

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ HIỆN TƯỢNG THẤT CỐ CHAI Ở QUẦN THỂ VÙ HƯƠNG (*Cinnamomum balansae* Lecomte) TẠI TỈNH PHÚ THỌ BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Vũ Đình Duy^{1,3*}, Bùi Thị Tuyết Xuân², Nguyễn Văn Sinh^{1,2}, Phạm Mai Phương³, Tạ Thị Thu Hà⁴, Nguyễn Viễn⁵, Lê Văn Quang⁵

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, 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

³Viện Sinh thái Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁴Trường Đại học Lâm nghiệp

⁵Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Vù hương (*Cinnamomum balansae* Lecomte) là loài đặc hữu và đang bị tuyệt chủng ở Việt Nam. Đây là loài có tầm quan trọng về mặt sinh thái và kinh tế. Để bảo tồn loài Vù hương ở Phú Thọ, đa dạng di truyền loài đã được đánh giá trên cơ sở phân tích 10 chỉ thị phân tử microsatellite (SSR) với 52 cá thể trưởng thành từ 4 quần thể ở huyện Đoan Hùng, Thanh Sơn, Hạ Hòa và Tp. Việt Trì. Tổng số 27 allele đã được ghi nhận cho tất cả locus nghiên cứu. Hàm lượng thông tin đa hình (PIC) cho mỗi cặp mỗi đa hình trung bình 0,43 và chỉ ra mức độ đa hình trung bình. Các giá trị đặc điểm của mỗi cặp mỗi SSR cũng được xác định: chỉ số khác nhau giữa các cặp mỗi ($R_p = 2,57$), chỉ số khác biệt giữa các cặp cá thể ($PD = 0,58$) và chỉ số đa dạng trung bình các locus đa hình ($MI = 1,08$). Kết quả chỉ mức độ đa dạng di truyền loài Vù hương ở tỉnh Phú Thọ cao, số allele hiệu quả cho một locus ($N_e = 2,68$), hệ số gen dị hợp tử quan sát ($H_o = 0,37$), gen dị hợp tử kỳ vọng ($H_e = 0,47$) và hệ số sinh sản cận noãn dương tính ($F_{is} = 0,16$). Không tìm thấy hiện tượng thất cố chai ở 4 quần thể Vù hương trong nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra tầm quan trọng cần phải bảo tồn nguồn gen loài Vù hương ở Phú Thọ.

Từ khóa: bảo tồn, *Cinnamomum balansae* Lecomte, đa dạng di truyền, đặc hữu, microsatellite (SSR), Vù hương.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vù hương (*Cinnamomum balansae* Lecomte) là loài đặc hữu của Việt Nam. Đây là loài cây lá rộng thường xanh, phân bố ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam như: Vườn Quốc gia Ba Vì (Hà Nội), Vườn Quốc gia Bến En (Thanh Hóa), Vườn Quốc gia Cúc Phương (Ninh Bình), Vườn Quốc gia Pù Mát (Nghệ An), Hà Giang, Yên Bái, Phú Thọ và Tuyên Quang (Nguyễn Kim Đào, 2010; Vũ Anh Tài & Nguyễn Nghĩa Thìn, 2014; Trần Ngọc Hải và cộng sự, 2016). Loài này không chỉ có tầm quan trọng về mặt sinh thái trong hệ sinh thái rừng mà còn có giá trị thương mại lớn, các ứng dụng gỗ, nhựa, tinh dầu và dược phẩm (Yan et al., 2015; Chen et al., 2016; Balijepalli et al., 2017; Lee et al., 2018). Do giá trị thương mại và nhu cầu của người dân địa phương, nhiều quần thể tự nhiên của loài này đang bị đe dọa do khai thác cạn kiệt và phá rừng làm nguyên liệu thuốc và lấy gỗ. Do vậy, quần thể tự nhiên của loài này bị suy giảm nghiêm trọng, phân cắt mạnh, trong khi tỷ lệ tái sinh của loài này

không cao (Trần Ngọc Hải và cộng sự, 2016). Theo các tiêu chí mới của Quỹ Bảo tồn Thiên nhiên quốc tế (IUCN 2018 ver 2.3) loài Vù hương hiện được xếp ở tình trạng sắp bị tuyệt chủng (A1cd, B1+2c). Tại Việt Nam loài này đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam (2007) ở mức độ đang bị đe dọa (VU A1c) và được pháp luật bảo vệ (nằm trong nhóm IIA của Nghị định 32/2006/NĐ-CP và Nghị định 06/2019 NĐ-CP). Mặc dù một số quần thể của loài này hiện là đối tượng đang được bảo vệ trong các khu bảo tồn thiên nhiên và vườn quốc gia, chúng vẫn đang trong tình trạng bị đe dọa.

