

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN LOÀI THÔNG ĐỎ LÁ DÀI (*TAXUS WALLICHINANA* ZUCC.) HỌ THÔNG ĐỎ (TAXACEAE) Ở TỈNH LÂM ĐỒNG

Vũ Đình Duy¹, Bùi Thị Tuyết Xuân², Nguyễn Minh Tâm¹, Nguyễn Văn Sinh²

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

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

TÓM TẮT

Thông đỏ lá dài (*Taxus wallihamia* Zucc.) là loài đang bị đe dọa tuyệt chủng và chỉ phân bố ở tỉnh Lâm Đồng. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá hiện trạng phân bố và mức độ đa dạng di truyền của 4 quần thể Thông đỏ lá dài ở hai huyện Đơn Dương: Đức Trọng và TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Mẫu lá hoặc vỏ cây thu thập từ 87 cá thể thuộc 4 quần thể đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử SSR lục lạp (cpSSR). Trong số 6 cặp mỗi SSR lục lạp (cpSSR) dùng để phân tích thì có 5/6 cặp mỗi chỉ ra tình đa hình với giá trị PIC (Polymorphic Information Content - hàm lượng thông tin đa hình) dao động từ 0 (pt 30204) đến 0,543 (pt 15169), trung bình 0,374. Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra số allele trung bình cho một locus là 1,45 (1,34 - 1,5), tỷ số locus đa hình trung bình 29,17% (25,00 - 41,67%). Hệ số gen di hợp tự quan sát trung bình 0,095 (0,071 - 0,111) và hệ số gen di hợp tự kỳ vọng trung bình 0,109 (0,09 - 0,133). 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, SSR lục lạp (cpSSR), *Taxus wallihamia*, Thông đỏ lá dài.

MỞ ĐẦU

Loài Thông đỏ lá dài (*Taxus wallihamia* Zucc.) thuộc chi Thông đỏ (*Taxus*), họ Thông đỏ (Taxaceae) là loài quý hiếm có giá trị đặc biệt về mặt y học được sử dụng để sản xuất taxol (hợp chất chữa bệnh ung thư) (Trình Thị Thủy *et al.*, 2005), xây dựng nhà cửa, đóng đồ dùng gia đình, thủ công mỹ nghệ và lâm cảnh. Loài này phân bố ở vùng núi đất tỉnh Lâm Đồng. Theo các tiêu chí mới của IUCN 2013 loài này hiện được xếp ở bậc đe dọa nguy cấp (A2acd), tại Việt Nam loài này đã được dẫn trong sách đỏ Việt Nam 2007 (VU A1a, c) 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/NĐ - 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 Tổ Lưu và đồng tác giả (2004) và Nguyễn Tiến Hiệp và đồng tác giả (2004) đã chỉ ra rằng Thông đỏ lá dài phân bố tàn lụi, với kích thước quần thể rất nhỏ. Thông đỏ lá dài hiện có mặt tại một số địa điểm như huyện Lạc Dương (VQG Bidoup - Núi Bà), TP Đà Lạt (Xuân Trường, Xuân Thọ), Đức Trọng (Núi Voi) và Sơn

Dương (Hồ Tiên). 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) (Lê Xuân Tùng, 2000). Tuy nhiên, các nhà quản lý và các nhà khoa học còn thiếu các thông tin quan trọng về đa dạng di truyền ở cả 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 đỏ lá dài 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 hoá của loài.

Hiện nay, có nhiều chỉ thị phân tử (RAPD, RFLP, ISSR, SSR, ...) đã được sử dụng trong các nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể và loài thực vật nói chung và các loài Thông đang có nguy cơ bị đe dọa nói riêng (Goncharrenko *et al.*, 1993; Shea, Furnier, 2002; Ledig *et al.*, 2005; Nguyễn Minh Tâm *et al.*, 2009, 2011; Vũ Đình Duy *et al.*, 2010). Trong đó, kỹ thuật SSR đã nhanh chóng trở thành kỹ thuật hữu hiệu và được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu SSR được sử dụng rộng rãi trong nghiên

cứ nhờ các đặc tính ưu việt của chúng: sự phân bố rộng trong hệ gen, tính di truyền đồng trội, tính lặp lại, bản chất đa allele và vị trí đặc hiệu ở nhiễm sắc thể SSR là đoạn DNA có trình tự lặp lại liên tiếp, mỗi đơn vị lặp lại có từ 2 đến 5 nucleotide và số lần lặp lại có thể từ hàng chục đến hàng trăm lần. Chính sự khác nhau về số lần lặp lại đem lại mức độ đa hình giữa các allele. Chỉ thị SSR không những phân bố ở các đoạn trình tự không mã hóa mà còn tìm thấy trong đoạn trình tự mã hóa, trong lục lạp (Chung *et al.*, 2006) và ty thể của sinh vật (Rajendrakumar *et al.*, 2007)

