

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ LAN LƯỠI NGỰA LÁ THUÔN
[*Rhomboda lanceolata* (Lindl.) Ormd] Ở LÂM ĐỒNG BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ
RAPD

Nguyễn Thuý Hà, Nông Văn Tiếp

Trường Đại học Đà Lạt

Lê Ngọc Triệu

Trung tâm Ứng dụng Kỹ thuật Hạt nhân trong Công nghiệp

Nông Văn Duy

Viện Sinh học Tây Nguyên

Trần Văn Tiến*

Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Lâm sinh Lâm Đồng

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Ba nhóm tuổi của quần thể Lan lười ngựa lá thuôn được thu thập ở vùng núi Lang Bian, Lâm Đồng, Việt Nam để phân tích đa dạng di truyền. Trong nghiên cứu này, chỉ thị RAPD được sử dụng để khảo sát biến động di truyền ở 30 cá thể từ quần thể đó. Có 28 band được ghi nhận từ 11 môi nhận diện đặc trưng. Tỷ lệ đa hình ở mức độ loài là thấp ($P_i = 76,92\%$); tỷ lệ đa hình giữa các nhóm trong quần thể cũng được ghi nhận là thấp, dao động từ 59,23% đến 64,61%, trong đó nhóm tuổi 1 có tỷ lệ đa hình là cao nhất. Tính dị hợp tử ở mức độ loài là thấp ($H_{Ei} = 0,269$), tuy nhiên ở mức độ quần thể có sự khác nhau giữa các nhóm tuổi, trong đó nhóm 1 là cao nhất ($H_{E1} = 0,296$ đối với nhóm tuổi 1; $H_{E2} = 0,190$ đối với nhóm tuổi 2; $H_{E3} = 0,1893$ đối với nhóm tuổi 3). Mức độ biệt hóa gene giữa các quần thể là thấp ($G_{ST} = 0,2125$). Khoảng cách di truyền giữa nhóm tuổi 1 và nhóm tuổi 2 là: $D_{12} = 0,49$; giữa quần thể 1 và quần thể 3 là: $D_{13} = 0,51$ và giữa quần thể 2 và nhóm tuổi 3 là: $D_{23} = 0,48$. Kết quả về phân tích lập nhóm theo phương pháp UPGMA hình thành 4 nhóm tuổi khác nhau (gồm nhóm 1, 2, 3 và kết hợp giữa các nhóm tuổi khác nhau).

Từ khóa: Lan lười ngựa lá thuôn, Đa dạng di truyền quần thể, RAPD.

MỞ ĐẦU

Biến dị di truyền được xem là động lực cho sự tồn tại lâu dài của quần thể hay loài (Beardmore, 1983; Anatonovis, 1984). Việc hiểu biết tính đa dạng và biến dị di truyền trong và giữa các quần thể của các loài quý hiếm và có nguy cơ bị đe dọa là vấn đề cần thiết. Đây là cơ sở để định hướng chiến lược cho các hoạt động bảo tồn theo cả hai hướng tại chỗ (*in situ*) và chuyển chỗ (*ex situ*) (Hogbin và Peakall, 1999). Ngoài ra các dữ liệu di truyền cũng hỗ trợ cho việc thu thập mẫu phục vụ cho việc bảo tồn chuyển chỗ, cụ thể là các bộ sưu tập lõi của nguồn tài nguyên di truyền thực vật (Ceska và cộng sự, 1997; Woff và Sinclair, 1997). Dữ liệu di truyền cũng có thể được sử dụng để đánh giá hiệu quả của công tác bảo tồn quần thể tại chỗ và chuyển chỗ (Robichaux và cộng sự, 1997). Hơn nữa, các chỉ thị di truyền còn được sử dụng cho việc đánh giá mối quan hệ phát sinh ở nhiều mức độ khác nhau trong hệ thống học thực vật (Milligan và cộng sự, 1994; Steele và Pires, 2011).