Bảo tồn và quản lý một loài đòi hỏi các thông tin về sinh thái và tính đa dạng di truyền (Gupta & Varshney, 2000). Chỉ thị phân tử vi vệ tinh microsatellite (Single Sequence Repeat - SSR) là một trong những công cụ được sử dụng rộng rãi cho việc đánh giá các mô hình đa dạng di truyền ở thực vật và chỉ thị này có tiềm năng, lợi thế cho việc điều tra các loại cây quý hiếm bởi vì SSR phân bố rộng trong hệ gen, tính di truyền đồng trội, tính lặp lại, bản chất đa allele và vị trí đặc hiệu ở nhiễm sắc thể (Varshney et al., 2005; Rajwant et al., 2011;

*Corresponding author: duyvu@vnmn.vast.vn/
duydinghu87@gmail.com

Xu et al., 2017). Trên thế giới, chỉ thị phân tử SSR được ứng dụng phổ biến cho các nghiên cứu về đa dạng di truyền đối với một số loài cây trong chi Quế (Yan et al., 2017, Kameyama et al., 2017; Abeysinghe et al., 2014; Gwari et al., 2016; Sandigawad & Patil, 2011; Joy & Maridass, 2008).

Hiện nay, chúng ta thiếu các tư liệu về sinh học sinh thái, đặc biệt mức độ đa dạng di truyền loài và quần thể của loài Vù hương. Mức độ đa dạng di truyền cao đảm bảo sự duy trì tồn tại của chúng ở hiện tại và tương lai trong điều kiện biến đổi khí hậu. Hơn nữa, duy trì mức độ cao đa dạng di truyền quần thể và loài đảm bảo tiềm năng tiến hóa của loài ở các thế hệ tiếp theo. Bởi vậy, trong bài báo này một số chỉ thị phân tử SSR được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài, cũng như sử dụng để đánh giá hiện tượng

thất cổ chai quần thể (suy giảm kích thước quần thể) của loài Vù hương ở tỉnh Phú Thọ, góp phần cho các nhà quản lý đưa ra các giải pháp bảo tồn, phục hồi và phát triển bền vững loài này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Năm mươi hai mẫu lá (hoặc vỏ) từ 52 cá thể Vù hương được Nguyễn Viễn thu thập để phân tích đa dạng di truyền tại huyện Đoan Hùng, Thanh Sơn, Hạ Hòa và Tp. Việt Trì, tỉnh Phú Thọ (Bảng 1). Các mẫu được đánh số, bảo quản trong túi nhựa dẻo có chứa silicagel ngay tại thực địa và chuyển đến phòng thí nghiệm giữ ở nhiệt độ phòng đến khi sử dụng. Trình tự nucleotide 10 chỉ thị phân tử SSR trong nghiên cứu khai thác từ các tài liệu và được tổng hợp bởi công ty IDT, Hoa Kỳ (Intergarated DNA Technology, USA) (Bảng 2).

Bảng 1. Nguồn gốc, ký hiệu và tọa độ của 52 mẫu Vù hương sử dụng trong nghiên cứu

Quần thể	Số mẫu	Nơi thu	Kinh độ (Bắc)	Vĩ độ (Đông)
Đoan Hùng	16	huyện Đoan Hùng - tỉnh Phú Thọ	21° 31' 51,8"	105° 13' 54,76"
Việt Trì	11	Tp. Việt Trì – tỉnh Phú Thọ	21° 21' 28,42"	105° 21' 40,33"
Thanh Sơn	20	huyện Thanh Sơn - tỉnh Phú Thọ	21° 04' 48,45"	105° 14' 89,28"
Hạ Hòa	5	huyện Hạ Hòa – tỉnh Phú Thọ	21° 52' 37,12"	105° 93' 94,5"

