

ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN TẬP ĐOÀN CÂY DẦU ĐỌT TÍM (*Dipterocarpus grandiflorus* Blco) Ở VIỆT NAM TRÊN CƠ SỞ PHÂN TÍCH CHỈ THỊ ISSR VÀ SSR

**TRẦN THỊ VIỆT THANH, TRẦN THỊ LIỄU,
VŨ THỊ THU HIỀN, ĐINH THỊ PHÒNG**

*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

PHÍ HỒNG HẢI, LA ÁNH DƯƠNG
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

Dầu đọt tím (*Dipterocarpus grandiflorus* Blco) là loại cây gỗ thuộc họ Dầu Dipterocarpaceae, bộ Chè Theales, phân bố ở Việt Nam, Ấn Độ, Thái Lan, Philippines, Myanmar và Malaysia. Theo tác giả Nguyễn Hoàng Nghĩa (2008), Dầu đọt tím ở Việt Nam được phân bố tại chân núi Bà Nà (Đà Nẵng), núi Kim Phụng (Vườn Quốc gia Bạch Mã-Thừa Thiên Huế), Tân Phú (Đồng Nai) và Đại Lộc (Quảng Nam). Dầu đọt tím là cây gỗ có giác lõi phân biệt, giác màu vàng nhạt. Gỗ có tỷ trọng tương đối nặng, ở độ ẩm 15% tỷ trọng đạt khoảng 650-945kg/m³. Dầu đọt tím có gỗ mịn, thớ thẳng, dễ gia công, sử dụng trong xây dựng, đóng đồ gia dụng, làm ván xẻ... Hiện nay loài này chỉ còn duy nhất một quần thể khoảng 300ha tại xã Đại Thanh, huyện Đại Lộc, tỉnh Quảng Nam. Vì vậy, nghiên cứu tính đa dạng di truyền nguồn gen của loài Dầu đọt tím làm cơ sở cho việc bảo tồn và bảo vệ nghiêm ngặt vùng phân bố tự nhiên của loài cũng như việc thu hạt thử nghiệm gieo ươm là cần thiết [1].

Hiện nay, việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trên cơ sở phân tích RFLP, AFLP, ISSR, RAPD, SSR... để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể đã được áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng [2, 4, 5, 6, 8]. Trong đó kỹ thuật ISSR và SSR được sử dụng rộng rãi hơn cả do có ưu điểm là tương đối đơn giản, hiệu quả cao và tiết kiệm thời gian trong việc đánh giá đa dạng nguồn gen cây rừng.

Nghiên cứu này đề cập đến kết quả “Đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen tập đoàn cây Dầu đọt tím (*Dipterocarpus grandiflorus* Blco) ở Việt Nam trên cơ sở phân tích chỉ thị ISSR và SSR” phục vụ cho công tác bảo tồn và tái tạo nguồn gen cây rừng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hai mươi lăm (25) mẫu lá cây Dầu đọt tím được bảo quản trong silica gel do Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp. Mẫu được thu tại huyện Đại Lộc (tỉnh Quảng Nam) có ký hiệu: QN1-QN7, QN10-QN16, QN19, QN21-QN30. Thông tin của 27 mỗi ISSR, 4 cặp mỗi SSR sử dụng trong nghiên cứu trình bày ở bảng 1, 2.

Bảng 1

**Trình tự nucleotide của 27 cặp mồi ISSR sử dụng trong nghiên cứu
(theo Zhi Yong Zhang và cs., 2005)**

TT	Tên mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	ISSR1	(CAG) ₅	500-3000
2	ISSR5	(CCG) ₆	500-1800
3	ISSR6	(CTC) ₆	600-2000
4	ISSR7	(GGC) ₆	400-1650
5	ISSR8	(GAA) ₆	250-800
6	ISSR9	(TG) ₈ GA	400-2000
7	ISSR10	(CTC) ₈	250-1500
8	ISSR11	(CCA) ₅	400-2100
9	ISSR13	(GT) ₈ C	450-1500
10	ISSR14	(CT) ₈ GTC	700-2000
11	ISSR15	(CA) ₈ A	400-1000
12	ISSR16	(CT) ₈ AC	350-600
13	ISSR17	(CT) ₈ T	350-1000
14	ISSR46	(AG) ₈ T	300-750
15	ISSR49	(GA) ₈ T	500
16	ISSR51	(GA) ₈ A	200-1000
17	ISSR52	(CT) ₈ G	500-1000
18	ISSR55	(AC) ₈ T	250-1200
19	ISSR56	(AC) ₈ G	300-1500
20	ISSR59	(GA) ₈ CT	250-1500
21	ISSR61	(AC) ₈ TG	350-1500
22	ISSR62	CTC (AG) ₇	250-750
23	ISSR63	CTC (GA) ₇	300-2000
24	ISSR64	ACA (GT) ₇	250-1000
25	ISSR65	CAC (TG) ₇	350-1000
26	ISSR67	(ATG) ₆	400-1500
27	ISSR69	(GGGTG) ₃	250-1400