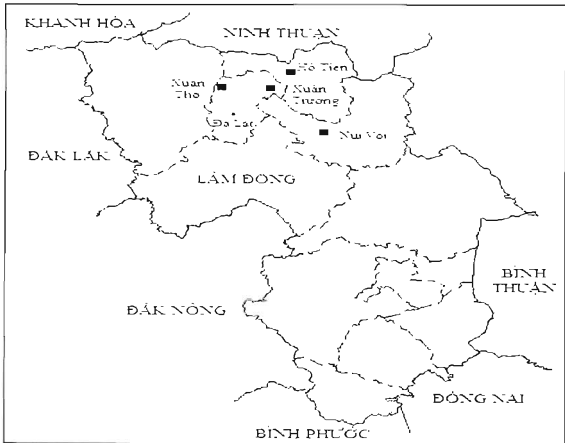
Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích 6 cặp marker SSR lục lạp (cpSSR) để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài Thông đỏ lá dài sống tự nhiên ở tỉnh Lâm Đồng và đề xuất một số giải pháp bảo tồn và phục hồi chúng ở Việt Nam

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Địa điểm và phương pháp khảo sát thực địa

Nghiên cứu được tiến hành tại 4 quần thể thuộc huyện Đơn Dương; Đức Trọng và TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng (Hình 1).

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 lá dài 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 lá dài

Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 87 mẫu lá hoặc vỏ cây từ 4 quần thể đã được tác giả thu thập ngẫu nhiên (Bảng 1). Tại hiện trường mẫu thu được ghi số cũng với đặc

điểm sinh học của cây lấy mẫu và bao quan trong silicagel, 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. Sáu cặp mồi SSR lục lạp (cpSSR) 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).

Bảng 1. Địa điểm và số mẫu Thông đỏ lá dài được thu thập

Quần thể	Số mẫu	Địa điểm	Độ cao	Vĩ độ	Kinh độ
Núi Voi	36	Núi Voi, Đức Trọng, Lâm Đồng	1475 m	11°50' B	108°25' Đ
Xuân Trường	12	Xuân Trường, TP Đà Lạt, Lâm Đồng	1266 m	11°47' B	108°28' Đ
Hồ Tiên	33	Hồ Tiên, Đơn Dương, Lâm Đồng	1390 m	11°48' B	108°29' Đ
Xuân Thọ	6	Xuân Thọ, TP Đà Lạt, Lâm Đồng	1450 m	11°57' B	108°36' Đ

Bảng 2. Trình tự các nucleotide của 6 cặp mồi cpSSR

Stt	Tên mồi	Mồi	Trình tự mồi	Nguồn tài liệu
1	Pi 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	Pi 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	Pi 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	Pi 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	Pi 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	Pi 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'	

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

Mẫu được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (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 đúng cho phản ứng PCR ở nồng độ 10 ng/ μ l.

Nhân bản DNA

Thế tích mỗi phản ứng PCR là 25 μ l, trong đó chứa các thành phần gồm 12 μ l H₂O khử ion; 2,5 μ l dung dịch đệm buffer 10X, 2,5 μ l MgCl₂ 25 mM; 2,5 μ l dNTPs 2,5 mM, 1,25 μ l mồi xuôi (10 pmol); 1,25 μ l mồi ngược (10 pmol); 0,5 μ l *Taq* polymerase (5 U/ μ l); 2 μ l 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: 1 ký hiệu phân đoạn DNA xuất hiện và 0 ký hiệu phân đoạn DNA không xuất hiện, khu điện di sản phẩm PCR- cpSSR trên ban gel điện di polyacrylamide 5% các mẫu nghiên cứu. Các thông số quan trọng trong nghiên cứu di truyền quần thể được xác định và phân tích bao gồm: giá trị PIC, số allele tại một locus (A), tỉ lệ phân trăm locus đa hình (P) với mức độ tin cậy 95%, tần số gen dị hợp tử quan sát H₀ và tần số gen dị hợp tử kỳ vọng dưới điều kiện cân bằng Hardy- Weinberg H_e, F_{is} - hệ số dư thừa gen đồng hợp tử trong quần thể, xác định hệ số tương đồng và khoảng cách di truyền theo Nei

