

BẢO TỒN NGUỒN GEN DI TRUYỀN LOÀI DẦU RÁI (*Dipterocarpus alatus*) Ở HAI TỈNH BÌNH PHƯỚC VÀ ĐỒNG NAI

VŨ ĐÌNH DUY, NGUYỄN MINH TÂM

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

NGUYỄN MINH ĐỨC, BUI THỊ TUYẾT XUÂN

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

ĐỖ THỊ PHƯƠNG THẢO

Viện Công nghệ Môi trường,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Loài Dầu rái (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don) thuộc chi Dầu (*Dipterocarpus*), họ Dầu (Dipterocarpaceae) phân bố ở miền Trung và miền Nam Việt Nam. Ngoài ra còn có ở Campuchia, Lào, Myanmar, Philippines, Thái Lan và Ấn Độ. Dầu rái đóng vai trò chủ đạo trong hệ sinh thái và kinh tế của khu rừng mưa vùng đất thấp tại phía Nam Việt Nam. Trong những năm gần đây, do khai thác quá nhanh, môi trường sống của loài Dầu rái bị phân cắt và suy giảm mạnh. Theo IUCN (2004) loài này đã được đưa vào danh sách các loài đang bị đe dọa ở mức độ EN A1cd, B1+2c. Ở Việt Nam, do mức độ suy giảm nơi sống và khai thác quá mức, chúng ở mức độ nguy cấp.

Loài Dầu rái có giá trị cao cả về mặt khoa học lẫn kinh tế, vì vậy việc bảo tồn và phục hồi loài Dầu rái là yêu cầu cấp thiết. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể Dầu rái có ý nghĩa quan trọng, không những chỉ ra khả năng tồn tại của loài ở hiện tại và tương lai, mà còn chỉ ra tiềm năng tiến hóa của loài. Ngày nay, kỹ thuật phân tử Microsatellite (SSR) được sử dụng rộng rãi, có hiệu quả trong việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài, đặc biệt các loài có nguy cơ bị đe dọa. Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng kỹ thuật phân tử SSR để điều tra mức độ đa dạng di truyền trong và giữa các quần thể của loài Dầu rái (*D. alatus*), kết quả sẽ cung cấp các thông tin cần thiết cho việc đưa ra các giải pháp hữu hiệu để bảo tồn, phục hồi và sử dụng bền vững loài.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Để phân tích mức độ đa dạng di truyền cả hai mức độ quần thể và loài, 64 mẫu vỏ cây từ 2 quần thể Dầu rái ở Vườn Quốc gia Bù Gia Mập, Bình Phước (VQG) và một khu rừng phòng hộ ở Tân Phú (Đồng Nai) đã được thu mẫu ngẫu nhiên vào tháng 6 và 7 năm 2012 (bảng 1). Mẫu được ghi số cùng với đặc điểm sinh học của cây lấy mẫu, bảo quản trong silica gel tại hiện trường và sau đó được bảo quản ở -30°C trong tủ lạnh sâu tại Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

Bảng 1

Thông tin các mẫu Dầu rái (*D. alatus*) nghiên cứu

TT	Quần thể	Ký hiệu	Số lượng	Vĩ độ	Kinh độ	Độ cao (m)
1	VQG Bù Gia Mập, Bình Phước	BGD	33	12°09'30"	107°03'30"	300
2	Khu rừng phòng hộ Tân Phú, Đồng Nai	TPD	31	11°02'32"	107°27'30"	250