Ở Việt Nam, Lan lười ngựa lá thuôn (*Rhomboda lanceolata* Ormd) là loài thân thảo, có vùng phân bố rất hẹp, mới chỉ ghi nhận có phân bố ở đỉnh núi Lang Bian, Lâm Đồng (Averyanov, 2003). Mặt khác theo kết quả điều tra khảo sát, hiện nay quần thể Lan lười ngựa lá thuôn chỉ có số lượng cá thể trong quần thể rất ít, nên việc nghiên cứu bảo tồn và quản lý, khai thác nguồn tài nguyên này một cách hợp lý là mang tính cấp thiết.

Nhằm góp phần vào việc xây dựng cơ sở dữ liệu giúp cho việc đưa ra các định hướng cũng như các biện pháp bảo tồn, quản lý nguồn tài nguyên Lan lười ngựa tại Lâm Đồng nói riêng và Việt Nam nói chung, cần tiến hành nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền của loài này tại Lâm Đồng. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chỉ thị phân tử (marker) RAPD để phân tích đa dạng di truyền.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Do đặc điểm sinh trưởng của loài Lan lười ngựa rất đặc biệt, cây sinh trưởng khoảng được 10 đốt thì bắt đầu ra hoa, sau khi ra hoa kết quả thì đoạn thân mang hoa chết, từ đốt đầu cùng phía trên mọc ra chồi mới và tiếp tục sinh trưởng cho đến khi khoảng 10 đốt thì bắt đầu ra hoa kết quả, sau khi đoạn mang hoa chết lại tiếp tục mọc chồi mới.... Qua khảo sát trong thực tế, chúng tôi nhận thấy các cá thể trong quần thể của loài này thường tập trung ở 3 đoạn sinh trưởng (có thể gọi là nhóm tuổi), do đó có chia các cá thể trong quần thể nghiên cứu thành 3 nhóm tuổi khác nhau. Ở mỗi nhóm tuổi thu 10 mẫu đại diện và ngẫu nhiên (bảng 1).

Bảng 1: Vị trí và số lượng mẫu thu thập

Nhóm tuổi của mẫu	Ký hiệu mẫu	Số lượng đốt	Chiều cao (cm)	Độ cao so với mặt nước biển (m)
Nhóm 1 Số lượng đốt <10	2	4	15	2026
	8	5	8	2117
	10	3	7	2076
	17	7	15	2090
	20	5	10	2089
	22	9	10	2080
	24	5	7	2124
	28	6	10	2132
	29	4	6	2132
	30	8	15	2134
Nhóm 2 10 < Số lượng đốt < 20	6	17	30	2010
	7	12	20	2117
	9	16	35	2113
	11	10	25	2076
	12	10	20	2076
	15	15	40	2090
	16	14	40	2090
	23	15	20	2080
	26	14	30	2124
	27	11	22	2132
Nhóm 3 Số lượng đốt > 20	1	40	20	2026
	3	20	40	2062
	4	20	45	2065
	5	22	45	2065
	13	41	50	2076
	14	20	40	2100
	18	22	42	2080
	19	22	60	2089
	21	22	55	2089
	25	20	50	2124

Phương pháp thu mẫu

Các mẫu lá thu được không quá non cũng không quá già, sạch và không bị nhiễm nấm, bệnh. Mẫu được bảo quản theo phương thức giữ mát trong quá trình di chuyển về phòng thí nghiệm. Các mẫu thu thập sau đó được giữ tươi trong ngăn mát tủ lạnh không quá 24 giờ trước khi tách chiết DNA.

Tách chiết và khuếch đại bằng kỹ thuật RAPD-PCR:

Các mẫu lá được tách chiết DNA tổng số bằng quy trình CTAB cải tiến từ quy trình CTAB I theo Kurt và cộng sự (2005), bổ sung 10% SDS vào đệm phân lập. Kiểm tra chất lượng và nồng độ DNA tổng số tách chiết được bằng phương thức so sánh tương quan mật độ

quang đo được ở các bước sóng 260nm, 280nm và 320nm trên hệ thiết bị SmartSpec™Plus của hãng Bio Rad (Mỹ) (Kurt và cộng sự, 2005).