(1972) 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 GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiện trạng quần thể và loài Thông đỏ lá dài

Loài Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) phân bố ở tỉnh Lâm Đồng. Chúng tôi tìm thấy ở những mảnh rừng thường xanh hỗn giao ở độ cao trên 1000 m trên đất feralit phát triển trên đá bazan. Loại đất này giàu chất dinh dưỡng. Thảm thực vật ở đây bị tác động mạnh bởi các hoạt động mạnh bởi người dân địa phương. Phần lớn thảm thực vật bị phá hủy mạnh để mở rộng đất nông nghiệp vào những năm 1980 và 1990. Hiện nay chỉ còn một số mảnh rừng còn sót lại xen lẫn những thảm cỏ cây bụi như ở Xuân Trường hoặc chỉ còn một vạt rừng nhỏ ven suối như ở Hồ Tiên và Xuân Thọ và được bao quanh bởi rừng thông hai lá (*Pinus krempfi*). Tuy nhiên, diện tích thảm thực vật rừng ở Núi Voi còn khá lớn so với Hồ Tiên, Xuân Trường và Xuân Thọ. Cấu trúc rừng ở đây thường có 4 tầng. Tầng ưu thế sinh thái gồm có các loài cây gỗ thuộc họ Dẻ (*Fagaceae*), Dầu (*Dipterocarpaceae*) với các loài Dầu nước (*Dipterocarpus alatus*), Dầu lông (*Dipterocarpus intricatus*), Cẩm lai vú (*Dalbergia*

mammosa), Gỗ đỏ (*Azelia xylocarpa*), Dáng hương (*Pterocarpus macrocarpus*). Một số loài thuộc Bộ Thông như Đinh tùng (*Cephalotaxus mannii*), Thông ba lá (*Pinus kesiya*), Thông nằng (*Dacrydium intricatum*), Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana*) cũng có mặt ở đây và một số họ khác như họ Thị (Ebenaceae), Côm (Elaeocarpaceae), Sô (Dilleniaceae). Tầng dưới tán gồm các cây con của tầng ưu thế sinh thái và các loài cây gỗ nhỏ và trung bình thuộc họ Vòi voi (Boraginaceae), Sầu (Anacardiaceae), Thầu dầu (Euphorbiaceae), Mông (Flacourtiaceae). Tầng cây bụi và cây cỏ với các loài họ Mua (Melastomaceae), Bông (Malvaceae), Dâu tằm (Moraceae), Đơn nem (Myrsinaceae), Cỏ roi ngựa (Verbenaceae), Araceae và Hòa thảo (Poaceae).

Loài thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana*) chi tập trung ở Lâm Đồng với số lượng cá thể và quần thể bị hạn chế, chẳng hạn ở khu vực Lạc Dương (Xuân Trường và Xuân Thọ) có số lượng còn tương đối cũng không vượt quá 100 cá thể cho cả 2 khu vực nghiên cứu. Ở khu rừng thứ sinh Xuân Trường có khoảng 60 cá thể và ở Xuân Thọ chỉ có 5 cá thể. Khu vực Núi Voi có số lượng cá thể khá hơn cũng không vượt quá 50 cá thể. Các cá thể Thông đỏ lá dài đều 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 mưa mùa á nhiệt đới.

Bảng 3. Cấu trúc tuổi quần thể của loài Thông đỏ lá dài

Quần thể	Số mẫu	Ti lệ phần trăm				
		Tái sinh	≤10 cm	11 - 20 cm	21 - 40 cm	> 40 cm
Hồ Tiên	32	40,62 (13 0,5 - 1)	31,25 (10 2 - 10)	6,25 (2 14 - 17)		21,87 (7 65 - 100)
Xuân Trường	11	63,64 (7 0,5 - 1,2)				36,36 (4 70 - 90)
Xuân Thọ	5	20,0 (1 0,5)		20,0 (1 17)	20,0 (1 30)	40,0 (2 45 - 120)
Núi Voi	36	50,0 (18 0,3 - 1)			11,76 (4 30 - 40)	38,89 (14 50 - 165)