Bảng 2

**Trình tự nucleotide của 4 cặp mồi SSR sử dụng trong nghiên cứu
(theo Tokuko Ujino et al., 1998)**

TT	Tên mồi	Trình tự		Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	SSR_Shc01	F	GCT ATT GGC AAG GAT GTT CA	110-190
		R	CTT ATG AGA TCA ATT TGA CAG	
2	SSR_Shc07	F	ATG TCC ATG TTT GAG TG	155-360
		R	CAT GGA CAT AAG TGG AG	
3	SSR_Shc09	F	TTT CTG TAT CCG TGT GTT G	197
		R	GCG ATT AAG CGG ACC TCA G	
4	SSR_Shc11	F	ATC TGT TCT TCT ACA AGC C	170
		R	TTA GAA CTT GAG TCA GAT AC	

Tách DNA tổng số theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (1987) [3] có cải tiến một số bước. Kiểm tra độ sạch trên gel agarose 0,9% và đo nồng độ DNA tổng số trên máy quang phổ hấp phụ. Kỹ thuật PCR-ISSR và PCR-SSR thực hiện như trong công bố của Trần Thị Việt Thanh và cs. [9]. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ).

Phân tích số liệu bằng chương trình NTSYSp version 2.0 [10] theo quy ước: 1 = phân đoạn DNA xuất hiện và 0 = phân đoạn DNA không xuất hiện khi điện di sản phẩm PCR. Xác định hệ số tương đồng di truyền, thông tin đa hình (giá trị PIC) và lập biểu đồ hình cây để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu theo phương pháp Nei và Li [7].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Mức độ đa hình DNA giữa 25 mẫu Dầu đọt tím nghiên cứu khi phân tích với 31 chỉ thị phân tử (27 chỉ thị ISSR và 04 chỉ thị SSR) cho thấy có 28/31 chỉ thị chỉ ra tính đa hình (chiếm 90,32%) với giá trị PIC dao động từ 0 (chỉ thị ISSR49, Shc09 và Shc11) đến 0,398 (chỉ thị ISSR7), không có chỉ thị nào cho giá trị PIC > 0,5. Tổng số có 194 phân đoạn DNA được nhân bản, trong đó có 148 phân đoạn đa hình (chiếm 76,3%), 46 phân đoạn đồng hình (chiếm 23,71%). Số phân đoạn nhân bản được với mỗi chỉ thị dao động từ 1 (chỉ thị ISSR49, Shc09 và Shc11) đến 12 (ISSR1 và ISSR56) với kích thước các phân đoạn trong khoảng từ 110bp đến 3000bp (bảng 3). Giá trị đa dạng gen (Hi) dao động từ 0 (chỉ thị ISSR49, Shc09 và Shc11) đến 0,370 (chỉ thị ISSR15), giá trị trung bình là 0,183 (bảng 3).

Bảng 3

Giá trị PIC và tỷ lệ phân đoạn đa hình của 25 mẫu Dầu đọt tím với chỉ thị ISSR và SSR

