

ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI GIÁNG HƯƠNG (*Pterocarpus macrocarpus*) TẠI KHU RỪNG THỰC NGHIỆM, TRƯỜNG ĐẠI HỌC LÂM NGHIỆP DỰA TRÊN CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD

Vũ Quang Nam^{1*}, Cao Thị Việt Nga¹, Nguyễn Trọng Trí¹, Nguyễn Thị Mến¹

TÓM TẮT

14 mẫu Giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) ở các tuổi và xuất xứ khác nhau ở Khu rừng thực nghiệm, Trường Đại học Lâm nghiệp được đánh giá tính đa dạng di truyền với 15 mỗi RAPD (CP1, CP17, CP2, CP3, RM5, OPF9, CP8, CP6, OPE14, CP5, CP9, CP11, CP13, CP15, CP19). Kết quả cho thấy trong tổng số 545 băng, có 92 băng là đa hình. Số phân đoạn ADN được nhân bản dao động từ 3 đến 10 đối với các mẫu khác nhau. Các mẫu Giáng hương có hệ số tương đồng di truyền từng cặp nằm trong khoảng 0,46 đến 0,88 và trung bình là 0,72. Điều này chứng tỏ mức độ tương đồng di truyền của các mẫu Giáng hương ở Khu rừng thực nghiệm, Trường Đại học Lâm nghiệp là không cao, do vậy khả năng tạo ưu thế lai trong sinh sản hữu tính để tạo nên sự đa dạng di truyền trong tập đoàn mẫu nghiên cứu là cao. Trên sơ đồ hình cây thì 14 mẫu Giáng hương với 15 mỗi ngẫu nhiên được chia làm 2 nhóm chính, trong đó nhóm I chỉ có duy nhất mẫu G1. Nhóm II gồm 13 mẫu chia thành 2 nhánh phụ N1 và N2, rồi tiếp tục phân nhánh: nhánh phụ 1 (N1) gồm G2, G3, G4 và G6; nhánh phụ 2 (N2) gồm 9 mẫu còn lại và tiếp tục chia thành 2 cụm: Cụm 1 (G5, G7, G14) và Cụm 2 (G8, G10, G9, G11, G12, G13). Nghiên cứu này cho thấy những ưu thế về đa dạng nguồn gen di truyền của các cá thể Giáng hương sưu tập tại Khu rừng thực nghiệm, Trường Đại học Lâm nghiệp.

Từ khóa: Đa dạng di truyền, Fabaceae, *Pterocarpus macrocarpus*, lâm nghiệp, RAPD.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) còn gọi là Giáng hương chân, Giáng hương quả to, Sen, Song lá là loài cây gỗ lớn thuộc họ Đậu (Fabaceae) với đặc điểm nổi bật như: thân thẳng, vỏ nứt dọc, có nhựa màu đỏ tươi; lá kép lông chim một lần lẻ, mang 7 - 13 lá chét; cụm hoa hình chùy ở nách lá phía đỉnh cành, hoa màu vàng nghệ, có lông, mùi thơm; quả gần như tròn, dẹt, giữa có một hạt, xung quanh là cánh rộng (Hình 1). Loài có phân bố rộng khắp, nhưng chủ yếu từ Nghệ An đổ vào các tỉnh phía Nam của Việt Nam. Ngoài ra chúng còn phân bố ở Lào, Campuchia và Thái Lan. Đây là loài cây gỗ tốt, bền, có mùi thơm, có màu sắc và vân hoa đẹp, không bị nứt nẻ, mối mọt, nhựa có thể dùng làm thuốc nhuộm màu. Loài được liệt vào phân hạng EN A1 a, c, d do bị khai thác mạnh, quần thể chia cắt, nơi cư trú bị xâm hại mạnh (Sách Đỏ Việt Nam, 2007) và thuộc nhóm IIA của Nghị định 06/2019/NĐ-CP ngày 22 tháng 01 năm 2019 của Chính phủ. Mặc dù khu

phân bố tương đối rộng nhưng lại bị chia cắt, đồng thời nạn chặt phá rừng làm cho nơi cư trú bị xâm hại mạnh. Đối tượng này hiện trở thành rất khan hiếm, khó tìm được những cá thể trưởng thành có kích thước lớn như trước đây.