Bảng 2. Trình tự các nucleotide của 10 cặp mồi SSR

Locus	Trình tự nucleotide của cặp mồi (5'-3')	Nucleotide lặp lại	Nhiệt độ bắt cặp (°C)	Nguồn tài liệu
C1	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: GGAACTCCTTTACAATCTCAG	(AC)6(AG)24	55	Kameyama, 2012
C2	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: CCTTCTACCACCCTATCCAAAT	(AC)6(AG)22	55	Kameyama, 2012
C3	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: TTCTGCCCAGTATTGTGAGTTT	(AC)6(AG)16	54	Kameyama, 2012
C4	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: ATCCGACAGGCAGTTTGAAT	(AC)6(AG)17	55	Kameyama, 2012
C5	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: ATGTACCTGAGTTTGTGATGC	(AC)6(AG)15	55	Kameyama, 2012
C6	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: TTTATTGGGTCTTTGAGTATTT	(AC)6(AG)26	55	Kameyama, 2012
C7	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC R: AAGACTAAAAACCAGGACAAAG	(AC)6(TC)17	55	Kameyama, 2012
C8	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC R: TAGGATAAGTGCCAAGGTAGTG	(AC)6(TC)16	55	Kameyama, 2012
C9	F: ACACACACACACTCTCTCTCTC R: ATTCTTGACTTCACGAAACC	(AC)6(TC)24	54	Kameyama, 2012
C10	F: TCTCTCTCTCTCACACACACAC R: TGCTGCCACCACAATCATCTTT	(TC)6(AC)12	55	Kameyama, 2012

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: Mẫu được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle J & Doyle L (1990) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam. Kiểm tra độ sạch và hàm lượng ADN bằng đo quang phổ hấp thụ kết hợp với điện di trên gel agarose 1%. ADN tổng số được pha loãng dùng cho phản ứng PCR ở nồng độ 10 ng/μl.

Nhân bản ADN: Thử nghiệm mỗi phản ứng PCR - SSR là 25μl, trong đó chứa các thành phần và nồng độ các chất tham gia phản ứng như: 2 μl ADN tổng số, 12,5 μl Master Mix 2X, 2 μl cho mỗi xuôi và mỗi ngược 10 μM và 9,5 μl H₂O deion. Quá trình nhân bản được tiến hành trên máy Gene amp PCR system 9700 theo chu trình nhiệt sau: (1) Biến tính ban đầu: 94°C trong 3 phút; (2) Biến tính: 94°C trong 1 phút; (3) Bắt cặp: 55°C trong 1 phút; (4) Kéo dài: 72°C trong 1 phút; (5) Lặp lại (2) đến (4) 40 chu kỳ; (6) Phản ứng kết thúc hoàn toàn: 72°C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR - SSR trên gel polyacrylamide 8% trong 40 mL dung dịch đệm 1xTAE trên bộ điện di Sequi-Gen (BIO-RAD, Mỹ), nhuộm GelRed™ Nucleotic Acid Gel Stain và chụp ảnh trên máy soi gel BioDocAnalyze (BIOMETRA, Đức). Kích thước allele được xác định bởi phần mềm Gel-Analyzer GenoSens1850 (Clinux Sci. Instruments Co. Ltd, Trung Quốc) với thang marker 20 bp DNA (Invitrogen, Đức).

2.3. Phân tích số liệu

Hiệu quả của mỗi cặp môi SSR được phân tích thông qua các chỉ số PIC (Polymorphism Information Content - hàm lượng thông tin đa hình), Rp (resolving power - chỉ số khác nhau của cặp môi) và PD (Discrimination power - chỉ số khác biệt giữa các cặp cá thể) và MI (Marker index - chỉ số đa dạng trung bình của các locus đa hình) được mô tả bởi Prevost & Wilkinson (1999). Các thông số đa dạng di truyền quần thể bao gồm: N_E (số allele hữu hiệu); H_O (observed heterozygosity - Hệ số gen dị hợp tử quan sát), H_E (Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng - expected heterozygosity, F_{IS} (Hệ số sinh

sản cận loài - inbreeding coefficient) theo các phần mềm GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006) và Arlequin (Excoffier et al., 2005). Xác định hiện tượng thắt cổ chai (bottleneck) cho mỗi quần thể Vù hương trên cơ sở 3 mô hình: IAM (Infinite Allele Model - Mô hình allele không xác định), SMM (Mô hình đột biến từng bước - Stepwise Mutation Model) và TPM (Mô hình đột biến 2 giai đoạn - Two-phase Mutation Model) sử dụng phần mềm Bottleneck ver. 1.2 (Piry et al., 1999).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tính đa hình của các cặp môi SSR