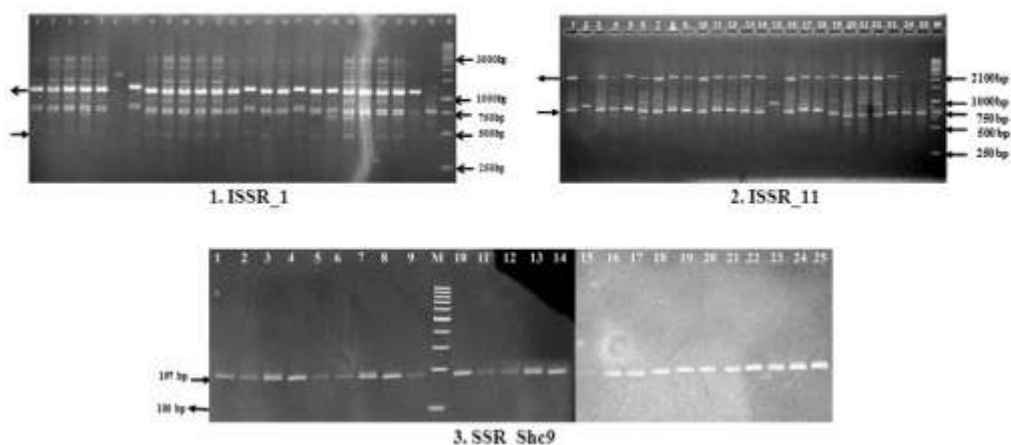
TT	Chỉ thị	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tổng số phân đoạn	% phân đoạn đa hình	Đa dạng gen (Hi)	Tổng phân đoạn cho các mẫu
Chỉ thị ISSR								
1	ISSR1	0,125	12	0	12	100	0,191	231
2	ISSR5	0,031	5	1	6	83,33	0,109	141
3	ISSR6	0,188	8	1	9	88,89	0,136	165
4	ISSR7	0,398	6	1	7	85,71	0,287	74
5	ISSR8	0,357	9	1	10	90,00	0,343	115
6	ISSR9	0,042	2	3	5	40	0,123	115
7	ISSR10	0,178	3	5	8	37,50	0,126	148
8	ISSR11	0,204	8	1	9	88,89	0,180	157
9	ISSR13	0,241	5	1	6	100	0,416	88
10	ISSR14	0,073	3	2	5	60	0,197	108
11	ISSR15	0,366	4	0	4	100	0,370	45
12	ISSR16	0,239	1	2	3	33,33	0,049	52
13	ISSR17	0,174	2	2	4	50	0,221	72
14	ISSR46	0,276	5	1	6	83,33	0,161	94
15	ISSR49	0	0	1	1	0	0,000	25

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT LẦN THỨ 5

TT	Chỉ thị	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tổng số phân đoạn	% phân đoạn đa hình	Đa dạng gen (Hi)	Tổng phân đoạn cho các mẫu
16	ISSR51	0,191	5	1	6	83,33	0,278	104
17	ISSR52	0,091	2	1	3	66,67	0,190	63
18	ISSR55	0,261	7	1	8	87,50	0,232	122
19	ISSR56	0,131	7	5	12	58,33	0,177	236
20	ISSR59	0,247	8	1	9	88,89	0,260	140
21	ISSR61	0,202	9	1	10	90,00	0,215	176
22	ISSR62	0,18	2	4	6	33,33	0,105	112
23	ISSR63	0,308	8	3	11	72,73	0,195	157
24	ISSR64	0,303	8	0	8	100	0,319	108
25	ISSR65	0,263	4	0	4	100	0,210	64
26	ISSR67	0,204	8	0	8	100	0,266	162
27	ISSR69	0,004	1	4	5	20	0,015	124
Chỉ thị SSR								
1	Shc01	0,237	4	0	4	100	0,211	66
2	Shc07	0,252	2	1	3	66,67	0,098	50
3	Shc09	0	0	1	1	0	0,000	25
4	Shc11	0	0	1	1	0	0,000	25
Tổng cộng			148	46	194			3364

Tính đa hình thể hiện ở sự xuất hiện hay không xuất hiện phân đoạn DNA khi so sánh giữa các mẫu với nhau. Tổng số phân đoạn DNA nhận bản được từ 25 mẫu lá Dầu đọt tím với 31 chỉ thị ISSR và SSR là 3364 phân đoạn. Số phân đoạn DNA nhận bản được nhiều nhất là 236 phân đoạn (chỉ thị ISSR56) và ít nhất là 25 phân đoạn (chỉ thị ISSR49, Shc09 và Shc11).