Trên cơ sở kích thước đường kính cây, đã chia mỗi quần thể Thông đỏ lá dài 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 tái sinh đều xuất hiện nhiều ở các quần thể Thông đỏ lá dài. Ti lệ cá thể non được ghi

nhân ở Hồ Tiên (40,62%), Núi Voi (50%) và Xuân Trường (63,64%). Ti lệ này thấp nhất là 20% ở Xuân Thọ. Khu vực Xuân Thọ, nơi sống của Thông đỏ lá dài chỉ còn một vạt rừng ven suối còn sót lại, chủ yếu là cây bụi, lau lách, không thuận lợi cho khả năng tái sinh của hạt. Dẫn liệu về cấu trúc quần thể (Bảng 3) cũng chỉ ra rằng nhóm có đường kính

ngang ngực lớn hơn 40 cm đều xuất hiện nhiều ở các quần thể nghiên cứu. Không tìm thấy cá thể nào trong 2 quần thể Hồ Tiên và Xuân Trường trong nhóm có đường kính ngang ngực dao động từ 21 đến 40 cm và 3 quần thể Xuân Thọ, Núi Voi và Xuân Trường trong nhóm có đường kính ngang ngực nhỏ hơn 10 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.

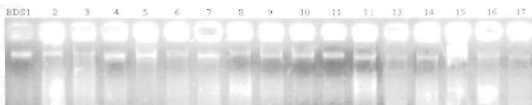
Kết quả tách chiết DNA tổng số và điện di sản phẩm PCR

Chúng tôi đã tách chiết DNA tổng số của 87 cá

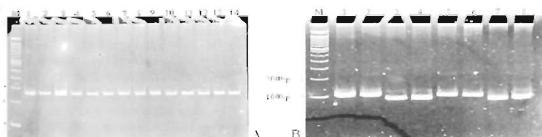
thể từ 4 quần thể của loài Thông đỏ là dài. DNA tổng số của một số mẫu được minh họa ở hình 2.

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 dải bước sóng từ 260 - 280 nm. Kết quả thu được cho thấy, các mẫu DNA đều có một đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 260 nm 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 3.



Hình 2. DNA tổng số đại diện của loài Thông đỏ là dài điện di trên gel agarose 0,9%



Hình 3. Sản phẩm PCR - cpSSR trên gel polyacrylamide 5% (A. Mỗi Pt 30204 và B Pt 87268, M marker phân tử 100 bp, Giếng 1-14 các mẫu Thông đỏ là dài)

Đa dạng di truyền quần thể và loài Thông đỏ là dài

Với sáu cặp mỗi SSR lục lạp (cpSSR) cho thấy, có 5/6 cặp mỗi chỉ ra tính đa hình với giá trị PIC dao động từ 0 (pt 30204) đến 0,626 (pt 15169), trung bình 0,456. Giá trị PIC = 0,374 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 về dịch từ 1 đến 3 phân đoạn. Kích thước các phân đoạn

DNA được nhận bản trong khoảng từ 100 bp đến 300 bp Tổng số phân đoạn DNA khi phân tích với 6 cặp mỗi 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 mỗi Pt30204. Tuy nhiên, tỉ lệ phân đoạn giữa các cặp mỗi khác nhau, dao động từ 50,00% ở cặp mỗi Pt10048 đến 100% ở 2 cặp mỗi Pt15169 và Pt71936, trung bình 63,89% (Bảng 4)

Bảng 4. Giá trị PIC và tỉ lệ phân đoạn đa hình của 87 cá thể Thông đỏ lá dài

Stt	Cặp mồi cpSSR	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tỉ lệ phân đoạn đa hình
1	Pt 71936	0,478	3	0	100,00
2	Pt 10048	0,329	1	1	50,00
3	Pt 87268	0,535	2	1	66,67
4	Pt 26081	0,368	2	1	66,67
5	Pt 15169	0,543	3	0	100,00
6	Pt 30204	0	0	1	0,00
Tổng			11	4	
Trung bình		0,374			63,89

Bảng 5. Đa dạng di truyền của 4 quần thể loài Thông đỏ lá dài

Quần thể	N	A	P	Ho	He	Fis
Núi Voi	36	1,34	25,00	0,100	0,090	-0,110
Xuân Trường	12	1,49	25,00	0,071	0,108	0,347***
Hồ Tiên	33	1,50	41,67	0,097	0,133	0,280
Xuân Thọ	6	1,47	25,00	0,111	0,106	-0,0526
Trung bình		1,45	29,17	0,095	0,109	