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về loài Giáng hương như Liengsiri *et al.* (1995) đã phân tích Isozyme cho 11 quần thể Giáng hương tự nhiên ở Thái Lan. Kết quả chỉ ra phần trăm locus đa hình đối với mỗi quần thể dao động từ 66,67 đến 100%, trung bình là 82,32%. Bai *et al.* (2014) đã sử dụng 12 mỗi RAPD và 4 mỗi ISSR để đánh giá tính đa dạng di truyền và mối phát sinh chủng loại của 4 loài thuộc chi *Pterocarpus* (*P. dalbergioides*, *P. indicus*, *P. marsupium* và *P. santalinus*) và loài *Tipuana tipu* (Fabaceae). Kết quả chỉ ra mức độ tương đồng di truyền trung bình giữa các loài là 52%. Ở trong nước, mặc dù đã có một số nghiên cứu về loài nhưng chỉ chủ yếu tập trung vào một số đặc điểm sinh lý hay nhân giống loài (Hà Thị Mùng, 2004; Nguyễn Xuân Lợi và cộng sự, 2011) mà chưa có nghiên cứu nào về di truyền loài/quần thể. Do vậy, nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm góp phần bảo tồn và phát triển

¹ Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

*Email: namvq@vnuf.edu.vn; namvq1975@gmail.com

nguồn gen loài cây bản địa quý hiếm này tại Khu rừng thực nghiệm của Trường Đại học Lâm nghiệp.



Hình 1. Giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus*)

A. Cảnh lá mang hoa và quả (mũi tên); B. Hình thái vỏ thân và cành lá mang chùm hoa

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

14 mẫu lá bánh tẻ của loài Giáng hương được lấy từ các vị trí khác nhau trong khu thực nghiệm Núi Luốt, Trường Đại học Lâm nghiệp. Các cá thể có chiều cao vút ngọn (H_{vn}) từ 10 -20 m, có đường kính ngang ngực ($D_{1,3}$) từ 20 - 35 cm. Các mẫu được ký hiệu lần lượt từ G1 đến G14.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết ADN

ADN tổng số được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo Doyle và Doyle (1990) có cải tiến theo điều kiện phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

2.2.2. Phương pháp PCR

Phản ứng PCR với các mẫu RAPD được thực hiện trên máy System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ) với tổng thể tích là 15 μ l/phản ứng gồm những thành phần sau: Nước khử ion vô trùng (5,3 μ l), 2 x PCR Master mix Solution (7,5 μ l), mỗi RAPD (1,2 μ l), ADN (1 μ l). ADN được pha loãng với H_2O deion với nồng độ pha loãng gấp 20 lần.

Các thành phần hỗn hợp trên được trộn đều và chạy PCR theo chương trình đã cài sẵn với 40 chu kỳ, gồm các bước: 1. 94°C trong 5 phút; 2. 94°C trong 45 giây; 3. 38°C trong 45 giây; 4. 72°C trong 1 phút; 5. 72°C trong 7 phút. Lặp lại 40 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 6. Giữ nhiệt độ 4°C. Trong nghiên cứu này đã sử dụng 15 mẫu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi RAPD sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ gắn mồi (°C)
1	CP1	GAAACGGGTG	38
2	CP17	GGGTAACGCC	37
3	CP2	CAATCGCCGT	38
4	CP3	GTTGCGATCC	36
5	RM5	GTCGGTTGTC	32
6	OPF9	TCCGCAACCA	39
7	CP8	CTGGGCACGA	38
8	CP6	TTCCGCCACC	36
9	OPE14	CCGCTACCGA	31
10	CP5	CCTTTCCCTC	35
11	CP9	CTGCTGGGAC	36
12	CP11	CCACAGCAGT	37
13	CP13	CAATCGCCGT	36
14	CP15	GTCCACACGG	38
15	CP19	CCAGACCCTG	38

2.2.3. Phương pháp phân tích số liệu RAPD

Kiểm tra ADN tổng số và sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% (đối với ADN tổng số) và agarose 1,5% (đối với sản phẩm PCR), sử dụng đệm TAE 1X, nhuộm gel bằng Redsafe™ Nucleic Acid gel Stain, thực hiện trên thiết bị điện di của Hãng Bio-Rad (Mỹ). Sản phẩm PCR sẽ được nhuộm và chụp ảnh để phân tích.