Danh sách và thông tin các mồi SSR dùng trong nghiên cứu

Tên cặp mồi	Trình tự mồi	Tm (°C)	Mã hiệu trình tự tham chiếu
P193	F: 5'-CTTCCCTAAATCCCCAATGTT-3' R: 5'-TAATGGTGTGTGTACCAGGCAT-3'	54	AJ319714
P226	F: 5'-ACAATGAACTTGACCACCCAT-3' R: 5'-CAAAAGGACATACCAGCCTAGC-3'	55	AJ319715
P214	F: 5'-TAGGGCATATTGCTTTCTCATC-3' R: 5'-CTTATTGCAGTCATCAAGGGAA-3'	55	AJ319719
P293	F: 5'-TCTCAAATCTGCAAAGACAGC-3' R: 5'-CCATAGTCATCACCTCTAATGGTC-3''	55	AJ319721
P258	F: 5'-TGGCAAACAAGCTACTGTTCAT-3' R: 5'-CATGGGTTTAGCAACCTACACA-3'	55	AJ319723
P120	F: 5'-CAGGAGGGGAATATGGAAA-3' R: 5'-AAGTCGTCATCTTTGGATTGC-3'	54	AJ319717
P170	F: 5'-ATGCTTACCACCAATGTGAATG-3' R: 5'-CTCGCAGCAGAACAACCTTTCTA-3'	55	S75829

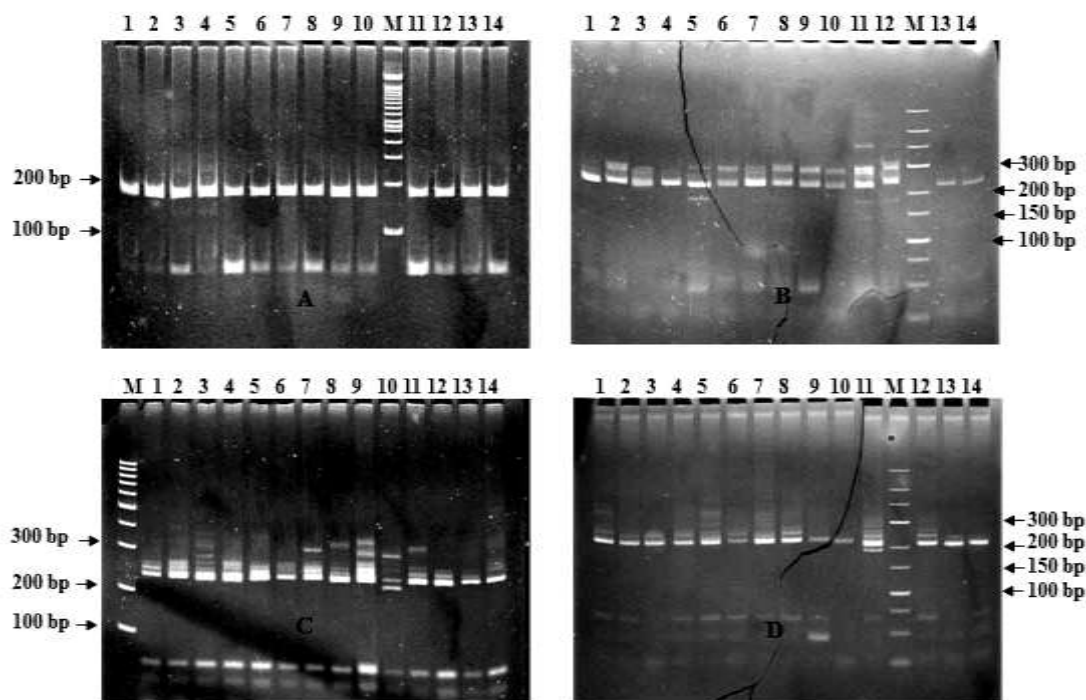
Mẫu được tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB của Doyle et Doyle [6]. Nhân bản DNA bằng kỹ thuật PCR, dung lượng hỗn hợp PCR là 25µl, trong đó chứa các thành phần gồm 12µl H₂O; 2,5µl dung dịch đệm buffer 10X; 2,5µl MgCl₂ 25mm; 2,5µl dNTPs 25mm; 1,25µl mồi xuôi (10mm); 1,25µl mồi ngược (10mm); 0,5µl *Taq* polymerase (5 U/µl); 2µl DNA khuôn. Chu trình nhiệt trên máy Gene amp PCR system 9700: (1) Biến tính ban đầu: 94°C trong 3 phút; (2) Biến tính: 94°C trong 45 giây; (3) Bắt cặp: 55°C trong 45 giây; (4) Kéo dài: 72°C trong 45 giây; (5) Lặp lại (2) đến (4) 40 chu kỳ; (6) Kết thúc phản ứng: 72°C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C. Điện di sản phẩm trên gel Polyacrylamide 5% trong 40ml dung dịch đệm 1xTAE, nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh trên máy soi gel CSL- MICRODOC. Bảy cặp mồi SSR đã được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền cả hai mức độ quần thể và loài nghiên cứu (bảng 2). Bảy cặp mồi SSR được thiết kế dựa trên trình tự đã được công bố trên Genbank và sử dụng chương trình hỗ trợ thiết kế.

