Thông đo Bắc (*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd) thuộc chi Thông đo (*Taxus*), họ Thông đo (Taxaceae) là loài quý hiếm có giá trị đặc biệt về mặt y học được sử dụng để sản xuất taxol (thọ chất chữa bệnh ung thư) (Trần Thị Thủy *et al.*, 2005), xây dựng nhà cửa, đóng đồ đồng gia đình, thu công mỹ nghệ và làm cảnh. Loài này phân bố ở vùng núi đá vôi và núi đất phía Bắc Việt Nam. Theo các tiêu chí mới của IUCN năm 2012 loài này cần được xếp vào bậc sắp bị tuyệt chủng VL A2ac, B2ab (i-v), đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam với bậc sắp bị tuyệt chủng VU A1a, c, B1+2b, c (Sách Đỏ Việt Nam, 2007; IUCN, 2012) và loài này thuộc nhóm IIA. Thực vật rừng hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại của nghị định số 32/2006 ND-CP ngày 30/3/2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm Mặc dù, một số quần thể của chúng là đối tượng đã được bảo vệ trong một số khu bảo tồn, nhưng chúng vẫn đang ở trong tình trạng bị đe dọa. Theo các tác giả Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004), Nguyễn Đức Tô Lưu và cộng sự (2004) và Nguyễn Tiến Hiệp và cộng sự (2004) đã chỉ ra rằng Thông đo Bắc hiện chỉ còn khoảng 250 cá thể, phân bố tàn mạn, với kích thước quần thể rất

nhỏ. Thông đo Bắc hiện có mặt tại một số địa điểm như huyện Đông Văn và Quan Ba (Hà Giang), Mộc Châu và Yên Châu (Sơn La), Na Hang (Tuyên Quang), Sa Pa (Lào Cai), Bảo Lạc (Cao Bằng), Mai Châu và Đà Bắc (Hòa Bình), Bá Thước (Thanh hóa), Con Cuông (Nghệ An). Số lượng cá thể cho mỗi quần thể là rất nhỏ. Đã có một số biện pháp bảo vệ loài này với các hình thức khác nhau, như bảo vệ nguyên vị tại một số khu bảo tồn và chuyển vị (giảm hom) (Nguyễn Sinh Khang *et al.*, 2011). Tuy nhiên, các nhà quản lý và các nhà khoa học cần thiếu các thông tin quan trọng về đa dạng di truyền ở ca 2 mức độ quần thể và loài, đặc biệt các yếu tố ảnh hưởng xấu đến sự tồn tại của chúng liên quan đến tác động của con người. Điều này rất khó để nâng cao hiệu quả cho công tác bảo tồn và sử dụng bền vững loài Thông nghiên cứu. Để góp phần đưa ra các giải pháp bảo tồn và phục hồi loài thì việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể loài Thông đo Bắc có ý nghĩa quan trọng. Mức độ đa dạng di truyền không những chỉ ra khả năng tồn tại của loài ở hiện tại và tương lai, mà còn chỉ ra tiềm năng tiến hóa của loài. Ngay nay, kỹ thuật công nghệ sinh học được sử dụng rộng rãi, nhanh và có hiệu quả trong việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài, đặc biệt các loài Thông đang có nguy cơ bị đe dọa

(Goncharrenko *et al.*, 1993, Shea *et al.*, 2002; Ledig *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2009, 2011: ).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích 6 cặp môi cpSSR để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài Thông đỏ Bắc sông tư nhiên ở 5 tỉnh phía Bắc Việt Nam và để xuất một số giải pháp bảo tồn và phục hồi chúng ở Việt Nam

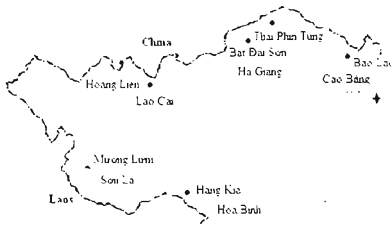
## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Địa điểm và phương pháp khảo sát thực địa

Nghiên cứu được tiến hành tại 6 quần thể thuộc

5 tỉnh phía Bắc Việt Nam (Hình 1). Đây là những khu vực loài này còn tồn tại trong rừng tự nhiên.