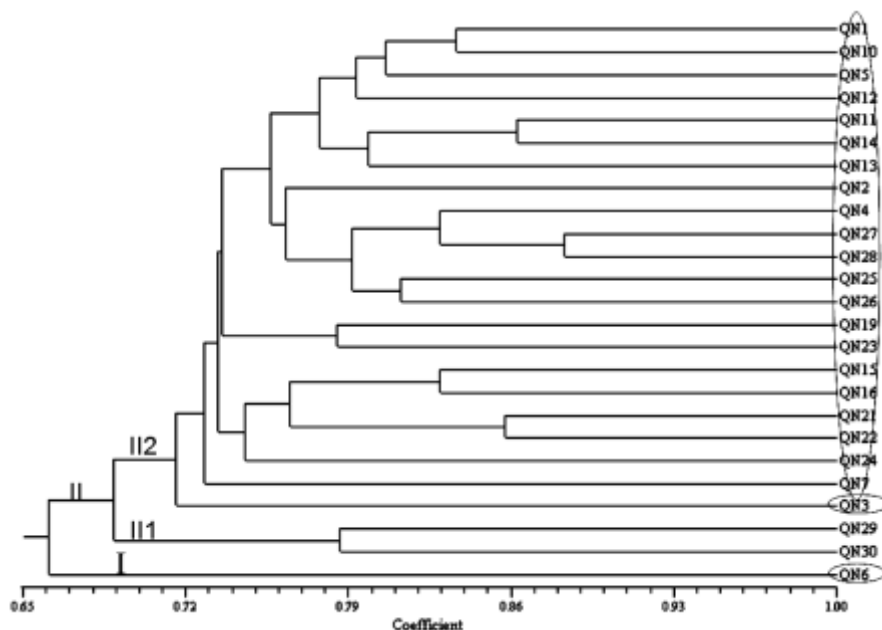
Hình 1 trình bày kết quả điện di sản phẩm PCR của 25 mẫu Dầu đọt tím với chỉ thị ISSR_1, ISSR_11 và chỉ thị SSR_Shc9.



Hình 1. Sản phẩm PCR của 25 mẫu Dầu đọt tím

1. Chỉ thị ISSR1; 2. Chỉ thị ISSR11; 3. Chỉ thị Shc9; M. Marker phân tử 1Kbp (ISSR_1, ISSR_11), 100bp (SSR_Shc9); Giếng 1-25 các mẫu Dầu đọt tím

Mối quan hệ di truyền giữa 25 mẫu Dầu đọt tím thể hiện trong biểu đồ hình cây (hình 2) phân làm 02 nhánh chính và có hệ số sai khác di truyền dao động trong khoảng 11,5% (1-0,885) đến 34% (1-0,66). Nhánh chính I duy nhất là mẫu QN6 có hệ số sai khác di truyền với 24 mẫu còn lại khoảng 34% (1-0,66). Nhánh chính II gồm 24 mẫu, có hệ số sai khác di truyền khoảng từ 11,5% đến 31,5% (1-0,695) và được chia thành 2 nhánh phụ. Trong đó nhánh phụ II.1 gồm 2 mẫu (QN29 và QN30), có hệ số sai khác di truyền 21,5% (1-0,785). Trong nhánh phụ II.2 chia làm 2 nhánh phụ nhỏ, nhánh phụ nhỏ 1 có duy nhất 1 mẫu (QN3), nhánh phụ nhỏ 2 là 22 mẫu còn lại có hệ số sai khác di truyền từ 11,5% (1-0,885) đến 27% (1-0,73).



Hình 2. Biểu đồ hình cây của 25 mẫu Dầu đọt tím theo hệ số di truyền Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA

Kết quả phân tích với chỉ thị ISSR và SSR cho thấy, hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu Dầu đọt tím dao động từ 0,67 (QN6) đến 0,885 (QN27 và QN28). Trên cơ sở những kết quả thu được chúng tôi cho rằng với 25 mẫu Dầu đọt tím được thu ở một địa phương thuộc huyện Đại Lộc-tỉnh Quảng Nam nên lựa chọn những cá thể có hệ số tương đồng di truyền cao trên 0,8 như mẫu QN27, QN28, QN11, QN14, QN21, QN22 để bảo tồn gen, nhân giống và phát triển để quần thể Dầu đọt tím còn lại duy nhất tại Quảng Nam được bảo tồn một cách hữu hiệu nhất.

III. KẾT LUẬN

Trong số 37 chỉ thị sử dụng phân tích tính đa dạng truyền của 25 mẫu Dầu đọt tím, có 31/37 chỉ thị (ISSR và SSR) nhân bản được DNA, trong đó 28/31 chỉ thị đã chỉ ra tính đa hình (chiếm 90,32%). Tổng số 194 phân đoạn DNA đã được nhân bản với kích thước dao động từ 110-3000bp, trong đó có 148 phân đoạn đa hình (chiếm 76,3%). Chỉ thị ISSR nhân được 185 phân đoạn và chỉ thị SSR nhân được 9 phân đoạn. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 25 mẫu Dầu đọt tím chia thành 2 nhánh chính có hệ số sai khác di truyền trong khoảng 11,5% đến 34%. Nhánh I gồm duy nhất mẫu QN6 có hệ số sai khác di truyền với 24 mẫu còn lại là 34%. Nhánh II là 24 mẫu và có hệ số sai khác di truyền dao động từ 11,5% đến 34%. Trong đó

nhánh II chia thành hai nhánh phụ nhỏ hơn, nhánh phụ II.1 là các mẫu QN29 và QN30 có hệ số sai khác di truyền 21,5% (1-0,785) và nhánh phụ II.2 là 22 mẫu còn lại có hệ số sai khác di truyền từ 11,5% (1-0,885) đến 27% (1-0,73).