Với 10 cặp môi microsatellite dùng để phân tích 52 cá thể Vù hương trưởng thành ở 4 quần thể tại Phú Thọ đã xác định được 27 allele khác nhau, với kích thước dao động từ 100 bp đến 290 bp. Các giá trị PIC, PD, Rp và MI đã được xác định (Bảng 3). Giá trị PIC cao nhất (0,73) được tìm thấy ở cặp môi C2 và thấp nhất (0,15) ở cặp môi C5; trung bình là 0,43. Giá trị PD dao động từ 0,22 (C9) đến 0,84 (C2), trung bình 0,58. Tương tự, giá trị Rp dao động từ 1,86 (C10) đến 3,15 (C6), trung bình 2,57. Giá trị MI dao động từ 0,10 (C9) đến 3,24 (C2), trung bình 1,08. Theo Botstein *et al.* (1980), nếu chỉ số PIC > 0,5 thì cặp môi được sử dụng cho kết quả đa hình cao, ngược lại chỉ số PIC nằm trong khoảng 0,25 < PIC < 0,5 cho kết quả đa hình trung bình và với chỉ số PIC < 0,25 thì kết quả đa hình thấp. Kết quả nghiên cứu chỉ ra loài Vù hương phân bố tại tỉnh Phú Thọ có hàm lượng thông tin đa hình (PIC) ở mức độ trung bình. Giá trị PIC của loài Vù hương ở Phú Thọ là cao so với giá trị này của loài Thông Xuân Nha ở Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Nha (PIC = 0,324) (Nguyễn Minh Tam *et al.*, 2015); loài Dầu mít (PIC = 0,207) (Nguyễn Minh Đức và cộng sự, 2017) và loài Dầu nước (PIC = 0,218) (Vũ Đình Duy & Bùi Thị Tuyết Xuân, 2014). Tuy nhiên giá trị này của loài Vù hương lại thấp hơn loài Dầu song nòng (PIC = 0,459) (Nguyễn Thị Hải Hà và cộng sự, 2016). Hơn nữa, Powell *et al.* (1996) mô tả rằng chỉ số MI càng cao sẽ phản ánh được hiệu quả của việc ứng dụng một kỹ thuật

nào đó khi đánh giá một lượng lớn các allele hơn là chỉ dựa vào các allele đa hình được khuếch đại. Việc sử dụng chúng để đánh giá khả năng hay tính hữu hiệu của cặp mồi thì hiện tại vẫn chưa được nghiên cứu chỉ có thể dựa vào chỉ số MI để so sánh hiệu quả giữa các kỹ thuật với nhau (Milbourne et al., 1997). Trong nghiên cứu này, các cặp mồi SSR được phân tích 4 quần thể Vù hương ở Phú Thọ đã tìm ra chỉ số đa dạng trung bình của các locus đa hình (MI = 1,08) thấp hơn loài Dầu song nòng (MI = 1,19) (Nguyễn Thị Hải Hà và cộng sự, 2016) và loài Dầu mít (MI = 0,389) (Nguyễn Minh Đức và cs, 2017). Mặt khác,

theo Prevost & Wilkinson (1999) chỉ số Rp đã chỉ ra được sự tương quan giữa các kiểu gen với chỉ thị phân tử ADN, chỉ số Rp càng cao chứng tỏ chỉ thị phân tử đó hữu hiệu trong việc phân nhóm kiểu gen. Từ kết quả trên cho thấy chỉ số Rp trung bình của loài Vù hương ở Phú Thọ là 2,57. Chứng tỏ rằng chỉ thị phân tử SSR hữu hiệu để phân chia các kiểu gen của mẫu Vù hương. Các giá trị này đã phản ánh các cặp mồi SSR trong nghiên cứu đã cung cấp những thông tin cần thiết, có giá trị hữu ích để đánh giá mức độ đa dạng di truyền loài Vù hương ở tỉnh Phú Thọ.

Bảng 3. Các giá trị PIC, PD, Rp và MI cho các locus đa hình

Locus	PIC	PD	Rp	MI
C1	0,64	0,82	2,84	2,32
C2	0,73	0,84	2,84	3,24
C3	0,63	0,78	2,26	1,26
C4	0,44	0,64	2,61	0,66
C5	0,11	0,25	2,23	0,15
C6	0,47	0,55	3,15	0,62
C7	0,21	0,42	2,68	0,48
C8	0,44	0,65	2,60	0,79
C9	0,13	0,22	2,60	0,10
C10	0,51	0,63	1,86	1,18
Trung bình	0,43	0,58	2,57	1,08

Chú thích: PIC - Hàm lượng thông tin đa hình; Rp - Chỉ số khác nhau của cặp mồi; PD - Chỉ số khác biệt giữa các cặp cá thể và MI: Chỉ số đa dạng trung bình của các locus đa hình

3.2. Đa dạng di truyền quần thể

Kết quả bảng 4 đã chỉ ra mức độ đa dạng di truyền của loài Vù hương ở Phú Thọ như: số allele hữu hiệu $N_A = 2,68$; hệ số gen di hợp tử quan sát $H_O = 0,37$ và hệ số gen di hợp tử kỳ vọng $H_E = 0,47$. White et al. (2007) đã chỉ ra đối với cây rừng nói chung, một quần thể được coi là có tính đa dạng di truyền nếu số lượng allele trung bình đạt từ 1,75 trở nên. Do vậy, số lượng allele trung bình của các quần thể Vù hương trong nghiên cứu này là 2,68 đảm bảo được tính đa dạng di truyền cần thiết. Tỷ lệ gen di hợp tử là chỉ số đánh giá mức độ đa dạng di truyền của quần thể, phản ánh tiềm năng di truyền và khả năng thích ứng của nguồn gen (Lê Sơn và cộng sự, 2012). Mức độ đa dạng di truyền quần thể loài Vù hương trong nghiên cứu này thể hiện ở mức thấp hơn khi so sánh với một số loài cây trong chi Quế trên thế giới

sử dụng chỉ thị phân tử SSR, chẳng hạn Kameyama (2012) đã chỉ ra đa dạng di truyền loài Long não (*C. camphora*) từ 104 cây trưởng thành tại 3 quần thể ở Nhật Bản ($H_O = 0,53 - 0,6$) và ($H_E = 0,55 - 0,68$). Tương tự, Kameyama et al. (2017) cũng đã chỉ ra mức độ đa dạng di truyền 504 mẫu Long não có nguồn gốc tại Nhật Bản là $H_O = 0,614 \pm 0,02$ và $H_E = 0,714 \pm 0,024$ và 300 mẫu từ Trung Quốc và Đài Loan là $H_O = 0,728 \pm 0,027$ và $H_E = 0,878 \pm 0,015$. Gần đây, Li et al. (2018) đã chỉ ra đa dạng di truyền 45 cây Long não ở Trung Quốc sử dụng 21 chỉ thị phân tử SSR là $H_O = 0,3449$ và $H_E = 0,4254$. Các tác giả cũng chỉ ra mức độ hữu ích khi sử dụng chỉ thị phân tử SSR để nghiên cứu lịch sử tiến hóa, biến đổi quần thể, hệ thống giao phối và cấu trúc di truyền của loài Long não. Ở Việt Nam chưa có một đánh giá đầy đủ nào về đa dạng di truyền đối với

loài Vù hương và các loài khác trong chi Quế bằng chỉ thị phân tử SSR, mà chỉ có vài công bố sử dụng chỉ thị phân tử (RADP) để đánh giá đa dạng di truyền và quan hệ di truyền loài Long não (Hà Văn Huân, 2015) và quế (*C. cassia*) (Hà Thị Phúc và cộng sự, 2015). Các tác giả cũng chỉ ra quần thể Long não có mức độ đa dạng di truyền cao. Từ các phân tích trên đây chúng tôi có nhận xét loài Vù hương phân bố ở tỉnh Phú Thọ có đa dạng di truyền ở mức cao và điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc nhân giống loài này.

Hệ số sinh sản cận loài (F_{IS}) là sự gia tăng tỉ lệ các cá thể mang gen đồng hợp tử trong

quần thể không thuần chủng (Phạm Mai Phương và cộng sự, 2019). Giao phối gần (các cá thể có quan hệ di truyền gần gũi) tạo ra sự gia tăng tỉ lệ gen đồng hợp tử lặn, dẫn đến biểu hiện của một số allele lặn có hại bẩm sinh, do đó làm giảm sức chống chịu của quần thể. Kết quả nghiên cứu được chỉ ra ở bảng 4 cho thấy hệ số cận loài thấp được tìm thấy ở cả 4 quần thể Vù hương tại Phú Thọ, trung bình là 0,16, dao động từ 0,12 ở quần thể Hạ Hòa đến 0,19 ở quần thể Thanh Sơn. Kết quả này có thể cho thấy hiện tượng giao phối cận loài diễn ra trong quần thể Vù hương ở Phú Thọ.

Bảng 4. Đa dạng di truyền loài Vù hương ở Phú Thọ

Quần thể	N	N_E	H_O	H_E	F_{IS}
Đoan Hùng	16	3,00	0,40	0,50	0,18
Việt Trì	11	2,60	0,34	0,49	0,16
Thanh Sơn	20	3,10	0,42	0,52	0,19
Hạ Hòa	5	2,00	0,31	0,37	0,12*
Trung bình		2,68	0,37	0,47	0,16

Chú thích: N - số mẫu thu thập; N_E - số alen hữu hiệu; H_O - Hệ số gen dị hợp tử quan sát; H_E - Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng và F_{IS} - Hệ số sinh sản cận loài với xác suất $*p < 0,05$.

3.3. Hiện tượng thắt cổ chai quần thể

Ba mô hình đột biến, gồm IAM (infinite alen model - Mô hình đột biến allele không xác định), SMM (Stepwis Mutation Model - Mô hình đột biến từng bước) và TPM (two phase model - Mô hình đột biến hai giai đoạn) được sử dụng cho phân tích hiện tượng thắt cổ chai (Bottleneck) (Bảng 5). Kết quả đã chỉ ra ở quần thể Đoan Hùng chỉ có mô hình đột biến SMM là có ý nghĩa với $p < 0,05$, tuy nhiên hai

mô hình IAM và TPM là không có ý nghĩa và chỉ ra không có hiện tượng thắt cổ chai ở quần thể này. Ở quần thể Việt Trì cả ba mô hình đột biến đều không có ý nghĩa. Mô hình đột biến IAM có ý nghĩa ở quần thể Thanh Sơn và Hạ Hòa và không có ý nghĩa theo mô hình đột biến TPM ở cả hai quần thể này. Các kết quả phân tích có thể kết luận không có dấu hiệu thắt cổ chai ở tất cả quần thể Vù hương ở tỉnh Phú Thọ.

Bảng 5. Mô hình đột biến ở mức độ quần thể loài Vù hương ở tỉnh Phú Thọ

Quần thể	Giá trị P trong hiện tượng thắt cổ chai (bottleneck)		
	IAM	SMM	TPM
Đoan Hùng	0,074 ^{ns}	0,027*	0,054 ^{ns}
Việt Trì	0,250 ^{ns}	1,000 ^{ns}	0,742 ^{ns}
Thanh Sơn	0,004**	0,004**	0,055 ^{ns}
Hạ Hòa	0,011*	0,742 ^{ns}	0,195 ^{ns}

Chú thích: IAM (Mô hình đột biến allele không xác định); SMM (Mô hình đột biến từng bước); TPM (Mô hình đột biến hai giai đoạn); Xác suất $*p < 0,05$. $P < 0,01$, $P < 0,001$; ns, not significant (không ý nghĩa)

4. KẾT LUẬN

- Loài Vù hương phân bố ở tỉnh Phú Thọ duy trì mức độ đa dạng di truyền tương đối cao ($N_E = 2,68$; $H_O = 0,37$ và $H_E = 0,47$) và không

có dấu hiệu xảy ra hiện tượng thắt cổ chai.

- Từ kết quả phân tích đa dạng di truyền nhận thấy loài Vù hương ở tỉnh Phú Thọ có tính đa dạng di truyền khá cao nên ưu tiên bảo

tồn nguyên vị và cần có chiến lược thu thập hạt giống để bảo tồn nguồn tài nguyên tự nhiên, và việc trồng Vù hương cần được khuyến khích.

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu này được tài trợ bởi nguồn kinh phí của Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam thuộc đề tài sau tiến sĩ mã số GUST.STS.ĐT2019-ST01, đề tài mã số NVQG-2018/12 và đề tài cơ sở của Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga năm 2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abeyasinghe P.D., Samarajeewa N.G.C.D., LiG., Wijesinghe K.G.G., 2014. Preliminary investigation for the identification of Sri Lankan *Cinnamomum* species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence related amplified polymorphic (SRAP) markers. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka*, 42 (3): 201-208.
2. Balijepalli M.K., Buru A.S., Sakirrolla, Pichika M.R., 2017. *Cinnamomum* genus: A review on its biological activities. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9(2): 1–11.
3. Bộ Khoa học Công nghệ và Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 2007. Sách đỏ Việt Nam. Phần 2: Thực vật. Nhà xuất bản Khoa học Công nghệ Việt Nam. Trang: 289-290.
4. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32(3): 314-331.
5. Chen T.W., Tsai K.D., Yang S.M., Wong H.Y., Liu Y.H., Cherng J., Chen T. W., Tsai K.D., Yang S.M., Wong H.Y., Liu Y.H., Cherng J., Chou K.S., Wang Y. T., Cuizon J., Cheng J.M., 2016. Discovery of a novel anti-cancer agent targeting both topoisomerase I and II as well as telomerase activities in human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo: *Cinnamomum verum* component cuminaldehyde. *Curr Cancer Drug Targets*, 16(9): 796-806.
6. 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.
7. Doyle J.J., Doyle L.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
8. Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005. Arlequin ver.3.0: an intergrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, 1: 47-50.
9. Gupta P.K., Varshney R.K., 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. *Euphytica*, 113: 63–185.
10. Gwari G., Bhandari U., Naik G., Haider S.Z., Chauhan N., 2016. Genetic diversity in *Cinnamomum tamala* Nees. accessions through DNA fingerprinting using molecular markers. *Indian J Agric Res*, 50 (5): 446-450.
11. Hà Thị Phúc, Đặng Quang Hưng, Phạm Bảo Yên, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Vũ Minh Hạnh, Phan Tuấn Nghĩa, 2015. Nghiên cứu sự đa hình di truyền một số loài thực vật thu thập từ Mã Đà và Cát Tiên (tỉnh Đồng Nai). *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, 1: 1-6.
12. Hà Văn Huân, 2015. Phân tích quan hệ di truyền quần thể Long não (*Cinnamomum camphora* L.Presl) bằng kỹ thuật PCR-RADP. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2: 1-9.
13. IUCN. 2018. IUCN red list of threatened species: version 2.3.
14. Joy P., Maridass M., 2008. Inter species relationship of *Cinnamomum* species using RAPD marker analysis. *Ethnobotanical Leaflets*, 12: 476-480.
15. Kameyama Y., Furumichi J., Li J.X., Tseng Y.H., 2017. Natural genetic differentiation and human-mediated gene flow: the spatiotemporal tendency observed in a long-lived *Cinnamomum camphora* (Lauraceae) tree. *Tree genet genomes*, 13: 38.
16. Kameyama Y., 2012. Development of microsatellite markers for *Cinnamomum camphora* (Lauraceae). *American Journal of Botany*: e1–e3.
17. Lê Sơn, Dương Thị Hoa, Hà Huy Thịnh, 2012. Đánh giá tính đa dạng di truyền các vườn giống vô tính Keo tai tượng bằng chỉ thị vi vệ tinh. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 1: 2077-2084.
18. Lee S.C., Wang S.Y., Li C. C., Liu C.T., 2018. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde and linalool from the leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira in endotoxin-induced mice. *J Food Drug Anal*, 26(1): 211–220.
19. Li Z., Zhong Y., Yu F., Xu M., 2018. Novel SSR marker development and genetic diversity analysis of *Cinnamomum camphora* based on transcriptome sequencing. *Plant Genetic Resources*: 1–4.
20. Milbourne D., Meyer R., Bradshaw J.E., Baird E., Provan J., Powell W., Waugh R., 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3: 127-136.
21. Nguyễn Kim Đào, 2010. Thực vật chí Việt Nam - Họ Long não (Lauraceae). NXB Khoa học và Kỹ Thuật. 20: 22-234.
22. Nguyễn Minh Đức, Vũ Đình Duy, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Thị Ngân, Nguyễn Thị Hải Hà, Nguyễn Thị Phương Trang, Bùi Thị Tuyết Xuân, Nguyễn Minh Tâm, 2017. Đánh giá chỉ thị SSR và hiện tượng thắt cổ chai ở quần thể Dầu mít trong rừng nhiệt đới Đông Nam bộ. *Tạp chí công nghệ sinh học*, 15(3): 497-504.
23. Nguyễn Minh Tâm, Phan Ke Loc., Vu Dinh Duy., 2015. Genetic diversity in Xuan nha pine (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan). *Resear J Biotechnol*, 10(3): 30-36.
24. Nguyễn Thị Hải Hà, Nguyễn Minh Đức, Đặng Phan Hiền, Vũ Đình Duy, Nguyễn Lê Anh Tuấn, Trương Hữu Thế, Phạm Quý Đôn, Nguyễn Minh Tâm, 2016. Đa dạng di truyền loài Dầu song (*Dipterocarpus dyeri*) ở rừng phòng hộ Tân Phú, Đồng Nai. *Tạp chí Sinh học*, 38(1):81-88.
25. Peakall R., Smouse P.E., 2006. GenAlex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
26. Phạm Mai Phương, Nguyễn Vũ Anh, Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Thanh Tuấn, Bùi Thị Tuyết Xuân,

Vũ Đình Duy, 2019. Đánh giá đa dạng di truyền loài Vên vên (*Anisoptera costata* Korth.) ở rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ bằng chỉ thị phân tử SSR. *Tạp chí Sinh học*, 41(2se): 23-31.

27. Piry S., Luikart G., Cornnet J.M., 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size frequency data. *J of Hered*, 90: 502-503.

28. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S.V., Rafalski A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.

29. Prevost A., Wilkinson M.J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.

30. Rajwant K.K., Manoj K.R., Sanjay K., Singh R., Dhawan A.K., 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309-334.

31. Sandigawad A. M., Patil C.G., 2011. Genetic diversity in *Cinnamomum zeylanicum* Blume. (Lauraceae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afri J Biotechnol*, 10(19): 3682-3688.

32. Trần Ngọc Hải, Đặng Hữu Nghị, Lê Đình Phương, Tống Văn Hoàng, 2016. Một số đặc điểm lâm

học của loài Vù Hương tại Vườn quốc gia Bến En. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (6): 176-185.

33. Varshney R.K., Graner Andreas., Sorells M.E., 2005. Genetic microsatellite markers in plants: features and application. *Trends Biotechnol*, 23: 48-55.

34. Vũ Anh Tài, Nguyễn Nghĩa Thìn, 2014. Kết quả điều tra và thống kê các loài thực vật bị đe dọa ở tỉnh Hà Giang, Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, 36(3): 323-329.

35. Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, 2014. Đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen loài Dầu nước (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don) ở tỉnh Đồng Nai. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 52 (2D): 276-284.

36. White T.L., Adams W.T., Neale D.B., 2007. Forest genetics. CABI publishing.

Xu M., Liu X., Wang J.W., Teng S.Y., Shi J.Q., Li Y.Y., Huang M.R., 2017. Transcriptome sequencing and development of novel genic SSR markers for *Dendrobium officinale*. *Molecular Breeding*, 37: 18

37. Yan K., Wei Q., Feng R., Zhou W., Chen F., 2017. Transcriptome analysis of *Cinnamomum longepaniculatum* by high-throughput sequencing. *Elect J Biotechnol*, 28: 58-66.

38. Yan Y. M., Fang P., Yang M.T., Li N., Lu Q., Cheng Y.X., 2015. Anti-diabetic nephropathy compounds from *Cinnamomum cassia*. *J Ethnopharm*, 165: 141-147.

EVALUATION GENETIC DIVERSITY AND A BOTTLENECK OF *Cinnamomum balansae* H. Lecomte POPULATIONS IN PHU THO PROVINCE BY MICROSATELLITE (SSR) MARKERS

Vu Dinh Duy^{1,3*}, Bui Thi Tuyen², Nguyen Van Sinh^{1,2}, Pham Mai Phuong³,
Ta Thi Thu Ha⁴, Nguyen Vien⁵, Le Van Quang⁵

¹Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

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

³Institute of Tropical Ecology, Vietnam - Russia Tropical Centre

⁴Vietnam National University of Forestry

⁵Vietnamese Academy of Forest Sciences

SUMMARY

Cinnamomum balansae Lecomte (Lauraceae) is considered as an endemic to Vietnam and is assessed as endangered. This species an ecologically and economically important tree species. To conserve the species in tropical forests, genetic diversity was investigated on the basis of ten microsatellites (single sequence repeat, SSR). In all, fifty-two *C. balansae* individuals of four populations in Phu Tho (Doan Hung, Thanh Son, Ha Hoa and Viet Tri city) were analyzed in this study. A total of 27 alleles were observed across the studied loci. The polymorphic information content (PIC) averaged 0.43 and indicated a high polymorphic value. Other values including discrimination power (PD = 0.58), resolving power (Rp = 2.57) and Marker index (MI = 1.08) were revealed. Genetic diversity in population level was higher (Ne = 2.68; Ho = 0.47 and He = 0.37) and positive inbreeding value (Fis = 0.16). Bottleneck tests had not found of four populations. This study also showed the importance of conserving the genetic resources of *C. balansae* species in Phu Tho province.

Keywords: *Cinnamomum balansae* Lecomte, endemic, genetic diversity, species conservation, SSR.

Ngày nhận bài : 02/01/2021

Ngày phản biện : 29/01/2021

Ngày quyết định đăng : 08/02/2021