Để đánh giá cấu trúc quần thể, các thông số hình thái cá thể trong mỗi quần thể nghiên cứu được quan sát và xác định trực tiếp tại hiện trường, bao gồm chiều cao và đường kính ngang ngực, đặc điểm nón đực hoặc nón cái được thu thập cho tất cả các cá thể. Khoảng cách giữa các cá thể nghiên cứu trong quần thể nghiên cứu cũng được xác định. Để xác định chính xác tên khoa học của loài Thông đỏ Bắc ở mỗi nơi nghiên cứu, mẫu tiêu bản được thu thập và được lưu giữ tại Phòng Sinh học, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam



Hình 1. Bản đồ chỉ ra địa điểm nghiên cứu loài Thông đỏ Bắc

Bảng 1. Địa điểm và số mẫu thu thập cho phân tích SSR

Quần thể	Số mẫu	Địa điểm	Độ cao	Vĩ độ	Kinh độ
Thái Phìn Tùng	35	Thái Phìn Tùng, Đông Văn, Hà Giang	1570 m	23°15' B	105°17' Đ
Bát Đại Sơn	31	Bát Đại Sơn, Quán Ba, Hà Giang	1250 m	23°08' B	104°56' Đ
Hoàng Liên	34	Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai	1950 m	22°12' B	103°05' Đ
Bảo Lạc	6	Xuân Trường, Bảo Lạc, Cao Bằng	1895 m	22°52' B	105°50' Đ
Hạng Kìa	14	Hạng Kìa – Pá Co, Mai Châu, Hòa Bình	1047 m	20°44' B	104°55' Đ
Mường Lũm	28	Mường Lũm, Yên Châu, Sơn La	1550 m	21°01' B	104°30' Đ

**Bảng 2.** Trình tự các nucleotide của 6 cặp mồi SSR

Stt	Tên mồi	Mồi	Trình tự mồi	Nguồn tài liệu
1	Pt 15169	F	5'- CTT GGA TGG AAT AGC AGC C -3'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
		R	5'- GGA AGG GCA TTA AGG TCA TTA - 3'	
2	Pt 26081	F	5'- CCC GTA TCC AGA TAT ACT TCC A - 3'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
		R	5'- TGG TTT GAT TCA TTC GTT CAT - 3'	
3	Pt 30204	F	5'- TCA TAG CGG AAG ATC CTC TTT - 3'	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
		R	5'- CGG ATT GAT CCT AAC CAT ACC - 3'	
4	Pt 71936	F	5'- TTC ATT GGA AAT ACA CTA GCC C - 3	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
		R	5'- AAA ACC GTA CAT GAG ATT CCC - 3	
5	Pt 110048	F	5'- TAA GGG GAC TAG AGC AGG CTA - 3	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
		R	5'- TTC GAT ATT GAA CCT TGG ACA - 3	
6	Pt 87268	F	5'- GCC AGG GAA AAT CGT AGG - 3	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
		R	5'- AGA AGA TTA GAC ATC CAA CCC - 3	

### Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 148 mẫu lá hoặc vỏ cây từ 6 quần thể đã được tác giả thu thập ngẫu nhiên (Bảng 1) Tại hiện trường mẫu thu được ghi số cùng với đặc điểm sinh học của cây lấy mẫu và bảo quản trong silica gel, sau đó chuyển về phòng Phân loại thực nghiệm và Đa dạng nguồn gen và giữ trong tủ lạnh sâu âm 30°C cho đến khi mẫu được lấy ra để phân tích DNA Sau cấp mồi SSR đã được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền giữa các quần thể nghiên cứu (Bảng 2).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Tách chiết DNA tổng số

Mẫu được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (Doyle *et al.*, 1990) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện Việt Nam Kiểm tra độ sạch và hàm lượng DNA bằng đo quang phổ hấp thụ kết hợp với điện di trên gel agarose 0.8% DNA tổng số được pha loãng dùng cho phản ứng PCR ở nồng độ 10 ng/μl

#### Nhân bản DNA

Thể tích mỗi phản ứng PCR là 25 μl, trong đó chứa các thành phần gồm 12 μl H<sub>2</sub>O deion, 2,5 μl dung dịch đệm buffer 10X, 2,5 μl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM; 2,5 μl dNTPs 2,5 mM, 1,25 μl mỗi muối (10 pmol); 1,25 μl mỗi ngược (10 pmol), 0,5 μl *Taq* polymerase (5 U/μl), 2μl DNA khuôn Quá trình nhân bản được tiến hành trên máy Gene amp PCR system 9700 theo chu trình nhiệt sau: (1) Biến tính ban đầu: 94 °C trong 3 phút; (2) Biến tính: 94 °C trong 1 phút, (3)

Bắt cặp 55°C trong 1 phút, (4) Kéo dài: 72 °C trong 1 phút, (5) Lặp lại (2) đến (4) 40 chu kỳ; (6) Phản ứng kết thúc hoàn toàn 72 °C trong 10 phút, (7) Giữ sản phẩm ở 4°C. Điện di sản phẩm trên gel polyacrylamide 5 % trong 40 ml dung dịch đệm 1xTAE, nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh trên máy soi gel CSL- MICRODOC, CLEARVER