Xác định băng đơn hình và đa hình dựa vào sự xuất hiện và không xuất hiện của băng đó giữa các mẫu nghiên cứu. Nếu một phân đoạn ADN (có kích thước cụ thể dựa trên ADN thang chuẩn (ADN marker) xuất hiện ở mẫu i nhưng không xuất hiện ở mẫu j hoặc xuất hiện đồng thời ở cả 02 mẫu i và j nhưng không xuất hiện ở mẫu khác thì phân đoạn ADN này gọi là phân đoạn đa hình. Ngược lại, nếu phân đoạn ADN nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là phân đoạn đơn hình. Các đoạn được mã hóa bằng số tự nhiên 0 và 1, khi đó mẫu nào

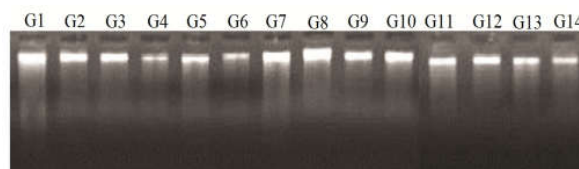
xuất hiện đoạn ADN thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện ký hiệu là 0. Các số liệu nhị phân này được đưa vào xử lý theo chương trình NTSYSpC 2.11X (Rohlf, 2000) để tính ma trận tương đồng (Similarity matrix) hoặc ma trận khoảng cách (Distance matrix) giữa các cặp mẫu (Nei và Li, 1979). $D_{ij} = 2n_{ij}/(n_i+n_j)$. Trong đó, n_{ij} là số băng chung của cả hai cá thể, n_i và n_j là số băng của cá thể i và j , D_{ij} là hệ số tương đồng di truyền giữa 2 cá thể i và j .

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết ADN tổng số các mẫu Giáng hương được thể hiện ở hình 2.

Hình 2 cho thấy ADN của các mẫu nghiên cứu đã được tách chiết thành công với các băng vạch thu được đều gọn và khá rõ nét, không xuất hiện băng phụ, không bị đứt gãy. Kết quả đo OD cho chỉ số OD_{260}/OD_{280} của các mẫu luôn nằm trong khoảng 1,8

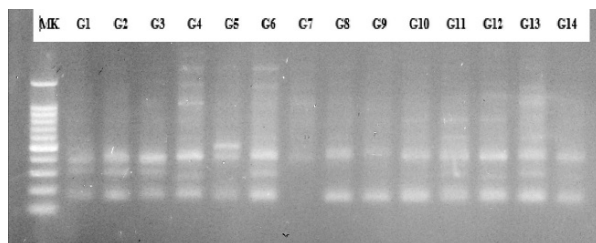
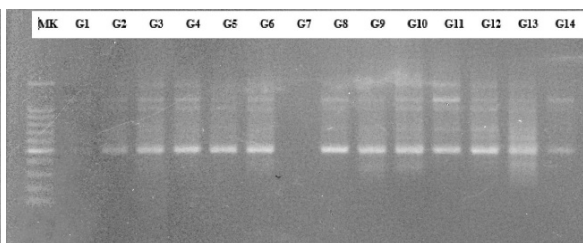
đến 2,0. Do vậy, ADN tổng số thu được có độ sạch và nguyên vẹn cao, hoàn toàn đáp ứng điều kiện thực hiện phản ứng PCR - RAPD tiếp theo. ADN được pha loãng để sử dụng cho phản ứng PCR - RAPD với nồng độ sau pha loãng là 20 ng/ μ l.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm tách chiết ADN tổng số của các mẫu Giáng hương