Phân tích số liệu: Theo quy ước: 1 = phân đoạn DNA xuất hiện và 0 = phân đoạn DNA không xuất hiện, khi điện di sản phẩm PCR-SSR. Xác định hệ số tương đồng và khoảng cách di truyền theo Nei (1972), giá trị PIC, số alen tại một locus (A), tỷ lệ phần trăm locus đa hình (P) với mức độ tin cậy 95%, tần số gene dị hợp tử quan sát H_o và tần số gene dị hợp tử kỳ vọng He dưới điều kiện cân bằng Hardy-Weinberg, hệ số Shannon's (I). Tất cả các thông số trên được tính toán và phân tích bằng phần mềm GenAlEx; Dữ liệu cũng được phân tích bằng phần mềm NTSYS-pc để xây dựng mối quan hệ di truyền giữa các cá thể trong loài nghiên cứu.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 1 trình bày kết quả điện di sản phẩm microsatellite của một số cặp mồi microsatellite lục lạp (cpSSR). Với bảy cặp mồi microsatellite, đã tạo ra 12 alen khác nhau, trung bình 1,71 alen trên 1 locus. Tất cả 7 cặp mồi SSR đều đa hình với giá trị PIC dao động từ 0,130 (P214) đến 0,335 (P120), trung bình 0,253. Giá trị PIC = 0,253 đã chỉ ra mức độ khác nhau về di truyền giữa các cá thể trong loài là khá cao. Số lượng các phân đoạn DNA nhân bản với mỗi mồi dao

động từ 1 đến 5 phân đoạn. Kích thước các phân đoạn DNA được nhân bản trong khoảng từ 100bp đến 300bp. Tổng số có 17 phân đoạn được tạo ra khi phân tích với 7 môi SSR. Trong đó có 16 phân đoạn đa hình (chiếm 97,14%) và 1 phân đoạn đồng hình (chiếm 2,86%). Chỉ một locus đơn hình được tìm thấy ở cặp môi P193. Tuy nhiên, tỷ lệ phân đoạn giữa các cặp môi khác nhau, dao động từ 80,0% ở cặp môi P258 đến 100% ở 6 cặp môi còn lại, trung bình 97,14% (bảng 3).



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR-SSR trên gel Polyacrylamide 5%

A. Môi P193; B. P214; C. 258; D. 226; M: Marker phân tử 100bp; Giếng 1-14: Tên các mẫu Dầu rái

Bảng 3

Giá trị PIC và tỷ lệ phân đoạn đa hình của loài Dầu rái (*D. alatus*)

TT	Môi	PIC	Phân đoạn đa hình	Phân đoạn đồng hình	Tổng số phân đoạn	% Phân đoạn đa hình
1	P120	0,335	2	0	2	100,00
2	P170	0,162	2	0	2	100,00
3	P193	0,282	1	0	1	100,00
4	P214	0,130	2	0	2	100,00
5	P226	0,275	3	0	3	100,00
6	P258	0,272	4	1	5	80,00
7	P293	0,317	2	0	2	100,00
Tổng		0,253	16	1	17	97,14