#### Phân tích số liệu

Theo quy ước I = phân đoạn DNA xuất hiện và 0 = phân đoạn DNA không xuất hiện, khi điện di sản phẩm PCR SSR trên ban gel điện di polyacrylamide 5% các mẫu nghiên cứu Xác định hệ số tương đồng và khoảng cách di truyền theo Nei (1972), giá trị PIC, số allele tại một locus (A), tỉ lệ phần trăm locus đa hình (P) với mức độ tin cậy 95 %, tần số gen di hợp tự quan sát H<sub>o</sub> và tần số gen di hợp tự kì vọng dưới điều kiện cân bằng Hardy-Weinberg H<sub>e</sub> và xây dựng cấu trúc hình cây theo phương pháp NJ (Neighbor Joining) trên cơ sở khoảng cách tương đồng di truyền giữa các quần thể nghiên cứu Tất cả các thông số trên được tính toán và phân tích bằng phần mềm GenA1Ex 6.5 (Peakall *et al.*, 2012)

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Hiện trạng quần thể và loài Thông đo Bắc

Loài Thông đo Bắc (*Taxus chinensis*) chỉ tồn tại ở phía Bắc Việt Nam với khoảng 200 cá thể, phân bố không đồng đều chủ yếu ở Hà Giang với số lượng khoảng 100 cá thể Quần thể ở khu Bảo

tôn Thiên nhiên Bát Đại Sơn (Quần Ba, Hà Giang) có khoảng 50 cá thể, ở Thài Phìn Tủng (Đồng Văn, Hà Giang) khoảng 40 cá thể, Mường Lưm (Yên Châu, Sơn La) khoảng 50 cá thể, Hang Kia - Pà Cò (Mai Châu, Hòa Bình) với 20 cá thể, con các nơi khác có số lượng rất thấp như ở Hoàng Liên hiện chỉ còn 3 cá thể và 6 cá thể ở Xuân Trường (Bào Lạc, Cao Bằng). Các cá thể Thông đỏ bắc phân bố rải rác, với mật độ 10-15 cây/ha, trên đường đỉnh và sườn núi và có mặt ở các tầng của thảm thực vật rừng kín thường xanh mùa mưa á nhiệt đới. Trên cơ sở kích thước đường kính cây, đã chia mỗi quần thể Thông đỏ bắc thành các nhóm tuổi khác nhau: cây tái sinh, cây có đường kính dưới 10 cm, cây có đường kính từ 11 - 20 cm, cây có đường kính từ 21 - 40 cm và cây có đường kính trên 40 cm (Bảng 3). Cây con tái sinh cũng được tìm thấy ở loài Thông đỏ bắc. Cây Thông đỏ bắc có đường kính trên 40 rất hiếm, phổ biến ở nhóm 1 và 2. Cây Thông đỏ bắc có đường kính lớn nhất gặp ở Hoàng Liên gồm chỉ có 3 cây với đường kính từ 45 đến 50 cm. Dẫn liệu về cấu trúc tuổi trong mỗi quần thể nghiên cứu đã chỉ ra rằng số cá thể non được sản sinh từ các cá

thể cái trưởng thành trong mỗi quần thể là khác nhau và phụ thuộc vào điều kiện môi trường sống, nơi sống và tác động của người dân địa phương. Tỷ lệ cá thể non được xác định là thấp nhất, 7.69% ở Mường Lưm. Tỷ lệ này là 12,5% ở Bát Đại Sơn và 14,28% ở Thài Phìn Tủng. Giá trị này cao nhất được ghi nhận ở Hoàng Liên là 60%, với 6 cá thể con mọc xung quanh một gốc Thông đỏ bắc mọc trên 1 kẻ đã đã bị chặt ngang ngực. Trong khi đó 2 khu vực Xuân Trường (Bào Lạc) và Hang Kia (Mai Châu) không tìm thấy cá thể non. Dẫn liệu về cấu trúc quần thể cũng chỉ ra rằng nhóm có đường kính ngang ngực dao động từ 11 đến 20 cm chiếm ưu thế ở quần thể Bát Đại Sơn (34,37%), Xuân Trường (40%), Hang Kia (44,44%). Nhóm có đường kính dưới 10 cm phổ biến ở quần thể Thài Phìn Tủng (71,43%). Đây là quần thể mới phục hồi khoảng chục năm gần đây sau khi thảm thực vật bị chặt phá hoàn toàn. Nhóm cây có đường kính dao động từ 21 đến 40 cm chiếm ưu thế ở quần thể Mường Lưm (46,15%). Nơi đây, thảm thực vật ít bị tác động bởi người dân hơn so với các quần thể ở Bát Đại Sơn.

