

BẢO TỒN NGUỒN GEN DI TRUYỀN LOÀI THỦY TÙNG (*GLYPTOSTROBUS PENSILIS* (Staub) K.Koch) ĐANG BỊ ĐE ĐỌA TUYỆT CHỦNG TRẦM TRỌNG Ở VIỆT NAM

Vũ Đình Duy¹, Bùi Thị Tuyết Xuân², Hoàng Thị Thu Trang³, Nguyễn Minh Tâm¹, Nguyễn Văn Sinh²

¹Bảo 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

³Trường Đại học Lâm nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

Ngày nhận bài: 27.02.2014

Ngày nhận đăng: 20.3.2014

TÓM TẮT

Thủy tùng hay còn gọi là Thông nước (*Glyptostrobus pensilis* (Staub) K.Koch) là loài đang bị đe dọa tuyệt chủng trầm trọng và chỉ phân bố ở tỉnh Đắk Lắk. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá hiện trạng phân bố và mức độ đa dạng di truyền của 2 quần thể tại 2 huyện của tỉnh Đắk Lắk: EaH'Leo và Krông Năng. Mẫu lá hoặc vỏ cây thu thập từ 134 cá thể thuộc 2 quần thể đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền quần thể và loài bằng chỉ thị phân tử SSR lục lạp (cpSSR). Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra mức độ đa dạng di truyền của loài Thủy tùng thấp: Số allele trung bình cho một locus là 1,13 (1,07 - 1,19), tỷ số locus đa hình trung bình 33,33%, hệ số gen dị hợp tử quan sát trung bình 0,076 (0,059 - 0,087) và hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng trung bình 0,087 (0,056 - 0,119). Quần thể ở EaRa1 (EaH'Leo) có hệ số sinh sản cận ổn định cao ($F_{IS} > 0,2$) do đó hệ số gen đồng hợp tử cao ở quần thể EaRa1 và là hậu quả của sự tăng mối quan hệ sinh sản cận ổn định xuất hiện trong kích thước quần thể nhỏ. Sự khác nhau di truyền giữa các quần thể thấp vì vậy mức độ trao đổi di truyền giữa các cá thể cao. Sự sai khác di truyền của 134 mẫu nghiên cứu trên sơ đồ hình cây theo hệ số di truyền giống nhau của Jaccard với kiểu phân nhóm UPGMA (Unweighted Pair Group Method) đã chia làm 13 nhóm khác nhau. Hoạt động của con người đã làm suy giảm kích thước quần thể và ảnh hưởng đến cấu trúc tuổi của mỗi quần thể. 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, *Glyptostrobus pensilis*, SSR lục lạp (cpSSR), Thủy tùng

MỞ ĐẦU

Thủy tùng hay còn gọi là Thông nước (*Glyptostrobus pensilis* (Staub) K.Koch) họ Hoàng đàn (Cupressaceae). Ngày nay ở trên thế giới chỉ còn Thủy tùng đang sống ở 3 miền: tỉnh Quảng Đông (Trung Quốc) cùng vùng ven biển của một số tỉnh lân cận, tỉnh Borikhamxai (Lào) và tỉnh Đắk Lắk (Việt Nam).

Thủy tùng là loài cây đặc biệt quý và hiếm, rất tiếc do nhu cầu tăng thêm diện tích trồng lúa nước và tìm nguồn nước tưới cho cà phê cũng như gỗ làm nhà, đóng đồ mà hầu hết diện tích có Thủy tùng mọc đã bị hủy diệt. Theo các tiêu chí mới của IUCN 2013 loài Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staub) K.Koch) hiện được xếp ở bậc đe dọa tuyệt chủng trầm trọng (C2a(i)) vì có phân bố hẹp, số cá thể trưởng thành còn lại quá ít và chất lượng cây xấu, không có tái sinh tự nhiên, bị khai thác và chặt đẵn vì môi trường sống bị xâm phạm và thu hẹp. Cũng vì lý do trên, tại Việt Nam loài này đã được dẫn trong