Ghi chú: Kích thước mẫu, A số allele tại một locus, P tỉ lệ locus đa hình, Ho tần số gen di hợp tử quan sát, He tần số gen di hợp tử kì vọng, Fis-Hệ số cân bằng, $p < 0,0001$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$

Bảng 5 chỉ ra mức độ đa dạng di truyền cao nhất hiện ở quần thể Hồ Tiên (A = 1,5; P = 41,67%; He = 0,133 và Ho = 0,097). Giá trị đa dạng di truyền thấp nhất được tìm thấy ở quần thể Xuân Trường (A = 1,49, P = 25%, He = 0,108 và Ho = 0,071). Giá trị trung bình này ở các quần thể trong loài Thông đỏ lá dài là A = 1,45, Ho = 0,095 và He = 0,109. Một số quần thể nghiên cứu (Xuân Trường, Hồ Tiên) có mức độ gen di hợp tử quan sát (Ho) thấp hơn gen di hợp tử kỳ vọng (He). Điều này phản ánh sự thiếu hụt lớn của gen di hợp tử có thể liên quan đến quan hệ cận huyết giữa các cá thể trong mỗi quần thể (Fis > 0,2) hoặc do cấu trúc tuổi quần thể được sản sinh từ thế hệ bỏ mẹ.

Kết quả trình bày ở trên đã chỉ ra rằng mức độ đa dạng di truyền thấp A = 1,45 (1,34 - 1,5), P = 29,17%, Ho = 0,095 (0,071 - 0,111) và He = 0,109 (0,09 - 0,133) của loài Thông đỏ lá dài ở Việt Nam khi so sánh với một số loài Thông khác đã nghiên cứu bởi một số tác giả khác. 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* (Ho = 0,515; Eght et al., 1999), *P. resinosa* (Ho = 0,185, Boy et al., 2005), *Cedrus atlantica* (P = 65,2%, He = 0,95; Terrab 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, Hichern et al., 1983), *Pinus strobus* (P = 47%, Ho = 0,215, He = 0,195; Rajora et al., 1998) và *Pinus brutia* (P = 68%, Ho = 0,191, He = 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 flinckii* (P = 30,2%, H = 0,113), *A. guatemalensis* (P = 20%, H = 0,069), *A. hickelii* (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%, Ho = 0,122, He = 0,134 dùng chỉ thị isozym và P = 34,1%, He = 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 Thuỳ tùng *Glyptostrobus pensalis* 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; Nguyen Minh Tam et al., 2009) và Pơ mu *Fokienia hodginsii* (P = 33,82% và H = 0,070; Nguyen Minh Tam et al., 2011). Kết quả của chúng tôi có thể giải thích rằng mức độ đa dạng di truyền thấp ở cả mức độ loài và

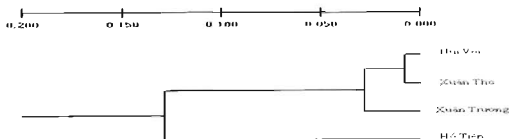
quần thể của loài Thông nghiên cứu liên quan đến nơi sống của chúng bị phân cắt và thêm vào đó các quần thể đều duy trì kích thước nhỏ và cô lập với nhau. Giả thiết này phù hợp với lý thuyết và được dự báo về khả năng mất tính đa dạng di truyền liên quan đến kích thước quần thể nhỏ và cô lập dưới ảnh 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 Xuân Trường, Xuân Thọ. Một số quần thể khác có số lượng cá thể dưới 100 được tìm thấy ở rừng thứ sinh Núi Voi, Hồ Tiên. Các quần thể như vậy thường xuất hiện mỗi quần thể sinh sản cận loài 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

Bảng 6. Hệ số tương đồng (trên) và khoảng cách di truyền (dưới) theo Nei (1972) cho các cặp quần thể của loài Thông đỏ lá dài

	Núi Voi	Xuân Trường	Hồ Tiên	Xuân Thọ
Núi Voi		0.967	0.899	0.992
Xuân Trường	0.033		0.844	0.977
Hồ Tiên	0.106	0.168		0.896
Xuân Thọ	0.007	0.022	0.110	-



Hình 4. Phân tích NJ trên cơ sở khoảng cách di truyền giữa các quần thể loài Thông đỏ lá dài