**Bảng 3:** Cấu trúc tuổi quần thể của loài Thông đỏ bắc.

Quần thể	Số mẫu	Tỷ lệ phần trăm				
		Tái sinh	≤10 cm	11 - 20 cm	21 - 40 cm	> 40 cm
Bát Đại Sơn	32	12.5 (4 0.5)	31.25 (10 2-9)	34.37 (11 11-20)	21.87 (7 21-37)	
Thài Phìn Tủng	35	14.28 (5 0.5-1.5)	71.43 (25 2-10)	14.28 (5 11-17)		
Hoàng Liên	10	60 (6 0.5-1.2)			10 (1 40)	30 (3 45-50)
Bào Lạc	5		20 (1 5)	40 (2 11-13.2)	40 (2 22-25)	
Hang Kia	9		55,55 (5 2-9)	44,44 (4 12-18)		
Mường Lưm	26	7.69 (2 1-1,3)	23.08 (6 2-8)	23.08 (6: 15-20)	46.15 (12 25-40)	

Nơi sống của loài Thông nghiên cứu bị suy giảm rất nghiêm trọng liên quan đến các hoạt động của con người. Thảm thực vật, nơi sống của một số quần thể ở Hoàng Liên, Xuân Trường (Bào Lạc), Thài Phìn Tủng bị phá hủy hoàn toàn. Cấu trúc thảm thực vật ở nơi sống của các quần thể này là các cây bụi và luôn bị tác động bởi người dân địa phương như phát

triển nông nghiệp ở Xuân Trường (Bào Lạc), khai thác củi đốt ở Thài, Phìn Tủng, Hang Kia. Nơi sống còn lại của các quần thể khác bị thu hẹp và suy giảm đều liên quan đến các hoạt động của con người. Phần lớn thảm thực vật này đều là rừng thứ sinh như Mường Lưm. Hơn nữa, loài Thông nghiên cứu đều là đối tượng khai thác củi làm hàng mỹ nghệ, khai thác

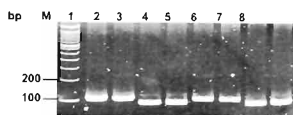
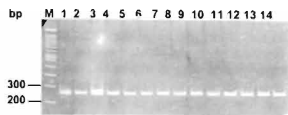
tận gốc để bán qua biên giới như ở Đồng Văn, Bảo Lạc; hoặc thu thập cây con trong rừng để làm cây cảnh bán cho khách du lịch như cây Thông đỏ Bắc ở Hoàng Liên. Kích thước quần thể của loài Thông nghiên cứu đều quá nhỏ, có thể không có khả năng duy trì sự sống trong tương lai không xa

### Kết quả tách chiết DNA tổng số và điện di sản phẩm PCR

Chúng tôi đã tách chiết DNA tổng số của 148 cá thể từ 6 quần thể của loài Thông đỏ Bắc. Sau khi tách chiết được DNA tổng số, để kiểm tra hàm lượng

và độ sạch của DNA tách được thì các mẫu DNA được đo quang phổ hấp thụ ở dài bước sóng từ 260-280nm. Kết quả thu được cho thấy, các mẫu DNA đều có một đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 260nm. Điều này chứng tỏ DNA tách chiết sạch, không bị lẫn tạp chất đảm bảo cho các nghiên cứu tiếp theo.

Sau khi hoàn thành phản ứng PCR, sản phẩm được điện di trên gel polyacrylamide 5% để phân tích đa hình DNA của các mẫu nghiên cứu. Phổ điện di sản phẩm PCR - SSR trên gel polyacrylamide 5% của một số cặp mẫu được minh họa bởi hình 2.



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR - SSR trên gel polyacrylamide 5% (A. Mẫu Pt 30204 và B. Pt 110048. M. marker phân tử 100bp, Giếng 1-14 tên các mẫu Thông đỏ Bắc

### Đa dạng di truyền quần thể và loài Thông đỏ Bắc

Với sáu cặp mẫu microsatellite (cpSSR) cho thấy, có 5/6 cặp mẫu chỉ ra tình đa hình với giá trị PIC dao động từ 0 (pt 30204) đến 0,626 (pt 15169), trung bình 0,456. Giá trị PIC < 0,456 thấp (< 0,6) đã chỉ ra mức độ khác nhau về di truyền giữa các cá thể nghiên cứu thấp. Số lượng các phân đoạn DNA nhân bản với mỗi mẫu xê dịch từ 1 đến 3 phân đoạn. Kích thước các phân đoạn DNA được nhân bản trong khoảng từ 100 bp đến 300 bp. Tổng số phân đoạn DNA khi phân tích với 6 cặp mẫu cpSSR là 15 phân đoạn. Trong đó có 11 phân đoạn đa hình chiếm 73,33% và 4 phân đoạn đồng hình chiếm 26,67%. Chỉ một locus đơn hình được tìm thấy ở cặp mẫu Pt30204. Tuy nhiên, tỉ lệ phân đoạn giữa các cặp mẫu khác nhau, dao động từ 50,00% ở cặp mẫu Pt110048

đến 100% ở 2 cặp mẫu Pt15169 và Pt 71936, trung bình 63,89% (Bảng 4).