sách đỏ Việt Nam và được pháp luật bảo vệ (năm trong nhóm IA của nghị định 32/2006/ ND- CP). 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 tuyệt chủng cao. Theo các tác giả Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004), Nguyễn Đức Tố Lưu và Thomas (2004) và Nguyễn Tiên Hiệp và đồng tác giả (2004) đã chỉ ra rằng loài Thủy tùng hiện chỉ gặp ở Ea H'Leo (Krông Búk) và Trấp Ksor (Krông Năng) thuộc tỉnh Đắk Lắk. Số lượng cá thể của loài này cũng chỉ còn khoảng 350 cây. Đã có biện pháp bảo vệ loài này với các hình thức khác nhau, như bảo vệ nguyên vẹn tại một số khu bảo tồn chiết cảnh, giám hom và nhân giống vô tính Thủy tùng (Trần Vinh., 1999; 2007; 2010; 2011; Nguyễn Đức Thành *et al.*, 2012). Tuy nhiên, các nhà quản lý và các nhà khoa học 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 của công tác bảo tồn và sử dụng bền vững loài Thông này, cũng

như các loài Thông khác có lịch sử sống tương tự. 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 Thủy tùng có ý nghĩa quan trọng.

Ngày nay, cùng với sự ra đời của các kỹ thuật chỉ thị phân tử (isozyme, RADP, RFLP, ISSR, SSR,...), từ những năm 1980 đã đem đến những sự tiến bộ ở tất cả các lĩnh vực của sinh học hiện đại, trong đó chỉ thị phân tử đóng vai trò ngày càng quan trọng trong nghiên cứu đa dạng di truyền, sự phát sinh chủng loại, sự tiến hóa giữa các loài và các giống (Nguyễn Đức Thành., 1999, Li, Xia, 2005, Ledig *et al.*, 2005, Nguyen Minh Tam *et al.*, 2009; 2011, Aguirre-Planter *et al.*, 2000). Đặc biệt đa hình DNA lục lạp đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu liên quan tới quá trình tiến hóa phân tử của genome lục lạp ở các loài thực vật bậc cao. Ưu điểm của nó so với DNA nhân là tính bảo thủ cao trong thiên nhiên, có kích thước nhỏ và tần số đột biến thấp hơn nhiều DNA nhân (Verdramin *et al.*, 1996, weising *et al.*, 1999). Các đặc điểm tiến hóa phân tử này trở nên hữu ích cho các nghiên cứu ở cấp độ loài và dưới loài về đa dạng di truyền, xác định mối quan hệ địa lý.

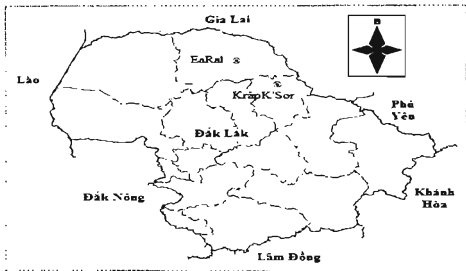
Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích 6 cặp mỗi SSR lục lạp (cpSSR) để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài Thủy tùng sống tự nhiên ở Việt Nam và đề xuất một số giải pháp bảo tồn và phục hồi chúng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Địa điểm và phương pháp khảo sát thực địa

Nghiên cứu được tiến hành tại 2 quần thể thuộc rừng thứ sinh EaRal (huyện Ea H'Leo) và Tráp Ksor (Krông Năng). Đây là những khu vực còn tồn tại loài Thông nghiên cứu trong rừng tự nhiên (Hình 1).

Kích thước quần thể của loài Thủy tùng là rất nhỏ, do đó sẽ thực hiện nghiên cứu toàn bộ. 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. Vị trí nghiên cứu được xác định trên cơ sở bản đồ địa hình tỷ lệ 1:50.000 và định vị khu vực nghiên cứu bằng máy định vị GPS.



Hình 1. Bản đồ chỉ ra địa điểm nghiên cứu loài Thủy tùng.

Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 134 cá thể thu được từ 2 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 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. Để xác định chính xác tên khoa học của loài Thủy tùng ở mỗi quần thể nghiên cứu, mẫu tiêu bản được thu thập và được lưu giữ tại Phòng Sinh học, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

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

| Quần thể | Số mẫu | Địa điểm | Độ cao (m) | Vĩ độ | Kinh độ |
|-----------|--------|--------------------------------|------------|-----------|-------------|
| EaRal | 117 | EaRal, EaH'Leo, ĐăkLăk | 570 | 13°09'Bắc | 108°18'Đông |
| TrápK'Sor | 17 | Tráp K'Sor, Krông Năng, ĐăkLăk | 756 | 13°01'Bắc | 108°09'Đông |

Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

Tách chiết DNA tổng số

Mẫu được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (1990). 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