Ghi chú: Giếng 1 - 14 tương ứng với 14 mẫu Giáng hương nghiên cứu

3.1. Kết quả phân tích đa dạng di truyền



Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm PCR các mẫu RAPD 14 mẫu Giáng hương

Môi CP1 (ảnh bên trái), Môi OPF9 (ảnh bên phải); MK: marker - thang ADN chuẩn 1 kb; Giếng 1-14: 14 mẫu Giáng hương.

Hiệu quả sử dụng các môi RAPD trong phân tích sự đa dạng di truyền các mẫu Giáng hương nghiên cứu: Tiến hành phản ứng PCR với 15 môi RAPD. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel

agarose cho thấy các phân đoạn ADN thu được có sự đa hình cao (Hình 3).

Phân tích ảnh điện di qua việc nhị phân hóa sự xuất hiện của các phân đoạn ADN và xử lý thống kê được tổng hợp và đánh giá ở bảng 2.

Bảng 2. Số phân đoạn và băng đa hình của 15 môi RAPD trong phân tích các mẫu Giáng hương

STT	Tên môi	Số phân đoạn được nhận bản	Số băng đa hình		Tổng số băng/môi	Số băng trung bình/mẫu
			Số lượng	Tỉ lệ (%)		
1	CP1	10	9	90	57	4,07
2	CP17	8	7	87,5	38	2,71
3	CP2	5	5	100	14	1,00
4	CP3	9	9	100	33	2,36
5	RM5	6	6	100	20	1,43
6	OPF9	7	7	100	58	4,14
7	CP8	3	3	100	19	1,36
8	CP6	5	5	100	16	1,14
9	OPE14	5	5	100	51	3,64

10	CP5	4	4	100	31	2,21
11	CP9	10	10	100	51	3,64
12	CP11	3	3	100	17	1,21
13	CP13	10	9	90	59	4,21
14	CP15	7	7	100	62	4,43
15	CP19	3	3	100	19	1,36
Tổng		95	92	97,8	545	

Bảng 2 cho thấy trong tổng số 545 băng ADN được nhân bản có 92 băng ADN đa hình, tỉ lệ trung bình đạt đến 6,5%. Tương tự, trong tổng số 95 phân đoạn ADN thu được có 92 phân đoạn ADN đa hình, trung bình đạt 96,8%. Số phân đoạn ADN được nhân bản dao động từ 3 đến 10 đối với các mẫu khác nhau. Tỷ lệ phân đoạn đa hình nằm trong khoảng 87,5% (với mẫu CP17) đến 100% (CP9, CP15, CP19, CP11, CP5, OPE14, CP6, CP8, OPF9, RM5, CP3, CP5).

3.2. Mối quan hệ di truyền và đa dạng di truyền của các mẫu *Giáng hương* nghiên cứu

Số liệu nhị phân tiếp tục được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc 2.11X để tính hệ số tương đồng di truyền và xây dựng sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hệ số tương đồng của 14 mẫu *Giáng hương* nghiên cứu

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14
G1	1,00													
G2	0,65	1,00												
G3	0,66	0,88	1,00											
G4	0,48	0,72	0,77	1,00										
G5	0,68	0,64	0,69	0,62	1,00									
G6	0,51	0,71	0,71	0,75	0,74	1,00								
G7	0,70	0,50	0,57	0,50	0,80	0,60	1,00							
G8	0,59	0,65	0,71	0,61	0,82	0,77	0,71	1,00						
G9	0,58	0,58	0,63	0,57	0,74	0,63	0,68	0,77	1,00					
G10	0,57	0,57	0,60	0,52	0,77	0,66	0,69	0,82	0,79	1,00				
G11	0,54	0,63	0,66	0,56	0,77	0,70	0,63	0,76	0,71	0,76	1,00			
G12	0,59	0,59	0,60	0,52	0,75	0,66	0,65	0,76	0,66	0,82	0,80	1,00		
G13	0,46	0,61	0,64	0,56	0,66	0,66	0,54	0,71	0,68	0,80	0,74	0,76	1,00	
G14	0,67	0,63	0,66	0,52	0,77	0,68	0,72	0,76	0,70	0,73	0,67	0,67	0,65	1,00