30 môi RAPD thuộc nhóm môi OPA, OPC, OPN, UBC và S do hãng Operon cung cấp được sử dụng trong nghiên cứu ban đầu để sàng lọc môi. Việc sàng lọc sử dụng 5 mẫu từ quần thể.

Các phản ứng chuỗi polymer hóa (PCR) được thực hiện ở thể tích 15µl gồm 0,1 µl mỗi loại dNTP 10mM; 1,2 µl Taq DNA polymerase 1U/µl (Fermentas); 1,5 µl mỗi decamer 10 pmol/µl; 2 µl khuôn mẫu DNA 30-40ng/ µl; 1,5 µl đệm 10X và 8,4 µl nước cất. Việc khuếch đại DNA được thực hiện trên hệ máy MyGenie 96 Thermal Block của Hãng BioNEER (Hàn Quốc) với chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 5 phút, 40 chu kỳ gồm 94°C trong 1 phút; 36°C trong 2 phút; 72°C trong 2 phút, 72°C trong 10 phút. Đối chứng âm không chứa DNA khuôn mẫu được thêm vào trong mỗi lần chạy PCR.

Sản phẩm khuếch đại được phân tách trên gel điện di agarose 1,5% (dùng đệm TBE 1X) ở 80V trong 2 giờ, nhuộm với ethidium bromide (0,5 µg/ml), được chụp ảnh lại dưới ánh sáng cực tím ở hai bước sóng 254nm và 312nm trên hệ thiết bị soi gel và ghi ảnh microDOC của hãng Cleaver Scientific (Anh), ảnh được lưu ở dạng tệp điện tử với định dạng JPGE đối với từng môi và từng nhóm tuổi.

Phân tích thống kê

Do các chỉ thị RAPD là chỉ thị trội, mỗi band được xem là đại diện cho kiểu hình của 1 locus gồm hai allele (Williams và cộng sự, 1990; Lynch và Milligan, 1994). Chỉ những phân đoạn rõ ràng có kích thước từ 200 đến 1800bp được ghi nhận và sử dụng trong phân tích. Các band RAPD được ghi nhận lại trong một ma trận nhị phân với 1 đại diện cho sự xuất hiện và 0 đại diện cho sự thiếu vắng của một band nào đó.

Phương pháp phân tích dữ liệu các đặc trưng nhận dạng DNA (DNA fingerprint) để phân tích, đánh giá đa dạng di truyền quần thể:

Để đánh giá đa dạng quần thể, có nhiều tiêu chí, tuy nhiên trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tiến hành đánh giá đa dạng di truyền thông qua một số tiêu chí sau:

Xác định tính đa hình hay tỷ lệ đa hình P_j (Nei, 1972; Nei và cộng sự, 1978, 1981, 1983, 1989, 1990)

Một gene được xem là đa hình khi tần số một trong các allele của chúng nhỏ hơn hoặc bằng 0,99 ($P_j \leq 0,99$), điều này được áp dụng trong nghiên cứu này để xác định band có phải là đa hình hay không.

Tỷ lệ các locus đa hình (P): Xét các band trên gel sau điện di, tỷ lệ đa hình là số band đa hình so với tổng số band. Công thức tính:

$$P = n_{pj} / n_{total}$$

n_{pj} : là số band đa hình và n_{total} : tổng số band.

Xác định tính dị hợp H (Heterozygosity, H_{Exp}) (hay tính đa dạng gene - gene diversity, D).

Công thức tính:

$$H_E = 1 - \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \sum_{i=1}^k P_i^2$$

p_i : là tần số allele thứ i của k allele, m là số lượng locus.

Mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm tuổi trong quần thể dựa trên tần số allele G_{ST} :

Trong trường hợp marker trội, cụ thể là marker RAPD trong nghiên cứu này, mức độ biệt hóa gene giữa các các nhóm tuổi trong quần thể dựa trên tần số allele, G_{ST} được tính theo công thức:

$$G_{ST} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_{ST}$$

$F_{ST} = 1 - (H_S/H_T)$ là mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm tuổi trong quần thể dựa trên tần số allele xét với locus thứ i , n trong trường hợp này là tổng số locus. H_S là mức độ dị hợp tử trung bình của các nhóm tuổi trong quần thể tính trên một locus theo công thức:

$$H_S = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k H_i$$

Trong đó: k là số nhóm tuổi trong quần thể, H_i là mức độ di hợp tử của nhóm tuổi thứ i đối với locus đang xem xét. H_T là tổng đa dạng gene hay mức độ dị hợp tử trong tổng thể các nhóm tuổi của khu vực. $H_T = 2 p_0 q_0$ với p_0 và q_0 là tần số trung bình của các allele tạo band và không tạo band trên gel xuyên suốt các nhóm tuổi xem xét (IPGRI và University of Cornell, 2003).

Khoảng cách di truyền giữa các nhóm tuổi trong quần thể:

Khoảng cách di truyền giữa các nhóm tuổi được tính toán thông qua khoảng cách di truyền Nei cho từng cặp nhóm tuổi.

Khoảng cách di truyền Nei (D_{XY}) giữa hai nhóm tuổi X và Y được tính theo công thức:

$$D_{XY} = - \ln (I_{XY})$$

Trong đó, I_{XY} được tính theo công thức:

$$I_{XY} = \frac{J_{XY}}{\sqrt{(J_X \cdot J_Y)}}$$

D_{XY} : khoảng cách di truyền giữa hai nhóm tuổi X và Y ; J_X và J_Y lần lượt là giá trị đồng hợp tử trung bình của nhóm tuổi X và Y ; J_{XY} là giá trị đồng hợp tử trung bình giữa hai nhóm tuổi X và Y

Công thức tính J_{XY} :

$$J_{XY} = j_{XY}/j$$

j_{XY} : giá trị đồng hợp tử trung bình trong hai nhóm tuổi X và Y ; j : số locus

$$j_{XY} = \sum_{XYjk} p_{Xjk} \times p_{Yjk}$$

với p_{Xjk} : tần số allele thứ k thuộc locus thứ j thuộc nhóm tuổi i và i' (i đại diện cho X hoặc Y)

I_{XY} là độ đồng nhất giữa hai nhóm tuổi X và Y

Xây dựng cây quan hệ phát sinh cho tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu để xem xét sự lập nhóm của tổng thể các mẫu:

Ứng dụng phần mềm NTSys 2.1 để khảo sát và vẽ cây quan hệ phát sinh của 30 mẫu cá thể từ quần thể Lan lười ngựa lá thuôn, với dữ liệu đầu vào chính là các ma trận nhị phân thống kê được. Từ cây quan hệ phát sinh cho tổng thể mẫu, xem xét sự lập nhóm của tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng phát triển các chỉ thị đặc hiệu cho quần thể

Qua khảo sát thủ công các band, cho thấy có những môi được sử dụng tạo được các band đặc trưng cho nhóm tuổi nào đó (không tồn tại ở hai nhóm tuổi còn lại), đồng thời cũng có những môi hình thành band ở hai nhóm tuổi nhưng thiếu vắng ở nhóm tuổi còn lại. Sự xuất hiện hay thiếu vắng một cách đặc biệt như thế có thể làm cơ sở để nghiên cứu tiếp nhằm phát triển các môi đặc hiệu cho quần thể. Những trường hợp nêu trên được thống kê trong bảng 2.