Kết quả nghiên cứu chỉ ra mức độ đa dạng di truyền cao xuất hiện ở quần thể BGD ($A = 1,714$; $P = 71,43\%$; $He = 0,330$ và $Ho = 0,335$) và ở quần thể TPD ($A = 1,7144$; $P = 85,71\%$; $He = 0,281$ và $Ho = 0,286$). Giá trị trung bình này ở các quần thể trong loài Dầu rái là khá cao $A = 1,714$; $P = 78,57\%$; $He = 0,311$ và $Ho = 0,330$. Chỉ số đa dạng Shannon's (I) dao động từ 0,420 (TPD) đến 0,467 (BGD), trung bình 0,444 (bảng 4). Khoảng cách di truyền theo Nei (1972) được tìm thấy ở mức quần thể của loài Dầu rái là 0,174 (cặp quần thể BGD và TPD) và hệ số tương đồng di truyền được tìm thấy ở cặp quần thể BGD và TPD (0,84). Đối với hai quần thể của loài Dầu rái nghiên cứu được điều tra tại một vùng và tách biệt nhau bởi khoảng cách địa lý và độc lập nhau bởi hệ sinh thái khác nhau như đất trồng trọt, vườn nhà, thảm cỏ cây bụi hoặc khu định cư, đều khá đồng nhất về mặt di truyền (hệ số di truyền tương đồng tương đối lớn hơn 0,8). Có sự khác nhau giữa tần số gene dị hợp tử quan sát với kỳ vọng và có ý nghĩa.

Bảng 4

Đa dạng di truyền của 2 quần thể loài Dầu dái (*D. alatus*)

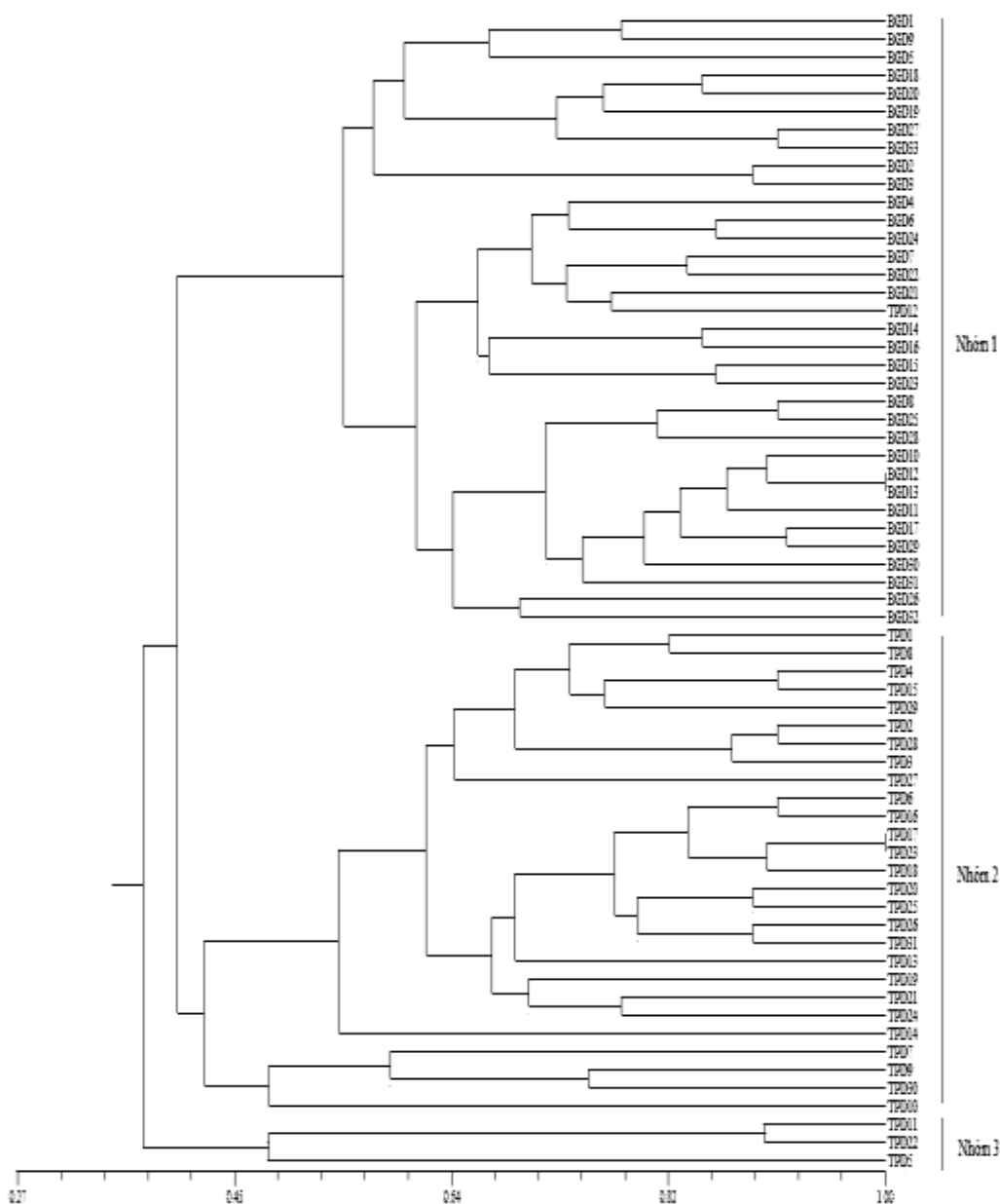
Quần thể	N	A	P	Ho	He	I
BGD	33	1,71	71,43	0,335	0,330	0,467
TPD	31	1,71	85,71	0,286	0,281	0,420
Trung bình		1,71	78,57	0,311	0,306	0,444