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 4). Các quần thể Thông đỏ lá dài hình thành 2 nhóm. Nhóm 1 quần thể Hồ Tiên được tách riêng và chỉ ra mức độ cao của gen dị hợp tử kỳ vọng (0,133) và tần số allele cao (1,50). Nhóm 2 gồm 3 quần thể Núi Voi, Xuân Trường và Xuân Thọ, trong đó quần thể Xuân Trường tách riêng so với 2 quần thể còn lại và

di truyền (D) nhận được sau khi so sánh các cặp quần thể với nhau và được ghi nhận ở bảng 6. *Hệ số tương đồng di truyền* dao động từ 0,844 (Xuân Trường/Hồ Tiên) đến 0,992 (Núi Voi/ Xuân Thọ), trung bình 0,929 cho loài Thông đỏ lá dài. *Khoảng cách di truyền (D)* dao động từ từ 0,007 (Xuân Thọ/Núi Voi) đến 0,168 (Hồ Tiên/Xuân Trường), trung bình 0,074

Đối với tất cả các quần thể của loài Thông nghiên cứu được điều tra tại một vùng và tách biệt nhau bởi khoảng cách địa lý và độc lập nhau bởi ma trận các hệ sinh thái khác nhau không giống nơi ở của chúng như đất trồng trọt, vườn nhà, thậm chí cây bụi hoặc khu định cư, chúng khá đồng nhất về mặt di truyền (hệ số di truyền tương đồng tương đối lớn hơn 0,9). Có sự khác nhau giữa tần số gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng và có ý nghĩa. Kết quả này có thể liên quan đến phương thức sinh sản cận loài cao diễn ra trong một số quần thể như Xuân Trường và Hồ Tiên.

chỉ ra mức độ cao hơn của gen dị hợp tử kỳ vọng (0,108) và tần số allele cao (1,49)

KẾT LUẬN

Tất cả các quần thể Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) ở tỉnh Lâm Đồng đều có kích thước nhỏ, dưới 100 cá thể cho mỗi quần thể, đặc biệt chỉ có 6 cá thể được tìm thấy ở Xuân Thọ, TP

Đà Lạt. Đây là hậu quả nơi sống của chúng bị suy giảm mạnh và khai thác không hợp lý với mục đích làm nông nghiệp, cây cảnh và cây thuốc. Số cây con chiếm tỷ lệ cao trong mỗi quần thể Thông đỏ là dài.

Kết quả phân tích chỉ ra các quần thể Thông đỏ là dài đều có tính đa dạng di truyền thấp. Số allele cho một locus trung bình $A = 1,45 (1,34 - 1,5)$, hệ số gen di hợp tự quan sát trung bình $H_o = 0,095 (0,071 - 0,111)$ và hệ số gen dị hợp tự kỳ vọng trung bình $H_e = 0,109 (0,09 - 0,133)$. Kết quả này phản ánh quá trình phân cắt nơi sống và kích thước quần thể nhỏ của loài Thông nghiên cứu. Mức độ cao của hệ số gen đồng hợp tử ở cả mức độ quần thể và loài là do sự thiếu hụt gen dị hợp tử, là hậu quả của mối quan hệ cận loài giữa các cá thể trong kích thước quần thể nhỏ.

Trên cơ sở khoảng cách di truyền theo Nei (1972) đã tìm thấy mối quan hệ giữa các nhóm quần thể với nhau. Các quần thể Thông đỏ là dài hình thành 2 nhóm: nhóm 1 quần thể Hồ Tiên được tách riêng; nhóm 2 gồm 3 quần thể Núi Voi, Xuân Thọ và Xuân Trường.

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 loài Thông đỏ là dài đang và cần khai thác rừng để cây con tái sinh phát triển. 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 trao đổi gen giữa các cá thể trong quần thể và làm tăng tần số gen đồng hợp tử ở mức độ cá thể và quần thể.