Bảng 5 chỉ ra mức độ đa dạng di truyền cao xuất hiện ở quần thể Bat Đai Sơn (A = 1,46, P = 41,67%, He = 0,123 và Ho = 0,124). Giá trị đa dạng di truyền thấp nhất được tìm thấy ở quần thể Bảo Lạc (A = 1,35, P = 25,00%; He = 0,108 và Ho = 0,083). Giá trị trung bình này ở các quần thể trong loài Thông đỏ Bắc (*Taxus chinensis*) là A = 1,141, P = 34,62%; He = 0,121 và Ho = 0,107. Ở 5 quần thể trừ quần thể Thủ Phìn Tùng hệ số gen di hợp tự quan sát (Ho) nhỏ hơn hệ số gen hợp tự kì vọng (0,121) chứng tỏ rằng trong các quần thể Thông đỏ Bắc đó có mức độ cao của hệ số gen đồng hợp tự là do sự thiếu hụt gen dị hợp tự, là hậu quả của mối quan hệ cận loài giữa các cá thể trong kích thước quần thể nhỏ.

Bảng 4. Giá trị PIC và tỉ lệ phân đoạn đa hình của 148 cá thể Thông đỏ Bắc

Stt	Cặp mẫu SSR	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tỉ lệ phân đoạn đa hình
1	Pt 71936	0,572	3	0	100,00
2	Pt110048	0,431	1	1	50,00
3	Pt 87268	0,542	2	1	66,67
4	Pt 26081	0,563	2	1	66,67
5	Pt 15169	0,626	3	0	100,00
6	Pt 30204	0	0	1	0,00
Tổng		0,456	11	4	63,89

**Bảng 5.** Đa dạng di truyền của 6 quần thể loài Thông đỏ Bắc với N kích thước mẫu, A, số allele tại một locus, P tỉ lệ phần lõi cắt đa hình, H<sub>o</sub> tần số gen di hợp từ quan sát và H<sub>e</sub> tần số gen di hợp từ kì vọng.

Quần thể	N	A	P	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
Thái Phìn Tung	35	1,48	41,67	0,105	0,101
Bát Đại Sơn	31	1,46	41,67	0,124	0,123
Hoàng Liên	35	1,5	41,67	0,105	0,138
Bào Lạc	6	1,35	25,00	0,083	0,108
Mường Lũm	28	1,33	33,33	0,119	0,137
Hàng Kìa	14	1,31	25,00	0,107	0,121
Trung bình		1,141	34,62	0,107	0,121

Kết quả trình bày ở trên đã chỉ ra rằng mức độ đa dạng di truyền thấp cả 2 mức độ quần thể và loài của loài Thông đỏ bắc (*Taxus chinensis*) ở Việt Nam khi so sánh với một số loài Thông khác đã nghiên cứu bởi một số tác giả khác. Đa dạng di truyền duy trì A = 1.41 (1,31-1,5), H<sub>o</sub> = 0,107 (0,083-1,24) và H<sub>e</sub> = 0,121 (0,101- 0,138) cho loài Thông đỏ Bắc. Trong khi đó, mức độ đa dạng di truyền cao ở một số loài Thông khác khi sử dụng chỉ thị SSR như *Pinus strobus* (H<sub>o</sub> = 0,515; Echt et al., 1999), *P. resinosa* (H<sub>o</sub> = 0,185; Boy et al., 2005), *Cedrus atlantica* (P = 65,2%, H<sub>e</sub> = 0,95; Terral et al., 2006); chỉ thị isozym cho loài Thông *Picea abies* (P = 76,4%, H = 0,420; Lundkvist, 1979), *Pinus longaeva* (P = 94,5%, H = 0,484; Hichert et al., 1983), *Pinus strobus* (P = 47%, H<sub>o</sub> = 0,215, H<sub>e</sub> = 0,195; Rajora et al., 1998) và *Pinus bruta* (P = 68%, H<sub>o</sub> = 0,191, H<sub>e</sub> = 0,271; Korol et al., 2002); chỉ thị RAPD cho *C. atlantica* (H = 0,191; Renau-Morata et al., 2005). Mức độ đa dạng di truyền thấp cũng được xác định ở một số loài Thông như *Abies finkii* (P = 30,2%, H = 0,113), *A. guatemalensis* (P = 20%, H = 0,069), *A. lueckii* (P = 28,2%, H = 0,1) và *A. religiosa* (P = 31,8%, H = 0,108; Aguirre-Planter et al., 2000), *Pinus longaeva* (P = 38,9%, H<sub>o</sub> = 0,122, H<sub>e</sub> = 0,134 dùng chỉ thị isozym và P = 34,1%, H<sub>e</sub> = 0,130 dùng chỉ thị RAPD; Lee et al., 2002); *Picea breweriana* (P = 44,2%, H = 0,129, Ledig et al., 2005); *A. sibirica* (P = 20%, H = 0,064; Larionova et al., 2007); và sử dụng isozym ở loài Thủy tùng *Glyptostrobus pensilis* ở Trung Quốc (P = 24,7%, H = 0,122, Li et al., 2005), và dùng chỉ thị ISSR (inter-simple sequence repeat) cho loài Sa mu đầu *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* (P = 49,35% và H = 0,063, Tam et al., 2009) và Pơ mu *Fokienia hodginsii* (P = 33,82% và H = 0,070; Tam et al., 2011) Kết quả của chúng tôi có thể giả thiết rằng mức độ đa dạng di truyền thấp ở cả mức độ loài và quần thể của loài Thông nghiên cứu liên quan đến nơi sống của