Ghi chú: N: Kích thước mẫu, A: Số alen tại một locus, P: Tỷ lệ phần trăm locus đa hình, Ho: Tần số gene dị hợp tử quan sát, He: Tần số gene dị hợp tử kỳ vọng, I: Hệ số Shannon's.

Phân tích UPGMA (Unweighted Pair Group Method) trên cơ sở ma trận của kiểu gene (genotyp) từ 7 cặp mỗi microsatellite cho mỗi cá thể trong mỗi loài theo phần mềm NTSYS cũng đã chỉ ra mối quan hệ giữa 64 cá thể Dầu dái từ 2 quần thể BGD và TPD đã được tách ra thành 3 nhóm (hình 2). Nhóm 1 gồm tất cả các cá thể của quần thể BGD chiếm 51,6%, nhóm 2 gồm 28 cá thể của quần thể TPD chiếm 43,75% và nhóm 3 gồm 3 cá thể thuộc quần thể của Tân Phú chiếm 4,6%. 33 cá thể của nhóm 1 có hệ số tương đồng di truyền từ 0,55 đến 1,0, trung bình 0,775, trong nhóm này có cặp cá thể BGD12 và BGD13 có mức độ tương đồng di truyền 100%. 28 cá thể của quần thể TPD trong nhóm 2 có hệ số tương đồng di truyền từ 0,52 đến 1,0, trung bình 0,76, trong nhóm này có cặp cá thể TPD17 và BGD23 có mức độ tương đồng di truyền 100%. 3 cá thể trong nhóm 3 thuộc quần thể TPD có hệ số tương đồng di truyền từ 0,47 đến 0,99, trung bình 0,735.