Bảng 2: Các môi có khả năng phát triển thành marker đặc hiệu cho quần thể

Môi (Primers)	Band	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
UBC 701	1000	-	-	+
	450	+	-	+
UBC 708	1150	-	-	+
	1000	-	+	+
	870	-	+	+
	250	+	-	+
	200	+	-	+
	150	+	-	+
UBC 728	380	-	+	+
	200	-	+	-

UBC 730	830	-	+	-
OPC 11	580	+	-	+
S 201	1250	+	-	+
	420	-	-	+
S 202	700	-	+	+
	660	+	-	-
	375	-	+	+
	270	+	-	-
S 208	1250	-	-	+
S 216	1300	+	-	+
	1200	+	-	+
	625	+	+	-
	350	-	+	+
S 256	850	+	+	-
	550	+	+	-
	250	+	+	-
S 258	910	+	+	-
	875	+	+	-

Ghi chú: + Có xuất hiện trong đặc trưng nhận diện DNA
- Không xuất hiện trong đặc trưng nhận diện DNA

Qua kết quả khảo sát nhận diện đặc trưng từ 30 môi thì có 11 môi có kết quả đặc trưng nhận diện DNA đa hình. Trong đó tổng cộng 28 band có kích thước từ 200 đến 1300 bp (base pairs) được ghi nhận từ 11 môi khác nhau, tương đương 2,55 band cho mỗi môi.

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dựa trên các đặc trưng nhận dạng DNA Tỷ lệ các locus đa hình (P)

Tỷ lệ các locus đa hình đối với các nhóm 1, 2, 3 và tổng thể các thế hệ của loài trong phạm vi nghiên cứu lần lượt là: $P_1 = 64,61\%$; $P_2 = 62,31\%$; $P_3 = 59,23\%$ và $P_t = 76,92\%$.

Qua kết quả phân tích về tỷ lệ locus đa hình cho thấy mức độ đa hình ở các thế hệ khác nhau là khác nhau, trong đó nhóm 1 là cao nhất, nhóm thứ 3 là thấp nhất trong số 3 nhóm tuổi khảo sát. Tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu có tỷ lệ locus đa hình cao hơn hẳn so với từng thế hệ đơn lẻ ($P_t = 79,92\%$), đây là một điều hiển nhiên vì nó thể hiện tính tổ hợp của toàn bộ tập hợp các mẫu được khảo sát.

Từ kết quả thu nhận được về tỷ lệ locus đa hình cho thấy mức độ đa hình tỷ lệ nghịch với độ tuổi của loài. Ở độ tuổi càng trẻ thì mức độ đa hình cao hơn, điều này cũng phù hợp với thực tế, vì các cá thể non được sinh ra dựa trên nền tảng di truyền có sự kết hợp giữa các thế hệ khác nhau.

Trong những thập niên gần đây, phân tích đa dạng di truyền dựa trên RAP đã cho một cái nhìn mới về tỷ lệ locus đa hình một số loài thực vật quý hiếm. Pvingila (2005), khi nghiên cứu trên đối tượng cây Tần bì (*Fraxinus excelsior*) cho kết quả P trung bình ở các quần thể là 65%. Dharmar và John (2011), nghiên cứu trên đối tượng *Withania somifera* cho kết quả tỷ lệ locus đa hình trong quần thể dao động trong khoảng 64-83%. Carmen và cộng sự (2008) đã xác định tỉ lệ locus đa hình trong quần thể của đối tượng *Betula pendula* subsp. *fontqueri* là 64,1%. Ngoài ra đối với đối tượng Lan (Orchid), có nhiều tác giả đã xác định tỷ lệ locus đa hình. Ang và cộng sự (2002) xác định tỷ lệ locus đa hình trong quần thể trung bình là 45,1% và ở quần thể tổng là 71,6% đối với loài *Paphiopedilum michranthum*; tỷ lệ locus đa hình trong quần thể trung bình là 12,7% và ở quần thể tổng là 49,5% đối với loài *Paphiopedilum malipoense*..... Nhìn chung, các tác giả đều cho rằng tