

ĐA DẠNG DI TRUYỀN MỘT SỐ RỪNG GIỐNG THÔNG CARIBE Ở VIỆT NAM

Lê Sơn¹, Trần Đức Vượng¹, Nguyễn Đức Kiên¹

TÓM TẮT

Thông caribe là loài cây trồng rừng có giá trị kinh tế cao, có biên độ thích nghi rộng đặc biệt là ở các khu vực đất trống, đồi núi trọc. Cho đến nay, nguồn cung cấp hạt giống phục vụ cho trồng rừng Thông caribe ở Việt Nam chủ yếu là thu từ các rừng giống được chuyển hóa từ rừng trồng ở giai đoạn trước, đặc biệt một số rừng giống không được ghi nhận nguồn gốc, xuất xứ một cách rõ ràng. Vì vậy, việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền của các nguồn giống này là rất cần thiết nhằm đưa ra các biện pháp quản lý thích hợp để nâng cao chất lượng nguồn cung cấp giống cho loài cây trồng rừng quan trọng này. Nghiên cứu này sử dụng 5 chỉ thị phân tử ISSR để đánh giá đa dạng di truyền của một số rừng giống Thông caribe (được gọi là nguồn giống trong nghiên cứu này) ở Việt Nam. Kết quả phân tích đã chỉ ra có tổng số 58 phân đoạn ADN được nhân bản với 49 phân đoạn đa hình (chiếm 83,82%). Tính đa dạng di truyền của các rừng giống Thông caribe ở mức trung bình, trong đó cao nhất ở rừng giống SPA Ba Vì 1996 ($h = 0,374$; $I = 0,555$, $PPB = 100\%$) và thấp nhất ở rừng giống thị trấn Tứ Hạ ($h = 0,221$; $I = 0,324$ và $PPB = 55,88\%$). Chỉ số giao phối cận loài trung bình $F_{is} = -0,028 < 0$, chứng tỏ hiện tượng tự thụ phấn có xảy ra ở các nguồn giống, nếu hiện tượng này diễn ra với tỷ lệ cao sẽ có ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng hạt giống. Kết quả phân tích cấu trúc nguồn giống (POPGENE) cũng cho thấy, Thông caribe có tính đa dạng ở mức trung bình với chỉ số $H_T = 0,3592$ và $H_S = 0,3024$; chỉ số trao đổi gen nhỏ ($Nm = 2,6633$), nhưng vẫn có sự trao đổi gen giữa các nguồn giống Thông caribe. Chỉ số sai khác di truyền G_{ST} đạt 0,1581 có nghĩa là có tới 15,81% sai khác di truyền giữa các rừng giống có nguồn gốc từ hiện tượng thụ phấn chéo. Tổng mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) giữa các rừng giống Thông caribe ở mức thấp (12%) và phần lớn sự biến đổi về phân tử được xác định giữa các cá thể trong cùng một rừng giống (88%). Cây quan hệ di truyền chia làm 2 nhánh chính và có hệ số tương đồng di truyền dao động từ 0,815 đến 0,957.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, ISSR, Thông caribe, thụ phấn chéo.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông caribe (*Pinus caribaea* Morelet) là một loài cây thuộc họ Thông (*Pinaceae*) phân bố ở khu vực Trung Mỹ, Cuba, Bahamas và quần đảo Turks và Caicos. Loài này được nhập và sử dụng trồng khảo nghiệm tại Việt Nam và đã được ghi nhận là loài cây trồng phù hợp với đất đồi ở nhiều tỉnh trong cả nước, từ các vùng ven biển đến vùng Tây Nguyên [1], [2]. Quá trình du nhập giống Thông caribe về trồng khảo nghiệm tại một số vùng tại Việt Nam đã được các nhà chọn tạo giống thuộc các cơ quan, đơn vị khác nhau thực hiện từ những năm 1963 cho đến nay. Theo kết quả nghiên cứu, đây là loài cây trồng có biên độ thích nghi rộng, phù hợp với nhiều vùng đất kể cả đất trống, đồi trọc nghèo dinh dưỡng, vừa mang lại hiệu quả kinh tế cao, vừa phù hợp với quy hoạch phát

triển trồng rừng gỗ lớn, rừng phòng hộ và ứng phó với biến đổi khí hậu [3]. Tuy nhiên, ở Việt Nam, nhiều rừng Thông caribe đã và đang bị người dân chặt phá để lấy đất canh tác, các doanh nghiệp chặt cây khai thác gỗ, chính các hoạt động này đã làm suy giảm và phá hủy môi trường sống của loài. Mặt khác, do có chu kỳ kinh doanh dài nên việc trồng lại Thông caribe sau khai thác là không đáng kể. Thông caribe chỉ còn được giữ lại trong nhiều mảnh rừng thứ sinh ở các khu vực bảo vệ thông dưới hình thức các khảo nghiệm hậu thế, các rừng giống. Các nguyên nhân trên dẫn đến việc giảm tính đa dạng di truyền của quần thể Thông caribe. Vì vậy, việc lưu giữ và phát triển nguồn gen Thông caribe ở Việt Nam là nhiệm vụ cần thiết đối với công tác cải thiện giống và phát triển loài cây này.

Cho đến nay, các nghiên cứu về Thông caribe ở nước ta mới chỉ tập trung vào đặc điểm sinh trưởng [4], một số biến dị [5] và đánh giá sinh trưởng, chất lượng thân cây [6]. Trên thế giới, một số nước đã tiến hành nghiên cứu di truyền quần thể cho một số loài

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

* Email: lesan@vafs.gov.vn

cây lá kim để phục vụ cho công tác bảo tồn [7]. Một số công trình sử dụng chỉ thị ISSR để đánh giá đa dạng di truyền ở các loài thông và loài lá kim đã được công bố như: Sa mộc dầu [8], Pơ mu [9], Thông lá dẹt [10], Thông Đà Lạt [11] và Thông Xuân Nha [12]. Trong nghiên cứu này, chỉ thị ISSR được sử dụng nhằm đánh giá đa dạng di truyền một số nguồn giống Thông caribe ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là các mẫu lá thu từ cây con trồng từ hạt của 100 cây trội (2 cây/gia đình) có nguồn gốc từ rừng giống/lâm phần trồng Thông caribe (sau đây được gọi là nguồn giống) được sử dụng để xây dựng khảo nghiệm hậu thế tại Cẩm

Linh, Ba Vì, Hà Nội từ tháng 8/2017 (Bảng 1). Trình tự 5 chỉ thị ISSR được sử dụng trong nghiên cứu (Bảng 2) để đánh giá mức độ đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể Thông caribe.

Bảng 1. Các nguồn giống Thông caribe được sử dụng nghiên cứu

STT	Rừng giống	Số lượng gia đình (số lượng cây con)
1	Thành phố Huế	19 (38)
2	Thị trấn Tứ Hạ	6 (12)
3	Đèo Hải Vân	13 (26)
4	SPA Đại Lải	23 (46)
5	SPA Ba Vì 1993	19 (39)
6	SPA Ba Vì 1996	20 (40)
Tổng cộng		100 (200)

Bảng 2. Trình tự mỗi ISSR sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên mỗi	Trình tự mỗi (5'-3')	Nhiệt độ gắn mỗi (°C)	Tài liệu tham khảo
1	UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	46,8	Isshiki và cs (2008) [13]
2	UBC851	GTG TGT GTG TGT GTG TCT G	53,9	
3	UBC855	ACA CAC ACA CAC ACA CT	51,4	
4	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	52,8	
5	UBC881	GGG TGG GGT GGG GTG	59,3	

2.2. Phương pháp phân tích đa dạng di truyền

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Áp dụng phương pháp CTAB của Doyle J. J. và Doyle J. L. [14] có cải tiến một số bước để tách chiết ADN tổng số. Các bước chính trong quy trình tách gồm: ủ mẫu lá trong 700 µl đệm chiết CTAB ở 60°C trong 60 phút, sau đó ly tâm thu dịch nổi và bổ sung 40 µl RNase ở 37°C trong 30 phút; loại bỏ protein và các tạp chất khác khỏi ADN bằng dung dịch Chloroform: Isoamyl Alcohol (24:1); kết tủa ADN bằng Isopropanol lạnh trong 60 phút ở tủ -20°C; thu hồi tủa ADN bằng cách ly tâm 14000 vòng/phút 20 phút ở 4°C và rửa tủa 2 lần bằng Ethanol 70°. Để khô ADN ở nhiệt độ phòng, sau đó hòa tan bằng dung dịch TE 1X. Kiểm tra độ tinh sạch ADN trên gel agarose 0,8% và đo nồng độ ADN tổng số trên máy NanoDrop. ADN tổng số được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

2.2.2. Phương pháp PCR với các môi ISSR

Khuếch đại gen được thực hiện trên máy PCR model AG 22331 với tổng thể tích 15µl gồm các thành phần: 7,5 µl Mastermix 2X, 1µl mỗi ISSR 10µM, 1µl DNA tổng số và 5,5 µl nước deion. Chu

trình nhiệt của phản ứng PCR: Biến tính ở 94°C trong 4 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: biến tính 94°C trong 45 giây, gắn mỗi trong thời gian 45 giây, kéo dài chuỗi 72°C trong 45 giây và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 4 phút, giữ sản phẩm ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,8% cùng với thang GeneRuler 1 kb Plus ADN Ladder (hãng Thermo Scientific) ở hiệu điện thế 70 V trong 60 phút, sau đó quan sát trên máy soi gel chứa tia UV.

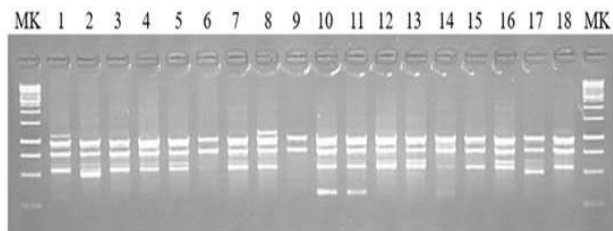
2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập theo quy ước: 1 – phân đoạn ADN xuất hiện và 0 – phân đoạn DNA không xuất hiện sau khi phân tích sản phẩm PCR - ISSR. Các thông số đa dạng di truyền của các nguồn giống như phần trăm đa hình (PPB), chỉ số đa dạng di truyền theo Nei (*h*), chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (*J*), số alen quan sát được (*N_a*), số alen có ý nghĩa (*N_e*)... sử dụng phần mềm GenAlEx 6.5 trên cơ sở phân tích mức độ thay đổi phân tử (AMOVA) để tính toán mức độ khác biệt giữa các xuất xứ và giữa các cá thể trong cùng xuất xứ. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) của mỗi chỉ thị ISSR được xác định theo công thức: $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ (trong đó P_{ij} là tần số allele thứ *j*

của kiểu gen i được kiểm tra). Các chỉ tiêu phân tích di truyền như hệ số gen dị hợp tử quan sát (H_o), hệ số gen dị hợp tử mong đợi (H_e), hệ số khác biệt di truyền (F_{st}), hệ số giao phối cận loài (F_{is}) bằng phần mềm GenAlEx 6.5 để xử lý [15]. Các giá trị về chỉ số đa dạng di truyền như chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các nguồn giống (H_p), chỉ số đa dạng gen trung bình trong nguồn giống (H_s), chỉ số sai khác di truyền theo Nei giữa các nguồn giống (G_{ST}), chỉ số trao đổi gen giữa các nguồn giống (N_m) được tính toán bằng phần mềm POPGENE [16]. Thiết lập ma trận khoảng cách di truyền để phân tích thành phần tọa độ (PCoA) và lập cây quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGA X [17].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách DNA tổng số và phản ứng khuếch đại PCR



Hình 1. Kết quả khuếch đại vùng gen mồi UBC856 của các mẫu Thông caribe

Ghi chú: MK: Marker 1kb (Thermo Scientific), Giếng 1 đến 18: mẫu DNA Thông caribe

Kết quả điện di sản phẩm tách chiết DNA tổng số trên gel agarose cho thấy, các băng xuất hiện rõ nét, gọn và không có hiện tượng đứt gãy DNA tổng số. Nồng độ DNA ≥ 20 ng/ μ l và độ tinh sạch OD_{260/280} dao động từ 1,8 – 2,0 đảm bảo điều kiện cho thí nghiệm tiếp theo. Kết quả điện di sản phẩm PCR-ISSR các mẫu Thông caribe cho thấy các giếng đều xuất hiện các băng rõ ràng, chứng tỏ phản ứng khuếch đại thành công.

3.2. Kết quả đa dạng di truyền Thông caribe giữa các nguồn giống

3.2.1. Phân tích đa dạng di truyền trong các nguồn giống Thông caribe

Với 5 chỉ thị ISSR đã nhân bản được tổng số 58 phân đoạn DNA với kích thước dao động từ 250 bp đến 2.000 bp, trong đó có 49 phân đoạn đa hình (chiếm 85,29%) khi phân tích với 6 nguồn giống Thông caribe trồng tại Cẩm Lĩnh, Ba Vì (Hà Nội). Hệ số PIC là thước đo tính đa hình của các alen ở mỗi locus ISSR, trong nghiên cứu này hệ số PIC thu được dao động từ 0,36 - 0,67. Nhìn chung, chỉ số PIC của 5 mồi có 4/5 mồi cao hơn 0,5 chứng tỏ mồi ISSR được sử dụng có tính đa hình cao [18] và cho thấy việc sử dụng các chỉ thị này phù hợp để đánh giá về mức độ đa dạng di truyền của Thông caribe nghiên cứu.

Bảng 3. Các chỉ số đa dạng di truyền của các nguồn giống Thông caribe

Nguồn giống	Chỉ số đa dạng di truyền							
	N_a	N_e	I	H_o	H_e	h	F_{is}	PPB (%)
Thành phố Huế	1,735	1,441	0,408	0,502	0,489	0,267	-0,025	82,35
Thị trấn Tứ Hạ	1,324	1,385	0,324	0,569	0,474	0,221	-0,197	55,88
Đèo Hải Vân	1,647	1,504	0,444	0,452	0,476	0,297	0,056	82,35
SPA Ba Vì 1996	2,000	1,643	0,555	0,503	0,488	0,374	-0,029	100,00
SPA Ba Vì 1993	1,706	1,552	0,472	0,462	0,490	0,319	0,058	85,29
SPA Đại Lải	1,941	1,567	0,507	0,504	0,489	0,337	-0,031	97,06
Trung bình	1,725	1,515	0,452	0,499	0,484	0,302	-0,028	83,82
SE	0,046	0,024	0,017	0,010	0,002	0,012	0,019	6,39

Ghi chú: N_a : số allele quan sát, N_e : số allele có hiệu quả; I : chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon; H_e : hệ số gen dị hợp tử mong đợi; H_o : hệ số gen dị hợp tử quan sát; h : chỉ số đa dạng di truyền theo Nei; F_{is} : hệ số giao phối cận loài và PPB: phần trăm phân đoạn đa hình.

Đánh giá mức độ đa dạng di truyền của các nguồn giống Thông caribe được phân tích thông qua các chỉ số đa dạng di truyền các nguồn giống (Bảng 3). Kết quả cho thấy, chỉ số đa dạng di truyền theo Nei (h), chỉ số đa dạng di truyền theo Shannon (I) và

phần trăm phân đoạn đa hình (PPB) của các nguồn giống của các nguồn giống Thông caribe dao động tương ứng từ 0,221 (thị trấn Tứ Hạ) đến 0,374 (SPA Ba Vì 1996); 0,324 (thị trấn Tứ Hạ) đến 0,555 (SPA

Ba Vì 1996) và từ 55,88% (thị trấn Tứ Hạ) đến 100% (SPA Ba Vì 1996).

Kết quả này khi so sánh mức độ đa dạng di truyền của các nguồn giống Thông caribe với một số loài Thông đã được công bố bằng chỉ thị ISSR nhận thấy Thông caribe có mức độ đa dạng di truyền cao hơn so với Thông lá dẹt (*Pinus krempfi*) ở Tây Nguyên ($I = 0,137$; $PPB = 30,11\%$) [10], Thông Đà Lạt (*Pinus dalatensis* Ferré) ($h = 0,128$; $I = 0,094$; $PPB = 17,72\%$) [11], Thông đen (*Pinus nigra*) ở Nam Tây Ban Nha và Bắc Ma-rốc ($I = 0,262$; $PPB = 51,04\%$) [19]. Điều này được giải thích do các loài thông nghiên cứu có phân bố hẹp, phân mảnh, số lượng cá thể ít và đây cũng là các loài được ghi nhận là cần có chương trình bảo vệ. Trong khi đó, các nguồn giống Thông caribe nghiên cứu có cả 3 biến chủng (*hondurensis*, *bahamensis* và *caribaea*) cũng như các rừng giống hiện được quản lý và bảo vệ khá tốt nên vẫn duy trì được tính đa dạng di truyền cần thiết so với một số loài thông khác.

Ngoài ra, chỉ số đa dạng di truyền của các nguồn giống Thông caribe trong nghiên cứu này ($h = 0,302$) lại thấp hơn kết quả phân tích đa dạng di truyền của 189 mẫu thông *Pinus sylvestris* ở Bồ Đào Nha và Tây Ban Nha (thu mẫu trên dải phân bố diện rộng) bằng 7 chỉ thị ISSR ($h = 0,4975$) [20], nhưng cao hơn chỉ số đa dạng di truyền ($h = 0,2393$) của 135 mẫu thông *Pinus sylvestris* cho 9 xuất xứ tại Trung Quốc phân tích bằng 10 mỗi ISSR [21]. Điều này cho thấy, việc thu thập mẫu đại diện để phân tích là rất quan trọng để đánh giá một cách đầy đủ nhất tính đa dạng di truyền của một loài. Như vậy, đối với việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền của Thông caribe ở Việt Nam cần tiến hành thêm trên một số lâm phần ở một số khu vực khác để đưa ra các hướng đi cho chương trình tuyển chọn và phát triển giống Thông caribe trong tương lai là việc cần thiết.

Bảng 3 cho thấy, số allele có hiệu quả (N_e) và hệ số gen dị hợp tử mong đợi (H_e) của nguồn giống SPA Ba Vì 1996 đạt cao nhất ($N_e = 1,643$ và $H_e = 0,488$) và thấp vẫn là nguồn giống thị trấn Tứ Hạ ($N_e = 1,385$ và $H_e = 0,474$). Kết quả phân tích về các chỉ số này trùng với kết quả của chỉ số đa dạng di truyền I theo Shannon và phân đoạn đa hình. Như vậy, kết quả này đồng nhất với nguồn gốc vật liệu giống tại các nguồn giống, trong đó SPA Ba Vì 1996 ghi nhận bao gồm cả 3 biến chủng và một số dạng lai của Thông caribe, trong khi tại thị trấn Tứ Hạ chỉ có biến

chủng *caribaea* - là biến chủng có mức độ đa dạng di truyền thấp hơn so với hai biến chủng còn lại [22].

Đối với kết quả phân tích cấu trúc các nguồn giống bằng phần mềm POPGEN (Bảng 4) nhận thấy các nguồn giống Thông caribe được nghiên cứu có tính đa dạng di truyền ở mức độ trung bình với chỉ số đa dạng nguồn gen của các nguồn giống $H_T = 0,3592$ và chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình trong mỗi nguồn giống $H_S = 0,3024$. Chỉ số trao đổi gen $Nm = 2,6633$ thể hiện mức độ trao đổi gen là không đáng kể. Trừ hai nguồn giống SPA Ba Vì 1993 và SPA Ba Vì 1996 là có thể xảy ra hiện tượng trao đổi hạt phấn tự nhiên, các nguồn giống nghiên cứu còn lại đều có khoảng cách địa lý xa nên hiện tượng trao đổi hạt phấn tự nhiên là khó có thể xảy ra.

Bảng 4. Các chỉ số đa dạng di truyền giữa các nguồn giống Thông caribe

Thông số di truyền	Trung bình $\pm$ SD
H_T	$0,3592 \pm 0,0158$
H_S	$0,3024 \pm 0,0114$
G_{ST}	0,1581
Nm	2,6633

Mặt khác, hệ số giao phần cận Noon trung bình $F_{is} = -0,028 < 0$ (Bảng 3), chứng tỏ hiện tượng thụ phấn chéo chiếm ưu thế trong hầu hết các nguồn giống. Kết quả này đồng nhất với kết quả phân tích chỉ số sai khác di truyền ở bảng 4, G_{ST} đạt 0,1581 có nghĩa là có tới 15,81% sai khác di truyền giữa các nguồn giống và phần lớn là các mẫu Thông caribe có nguồn gốc từ hiện tượng thụ phấn chéo. Tuy nhiên, tại hai nguồn giống đèo Hải Vân và SPA Ba Vì 1993 có chỉ số giao phần cận Noon dương nhưng rất nhỏ (lần lượt là 0,056 và 0,058), chứng tỏ vẫn có hiện tượng tự thụ phấn xảy ra tại hai nguồn giống này.

3.2.2. Mức độ biến đổi di truyền giữa các nguồn giống Thông caribe

Kết quả phân tích về mức độ biến đổi phân tử (AMOVA) giữa các nguồn giống Thông caribe (Bảng 5) cho thấy tổng mức độ thay đổi phân tử giữa các nguồn giống ở mức độ thấp (12%) và phần lớn sự biến đổi về phân tử được xác định giữa các cá thể trong cùng một nguồn giống (88%). Kết quả này lần nữa khẳng định, Thông caribe là loài có xu hướng thụ phấn chéo chiếm ưu thế nhưng với tỷ lệ thấp.

Bảng 5. Mức độ thay đổi phân tử AMOVA giữa các nguồn giống Thông caribe nghiên cứu

Mức độ biến đổi di truyền	Tổng sự biến đổi (%)	Giá trị P
Giữa các xuất xứ	12,00	<0,001
Trong cùng xuất xứ	88,00	

Kết quả phân tích AMOVA giữa các nguồn giống của Thông caribe thấp hơn rất nhiều so với loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii*) (20,28%) [10] hay Thông Đà Lạt (*Pinus dalatensis* Ferré) (41,99%) [11]. Theo Young (2000), thông thường, các loài có phân bố rải rác, số lượng cá thể trong tự nhiên còn lại không nhiều thường có xu thế tự thụ phấn cao hơn so với các loài có phân bố tập trung với số lượng

cá thể lớn [23]. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến hiện tượng các loài Thông đang trong tình trạng cần được bảo vệ có giá trị sai khác giữa các xuất xứ/quần thể cao hơn so với nhiều cây rừng nói chung và Thông caribe nói riêng.

3.2.3. Phân tích khoảng cách di truyền và mức độ tương đồng về di truyền giữa các nguồn giống Thông caribe

Kết quả phân tích khoảng cách di truyền và mức độ tương đồng di truyền giữa các nguồn giống Thông caribe theo phương pháp của Nei [24] cho thấy khoảng cách di truyền giữa 6 nguồn giống Thông caribe dao động từ 0,044 đến 0,205 và mức độ tương đồng di truyền dao động từ 0,815 (81,5%) đến 0,957 (95,7%) (Bảng 6).

Bảng 6. Khoảng cách di truyền (dưới vạch) và mức độ tương đồng (trên vạch) giữa các nguồn giống Thông caribe

	Thành phố Huế	Thị trấn Tứ Hạ	Đèo Hải Vân	SPA Ba Vì 1993	SPA Ba Vì 1996	SPA Đại Lải
Thành phố Huế	-	0,876	0,815	0,846	0,840	0,849
Thị trấn Tứ Hạ	0,132	-	0,932	0,911	0,898	0,935
Đèo Hải Vân	0,205	0,071	-	0,937	0,936	0,940
SPA Ba Vì 1993	0,167	0,094	0,065	-	0,939	0,956
SPA Ba Vì 1996	0,174	0,108	0,066	0,072	-	0,957
SPA Đại Lải	0,163	0,067	0,062	0,043	0,044	-

Kết quả phân tích cho thấy, nguồn giống Thông caribe tại thành phố Huế có khoảng cách di truyền lớn nhất với nguồn giống Đèo Hải Vân (0,205) và có mức độ tương đồng về mặt di truyền đạt 81,5%; có khoảng cách di truyền nhỏ nhất với nguồn giống tại thị trấn Tứ Hạ (0,132) mới mức độ tương đồng đạt 87,6%. Các nguồn giống Đèo Hải Vân, SPA Ba Vì (bao gồm cả 1993 và 1996) và SPA Đại Lải có mức độ tương đồng khá cao (đạt từ 93,7% đến 95,7%). Qua phân tích khoảng cách di truyền và chỉ số sai khác di truyền giữa các xuất xứ ($G_{ST} = 0,1581$) nhận thấy có mối tương quan giữa 2 giá trị này, chỉ số sai khác di truyền tác động tới khoảng cách di truyền khác nhau giữa các xuất xứ.

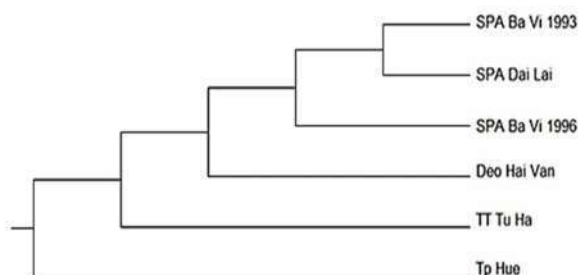
3.2.4. Phân tích mối quan hệ di truyền của các nguồn giống Thông caribe

Cây phân loại các nguồn giống Thông caribe được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng di truyền (Bảng 6) và phân nhóm UPGMA bằng phần mềm MEGA X (Hình 2).

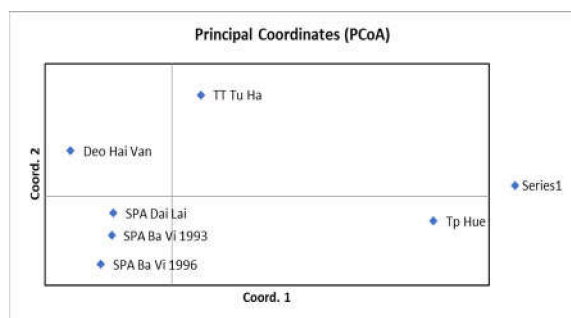
Dựa vào kết quả phân tích mối quan hệ di truyền Thông caribe ở hình 3 cho thấy, về cơ bản các nguồn giống được xếp vào 2 nhánh chính, trong đó nhánh lớn thứ nhất là nguồn giống thành phố Huế và nhánh lớn thứ hai bao gồm 5 nguồn giống còn lại. Nhánh lớn thứ hai tiếp tục được chia làm hai nhánh nhỏ, trong đó, nguồn giống thị trấn Tứ Hạ nằm ở một nhánh và nhánh còn lại bao gồm 4 xuất xứ còn lại và được chia tiếp thành hai nhóm nhỏ hơn. Trong đó, nguồn giống đèo Hải Vân được xếp ở một nhóm riêng và nhóm còn bao gồm 3 xuất xứ còn lại. Trong nhánh nhỏ này lại bao gồm 2 nhóm nhỏ hơn, một nhóm chỉ có nguồn giống SPA Ba Vì 1996 và nhóm còn lại bao gồm SPA Ba Vì 1993 và SPA Đại Lải với sự khác biệt di truyền tương đối nhỏ.

Kết quả này cũng tương tự với kết quả phân tích PCoA khi nguồn giống tại thành phố Huế, thị trấn Tứ Hạ và đèo Hải Vân được phân tách khá riêng biệt so với các nguồn giống Thông caribe còn lại (Hình 3). Kết quả phân tích này đồng nhất với kết quả điều tra của Cấn Thị Lan và cs (2020) về các xuất xứ và biến chủng được trồng tại các nguồn giống này [3]. Tuy

nhiên, việc chọn lọc cây trội để thu hái hạt giống và xây dựng khảo nghiệm hậu thế với các cây con từ hạt là nguồn vật liệu để tách chiết ADN và đánh giá mức độ đa dạng di truyền các nguồn giống có thể chưa phản ánh hết mức độ đa dạng di truyền cũng như mối quan hệ di truyền giữa các nguồn giống Thông caribe ở Việt Nam.

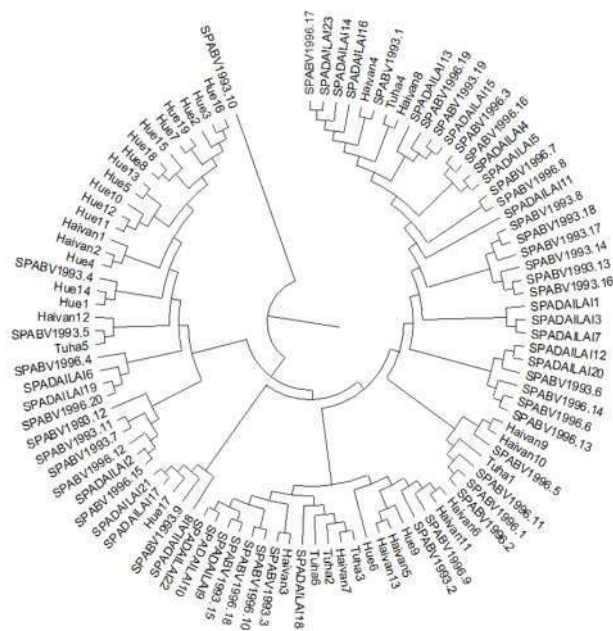


Hình 2. Cây quan hệ di truyền 6 nguồn giống Thông caribe



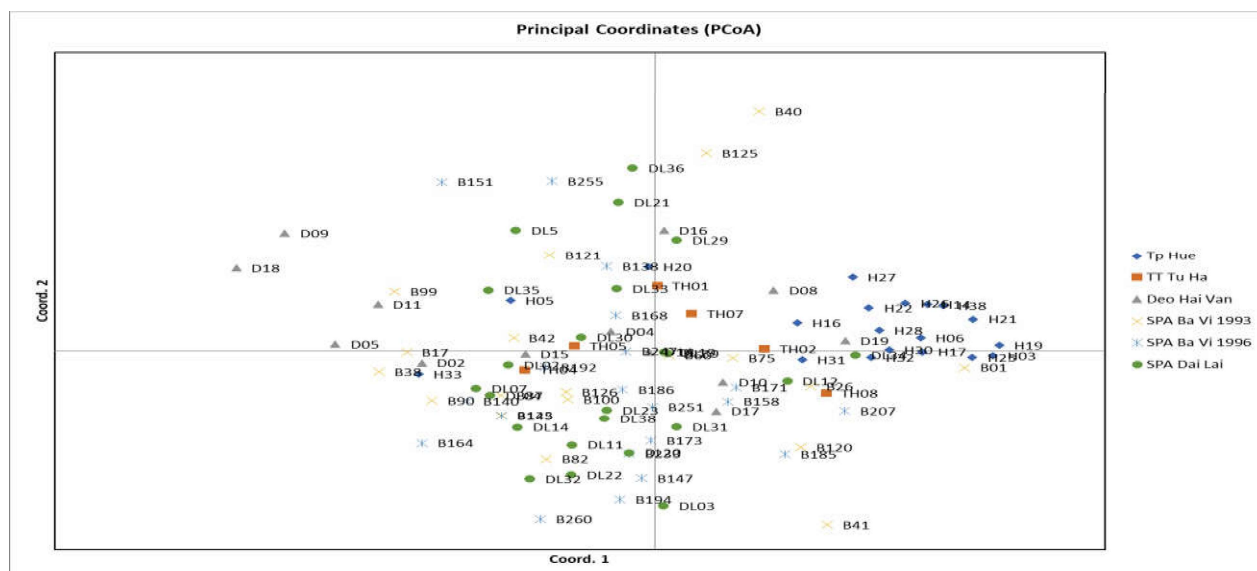
Hình 3. Kết quả phân tích PCoA của 6 nguồn giống Thông caribe

nguồn giống cho thấy về cơ bản các gia đình trong cùng nguồn giống được ghép vào từng nhóm nhỏ ngoại trừ một số mẫu của nguồn giống SPA Ba Vi 1993 cùng nhóm với các mẫu thu từ rừng trồng ở thành phố Huế, hay một số mẫu thuộc nguồn giống thị trấn Tứ Hạ và đèo Hải Vân cùng nhóm với một số của nguồn giống SPA Đại Lải (Hình 4). Kết quả này một lần nữa cho thấy, giữa các nguồn giống có mối tương đồng về di truyền tương đối lớn, đặc biệt đối với các nguồn giống SPA Ba Vi và SPA Đại Lải.



Hình 4. Cây quan hệ di truyền các mẫu Thông caribe

Tương tự, phân tích cây quan hệ di truyền (Hình 4) và PCoA (Hình 5) của 100 gia đình cây trội của 6



Hình 5. Kết quả phân tích PCoA của các mẫu Thông caribe với 6 nguồn giống

4. KẾT LUẬN

Đã xác định tính đa dạng di truyền của các nguồn giống Thông caribe nghiên cứu ở mức trung bình ($h = 0,302$) trên cơ sở phân tích 5 chỉ thị phân tử ISSR, trong đó cao nhất là nguồn giống SPA Ba Vì 1996 ($h = 0,374$) với cả 3 biến chủng và một số dạng thông lai.

Mức độ khác biệt về mặt di truyền giữa các nguồn giống là không đáng kể (12%) chứng tỏ các nguồn giống này có mối quan hệ di truyền gần gũi, trong đó nguồn giống SPA Đại Lải có mức độ tương đồng cao trên 95% với 2 nguồn giống SPA Ba Vì 1993 (95,6%) và SPA Ba Vì 1996 (95,7%).

Hiện tượng thụ phấn chéo ở các nguồn giống Thông caribe chiếm ưu thế, mặt khác tại 2 nguồn giống SPA Ba Vì 1996 và thành phố Huế lại có hiện tượng tự thụ phấn với tỷ lệ rất nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Khả, Hồ Viết Sắc (1980). Tình hình sinh trưởng một số loài cây lá kim ở vùng núi Đà Lạt. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 9, trang 24 - 28.
2. Lê Đình Khả (1999). Chọn giống các loài Thông thuộc chi Pinus. *Thông tin chuyên đề, Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn, Trung tâm Thông tin*, số 7.
3. Cấn Thị Lan (2020). Nghiên cứu chọn giống Thông caribê (*Pinus caribaea* Morelet) cung cấp gỗ lớn cho vùng Bắc Trung bộ và Đông Bắc bộ. *Báo cáo tổng kết đề tài, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*.
4. Phan Thanh Hương (2000). Đặc điểm sinh trưởng của một số xuất xứ Thông caribe (*Pinus caribaea* Morelet) được khảo nghiệm trên một số vùng sinh thái ở Việt Nam. *Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Lâm nghiệp*, 81 trang.
5. Khuất Thị Hải Ninh (2003). Nghiên cứu một số đặc điểm biến dị của Thông caribe (*Pinus caribaea* Morelet) trồng thuần loài tại Đại Lải, huyện Mê Linh, Vĩnh Phúc. *Khóa luận tốt nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp*, 48 trang.
6. Trịnh Văn Hiệu, Cấn Thị Lan, Ngô Văn Chính, Phan Đức Chính, Quách Mạnh Tùng, Dương Hồng Quân, Nguyễn Đức Kiên, Đỗ Hữu Sơn (2020). Đánh giá sinh trưởng, chất lượng thân cây của khảo nghiệm hậu thế Thông caribê (*Pinus caribaea* Morelet) tại Ba Vì, Hà Nội. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, số 24: 105-112.
7. Rao N. K. (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3(2): 136 - 145.
8. Nguyen Minh Tam, Nguyen Thi Hoa, Nguyen Thi Phuong Trang (2009). Genetic variation in threatened conifer *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* using ISSR markers, Implications for conservation, *Tạp chí Sinh học*, 31(2): 66-72.
9. Nguyen Minh Tam, Nguyen Thi Phuong Trang, Nguyen Thi Hoa (2011). Genetic diversity of an endangered species, *Fokienia hodginsii* (Cupressaceae). *African Journal of Biotechnology* 10(71): 15838 - 15844.
10. Trần Thị Liễu, Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Tiến Hiệp, Đinh Thị Phòng (2015). Tính đa dạng nguồn gen di truyền loài Thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) - Loài đặc hữu hẹp ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 53 (2): 169-179.
11. Đinh Thị Phong, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu (2015). Genetic variation of *Pinus dalatensis* Ferre' (Pinaceae) populations - endemic species in Vietnam revealed by ISSR markers. *Journal of Chemical Biological and Physical Science*, 5 (2): 1415 - 1425.
12. Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, Đỗ Thị Phương Thảo, Phan Kế Lộc, Nguyễn Minh Tâm (2016). Nghiên cứu đa dạng và biến đổi di truyền ở quần thể tự nhiên của dưới loài thông Xuân Nha (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L. K. Phan) đặc hữu hẹp ở Sơn La, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14 (3): 441 -450.
13. Isshiki S., Iwata N., Khan M. M. R. (2008). ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related Solanum species. *Scientia Horticulture* 117: 186 – 190.
14. Doyle J. J. and Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. Vol. 19: 11 - 15.
15. Peakall R., Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288 - 95.
16. Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. B. J., Ye Z. H., Mao J. X. (1997). POPGENE, the User - Friendly Shareware for Population Genetic Analysis.

Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

17. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz and Koichiro Tamura (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6), DOI:10.1093/molbev/msy096.

18. David Botstein, Raymond L. White, Mark Skolnick and Ronald W. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314 - 331.

19. Moraga A. R., Perez D. C., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñegla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O. (2013). 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: 5645 - 5658.

20. Cipriano J., Carvalho A., Fernandes C., Gaspar M. J., Pires J., Bento J., Roxo L., Louzada J. and Lima - Brito J. (2013). 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 (2): 41 - 48.

21. Hui-yu L., Jing J., Gui-feng L., Ma Xu-jun, Dong Jing-xiang & Lin Shi-jie (2005). Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. *Journal of Forestry Research* 16, 216 - 218.

22. Virginia Rebolledo Camacho, Lev Jardón Barbolla, Ivón Ramírez Morillo, Alejandra Vázquez-Lobo, Daniel Piñero & Patricia Delgado (2018). Genetic variation and dispersal patterns in three varieties of *Pinus caribaea* (Pinaceae) in the Caribbean Basin. *Plant Ecology and Evolution*, 151 (1): 61 - 76.

23. Young A., Boshier D., Boyle, T. (2000). Forest conservation genetics: Principles and Practice. *CSIRO publishing, Collingwood, VIC, Australia*.

24. Nei M (1973). Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 70: 3321 - 3323.

GENETIC DIVERSITY OF SOME SEED ORCHARD OF *Pinus caribaea* Morelet IN VIETNAM

Le Son, Tran Duc Vuong, Nguyen Duc Kien

Summary

Pinus caribaea Morelet is an economically valuable forest plant with a wide margin of adaptation, especially in areas of cultivated land, hilly areas. In this study, 5 ISSR markers were used analyze genetic diversity of some *Pinus caribaea* resources in Viet Nam. The analysis results showed that a total of 58 DNA fragments were amplified, in which 49 fragments were polymorphic (83.82%). Genetic diversity of *P. caribaea* sources was moderate, with the highest in the Ba Vi SPA seed source 1996 ($h = 0.374$; $I = 0.555$, $PPB = 100\%$) and lowest in the Tu Ha town seed source ($h = 0.221$; $I = 0.324$ and $PPB = 55.88\%$). The mean inbreeding index $F_{is} = -0.028 < 0$ indicates that cross-pollination occurs in seed sources. The results of the seed source structure analysis (POPGENE) also showed that Caribbean Pine is moderately diverse with $H_T = 0.3592$ and $H_S = 0.3024$; gene exchange index $Nm = 2.6633$ is negligible but there is still gene exchange between *P. caribaea* seed sources. Genetic differential index G_{ST} of 0.1581 means that up to 15.81% of genetic differences between seed sources are derived from cross-pollination. The total level of molecular change (AMOVA) between *P. caribaea* seed sources was low (12%) and the majority of molecular variability was identified between individuals in the same seed source (88%). The genetic relationship tree is divided into 2 main branches and has a genetic similarity coefficient ranging from 0.815 to 0.957.

Keywords: Genetic diversity, ISSR, *Pinus caribaea* Morelet, cross - pollination.

Người phản biện: PGS.TS. Bùi Văn Thắng

Ngày nhận bài: 23/8/2022

Ngày thông qua phản biện: 23/9/2022

Ngày duyệt đăng: 30/9/2022