

TÍNH ĐA DẠNG NGUỒN GEN DI TRUYỀN VÀ CẤU TRÚC QUẦN THỂ LOÀI THÔNG LÁ DỆT (*PINUS KREMPFII* LECOMTE) - LOÀI ĐẶC HỮU HẠP Ở TÂY NGUYÊN, VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ ISSR

Trần Thị Liễu*, Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Tiến Hiệp, Đinh Thị Phòng

*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

* Email: tranthilieue@vnmn.vast.vn

Đến Tòa soạn: 21/7/2014; Chấp nhận đăng: 21/1/2015

TÓM TẮT

Tây Nguyên là một trong những vùng giàu loài lá kim nhất Việt Nam. Hầu hết những loài lá kim ở Tây Nguyên đều là những loài có giá trị khoa học và kinh tế cao. Nhiều loài đang đứng trước nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng, trong đó có loài Thông lá dệt (*Pinus krempfii*), là loài đặc hữu hẹp của Việt Nam. Vì vậy việc điều tra thực trạng loài và thực hiện một số nghiên cứu cơ bản là rất cần thiết phục vụ cho công tác bảo tồn loài, sử dụng hợp lý và phát triển bền vững. Trong nghiên cứu này, 26 chỉ thị ISSR đã được sử dụng để phân tích tính đa dạng nguồn gen di truyền quần thể loài Thông lá dệt thu ở Giang Ly, Cổng Trời, Hòn Giao và Chư Yang Sin. Kết quả phân tích đã chỉ ra 18/26 chỉ thị có tính đa hình. Tổng số đã nhân bản được 137 phân đoạn DNA, trong đó 98 phân đoạn đa hình (chiếm 71,53 %). Tính đa dạng di truyền của quần thể Chư Yang Sin đạt cao nhất ($h = 0,117$; $I = 0,239$; $PPB = 62,04$; $Ne = 1,226$ và $He = 0,151$) và thấp nhất là quần thể Giang Ly ($h = 0,070$; $I = 0,086$; $PPB = 13,87$; $Ne = 1,111$ and $He = 0,060$). Mức độ sai khác di truyền giữa các quần thể là thấp (20,28 %) và cao giữa các cá thể trong quần thể (79,82 %). Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 70 mẫu Thông lá dệt chia thành hai nhánh chính có hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng từ 65,7 % (Pk45 và Pk8) đến 100 % (Pk12 và Pk13; Pk47 và Pk48). Thông qua kết quả phân tích phân tử cho thấy loài Thông lá dệt cần được quan tâm bảo tồn ở mức độ loài.

Từ khóa: bảo tồn loài, đa dạng di truyền, đặc hữu, ISSR, *Pinus krempfii*.

1. MỞ ĐẦU

Số loài cây lá kim ở Việt Nam cũng như trên thế giới bị đe dọa tuyệt chủng ngày càng nhiều không chỉ do việc khai thác tài nguyên quá mức mà còn do rừng bị tàn phá, diện tích rừng ngày càng thu hẹp, nơi sống của nhiều loài lá kim đã bị thay đổi hoặc không còn. Sự suy thoái của điều kiện sinh thái ở nơi sống là yếu tố thường thấy nhất khi đánh giá các nguy cơ đe dọa tới các loài lá kim. Năm 1999, nhóm chuyên gia Thông của IUCN (The International Union Conservation of Nature) đã công bố về “*Hiện trạng và Kế hoạch bảo tồn Thông trên thế giới*” cho thấy ít nhất có 25 % tổng số loài Thông bị đe dọa tuyệt chủng [1]. Vì thế việc nghiên cứu di