chúng bị phân cắt và thêm vào đó các quần thể đều duy trì kích thước nhỏ và cô lập với nhau. Giả thiết này phù hợp với lý thuyết và được dự báo về khả năng mất tính đa dạng di truyền liên quan đến kích thước quần thể nhỏ và cô lập dưới ảnh hưởng xấu bởi con người. Số lượng cá thể khảo sát tại mỗi quần thể là nhỏ và khác nhau đáng kể, khoảng dưới 30 cá thể ở một số quần thể trong rừng thứ sinh Hàng Kìa, Bào Lạc. Một số quần thể khác có số lượng cá thể dưới 100 được tìm thấy ở rừng thứ sinh Thái Phìn Tung, Bát Đại Sơn, Mường Lũm. Các quần thể như vậy thường xuất hiện môi quan hệ sinh sản cân bằng và ảnh hưởng của quá trình phiêu bạt di truyền (Barrert et al., 1991; Ellstrand et al., 1993).

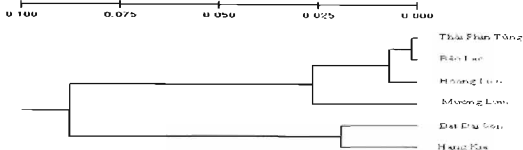
#### Hệ số tương đồng di truyền và khoảng cách di truyền

Hệ số tương đồng di truyền (I) và khoảng cách di truyền (D) nhân được sau khi so sánh các cặp quần thể với nhau và được ghi nhận ở bảng 6. *Hệ số tương đồng di truyền* đều vượt 0,9 cho tất cả các quần thể của loài Thông đỏ bắc. Giá trị I trung bình 0,947, dao động từ 0,874 (Mường Lũm/Hàng Kìa) đến 0,998 (Thái Phìn Tung/Bào Lạc) *Khoảng cách di truyền* (D) dao động từ 0,001 (Bào Lạc/Thái Phìn Tung) đến 0,135 (Hàng Kìa/Mường Lũm), trung bình 0,074.

Phân tích NJ (Neighbor Joining) trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Nei (1972) đã tìm thấy mối quan hệ giữa các nhóm quần thể với nhau (Hình 3). Các quần thể Thông đỏ Bắc hình thành 2 nhóm. Một nhóm bao gồm 2 quần thể Bát Đại Sơn và Hàng Kìa, và chỉ ra hệ số gen di hợp từ dao động từ 0,121 đến 0,123, trung bình 0,122. Nhóm thứ hai gồm 4 quần thể còn lại. Tuy nhiên, ở nhóm này quần thể Mường Lũm tách riêng với hệ số gen di hợp từ quan sát cao nhất 0,119

**Bảng 6.** Hệ số tương đồng (trên) và khoảng cách di truyền (dưới) theo Nei (1972) cho các cấp quần thể của loài Thông đỏ Bắc (*Taxus chinensis*)

	Thái Phin Tùng	Bát Đại Sơn	Hoàng Liên	Bảo Lạc	Mường Lùm	Hàng Kia
Thái Phin Tùng	-	0,941	0,991	0,998	0,961	0,919
Bát Đại Sơn	0,061	-	0,933	0,939	0,905	0,981
Hoàng Liên	0,009	0,069	-	0,995	0,989	0,905
Bảo Lạc	0,001	0,062	0,005	-	0,972	0,916
Mường Lùm	0,040	0,099	0,011	0,028	-	0,874
Hàng Kia	0,085	0,019	0,100	0,087	0,135	-



**Hình 3.** Phân tích NJ trên cơ sở khoảng cách di truyền giữa các quần thể loài Thông đỏ Bắc

## KẾT LUẬN

Tất cả các quần thể Thông đỏ Bắc (*Taxus chinensis* (Pall.) Rehd) nghiên cứu ở 5 tỉnh phía Bắc Việt Nam đều có kích thước rất nhỏ trong các mảnh rừng bị suy giảm, thậm chí ngay cả trong các khu bảo tồn, dưới 50 cá thể cho mỗi quần thể, đặc biệt chỉ có 6 cá thể được tìm thấy ở Bảo Lạc - Cao Bằng. Hoạt động của con người đã làm suy giảm kích thước quần thể và ảnh hưởng đến cấu trúc tuổi của mỗi quần thể Thông.