Sáu cặp mỗi SSR lục lạp (cpSSR): Pt 15169; Pt 26081; Pt 30204; Pt 71936; Pt 110048; Pt 87268 (Vendramun *et al.*, 1996) đã được sử dụng để nhân bản DNA. Thể tích mỗi phản ứng PCR là 25 μl, trong đó chứa các thành phần gồm 12 μl H₂O khử ion; 2,5 μl dung dịch đệm buffer 10X; 2,5 μl MgCl₂ 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) Bối cặp: 55°C trong 1 phút; (4) Kéo dài: 72°C trong 1 phút; (5) Lặp lại (2) đến (4) 40 chu kì; (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 xTAE, nhuộm ethidium bromide và chụp ảnh trên máy soi gel CSL- MICRODOC, CLEARVER.

Phân tích số liệu

Các thông số quan trọng trong nghiên cứu di truyền quần thể và loài được xác định và phân tích. Số allele tại một locus: số alen trung bình (A), số alen hữu hiệu (Ae), số alen hiếm (Ap) và các thông số đa dạng di truyền quần thể: phần trăm locus đa hình (P) với mức độ tin cậy 95%, tần số gen dị hợp từ quan sát (Ho) và tần số gen dị hợp từ kỳ vọng (He) được tính toán và kiểm định tại tất cả các locus theo giả thuyết χ^2 về khả năng phù hợp với phương trình Hardy-Weinberg (HW). Các chỉ số thông kê F của Wright (1969), Fis - hệ số sai khác trong quần thể và Fst - hệ số sai khác giữa các quần thể trong loài.

Tất cả các thông số này được trình bày bởi công thức sau: Fis = [Hs - Ho]/ Hs với -1 ≤ Fis ≤ 1; Fit = [Ht - Ho]/ Ht với -1 ≤ Fit ≤ 1 và Fst = [Ht - Hs]/ Ht với 0 ≤ Fst ≤ 1. Sự sai khác di truyền giữa các quần thể được đánh giá theo tần số allele sử dụng hệ số khoảng cách di truyền (D) và tương đồng di truyền (I) theo Nei (1972). Tất cả các thông số trên được tính toán và phân tích bằng phần mềm GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012), FSTAT (Goudet., 1995) và TFGPA (Miller., 1997). Dẫn liệu cũng được phân tích bằng phần mềm Winboot (Yap, Nelso, 1996) để xây dựng mối quan hệ di truyền giữa các cá thể trong loài nghiên cứu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiện trạng quần thể và loài Thủy tùng

Loài thủy tùng, đây là loài chi còn phân bố ở ĐăkLăk với 2 dạng khu rừng đặc dụng EaRal thuộc huyện EaH'Leo với số lượng khoảng 200 cá thể và khu rừng đặc dụng Tráp K'sor, huyện Krông Năng chỉ còn khoảng 30 cá thể. Ngoài ra, còn một vài cây Thủy tùng còn sót lại trong thảm cỏ cây bụi ở Cư Né, Quảng Hà và Trường Hà. Loài Thủy tùng thường mọc và phát triển tập trung với mật độ cao, khoảng 200 cây/ha trong rừng dâm lầy.

Trên cơ sở kích thước đường kính cây, đã chia mỗi quần thể Thủy tùng thành 5 nhóm (nhóm 1: có đường kính dưới 20 cm, nhóm 2: 21 - 40 cm, nhóm 3: 41 - 60 cm, nhóm 4: 61 - 80 cm và nhóm 5: trên 81 cm). Số cây trung chủ yếu ở nhóm 1, 2, 3 và 4. Cùng đã gặp cây có đường kính khoảng trên 1 m ở Tráp K'sor. Cấu trúc tuổi quần thể của loài Thủy tùng được đề cập ở bảng 2. Không ghi nhận cá thể non ở các quần thể Thủy tùng có thể các khu vực nghiên cứu EaRal và Tráp K'sor, nơi sống của loài Thủy tùng luôn luôn bị ngập nước sâu vào cả 2 mùa khô và mùa mưa. Điều này sẽ hạn chế khả năng hạt nảy mầm khi rơi xuống mặt đất. Nhóm có thể chiếm ưu thế đều thuộc nhóm có đường kính dao động từ 21 đến 40 cm như ở EaRal (42,73%) và Tráp K'sor (35,29%). Nhóm có đường kính trên 81 cm chiếm tỷ lệ rất thấp 5,98% (EaRal) và 5,88% (Tráp K'sor) Sự

thiếu vắng các cá thể non dưới 10 cm và cây con có thể dẫn đến sự tuyệt chủng loài Thủy tùng trong thời gian không xa, nếu không có sự can thiệp của con người để phục hồi nơi sống và tăng kích thước của 2

quần thể EaRal và Tráp K'sor, cũng như phục hồi nơi sống của loài này ở một số khu vực, trước khi là nơi chiếm cứ của chúng như Cư Né, Quảng Hà và Trường Hà.