truyền quần thể Thông phục vụ cho công tác bảo tồn và phục hồi đã được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm [2, 3, 4, 5, 6]. Đặc biệt thông qua việc phân tích cấu trúc di truyền sử dụng chỉ thị phân tử của một số loài lá kim bị đe dọa tuyệt chủng cho thấy mức độ đa dạng di truyền bị suy giảm rất cao liên quan đến khả năng tăng hệ số đồng hợp tử trong các quần thể nhỏ và hẹp. Những nghiên cứu đó cũng chỉ ra mức độ đa dạng giữa các quần thể là rất lớn và đồng thời đưa ra một số biện pháp hiệu quả để phục hồi nguồn gen một số loài lá kim bị đe dọa tuyệt chủng [7, 8]. Theo số liệu thống kê của Nguyễn Tiến Hiệp và cộng sự (2004), trong số 34 loài lá kim đã biết của Việt Nam, thì có tới 15 loài gặp ở Tây Nguyên. Trong đó có nhiều loài được coi là đặc hữu và đang bị đe dọa tuyệt chủng ở Việt Nam như Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte), Thông dẻ lạt (*Pinus dalatensis* Ferre), Dẻ tùng nam (*Amentotaxus poilanei* D.K. Ferguson)... [9, 10, 11, 12]. Hầu hết chúng đều là những loài vừa có giá trị khoa học và kinh tế cao. Chúng đang đứng trước nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng. Tuy nhiên các nghiên cứu trước đây mới chỉ tập trung vào việc phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và nơi phân bố, còn các nghiên cứu về đa dạng di truyền nguồn gen còn rất hạn chế và mới chỉ cho vài loài [13, 14]. Đến nay hầu như chưa có một nghiên cứu nào về đa dạng nguồn gen di truyền đối với loài Thông lá dẹt. Vì vậy, nghiên cứu tính đa dạng nguồn gen di truyền đối với một số loài lá kim đặc hữu, có nguy cơ bị tuyệt chủng là những cơ sở khoa học cho việc bảo tồn, sử dụng hợp lý và phát triển bền vững tính đa dạng sinh học ở Tây Nguyên.

Xuất phát từ các cơ sở khoa học trên đây, công trình này trình bày kết quả nghiên cứu “Tính đa dạng nguồn gen di truyền và cấu trúc quần thể Thông lá dẹt ở Tây Nguyên - loài đặc hữu hẹp ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR” nhằm đề xuất giải pháp bảo tồn, sử dụng và phát triển bền vững tính đa dạng sinh học ở Tây Nguyên nói riêng và Việt Nam nói chung.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bảy mươi mẫu lá/vỏ/rễ của loài Thông lá dẹt được lấy ngẫu nhiên từ 124 cá thể của bốn quần thể Giang Ly, Hòn Giao, Công Trời, tỉnh Lâm Đồng và Vườn Quốc Gia (VQG) Chu Yang Sin, tỉnh Đắk Lắk được sử dụng để phân tích phân tử.

Bảng 1. Thông tin của các mẫu Thông lá dẹt sử dụng trong nghiên cứu phân tử.

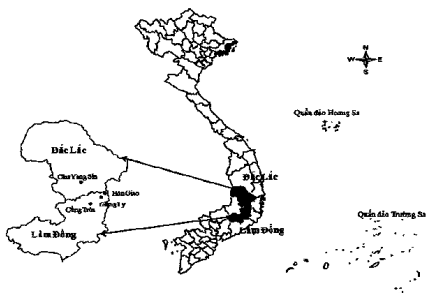
Tên quần thể	Địa điểm	Số mẫu	Kí hiệu mẫu	Vĩ độ bắc (°N)	Kinh độ đông (°E)	Độ cao so với mặt nước biển (m)
Giang Ly	Đa Chay, Lạc Dương, Lâm Đồng	5	Pk1 - Pk5	12°11'02.7"N	108°41'24.3"E	1482 - 1485
Công Trời	Lát, Lạc Dương, Lâm Đồng	11	Pk6 - Pk16	12°05'17.9"N	108°22'13.0"E	- 1659-1757
Hòn Giao	Đa Chay, Lạc Dương, Lâm Đồng	26	Pk17 - Pk42	12°11'03.2"N	108°41'30.3"E	1482- 1593
Chu Yang Sin	Hòa Sơn, Krông Bông, Đắk Lắk	28	Pk43 - Pk70	12°25'05.2"N	108°22'17.1"E	1110- 1120

Các mẫu thu ngoài thực địa được bảo quản trong túi nhựa dẻo trong có chứa silicagel và chuyển đến phòng thí nghiệm giữ ở nhiệt độ phòng đến khi sử dụng. Thông tin của các mẫu nghiên cứu như trong Bảng 1 và Hình 1.

Trình tự 26 chỉ thị ISSR khai thác từ các tài liệu và được tổng hợp bởi công ty IDT, Hoa Kỳ (Intergarated DNA Technology, USA) như trong Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự nucleotide và nhiệt độ gắn mỗi của 26 chỉ thị ISSR.