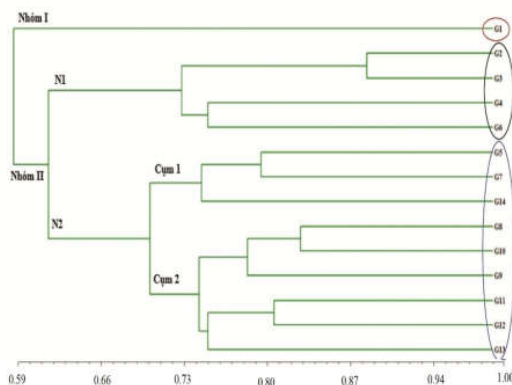
Bảng 3 cho thấy hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu theo từng cặp dao động từ 0,46 đến 0,88. Hệ số tương đồng di truyền thấp nhất là cặp mẫu G1-G13 (0,46) cho thấy 2 mẫu này có quan hệ di truyền cách xa nhau và cao nhất là cặp mẫu G2 - G3 (0,88) cho thấy 2 mẫu này có quan hệ di truyền tương đối gần nhau. Hệ số tương đồng trung bình là 0,72, thấp

hơn so với nghiên cứu của Bai *et al.* (2014) khi tác giả đánh giá mối quan hệ di truyền 16 cây cá thể của loài thuộc chi *Pterocarpus* (hệ số tương đồng về di truyền giữa các cá thể trong cùng loài đạt từ 84 - 95%). Như vậy mức độ tương đồng di truyền của 14 mẫu *Giáng hương* ở Khu rừng thực nghiệm, Trường Đại học Lâm nghiệp là không cao; hay nói cách khác

mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu là cao. Điều này có thể do nguồn cây giống (xuất xứ) được di thực về trồng là khác nhau.

Xử lý bằng phần mềm trên cũng thu được kết quả phân nhóm các mẫu nghiên cứu theo dạng cây phân loại (Hình 4).

Sơ đồ hình cây biểu diễn mối quan hệ di truyền ở hình 4 được tạo ra khi phân tích 14 mẫu Giáng hương với 15 mẫu ngẫu nhiên được chia làm 2 nhóm chính: nhóm I: chỉ có duy nhất mẫu G1 có hệ số di truyền sai khác so với các mẫu khác thuộc nhóm II là 41% (1 - 0,59). Nhóm II gồm 13 mẫu chia thành 2 nhánh phụ N1 và N2, N1 và N2 tiếp tục phân nhánh: nhánh phụ 1 (N1): gồm 4 mẫu chia làm 2 nhánh, nhánh 1 có G2 và G3 có hệ số tương đồng là 0,88, nhánh 2 có G4 và G6 với hệ số tương đồng là 0,75. Hệ số di truyền sai khác của nhánh phụ (N1) với các mẫu ở nhánh phụ (N2) là 38% (1 - 0,62). Nhánh phụ 2 (N2) gồm 9 mẫu còn lại và chia thành 2 cụm: Cụm 1 (G5, G7, G14) và Cụm 2 (G8, G10, G9, G11, G12, G13) có hệ số di truyền sai khác với nhau là 29,5% (1 - 0,70).



Hình 4. Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Giáng hương

4. KẾT LUẬN

14 mẫu Giáng hương nghiên cứu có mức độ tương đồng về di truyền không cao, do đó, các cây này có thể được sử dụng làm cây bố mẹ để cung cấp vật liệu giống qua sinh sản hữu tính cho các chương trình nghiên cứu và phát triển nguồn gen loài cây này trong thời gian tới.