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bởi kinh phí của đề tài “Bảo vệ nguồn gen cây rừng” của Ban Kế hoạch khoa học, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ Khoa học Công nghệ, Viện Khoa học Công nghệ Việt Nam**, 2007. Danh lục Đồ Việt Nam. NXB. KHTN & CN, Hà Nội, tr. 195-196.
2. **Đinh Thị Phong, Vu Thị Thu Hiền, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Tuông Văn, Nguyễn Quốc Bình**, 2011. *African Journal of Biotechnology*, 10 (55): 11397-11408.
3. **Doyle J. J., Doyle J. J.**, 1990. *Focus*, 12: 13-15.
4. **Ezekiel Amri, Florence Mamboya**, 2012. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 6 (2): 105-114.
5. **Lee S. L., Wickneswari R., Mahanim. C., Zakri A. H.**, 2001. *Journal of Tropical Forest Science*, 13 (1): 202-215.
6. **Muller F., Vocciam., Baa A., Bouvet J.**, 2009. *Genetica*, 135: 185-198.
7. **Neim., Li W. H.**, 1979. *Proc. Natl. Sci.*, 76: 5269-5273.
8. **Nguyễn Minh Tam, Nguyễn T. Phương Trang, Nguyễn Thị Hoa**, 2011. *African Journal of Biotechnology*, 10 (71): 15838-15844.
9. **Trần Thị Việt Thanh, Vũ Thị Thu Hiền, Phí Hồng Hải, Nguyễn Tường Vân, Đinh Thị Phòng**, 2012. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 10 (2): 263-270.
10. **Weir B. S.**, 1990. Genetic data analysis-Methods for discrete genetic data. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

GENETIC DIVERSITY OF *Dipterocarpus grandiflorus* Blco POPULATIONS IN VIETNAM BASE ON ISSR AND SSR MARKERS ANALYSIS

TRAN THI VIET THANH, TRAN THI LIEU, VU THI THU HIEN,
DINH THI PHONG, PHI HONG HAI, LA ANH DUONG

SUMMARY

Dipterocarpus grandiflorus Blco (Dau dot tim) is a species of large timber, evergreen high 30-35m, diameter 50-100cm is being over-exploited, only a single population at Dai Thanh humlet, Dai Loc district, Quang Nam province. Thirty three ISSR primers and four SSR primers were used to analysed genetic diversity of 25 individuals of Dau dot tim collected in Quang Nam. A total 37 polymorphic markers (33 ISSRs and 4 SSRs) were used, there were 31/37 primers successfully cloned. There were 28/31 primers revealing polymorphic with PIC value (Polymorphic Information Content) ranged from 0 (ISSR_49, SSR_Sh09 and SSR_Sh011) to 0.398 (ISSR_7). Total of 194 fragments DNA segments with size ranging from 110-3000bp, including 148 polymorphic segments (76.3%). Degree of genetic similarity between 25 sample *D. grandiflorus* ranged from 0.595 (QN6 and QN24) to 0.883 (QN27 and QN28). Tree diagram of the genetic relationship of 25 samples of *D. grandiflorus* were classified into 2 main groups and showed the genetic variation ranging from 11.5% (1-0.885) and 34% (1-0.66). The first group included only one QN6 genetic coefficient of variation for 24 different samples of about 34% (1-0.66). The second group included 24 remaining samples, genetic coefficient of variation ranging from 11.5% to 31.5% (1-0.695). The second group also divided into 2 sub-groups, II.1 and II.2. In sub II.1 including 2 samples (QN29 and QN30), genetic coefficient of variation is 21.5% (1-0.785). In sub II.2 divided into two small sub-branches only small 1:1 sample (QN3), small tributary 2 the remaining 22 samples with a coefficient of genetic variation from 11.5% (1-0.885) to 27% (1-0.73).