Kết quả phân tích chỉ ra các quần thể Thông đỏ bắc (*Taxus chinensis*) đều có tính đa dạng di truyền thấp. Số allele cho một locus trung bình 1,41 (1,31-1,5), tỷ số locus đa hình trung bình 34,62% (25,00-41,67%), hệ số gen di hợp tự quan sát trung bình 0,107 (0,083-0,124) và hệ số gen di hợp tự kỳ vọng trung bình 0,121 (0,101-0,138).

Trên cơ sở phân tích cấu trúc hình cây về mối quan hệ giữa các quần thể thông đỏ bắc với nhau trên cơ sở khoảng cách di truyền đã chỉ ra 2 nhóm chính nhóm I gồm 2 quần thể Bát Đại Sơn và Hàng Kia,

nhóm II gồm 4 quần thể Thái Phin Tùng, Mường Lùm, Hoàng Liên và Bảo Lạc.

## MỘT SỐ GIẢI PHÁP BẢO TỒN VÀ PHỤC HỒI LOÀI

Từ kết quả khảo sát thực địa và phân tích đa dạng di truyền nhận thấy tất cả các quần thể có tính đa dạng di truyền thấp nên trước tiên, phải bảo vệ nghiêm ngặt nơi sống của các loài đang bị đe dọa và cấm khai thác rừng. Nơi sống bị phân cắt và suy giảm dẫn đến kích thước quần thể bị thu nhỏ và cô lập, ảnh hưởng xấu đến quá trình thu phân giữa các cá thể trong quần thể và làm tăng tần số gen đồng hợp tử ở mức độ cá thể và quần thể.

Ngoài vấn đề bảo vệ quần thể và loài trong các khu bảo vệ cũng với việc khôi phục nơi sống của chúng, một vấn đề quan trọng khác trong phục hồi và phát triển bền vững của loài thông này, các nhà quản lý cần phải thiết lập vườn giống với chất lượng cao về mặt di truyền với nguồn giống bố mẹ tự hạt được thu thập từ các quần thể hiện có cho mỗi loài. Thế hệ

tiếp theo mới được sử dụng để phục hồi quần thể và loài. Nếu có thể, thiết lập vườn giống bảo tồn Thông tại khu vực rừng thứ sinh tại Thái Phin Tung. Nơi này đáp ứng được điều kiện sống của chúng.

Một công tác phục vụ cho cả bảo tồn nguyên vẹn và chuyển vị là nâng cao hiểu biết của người dân địa phương cũng như lợi ích của họ về bảo vệ rừng nói chung và bảo tồn loài nói riêng.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề án "Bảo tồn và sử dụng bền vững một số loài thông quý hiếm có giá trị kinh tế cao đang bị đe dọa tuyệt chủng và khu hệ nấm nội kỷ sinh có ích trong các loài nghiên cứu".

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aquirre-Planter I, Furnier GR, Eguarte LE (2000) Low levels genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *Amer. J. Bot.* 87: 362-371
- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In Falk DA and Holsinger KE. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press. 3-30
- Boyd J, Cherry M, Dayanandan S (2005) Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 92(5): 833-841
- Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007) *Sách Đỏ Việt Nam - Phần 2: Thực vật*. NXB KHTN & CN. 528-529
- Chính Phủ nước CHXHCN Việt Nam, Nghị định 32/2006 ND-CP (2006) Nghị định của Chính phủ ngày 30 tháng 3 năm 2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm
- Doyle JJ, Doyle DJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Procs* 12: 13-15
- Echt CS, Vendramin GG, Neilson CD, Marquardt P (1999) Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Canada Journal of Forest Resources* 29: 365-371.
- Ellstrand NC, Elam RD (1993) Population genetic consequences of small population size implication for plant conservation. *Plant Cons. Gen.* 2:17-242
- Goncharenko GG, Padutov VE, Silm E (1993) Allozyme variation in natural populations of Eurasian pines II. Genetic variation, diversity, differentiation, and gene flow in *Pinus sibirica* Du Tour in some lowland and mountain populations. - *Silvae Genet* 42: 246-258
- Hichert RD, Hamrick JL (1983) Patterns and levels of genetic variation in Great Basin bristlecone pine, *Pinus longaeva*. - *Evolution*, 37(2): 302-311.
- IUCN (2012) *IUCN Red List of Threatened Species* version 2012.2
- Korol L, Shklar G, Schiller G (2002) Diversity among Circum-Mediterranean populations of Aleppo pine differentiation from Brutia pine in their isoenzymes: Additional results. *Silvae Genet.* 51(1): 35-41
- Larionova AY, Ekan AK, Kravchenko AN (2007) Genetic diversity and population structure of Siberian fir (*Abies sibirica* LEDER.) in Middle Siberia, Russia. *Eurasian J. For. Res.* 10(2): 185-192
- Li F, Xia N (2005). Population structure and genetic diversity of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae). *Bot. Bull. Aca Sin* 46: 155-162.
- Ledig F T, 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
- Lee SW, Ledig FT, Johnson DR (2002) Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longuana* (Pinaceae) of the White mountains, California. *Amer. J. Bot.* 89. 566-577.
- Lundkvist K (1979) Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* K.) I. Estimation of genetic variation within and among populations. Genetic linkage and a mating system parameter. *Hereditas*, 90: 127-143.
- Nguyễn Đức T, Lưu P, Thomas (2004) *Cây lá kim Việt Nam*. NXB Trẻ giới thiệu
- Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004) *Các loài cây lá kim ở Việt Nam*. NXB nông nghiệp
- Nguyễn Tiến Hiệp, Phan Kế Lộc, Nguyễn Đức Tô Lưu, Philip Lan Thomas, Aljos Farjon, Leonid Averyanov, Jacinto Regalado Jr (2004) Thông Việt nam, Nghiên cứu hiện trạng và bảo tồn. NXB Lao Động Xã hội, Hà Nội. 110-113.
- Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn T. Phương Trang, Nguyễn Thị Hoa (2009) Genetic variation in threatened conifer *Cunninghamia lanceolata* var *konishi* using ISSR markers: Implications for conservation. *J. Biol.* 31(2): 66-72.
- Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn T. Phương Trang, Nguyễn Thị Hoa (2011) Genetic diversity of an endangered species, *Fokienia hodginsii* (Cupressaceae). *African J. Biotech.* 10(71): 15838-15844