Bảng 2. Cấu trúc tuổi quần thể của loài Thủy tùng.

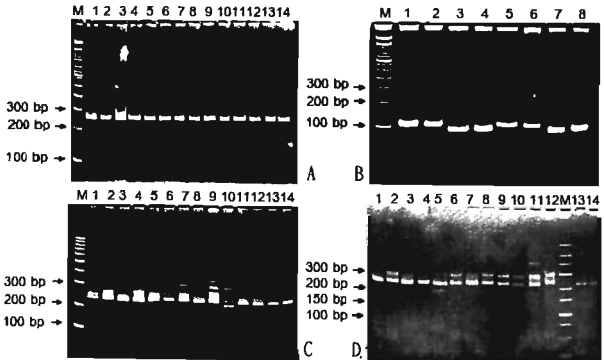
| Quần thể | Số mẫu | Tỷ lệ phần trăm | | | | |
|------------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | ≤ 20 cm | 21 - 40 cm | 41 - 60 cm | 61 - 80 cm | ≥ 81 cm |
| EaRal | 117 | 14,53 (17:12-20) | 42,73 (50:25-40) | 24,79 (29:45-60) | 11,11 (13:65-80) | 5,98 (7:100-150) |
| Tráp K'Sor | 17 | 17,65 (3:20) | 35,29 (6:25-40) | 17,65 (3:45-60) | 23,53 (4:65-80) | 5,88 (1:100) |

Đa dạng di truyền quần thể và loài Thủy tùng

Để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài của loài Thủy tùng nghiên cứu, các thông số di truyền được xác định bao gồm tần số allele, tỷ lệ phần trăm locus đa hình và các thông số khác trên cơ sở kết quả điện di sản phẩm PCR của 6 cặp mồi SSR lục lập (cpSSR). Mã hoá các phổ điện di cho mỗi bản gel được tiến hành cẩn thận và thí nghiệm được lặp lại cho đến khi đạt được kết quả hình 2.

đến 12 (EaRal). Tỷ lệ phần trăm locus đa hình cho loài Thủy tùng là 33,33%. 3 locus đa hình được xác định cho loài Thủy tùng: locus pt15169, pt110048 và pt87268. Số allele cho mỗi locus đa hình là khác nhau ở cả 2 mức độ quần thể và loài. Ở mức độ loài, 3 allele được xác định ở 2 locus pt110048 và pt87268; 5 allele ở locus pt15169. Ở mức độ quần thể, 2 allele khác nhau được tìm thấy ở locus pt110048 với quần thể Tráp K'sor, 3 allele được xác định ở locus pt110048 với quần thể EaRal, locus pt87268 với Tráp K'sor và 5 allele ở locus pt15169 với quần thể EaRal.

Sáu cặp mồi SSR lục lập (cpSSR) đã tìm thấy 14 allele cho loài Thủy tùng dao động từ 9 (Tráp K'sor)



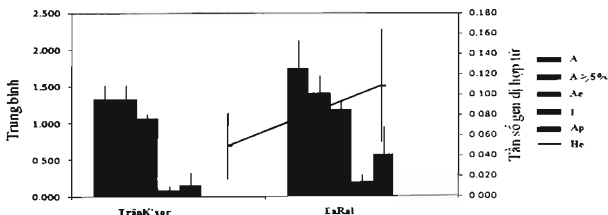
Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR - cpSSR trên gel Polyacrylamide 5% . (A: Mồi Pt 26081, B: pt87268, C: pt15169, D: pt110048; M: marker phân tử 100bp, Giếng 1-14: tên các mẫu Thủy tùng).