Tên chỉ thị	Trình tự nucleotide	Nhiệt độ gắn mỗi (°C)	Tên chỉ thị	Trình tự nucleotide	Nhiệt độ gắn mỗi (°C)
HB12	(CAC) ₃ GC	50	ISSR16	(CT) ₈ AC	49
HB15	(GTG) ₃ GC	50	ISSR18	(CT) ₈ A	49
ISSR1	(CAG) ₃	51	ISSR52	(CT) ₈ G	49
ISSR2	(CAA) ₃	51	ISSR55	(AC) ₈ T	51
ISSR3	(GACA) ₄	49	ISSR61	(AC) ₈ TG	51
ISSR5	(CCG) ₆	51	ISSR67	(ATG) ₆	49
ISSR6	(CTC) ₆	50	ISSR69	(GGGTG) ₃	49
ISSR7	(GGC) ₆	49	UBC811	(GA) ₈ C	51
ISSR8	(GAA) ₆	51	UBC834	(AG) ₈ CT	50
ISSR9	(TG) ₈ GA	51	UBC843	(CT) ₈ GA	49
ISSR10	(CTC) ₈	50	UBC851	(GT) ₈ CG	50
ISSR11	(CCA) ₃	52	UBC854	(TC) ₈ AG	50
ISSR15	(CA) ₈ A	51	UBC859	(TG) ₈ GC	50



Hình 1. Vị trí thu mẫu các quần thể Thông lá dẹt trong nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: Tách chiết và làm sạch DNA theo phương pháp của Porebski và cộng sự (1997) [15]. Kiểm tra độ sạch trên gel agarose 0,9 % và đo nồng độ DNA tổng số trên máy UVS 2700, Labomed, Hoa Kỳ.

Phân tích phản ứng PCR- ISSR: Phản ứng nhân gen được thực hiện trên máy PCR system 9700 (Hoa Kỳ) với tổng thể tích 25 μ l gồm các thành phần: dung dịch đệm PCR IX; $MgCl_2$ 2,5 mM; dNTPs 2 mM; mỗi 100 nM; 50 ng DNA khuôn và 0,5 đơn vị *Taq* polymerase. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: biến tính ở 94 °C trong 4 phút, tiếp sau là 35 chu kì nối tiếp nhau với các bước: biến tính 94 °C trong 1 phút, gắn mỗi 49 – 52 °C trong 1 phút, kéo dài mỗi 72 °C trong 1 phút và kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4 °C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5 % cùng với thang DNA chuẩn 1000 bp, sau đó nhuộm ethidium bromide 15 phút và quan sát dưới tia UV.

Phân tích số liệu: Phân tích số liệu theo quy ước: 1 – phân đoạn DNA xuất hiện và 0 – phân đoạn DNA không xuất hiện khi phân tích sản phẩm PCR-ISSR với phần mềm NTSYS 2.0 [16]. Các thông số đa dạng di truyền của mỗi quần thể như phần trăm số phân đoạn đa hình (PPB), chỉ số đa dạng di truyền tính theo Nei (*h*) (1973) [17], chỉ số đa dạng di truyền Shannon (*I*) (1949) [18], dị hợp tử mong chờ (*He*), dị hợp tử không mong đợi (*UHe*) và mức biến động phân tử (AMOVA) giữa các cá thể trong quần thể và giữa các quần thể được tính toán sử dụng phần mềm GENALEX 6.3 [19]. Thiết lập ma trận khoảng cách di truyền để phân tích thành phần tọa độ (PCA) giữa các loài. Lập biểu đồ hình cây theo phương pháp của Nei và Li (1972) trong phần mềm NTSYS 2.0 và giá trị Bootstrap được hỗ trợ bởi phần mềm Win-Boot [20] với số lần lặp lại 1000 lần.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

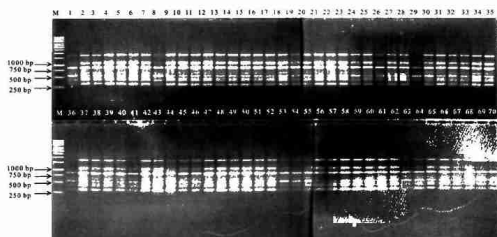
3.1. Đa dạng di truyền DNA của 70 mẫu Thông lá dẹt với chỉ thị ISSR

Hai mươi sáu chỉ thị ISSR đã được sử dụng để phân tích cho 70 cá thể thuộc 4 quần thể Thông lá dẹt thu được tại Giang Ly, Công Trời, Hòn Giao (Lâm Đồng) và Chu Yang Sin (Đắc Lắc) thì có 18/26 chỉ thị ISSR chỉ ra tính đa hình giữa các mẫu nghiên cứu. Tổng số có 137 phân đoạn DNA được nhân bản, trong đó có 98 phân đoạn đa hình. Chỉ thị UBC843 có hàm lượng thông tin đa tính (PIC) cao nhất (0,515). Sáu chỉ thị (ISSR3, ISSR6, ISSR67, UBC834, UBC843 và UBC854) có số phân đoạn đa hình chiếm 100 % (Bảng 3). Kết quả điện di sản phẩm PCR của 70 mẫu Thông lá dẹt với chỉ thị HB15 đại diện cho 26 chỉ thị ISSR được thể hiện trong Hình 2.