Kết quả phân tích 14 mẫu Giáng hương với 15 mẫu ngẫu nhiên được chia làm 2 nhóm chính, trong đó nhóm I chỉ có duy nhất mẫu G1; nhóm II: bao gồm 13 mẫu chia thành 2 nhánh phụ N1 và N2, rồi

tiếp tục phân nhánh: Nhánh phụ 1 (N1) gồm G2, G3, G4 và G6. Nhánh phụ 2 (N2) gồm 9 mẫu còn lại và chia thành 2 cụm: Cụm 1 (G5, G7, G14) và Cụm 2 (G8, G10, G9, G11, G12, G13).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.03-2017.16 và Trường Đại học Lâm nghiệp. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất và phòng thí nghiệm cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bai P., Panda P. C., Mohapatra U. B., 2014. Genetic diversity and phylogenetic relationship in *Pterocarpus* species and its closely related genus *Tipuana* (Fabaceae) as revealed by RAPD and ISSR markers. *Plant Science Research* 36 (1&2): 68 - 76.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ và Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam, Phần II. Thực vật. Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
3. Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: No1, p. 13 - 15.
4. Liengsiri C, Yeh F. C, Boyle T. J. B, 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Pterocarpus macrocarpus* Kurz in Thailand. *Forest Ecology and Management* 74 (1 - 3): 13 - 22.
5. Nguyễn Xuân Lợi, Lưu Văn Nông, Trần Thế Bách, 2011. Nghiên cứu nhân giống cây Giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) tại Khu Bảo tồn Thiên nhiên Hòn Bà. *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4*: 704 - 706.
6. Hà Thị Mìng, 2004. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và biện pháp tạo cây con giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) góp phần đề xuất kỹ thuật gây trồng ở Đắk Lắk - Tây Nguyên, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
7. Nei M., Li W. H., 1979. Mathematical model for studying generic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science* 76: 5269 - 5273.
8. Rohlf F. J., 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.11. Exeter Software, New York.

9. Nghị định số 06/2019/NĐ - CP ngày 22 tháng 01 năm 2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực trạng thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.

GENETIC DIVERSITY OF *Pterocarpus macrocarpus* AT THE EXPERIMENTAL FOREST, VIETNAM NATIONAL UNIVERSITY OF FORESTRY BASED ON RAPD MARKERS

Vu Quang Nam^{1*}, Cao Thi Viet Nga¹, Nguyen Trong Tri¹, Nguyen Thi Men¹

¹*College of Forestry Biotechnology, Vietnam National University of Forestry*

**Email: namvq@vnuf.edu.vn; namvq1975@gmail.com*

Summary

14 leaf samples of *Pterocarpus macrocarpus*, at various locations and presented at the Experimental Forest, Vietnam Forestry University (VNUF) were used to study genetic diversity based on 15 RAPD primers (CP1, CP17, CP2, CP3, RM5, OPF9, CP8, CP6, OPE14, CP5, CP9, CP11, CP13, CP15, CP19). The results showed that a total of 545 bands were produced, 92 of which were found to be polymorphic. The number of amplification products ranged from 3 to 10 for different primers. Genetic similarity coefficients ranged from 0.46 to 0.88 with an average of 0.72. This shows that the level of genetic similarity of *Pterocarpus macrocarpus* samples at the experimental forests of VNUF is not high, showing the ability to create heterogeneity during sexual reproduction to induce genetic diversity of *Pterocarpus macrocarpus* at VNUF. The UPGMA cluster analysis divided samples into two distinct main groups. Group I included the only G1. Group II was divided into two subgroups in which the clade 1 had G2, G3, G4 and G6 and clade 2 consisted of remain samples. This study demonstrated the genetic advantages of *Pterocarpus macrocarpus* at the Experimental Forest, Vietnam Forestry University.

Keywords: *Forestry, Fabaceae, genetic diversity, Pterocarpus macrocarpus, RAPD.*

Người phản biện: TS. Lê Sơn

Ngày nhận bài: 24/02/2021

Ngày thông qua phản biện: 24/3/2021

Ngày duyệt đăng: 31/3/2021