Các chỉ số đa dạng di truyền cao $A = 1,714$; $P = 78,57\%$ (71,43%-85,71%); $Ho = 0,331$ (0,286-0,335) và $He = 0,306$ (0,281- 0,330) cho cả 2 quần thể của loài Dầu rái (*D. alatus*) nghiên cứu khi so sánh với một số loài cây họ Dầu (Dipterocarpaceae) đã được một số tác giả khác nghiên cứu trước đây. Trong khi đó, mức độ đa dạng di truyền cao ở một số loài cây họ Dầu khác khi sử dụng chỉ thị SSR như *Hopea dryobalanoides* ($Ho = 0,644$; $He = 0,565$), *Shorea parvifolia* ($Ho = 0,436$; $He = 0,594$), *Shorea acuminata* ($Ho = 0,52$; $He = 0,63$); *Shorea acuminata* ($Ho = 0,604$; $P = 1,0$) [8], *S. leprosula* ($Ho = 0,565$; $Ho = 0,457$; $P = 0,9$), *Shorea curtisii* ($He = 0,64$); *Shore robusta* ($Ho = 0,68$; $He = 0,68$); *Dipterocarpus alatus* $P = 66,67\%$; *Parashorea malaanonan* ($P = 75\%$; $He = 0,46$); *Shorea acuminata* ($Hs = 0,203$; $Ht = 0,239$); *Dipterocarpus grandiflorus* ($He = 0,680$), *S. xanthophylla* ($He = 0,662$), *Parashorea tomentella* ($He = 0,608$); *Shorea leprosula* ($He = 0,709$); *Shorea leprosula* ($He = 0,454$), *Hopea beccariana* ($He = 0,602$); *Dipterocarpus arornatica* ($Ho = 0,491$, $He = 0,705$). Mức độ đa dạng

di truyền thấp hơn cũng được xác định ở một số loài cây họ Dầu như *Dipterocarpus alatus* ($H_o = 0,092$, $H_e = 0,088$) khi sử dụng kỹ thuật isozyme và một số tác giả sử dụng kỹ thuật AFLP cũng chỉ ra kết quả tương tự như *Shorea dasyphylla* ($H_e = 0,164$; $I = 0,251$), *S. blumutensis* ($H_e = 0,165$; $I = 0,257$), *Shorea acuminata* ($H_e = 0,100$; $I = 0,162$); *Shorea leprosula* ($H_e = 0,161$), *S. parvifolia* ($H_e = 0,205$). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng các cá thể của 2 quần thể nghiên cứu tồn tại trước khi có tác động của con người và sự suy giảm nơi sống của chúng. Tuy nhiên, hiện trạng của 2 quần thể hiện nay với kích thước quần thể nhỏ (< 100 cá thể) sẽ ảnh hưởng đến tính di truyền của cả 2 quần thể này ở các thế hệ tiếp theo.