Bảng 3 Giá trị PIC và tỉ lệ phân đoạn đa hình của 70 mẫu Thông lá dẹt phân tích với 26 chỉ thị ISSR.

STT	Chỉ thị	Kích thước (bp)	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tổng phân đoạn	% phân đoạn đa hình
1	HB12	300-1550	0,250	4	3	7	57,14
2	HB15	300-1700	0,018	4	4	8	50,00
3	ISSR1	400-1100	0,231	3	1	4	75,00
4	ISSR2	280-950	0,131	5	2	7	71,43
5	ISSR3	250-1500	0,415	7	0	7	100

6	ISSR5	450-1000	0,000	0	4	4	0,00
7	ISSR6	500-1000	0,385	5	0	5	100
8	ISSR7	400-850	0,220	1	3	4	25,00
9	ISSR8	300-1200	0,374	4	1	5	80,00
10	ISSR9	450-850	0,157	2	1	3	66,67
11	ISSR10	250-1000	0,000	0	3	3	0,00
13	ISSR11	650-1800	0,357	3	1	4	75,00
13	ISSR15	300-850	0,305	5	3	8	62,50
14	ISSR16	750-1500	0,241	2	1	3	66,67
15	ISSR18	750-750	0,000	0	1	1	0,00
16	ISSR52	750-1500	0,267	2	1	3	66,67
17	ISSR55	250-900	0,386	4	3	7	57,14
18	ISSR61	250-1200	0,251	7	1	8	87,50
19	ISSR67	250-750	0,460	5	0	5	100
20	ISSR69	250-1350	0,238	7	1	8	87,50
21	UBC811	250-600	0,236	1	2	3	33,33
22	UBC834	250-1350	0,373	10	0	10	100
23	UBC843	300-600	0,515	7	0	7	100
24	UBC851	250-1300	0,220	5	1	6	83,33
25	UBC854	500-700	0,384	2	0	2	100
26	UBC859	300-900	0,141	3	2	5	60,00
	Tổng	250-1800		98	39	137	71,53



Hình 2. Sản phẩm PCR-SSR của 70 mẫu Thông lá dẹt với chi thị HB15 (giếng 1 - 70 thứ tự sắp xếp của các mẫu Thông lá dẹt từ Pk1 – Pk70, M: marker phân tử 1 kb).

3.2. Phân tích đa dạng di truyền quần thể

Theo cả ba cách tính đa dạng di truyền của Nei (1973), Shannon (1949) và phần trăm phân đoạn đa hình của bốn quần thể ở Bảng 4 đã chỉ ra quần thể Thông lá dẹt ở Chư Yang Sin có tính đa dạng di truyền cao nhất ($h = 0,117$; $I = 0,239$ và $PPB = 62,04$, tương ứng) và thấp nhất là quần thể Giang Ly ($h = 0,070$; $I = 0,086$ và $PPB = 13,87$, tương ứng). Kết quả này cho thấy, dù tính theo phương pháp nào cũng vẫn phản ánh đúng thực trạng về tính đa dạng nguồn gen di truyền của mỗi quần thể. Kết quả phân tích trong Bảng 4 cũng chỉ ra tính đa dạng nguồn gen ở mức độ loài Thông lá dẹt rất thấp ($h = 0,094$ và $I = 0,245$).

So sánh mức độ đa dạng nguồn gen di truyền với một số loài thông khác trên thế giới cho thấy loài Thông lá dẹt của Việt Nam có mức độ đa dạng di truyền rất thấp ($PPB = 30,11\%$ và $I = 0,137$) so với loài *Pinus nigra* của Trung Quốc ($PPB = 51,04\%$ và $I = 0,262$) and *Pinus sylvestris* ở Đức và Tây Ban Nha ($PPB = 99,76\%$ và $I = 0,690$) [21, 22].

Bảng 4. Thông số đa dạng di truyền quần thể thông lá dẹt phân tích với chỉ thị ISSR.

Thông số di truyền	Giữa các quần thể					Giữa các cá thể
	Giang Ly	Cổng Trời	Hòn Giao	Chư Yang Sin	Trung bình	
<i>N</i>	5	11	26	28	17,5	70
<i>Na</i>	0,810	0,854	1,073	1,599	1,084	1,715
<i>Ne</i>	1,111	1,112	1,135	1,226	1,146	1,228
<i>He</i>	0,060	0,063	0,084	0,148	0,089	0,151
<i>UHe</i>	0,067	0,066	0,086	0,151	0,092	0,152
<i>PPB</i>	13,87	16,06	28,47	62,04	30,11	71,53
<i>h</i>	0,070	0,071	0,079	0,117	0,082	0,094
<i>I</i>	0,086	0,093	0,129	0,239	0,137	0,245