Ngay 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 từ hạt được thu thập từ các quần thể hiện có cho mỗi loài. Hệ thống 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 Hồ Tiên, Lạc Dương, Lâm Đồng. 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: Bài báo này là kết quả thực hiện được tài trợ 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" Mã số: VAST.BVMT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aquirre-Planter E, Furner GR, Eguiarte 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.
- Boy 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 Khoa học và Công nghệ. 528-529.
- Chính phủ nước CHXHCN Việt Nam, Nghị định 32/2006/NĐ-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
- Chung AM, Staub JE, Chen JF (2006) Molecular phylogeny of *Cucumis* species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation *Genome* 49:219-229.
- Doyle JJ, Doyle DJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Pocus* 12: 13-15.
- Echt CS, Vendramin GG, Neison CD, Marquardt P (1999) Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species *Can J For Res* 29: 365-371.
- Ellstrand NC, Elam RD (1993) Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation, *Plant Cons Gen*: 217-242
- Goncharenko GG, Padutov VE, Sihn 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 (2013) IUCN Red List of Threatened Species: version 2013 2

Korol L, ShkJar 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, Ekart AK, Kravchenko AN (2007) Genetic diversity and population structure of Siberian fir (*Abies sibirica* LEDER.) in Middle Siberia, Russia. *Euras 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 Acad Sin* 46: 155-162.

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. *Am J Bot* 92(12): 1975-1986.

Lee SW, Ledig FT, Johnson DR (2002) Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White mountains, California. *Amer J Bot* 89: 566-577

Lê Xuân Tung (2000) Đước đầu nghiên cứu kỹ thuật gây trồng cây thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.) tại Lâm Đồng. Đề tài cấp Bộ NN & PTNT

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. *Heredity* 90 127-143.

Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am J Bot* 72: 1590-1597

Nguyễn Đức T, Lưu và P. Thomas (2004) *Cây lá kim Việt Nam* NXB Thế giới mới

Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004) *Các loài cây lá kim ở Việt Nam* NXB Nông nghiệp

Nguyễn Tiến Hiệp, Phan Kê Lộc, Nguyễn Đức Tô Lưu, Philip Lan Thomas, Aijos Farjon, Leonid Averyanov, Jacinto Regalado J (2004) Thông Việt nam, Nghiên cứu hiện trạng và bảo tồn. NXB Lao Động Xã hội, Hà Nội 110-113.

Nguyen Minh Tam, Nguyen T Phuong Trang, Nguyen Thi Hoa (2009) Genetic variation in threatened conifer

Cunninghamia lanceolata var *konishi* using ISSR markers: Implications for conservation. *J Biol* 31(2): 66-72.

Nguyen Minh Tam, Nguyen T Phuong Trang, Nguyen Thi Hoa (2011) Genetic diversity of an endangered species, *Fokienia hodginsii* (Cupressaceae) *Afr J Biotech* 10(71): 15838-15844

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*). *Am J Bot* 76: 500-508.

Rajendrakumar P, Biswal AK, Balachandran SM, Srinivasarao K, Sundaram RM (2007). Simple sequence repeats in organellar genomes of rice, frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics* 23:1-4.

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. *Am J Bot* 92: 875-884.

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

Terrah 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. *Am J Bot* 93(9): 1274-1280

Trình Thị Thủy, Nguyễn Thanh Tâm, Trình Văn Sung (2005) Taxoids and Biflavonoid from *Taxus chinensis* *J Chem* 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.

Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, Trần Vinh, Nguyễn Minh Tâm (2010) Phân tích đa dạng và quan hệ di truyền quần thể Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis*) ở Đắk Lắk bằng chỉ thị SSR. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 8(3): 331-336

ANALYSIS GENETIC VARIATION OF SPECIES *TAXUS WALLICHIANA* (ZUCC.) (TAXACEAE) IN LAMDONG PROVINCEVu Dinh Duy^{1*}, Bui Thi Tuyet Xuan², Nguyen Minh Tam¹, Nguyen Van Sinh²¹Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology²Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Taxus wallichiana (Zucc.) is considered as one of the endangered species and only distributed in Lamdong province. We investigated the genetic variability and pattern structure of four populations sampled in two districts Don Duong: Duc Trong and Da Lat city, Lamdong province. A total of leaves or inner barks collected from 87 individuals of six populations were used to assess genetic diversity using cpSSR. Six primer pairs were used in this study at population and species levels. Five from six primer pairs revealed polymorphism with PIC value (Polymorphic Information Content) varied from 0 (pt 30204) to 0.543 (pt 15169), an average of 0.374. The study results showed an average number of alleles for a locus was 1.45 (1.34 - 1.5), the average polymorphism was 29.17% (25.00% - 41.67%). Observed heterozygosity was 0.095 in average (0.071 - 0.111) and expected heterozygosity ranged from 0.09 to 0.133, with an average of 0.109. The results suggest that small population size isolation had 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, chloroplast SSR (cpSSR), *Taxus wallichiana*

* Author for correspondence: E-mail, duyvu@vmm.vast.vn