Hình 2. Phân tích UPGMA trên cơ sở khoảng cách di truyền từ 64 cá thể Dầu rái

III. KẾT LUẬN

Tính đa dạng di truyền quần thể trong mỗi quần thể Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*) ở hai tỉnh Bình Phước và Đồng Nai tương đối cao (số alen cho một locus trung bình $A = 1,174$, tỷ lệ phần trăm locus đa hình $P = 78,57\%$, hệ số gene dị hợp tử quan sát trung bình $H_o = 0,331$ và hệ số gene dị hợp tử kỳ vọng trung bình $H_e = 0,306$), dù hai quần thể có kích thước nhỏ dưới 100 cá thể, do nơi sống của chúng bị suy giảm mạnh và khai thác không hợp lý, số cây con chiếm tỷ lệ thấp, sẽ bị ảnh hưởng xấu đến cấu trúc di truyền của chúng ở các thế hệ tiếp theo. Để bảo tồn hiệu quả loài Dầu rái, cần áp dụng ngay các biện pháp nhằm tăng kích thước quần thể để giảm mối quan hệ cận loài.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài NAFOSTED mã số 106.15-2011.74.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Anto Rimbawanto, Keuya Isoda**, 2001. In situ and Ex situ Conservation of Commercial Tropical Trees, p. 331-338.
2. **Cui-Ping Cao, Oliver Gailing, Iskandar Z. Siregar, Ulfah J. Siregar and Reiner Finkeldey.**, 2009. *Tree Genetics & Genomes*, 5: 407-420.
3. **Cui-Ping Cao, Reiner Finkeldey, Iskandar Zulkarnaen Siregar, Ulfah Juniarti Siregar and Oliver Gailing**, 2006. *Tree Genetics & Genomes*, 2: 225-239.
4. **Doyle J. J., Doyle D. J.**, 1990. *Pocus*, 12: 13-15.
5. **Lim L. S., Wickneswari R., Lee2 S. L., Latiff A.**, 2002. *Forest Genetics*, 9 (2): 125-136.
6. **Martins W. S., Lucas D. C. S., Neves K. F. S., Bertoli D. J.**, 2009. *Bioinformatics*, 3 (6): 282-283.
7. **Myralyn A. Abasolo, Edwino S. Fernando, Teresita H. Borromeo, Desireem. Hautea**, 2009. *Philippine Journal of Science*, 138 (1): 23-28.
8. **Nguyễn Hoàng Nghĩa**, 2005. Cây họ Dầu Việt Nam. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
9. **Nor ai Shukor.**, 1999. *J. Trap. Agric. Sci.*, 22 (2): 111-116.
10. **Peakall R., Smouse P. E.**, 2011. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295. Available at: [Http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/](http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/).
11. **Quách Thị Liên, Nguyễn Hoàng Nghĩa, Nguyễn Đức Thành**, 2009. Tạp chí Công nghệ sinh học, 7 (1): 67-74.
12. **Rohlf F. J.**, 1988. NTSYS-pc number taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishing, NY.
13. **Suchitra Changtragoon**, 2001. In situ and Ex situ Conservation of Commercial Tropical Trees, 349-354.
14. **Takeuchi Y., Ichikawa S., Konuma A., Tomaru N., Niiyama K., Lee S. L., Muhammad N., Tsumura Y.**, 2004. *Heredity*, 92: 323-328.
15. **Ujino T., Kawahara T., Tsumura Y., Nagamitsu T., Yoshimura H., Wickneswari R.**, 1998. *Heredity*, 81: 422-428.
16. **Zulfahmi, Iskandar Z. L., Ulfah J. S.**, 2010. *Biodiversitas*, 11 (3): 107-111.

**CONSERVATION GENETIC OF *Dipterocarpus alatus*
IN TWO PROVINCES: BINH PHUOC AND DONG NAI**

**VU DINH DUY, NGUYEN MINH TAM,
NGUYEN MINH DUC, BUI THI TUYET XUAN, DO THI PHUONG THAO**

SUMMARY

Dipterocarpus alatus Roxb. ex G. Don is considered as one of the endangered species and distributed in Southern Vietnam. We investigated the genetic pattern structure of two populations, one in Bu Gia Map National Park (Binh Phuoc) and one Tan Phu Protective Forest (Dong Nai). A total of inner barks collected from 64 individuals of two populations, Bu Gia Map and Tan Phu were used to assess genetic diversity using 7 SSR primer pairs. PIC value (Polymorphic Information Content) varied from 0.130 (P214) to 0.335 (P120), an average of 0.253. The study results showed an average number of alleles for a locus was 1.174, the average polymorphism $P = 78.57\%$ (71.43-85.71%). Observed heterozygosity averaged 0.331 (0.286-0.335) and expected one averaged 0.306 (0.281-0.330). Shannon's index $I = 0.444$ (0.42-0.467). The results suggest that although relative high level of genetic diversity, small population sizes will have to lead to an increase of inbred individuals within populations in future generations. A number of measures applied to the conservation and sustainable development were also discussed.