Cấu trúc không gian của allele tại các quần thể của 3 loài Thông nghiên cứu được trình bày ở hình 3. Quần thể Tráp K'sor thường có các thông số về allele thấp hơn so với EaRal. Giá trị các allele trung bình cho một locus (A, Ae, Ap và I) thấp ở quần thể Tráp K'sor so với EaRal. Giá trị allele trung bình cho mỗi locus (A), hệ số gen dị hợp từ quan sát (Ho) và hệ số gen dị hợp từ kỳ vọng (He) được tìm thấy cho quần thể và loài Thủy tùng được trình bày ở bảng 3. Số allele đã được tìm thấy ở mức độ loài trung bình 1,13. Tuy nhiên, có sự sai khác nhau về số allele tại mỗi locus cho mỗi quần thể từ 1,07 ở Tráp K'sor đến 1,19 ở EaRal. Rõ ràng, mức độ trung bình allele cho mỗi locus được xem xét là thấp cho tất cả các quần thể của loài Thông nghiên cứu.

Mức độ trung bình của hệ số gen dị hợp từ quan sát (Ho) và kỳ vọng (He) được so sánh giữa các quần thể trong loài Thủy tùng nghiên cứu. Giá trị Ho khác nhau giữa các quần thể, dao động từ (0,059) quần thể Tráp K'sor đến (0,087) quần thể EaRal, trung bình là 0,076. Giá trị He khác nhau giữa các quần thể, dao động từ (0,056) quần thể Tráp K'sor đến (0,119) quần thể EaRal, trung bình là 0,087. Kiểm định giả thiết χ^2 đã chỉ ra rằng sự khác nhau có ý nghĩa đối với loài Thủy tùng giữa hệ số gen dị hợp từ quan sát và kỳ vọng tại locus pt15169 ($p < 0,0001$). Sự khác nhau có ý nghĩa cũng được tìm thấy ở một số locus ở mức độ quần thể. Sự khác nhau này được tìm thấy ở locus pt15169 ($p < 0,05$) cho quần thể EaRal.

Kết quả trình bày ở trên đã chỉ ra rằng mức độ đa dạng di truyền thấp $A = 1,13$ (1,07 - 1,19), $P = 33,33\%$, $Ho = 0,076$ (0,059 - 0,087) và $He = 0,087$ (0,056 - 0,119) của loài Thủy tùng 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* ($Ho = 0,515$; Echt *et al.*, 1999), *P. resinosa* ($Ho = 0,185$; Boy *et al.*, 2005), *Cedrus atlantica* ($P = 65,2\%$, $He = 0,95$; Terrab *et al.*, 2006) 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. guatemallelesis* ($P = 20\%$, $H = 0,069$), *A. hickeli* ($P = 28,2\%$, $H = 0,1$) và *A. religiosa* ($P = 31,8\%$, $H = 0,108$; Aguirre-Planter *et al.*, 2000); *Pinus longae* ($P = 38,9\%$, $Ho = 0,122$, $He = 0,134$ 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 Thủy tùng *Glyptostrobus pensilis* ở Trung Quốc ($P = 24,7\%$, $H = 0,122$; Li F, Xia N, 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 Sa mu *Fokienia hodginsii* ($P = 33,82\%$ và $H = 0,070$; Nguyen Minh 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 Thủy tùng liên quan đến lịch sử sống của loài và thụ phấn nhờ gió. 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 có lập dưới ảnh hưởng xấu bởi con người.



Hình 3. Cấu trúc không gian allele của các quần thể nghiên cứu A: Số allele, Ae- Allele hữu hiệu, Ap- Allele hiếm, I- Chỉ số đa dạng Shimmon

Hệ số F của Wright (1969)

Các giá trị trung bình F (Fis, Fst và Fit) cũng được tìm thấy tại mỗi locus đa hình và chỉ ra mức độ thiếu hụt gen dị hợp tử theo phương trình Hardy-Weinberg (Bảng 4). Giá trị Fis cho tất cả các quần thể của loài Thủy tùng (Bảng 3), trung bình 0,106, dao động từ -0,061 ở Tráp K'sor đến 0,274 ở EaRal. Kết quả này chỉ ra ảnh hưởng của mối quan hệ sinh sản giữa các cá thể trong mỗi quần thể. Mối quan hệ sinh sản cận loài cao xuất hiện ở quần thể EaRal (Fis > 0,2). Tuy nhiên, giá trị này cao tại một số locus pt15169 (0,371). Giá trị Fis thấp được tìm thấy ở locus pt110048 và locus pt87268. Kết quả này chỉ ra ảnh hưởng của mối quan hệ sinh sản cận loài cao đến một số quần thể, đặc biệt ở một số locus đa hình. Giá trị Fit chỉ ra mức độ suy giảm gen dị hợp tử của loài theo phương trình Hardy-Weinberg là 33,7%. Tuy nhiên, có sự khác nhau về locus đa hình duy trì giá trị dương cao trong loài. Giá trị Fit là 0,476 tại locus pt15169. Giá trị Fst chỉ ra sự khác nhau về di truyền giữa các quần thể trong loài Thủy tùng là thấp với Fst = 0,110.