Ghi chú: *N*: kích thước quần thể, *Na*: số alen quan sát trung bình, *Ne*: số alen hiệu quả, *He*: Hệ số gen dị hợp tử mong đợi, *UHe*: -Hệ số gen dị hợp tử không mong đợi, *PPB*: Phần trăm phân đoạn đa hình, *h*: Chỉ số đa dạng Nei, *I*: Chỉ số đa dạng Shannon

Kết quả phân tích trong Bảng 4 cũng chỉ ra, số alen hiệu quả (*Ne*) và hệ số gen dị hợp tử mong đợi (*He*) của quần thể Chư Yang Sin đạt cao nhất ($Ne = 1,226$ và $He = 0,151$, tương ứng), tiếp đến là quần thể Hòn Giao ($Ne = 1,135$ và $He = 0,084$, tương ứng), xếp thứ 3 là quần thể Cổng Trời ($Ne = 1,112$ và $He = 0,063$, tương ứng) và cuối cùng là quần thể Giang Ly ($Ne = 1,111$ và $He = 0,060$, tương ứng). Kết quả phân tích về các thông số này cũng phù hợp với kết quả của các thông số đa dạng di truyền theo cách tính (*h*) của Nei (1973), chỉ số *I* của Shannon (1949) và phần trăm phân đoạn đa hình ở mức độ quần thể theo thứ tự từ cao đến thấp là Chư Yang Sin, Hòn Giao, Cổng Trời và Giang Ly.

Mức độ đa dạng di truyền trong quần thể loài *P. krempfii* (Thông lá dẹt) trong nghiên cứu này rất thấp ($He = 0,151$) khi so sánh với một số loài thông trên thế giới. Chẳng hạn quần thể *Pinus tabulaeformis* ($He = 0,415$), *Pinus koraiensis* ($He = 0,348$), *Pinus sibirica* ($He = 0,267$),

Pinus sylvestris ($He = 0,262$) [23, 24, 25, 26]. Kết quả này cho thấy loài Thông lá dẹt của Việt Nam có nguy cơ suy giảm đa dạng di truyền rất cao.

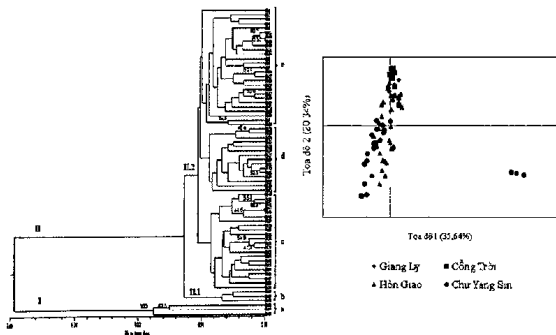
Bên cạnh đó, phân tích về mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các quần thể và giữa các cá thể trong cùng quần thể ở bảng 5 cũng cho thấy, tổng mức độ thay đổi phân tử rất thấp giữa các quần thể (20,28 %) và cao giữa các cá thể trong cùng quần thể (79,82 %) với giá trị $P < 0,001$. Cho đến nay chưa có một đánh giá đa dạng di truyền đối với quần thể Thông lá dẹt, tuy nhiên so sánh với loài Thông nước (*Glyptostrobus pensilis*) của Nguyễn Minh Tâm và cộng sự (2013) phân tích với 6 chỉ thị SSR nhận thấy, mức độ thay đổi phân tử giữa các quần thể của loài Thông lá dẹt thấp hơn (20,28 % so với 33,69 %) và cao giữa các cá thể trong quần thể (79,82 % so với 66,31 %) [27].

Bảng 5 Mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa và trong quần thể Thông lá dẹt.

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Thành phần biến đổi	Tổng sự biến đổi (%)	Giá trị P
Giữa các quần thể	3	92,828	1,577	20,28	<0.001
Trong các quần thể	66	409,186	6,200	79,72	

3.3. Mối quan hệ di truyền của 70 mẫu Thông lá dẹt

Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 70 mẫu Thông lá dẹt với chỉ thị ISSR chia thành 2 nhánh chính I và II riêng biệt có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng 65,7 – 100 %, trong đó có 2 cặp mẫu có hệ số tương đồng di truyền 100 %, đó là cặp mẫu Pk12 và Pk13 (Cổng Trời) và cặp mẫu Pk47 và Pk48 (Chư Yang Sin) (Hình 3).



Hình 3. Biểu đồ hình cây (trái) và biểu đồ đa chiều (phải) của 70 mẫu Thông lá dẹt theo hệ số di truyền của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA (a, b, c: mẫu thu ở Chư Yang Sin; d: mẫu thu ở Hòn Giao; e: mẫu thu ở Giang Ly, Cổng Trời và Hòn Giao).