Nguyễn Sinh Khang, Phạm Văn Thế, Nguyễn Tiên Vinh, Nguyễn Quang Hiếu, Nguyễn Tiến Hiệp và Nguyễn Trương Sơn (2011) Nhân giống Thông đỏ bắc - *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehder tại Khu Bảo tồn Thiên nhiên Bát Đạt Sơn, Quốc Quan Bạ, tỉnh Hà Giang. *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4* 656-660

Peakall R, Smouse PE (2012) GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6.5 288-295

Rajora OP, DeVerno L, Mosseler A, Innes DJ (1998) Genetic diversity and population structure of disjunct Newfoundland and central Ontario populations of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Amer J. Bot* 76: 500-508.

Renau-Morata B, Nebauer SG, Sales E, Allainguillaume J, Caligari H, Segura J (2005) Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus*

*atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. *Amer J. Bot.* 92 875-884

Shea KL, Furnier GR (2002) Genetic variation and population structure in central and isolated populations of halsam fir, *Abies balsamea* (Pinaceae). - *Amer J Bot* 76 1395-1403

Terrab A, Paun O, Talavera S, Tremetsberger K, Arista M, Stuessy TF (2006) Genetic diversity and population structure in natural populations of Moroccan Atlas cedar (*Cedrus atlantica*, Pinaceae) determined with cpSSR markers. *Amer J Bot* 93(9) 1274-1280

Trình Thu Thủy, Nguyễn Thanh Tâm, Trình Văn Sung (2005) Taxoids and Biflavonoid from *Taxus chinensis*. *Journal of Chemistry*. 43(4):503-507

Vendramin GG, Lelli L, Rossi P, Morgante M (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol Ecol* 5: 595-598

## ANALYSIS GENETIC VARIATION OF SPECIES *TAXUS CHINENSIS* (Pilg.) Rehder USING SSR MARKERS FOR CONSERVATION PURPOSE

Vu Dinh Duy<sup>1\*</sup>, Bui Thi Tuyet Xuan<sup>2</sup>, Nguyen Minh Duc<sup>2</sup>, Nguyen Minh Tam<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology;

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd is considered as one of the endangered species and only distributed in Northern Vietnam. We investigated the genetic variability and pattern structure of six populations sampled in five province of Northern Vietnam: Cao Bang, Ha Giang, Lao Cai, Hoa Binh and Son La. A total of leaves or inner barks collected from 148 individuals of six populations were used to assess genetic diversity using SSR. Six primer pairs were used in this study at population and species levels. Among six primers pair then 5/6 primer pair revealed polymorphic with PIC value (Polymorphic Information Content) varied from 0 (pt 30204) to 0.626 (pt15169), an average of 0.456. The study results showed an average number of alleles for a locus was 1.142 (1.054 - 1.166), the average polymorphism 34.62% (25.00% - 41.67%). Observed heterozygosity averaged 0.107 (0.083 - 0.124) and expected one averaged 0.121 (0.101 - 0.138). The results suggest that small population sizes isolation have led to an increase of inbred individuals within populations. A number of measures applied to the conservation and sustainable development were also discussed.

**Keywords:** conservation, genetic variation, microsatellite (SSR), *Taxus chinensis*