Bảng 3. Đa dạng di truyền của 2 quần thể loài Thủy tùng

| Quần thể | N | A | Ho | He | Fis |
|------------|-----|------|-------|-------|--------|
| Tráp K'sor | 17 | 1,07 | 0,059 | 0,056 | -0,061 |
| EaRal | 117 | 1,19 | 0,087 | 0,119 | 0,274* |
| Trung bình | | 1,13 | 0,076 | 0,087 | |

Ghi chú: N kích thước mẫu, A, số allele tại một locus, P, tỷ lệ locus đa hình, Ho, tần số gen dị hợp tử quan sát; He, tần số gen dị hợp tử kì vọng. Fis-Hệ số sinh sản cận loài; $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Bảng 4. Hệ số sinh sản cận loài (Fis) và mức độ khác nhau giữa các quần thể (Fst) và trong loài (Fit) tại các locus đa hình của loài Thủy tùng (* $p < 0,0001$ và ** $p < 0,05$)

| Locus | Thủy tùng | | |
|----------|-----------|--------|-------|
| | Fis | Fst | Fit |
| pt30204 | | | |
| pt15169 | 0,371* | 0,137* | 0,476 |
| pt110048 | 0,052 | 0,010 | 0,062 |
| pt87268 | -0,098 | 0,284* | 0,214 |

Hệ số tương đồng di truyền và khoảng cách di truyền

Hệ số tương đồng di truyền (I) và khoảng cách di truyền (D) nhận được sau khi so sánh các cặp quần thể với nhau và được ghi nhận ở bảng 5. Giá trị I trung bình 0,983. Giá trị D trung bình 0,017.

Phân tích UPGMA (Unweighted Pair Group Method) trên cơ sở ma trận của kiểu gen (genotype) từ 6 cặp mỗi SSR lục lạp cho mỗi cá thể trong loài theo phần mềm Winboot cũng đã chỉ ra mối quan hệ giữa các cá thể trong loài Thông nghiên cứu. Dữ liệu thu thập được đã chỉ ra 134 cá thể Thủy tùng từ 2 quần thể Tráp K'sor và EaRal. Tất cả các cá thể nghiên cứu được tách thành 13 nhóm khác nhau (Hình 4, Bảng 6). Nhóm 1 và nhóm 13 gồm các cá thể của quần thể EaRal với 42,8% và 50% của quần thể Tráp K'sor, trong khi đó nhóm 2, 11 và 12 với số lượng cá thể là 9,5%, 9,1% và 6,7% của quần thể Tráp K'sor, tương ứng. Các nhóm còn lại gồm duy nhất các cá thể của quần thể EaRal. Mối quan hệ gần gũi giữa các cá thể trong mỗi nhóm (giá trị bootstrap > 60%) cũng được ghi nhận. Chẳng hạn, ở nhóm 13, ba cá thể của quần thể Tráp K'sor cùng kết hợp với nhau với giá trị bootstrap 79%. Trong nhóm 1, 6 cá thể của EaRal kết hợp với nhau với bootstrap 68%. Các cá thể của quần thể EaRal có quan hệ không mật thiết với nhau và đều có bootstrap < 50%.

Bảng 5. Hệ số tương đồng (trên) và khoảng cách di truyền (dưới) theo Nei (1972), cho các cặp quần thể của loài Thủy tùng.

| | Tráp K'sor | EaRal |
|------------|------------|-------|
| Tráp K'sor | - | 0,983 |
| EaRal | 0,017 | |

KẾT LUẬN

Tất cả các quần thể Thủy tùng ở ĐăkLăk đều quá nhỏ về kích thước trong các mảnh rừng bị suy giảm, thậm chí ngay cả trong các khu bảo tồn, không quá 100 cá thể/quần thể, trừ quần thể EaRal khoảng 200 cá thể. 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.