Nhánh chính I gồm 3 mẫu Pk43, Pk44 và Pk45 đều có nguồn gốc ở Chư Yang Sin và có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng từ 84 % đến 86,5 %. Nhánh chính II chia thành 2 nhánh phụ II.1 và II.2 có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng từ 88,5 % đến 100 %. Nhánh phụ II.1 gồm 3 mẫu Pk68, Pk69 và Pk70 thu ở Chư Yang Sin, có hệ số tương đồng di truyền trong khoảng từ 94 % đến 97 %. Nhánh phụ II.2 lại chia thành 3 nhóm nhỏ hơn, trong đó nhóm thứ nhất gồm 22 mẫu thu ở Chư Yang Sin (kí hiệu c); nhóm thứ 2 gồm 15 mẫu thu ở Hòn Giao (kí hiệu d); nhóm thứ 3 gồm 27 mẫu còn lại thu ở Giang Ly, Công Trời và Hòn Giao (kí hiệu e). Trong nhóm nhỏ (e) có 2 mẫu Pk12 và Pk13 giống nhau về mặt di truyền và có cùng nguồn gốc ở Công Trời. Kết quả phân nhóm theo biểu đồ ba chiều cũng phản ánh kết quả tương tự như biểu đồ hình cây. Các mẫu có khoảng cách di truyền càng gần nhau thì trên biểu đồ ba chiều chúng sẽ nằm co cụm lại với nhau.

Kết quả điều tra thực địa của chúng tôi cho thấy tất cả 4 quần thể Thông lá dẹt đều quá nhỏ về kích thước (< 60 cá thể) trong các mảnh rừng bị suy giảm. Điều này cũng có thể liên quan tới khoảng cách địa lý, quần thể Chư Yang Sin là thuộc tỉnh Đắk Lắk, còn ba quần thể Giang Ly, Công Trời và Hòn Giao thuộc tỉnh Lâm Đồng. Hơn nữa thực tế chúng tôi cũng ghi nhận quần thể Thông lá dẹt ở Giang Ly còn rất ít (8 cá thể) thì hầu như là tất cả đều là cây trưởng thành (chiều cao > 15 mét) trong đó có 2 cá thể có chiều cao < 10 mét, 4 cá thể có chiều cao từ 10 đến 25 mét và 2 cá thể còn lại có chiều cao > 25 mét. 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 lá dẹt. Kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền đối với loài Thông lá dẹt đều duy trì ở mức độ thấp, điều này đồng nghĩa với sự suy giảm tính đa dạng di truyền ở cả 2 mức độ quần thể và loài và đều liên quan đến hoạt động của con người, đặc biệt nơi sống của chúng bị phá hủy hoặc bị suy giảm nghiêm trọng. Khai thác các loài Thông rừng làm gia tăng sự tuyệt chủng ở cả 2 mức độ quần thể và loài.

Theo Hiệp hội bảo tồn thiên nhiên quốc tế (IUCN), Thông lá dẹt thuộc cấp độ nguy cấp VU A2c; Blab (iii) [28]. Còn theo Nguyễn Tiến Hiệp (2014) đề xuất hiện trạng bảo tồn của loài Thông lá dẹt ở bậc VU A2a,c,d, A3a,c,d, B2a,c, C1 là hợp lý nhất (số liệu chưa công bố). Trong số 70 cá thể nghiên cứu thì có 13 cá thể có chiều cao < 10 mét, 31 cá thể có chiều cao < 25 mét và 26 cá thể cây có chiều cao > 25 m đang được bảo vệ nghiêm ngặt. Vì vậy, nguy cơ tuyệt chủng đối với loài này rất cao. Dựa vào số liệu trong nghiên cứu này cho thấy trong số 70 mẫu Thông lá dẹt có hai cặp mẫu là Pk 12 và Pk 13 (Công Trời) và cặp mẫu Pk 47 và Pk 48 (Chư Yang Sin) giống nhau 100 % về mặt di truyền. Kết quả này một lần nữa cho thấy sự đa dạng di truyền trong quần thể loài Thông lá dẹt là tương đối thấp. Vì thế cần phải bảo tồn cả ở mức cá thể và quần thể.

4. KẾT LUẬN

Mức độ đa dạng di truyền quần thể Thông lá dẹt ở Tây Nguyên có thể xếp theo thứ tự từ cao đến thấp: quần thể Chư Yang Sin có tính đa dạng di truyền cao nhất ($h = 0,117$; $I = 0,239$; $PPB = 62,04$; $Ne = 1,226$ và $He = 0,151$), tiếp đến là quần thể Hòn Giao ($h = 0,079$; $I = 0,129$; $PPB = 28,47$; $Ne = 1,135$ và $He = 0,084$), xếp thứ 3 là quần thể Công Trời ($h = 0,071$; $I = 0,093$; $PPB = 16,06$; $Ne = 1,112$ và $He = 0,063$) và cuối cùng là quần thể Giang Ly ($h = 0,070$; $I = 0,086$; $PPB = 13,87$; $Ne = 1,111$ và $He = 0,060$).

Mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các quần thể và giữa các cá thể trong cùng quần thể cho thấy tổng mức độ thay đổi phân tử rất thấp giữa các quần thể (20,28 %) và cao giữa các cá thể trong cùng quần thể (79,82 %).

Mức độ tương đồng di truyền của loài Thông lá dẹt ở Tây Nguyên tương đối thấp dao động từ 65,7 % (Pk45 và Pk8) đến 100 % (cặp mẫu Pk12 và Pk13 và cặp mẫu Pk47 và Pk48). Các cá thể trong cùng quần thể có quan hệ gần gũi nhau về mặt di truyền và đều nằm co cụm vào từng nhóm riêng biệt trên biểu đồ hình cây. Kết quả phân nhóm trên biểu đồ tọa độ (PCA) cũng phản ánh kết quả tương tự.

Lời cảm ơn. Đây là một phần kết quả nghiên cứu của đề tài mã số TN3/T15 thuộc Chương trình Tây Nguyên 3. Chủ nhiệm đề tài xin chân thành cảm ơn các thành viên tham gia thực hiện đề tài và các cơ quan ở địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Farjon A. and Page C. N. - *Conifer: status survey and conservation action plan*, Conifer Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland & Cambridge, UK, 1999.
2. Kadermir G. E., Kadermir I. and Kaya Z. - Genetic variation in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) seed stand as determined by RAPD markers, *Silvae Genet.* 53 (5) (2004) 169-175.
3. Ledig F. T., Hodgskiss P. D. and Johnson D. R. - Genetic diversity, genetic structure, and mating system of Brewer spruce (Pinaceae), a relict of the Arcto-Tertiary forest, *Amer. J. Bot* 92 (12) (2005) 1975-1986.
4. Clark C. M., Wentworth T. R. and Woolliam J. A. - Genetic discontinuity revealed by chloroplast microsatellites in eastern north American *Abies* (Pinaceae), *Amer. J. Bot* 87 (6) (2000) 774-782.
5. Rao N. K. Plant Genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology, *African J. Biotechnology* 3 (2) (2004) 136-14.
6. Larionova A. Y., Ekart A. K. and Kravchenko A. N. - Genetic diversity and population structure of Siberian fir (*Abies sibirica* LEDER.) in Middle Siberia, Russia, *Eurasian J. For. Res.* 10 (2) (2007) 185-192.
7. Chung J. D., Lin T. P., Tan J. C., Lin M. Y. and Hwang S. Y. - Genetic diversity and biogeography of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae), an island species in Taiwan: a comparison with *Cunninghamia lanceolata*, a mainland species in China, *Mol. Phylogenet. Evol.* 33 (2004) 791-801.
8. Wu Z. Y., Liu J. F., Hong W., Pan D. M. and Zheng S. Q. - Genetic diversity of natural and planted *Glyptostrobus pensilis* populations: a comparative study, *Chinese Journal of Applied Ecology* 22 (4) (2011) 873-9.
9. Nguyễn Tiến Hiệp, Phan Kế Lộc, Nguyễn Đức Tổ Lưu, Philip Ian Thomas, Aljos Farjon, Leonid Averyanov and Jacinto Regalado - Thông Việt Nam: Nghiên cứu hiện trạng bảo tồn 2004, Fauna & Flora International, Chương trình Việt Nam, Hà Nội, 2004.
10. Nguyễn Đức Tổ Lưu and Thomas P. - Thông Việt Nam, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2004.
11. Nguyễn Hoàng Nghĩa - Các loài cây lá kim ở Việt Nam, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2004.

12. Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp and Averyanov L. V. - Góp phần kiểm kê tính đa dạng, sự phân bố và đánh giá giá trị bảo tồn của Thông ở Kon Tum, Tạp chí Kinh Tế Sinh Thái 37 (2010) 42-48.
13. Đinh Thị Phòng, Vũ Thị Thu Hiền, Phí Hồng Hải và La Ánh Dương - Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các xuất xứ Pơ Mu (*Fokientia hodginsii*) bằng chỉ thị RAPD và ADN lục lạp. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn 12 (2) (2009) 195-201.
14. Nguyễn Minh Tâm, Vũ Đình Duy, Dương Văn Tăng, Nguyễn Tiến Hiệp và Nguyễn Sinh Khang - Mối quan hệ di truyền một số loài thông (Coniferales) ở Việt Nam trên cơ sở xác định trình tự nucleotide vùng gen RPOC1, Proceeding Hội nghị toàn quốc lần thứ nhất Hệ thống Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, 2011, tr. 189-194.
15. Porebski S., Bailey L. G. and Baum B. R. - Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components, Plant Mol. Biol. Rep. 15 (1) (1997) 8-15.
16. Rohlf F. J. - NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0, State University of New York (Stony Brook, New York), 1992.
17. Nei M. - Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 (1973) 3321-3323.
18. Shannon C. and Weaver W. - The mathematical theory of communication, University of Illinois Press, Urbana, USA, 1949.
19. Peakall R. and Smouse P. E. - GenALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, Molecular Ecology Note 6 (2006) 288-295.
20. Yap I. V. and Nelson R. J. - Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence of UPGMA-based dendrograms, IRRI, Manila, 1996.
21. Cipriano J., Carvalho A., Fernandes C., Gaspar M. J., Pires J., Bento J., Roxo L., Louzada J. and Lima-Brito J. - Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm, Journal of Genetics 92 (2013) e41-e48.
22. Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñegla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L. and Ahrazem O. - Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles, International Journal of Molecular Sciences 13 (2013) 5645-5658.
23. Wang M. B. and Hao Z. Z. - Rangewide genetic diversity in natural populations of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*), Biochem. Gene. 48 (2010) 590-602.
24. Feng F. J., Han S. J. and Wang H. M. - Genetic diversity and genetic differentiation of natural *Pinus koraiensis* populations, J. For. Res. 17 (2006) 21-24.
25. Yang C. P., Wei L., Jiang J., Liu G. F. and Zhao G. Y. - Analysis of genetic diversity for nineteen populations of *Pinus sibirica* Du Tour with technique of ISSR, J. Northeast For. Univ. 33 (2005) 1-3.
26. Liu G. F., Dong J. X., Jiang Y., Lu Y. F., Jiang J. and Zhao G. Y. - Analysis of genetic relationship in 12 species of Section Strobilus with ISSR markers. J. For. Res. 16 (2005) 213-215.

27. Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy, Bui Thi Tuyen Xuan and Nguyen Minh Duc – Genetic variation and population structure in Chinese water pine (*Glyptostrobus pensilis*): A threatened species, *Indian Journal of Biotechnology* **12** (2013) 499-503
28. Thomas P., Nguyen T. H., Phan K. L. and Nguyen Q. H. - *Pinus krempfii*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2.

ABSTRACT

GENETIC VARIATION AND POPULATION STRUCTURE IN *PINUS KREMPFII* LECOMTE – ENDEMIC SPECIES IN TAY NGUYEN, VIETNAM BY ISSR MARKERS

Tran Thi Lieu*, Vu Thu Thu Hien, Nguyen Tien Hiep, Dinh Thi Phong

*Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

*Email: tranthilieu@vnmn.vast.vn

Highland is one of the areas where is abundant with coniferous species of Vietnam. Most of these species are economic and of scientific value. Many coniferous species are in danger of being threatened with extinction, among them is *Pinus krempfii* species - endemic in Vietnam. Therefore, surveys of species status and the conducting some basic researches are the scientific basis for the conservation, rational use and sustainable development. Results of the molecular analysis based on ISSR markers were used to study genetic diversity of *Pinus krempfii* populations collected in Giang Ly, Cong Troi, Hon Giao and Chu Yang Sin. There were 18/26 primers revealed polymorphic. Among 137 fragments were amplified, of which 98 were polymorphic (accounting for 71.53 %). The genetic diversity is the highest in Chu Yang Sin populations ($h = 0.117$; $I = 0.239$; $PPB = 62.04$; $Ne = 1,226$ and $He = 0.151$) and lowest in Giang Ly population ($h = 0.070$; $I = 0,086$; $PPB = 13.87$; $Ne = 1.111$ and $He = 0.060$). The degree of genetic differences identified among populations is low (total variation is 20.28 %) and higher within populations (79.82 %). A phylogenetic tree based on UPGMA analysis grouped the 70 genotypes into two main clusters with genetic similarity within clusters ranged from about 65.7 (Pk45 and Pk8) to 100 % (Pk12 and Pk13; Pk47 and Pk48). These results suggest that *Pinus krempfii* populations should be paid attention to the conservation of species.

Keywords: genetic diversity, endemic, ISSR, *Pinus krempfii*, species conservation.