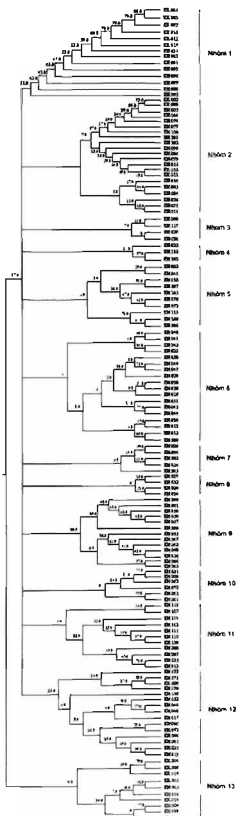
Loài Thông nghiên cứu duy trì mức độ đa dạng di truyền thấp. Số allele trung bình cho một locus là 1,13 (1,07 - 1,19), tỷ số locus đa hình trung bình 33,33%, hệ số gen dị hợp tử quan sát trung bình 0,076 (0,059 - 0,087) và hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng trung bình 0,087 (0,056 - 0,119)

Quần thể ở EaRal có hệ số sinh sản cận loài cao (Fis > 0,2). Nghiên cứu này cũng xác định mức độ cao của hệ số gen đồng hợp tử ở quần thể EaRal và là hậu quả của sự tăng mối quan hệ cận loài xuất hiện trong kích thước quần thể nhỏ.

Phân tích UPGMA (Unweighted Pair Group Method) trên cơ sở ma trận của kiểu gen (genotype) đã

chỉ ra mối quan hệ giữa các cá thể trong loài Thông nghiên cứu. Tất cả các cá thể nghiên cứu được tách

thành 13 nhóm khác nhau, mỗi quan hệ gần gũi giữa các cá thể trong mỗi nhóm (giá trị bootstrap > 60%).



Hình 4. Phân tích UPGMA trên cơ sở khoảng cách di truyền từ 134 cá thể của 2 quần thể Tráp K'sor (EK) và Ea Rai (EH)

Bảng 6. Phân tích UPGMA (Unweighted Pair Group Method) trên cơ sở ma trận của kiểu gen (genotype) từ 134 cá thể Thủy tùng của 2 quần thể Tráp K'sor và EaRal.

| Nhóm | Cá thể trong quần thể | |
|------|--|------------------------------|
| | EaRal | Tráp K'sor |
| 1 | 032, 083, 091, 093, 096, 097, 098, 092 | 001, 003, 007, 010, 011, 017 |
| 2 | 002, 064, 074, 077, 100, 101, 102, 099, 084, 079, 015 | 002, 009, 015, 013 |
| 3 | 089, 117, 027, 038 | |
| 4 | 022, 112, 103 | |
| 5 | 052, 043, 010, 007, 105, 078, 072, 115, 108, 086 | |
| 6 | 040, 041, 042, 023, 050, 049, 047, 029, 030, 020, 018, 051, 045, 044, 036, 013, 012, 009 | |
| 7 | 026, 094, 082, 054, 095 | |
| 8 | 037, 032, 028, 024 | |
| 9 | 068, 061, 059, 058, 057, 069, 055, 067, 062, 060, 056, 066, 065 | |
| 10 | 021, 008, 063, 070, 003, 001 | |
| 11 | 116, 107, 114, 113, 111, 110, 109, 088, 087, 035 | 012 |
| 12 | 075, 008, 039, 106, 053, 048, 046, 017, 090, 073, 080, 081, 025, 019 | 008 |
| 13 | 004, 006, 016, 005, 014 | 005, 014, 004, 016, 006 |

MỘT SỐ GIẢI PHÁP BẢO TỒN VÀ PHỤC HỒI LOÀI

Từ kết quả khảo sát thực địa và phân tích đa dạng di truyền quần thể và loài Thủy tùng 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 Thủy tùng và cấm khai thác rừng. Thay đổi chế độ giữ nước trong rừng để dần dần phục hồi nơi sống của chúng, đặc biệt tạo điều kiện cho cây con tái sinh.

Bảo tồn ngoại vi các loài Thông cần phải được tiến hành càng sớm càng tốt. Đây là nơi bảo tồn và quản lý để Thông sinh trưởng và phát triển và phòng tránh tiềm năng xói mòn nguồn gen của các quần thể Thông. Như vậy, thu thập Thông được xem như là nguồn tư liệu để tái tạo lại và cần thiết để duy trì bảo tồn bền vững các loài Thông ở nước ta. Nếu có thể, thiết lập vườn giống bảo tồn Thông tại khu vực Cư Né. Những nơi này đáp ứng được điều kiện sống của chúng.

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 E, 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.
- 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 tự nhiên và Công nghệ: 532-533.
- 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: 1-17
- 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.
- IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species: version 2013.1

Goudet J (1995) FSTAT, a computer program to calculate F-statistics *J Her* 86, pp: 485-486.

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, Ekart 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 longaeva* (Pinaceae) of the White mountains, California. *Amer J Bot* 89: 566-577.

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

Miller MP (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

Nguyễn Đức Thành (1999) Ứng dụng và phát triển các chỉ thị sinh học phân tử trong nghiên cứu đa dạng phân tử ở lúa. Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc, Hà Nội: 1205-1215.

Nguyễn Đức Thành, Đặng Thị Minh Lua, Quách Thị Liên (2012) Tạo cây thông nước *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch hoàn chỉnh từ chồi nhân in vitro. *Tap chí Sinh học.* 34(2): 228-234.

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 Kế Lộc, Nguyễn Đức Tô Lưu, Philip Lao Thomas, Aljos 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. *kanshui* 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). *African 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. *Mol Ecol* 6.5: 288-295.

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, Allainguiillaume 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.

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.

Trần Vinh (1999) Kết quả bước đầu giâm hom cây Thùỵ tùng tại Đắk Lắk - Thông tin khoa học công nghệ và môi trường Đắk Lắk.

Trần Vinh (2007) Nghiên cứu giâm hom cây thùỵ tùng tại Đắk Lắk. *Tap chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* (7): 41-42.

Trần Vinh, Dương Mộng Hùng (2010). Kết quả thí nghiệm ghép cây thùỵ tùng trên gốc ghép cây bụt mộc (*Taxodium distichum*) và sa mu (*Cunninghamia lanceolata*) ở tỉnh Đắk Lắk. *Tap chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* (11): 77-81

Trần Vinh (2011) Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, sinh thái và nhân giống lâm cơ sở bảo tồn loài thùỵ tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunt.) K.Koch) tại Việt Nam. Luận văn Tiến sĩ Sinh học Trường Đại Học Lâm Nghiệp

Weising K, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primer for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19

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.

Wright S (1969) Evolution and the genetics of populations V2. *The theory and gene frequencies*. University of Chicago Press

Yap IV, Nelso RJ (1996) in WinBoot a program for performing bootstrap analysis for binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Discussion paper series number 15, International rice research institute, Manila

CONSERVATION GENETIC OF CRITICALLY ENDANGERED CONIFER SPECIES (*GLYPTOSTROBUS PENSILIS* (Staun) K.Koch) IN VIET NAM

Vũ Đình Duy^{1*}, Bui Thi Tuyet Xuan², Hoang Thi Thu Trang³, Nguyen Minh Tam¹, Nguyen Van Sinh¹

¹Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

³Vietnam Forestry University, Ministry of Agriculture and Rural Development

SUMMARY

Glyptostrobus pensilis (Staun) K.Koch is considered as one of the critically endangered conifer species and only distributed in Dak Lak province. We investigated the genetic variability and pattern structure of two populations sampled in two districts EaHLeo and Krong Nang, Dak Lak province. A total of leaves or inner barks collected from 134 individuals of two populations were used to assess genetic diversity using chloroplast simple sequence repeat (cpSSR). Six primer pairs were used in this study at population and species levels. The study results showed *Glyptostrobus pensilis* had a low level of genetic diversity: an average number of alleles for a locus was 1.13 (1.07 - 1.19), the average polymorphism was 33.33%, observed heterozygosity was 0.076 in average (0.059 - 0.087) and expected heterozygosity ranged from 0.056 to 0.019, with an average of 0.087. At EaRal (EaHLeo) population have high levels of inbreeding coefficient ($F_{IS} > 0.2$). These findings confirm high levels of genetic homozygosities at EaRal population and consequence of increase matings between very close relatives in small populations. Low genetic differentiation among the populations, indicating the high gene flow. The difference in genetic studies of 134 samples on the tree diagram by a factor of Jaccard's genetic similarity with UPGMA (Unweighted Pair Group Method) grouping type was divided into 13 main groups. Human activities which reduces population size and these consequences also affect to age structure in each population. A number of measures applied to the conservation and sustainable development were also discussed.

Keywords: Conservation, genetic diversity, *Glyptostrobus pensilis*, chloroplast simple sequence repeat (cpSSR)

* Author for correspondence: Tel: 84-0977365689; E-mail: duyvu@vnmn.vast.vn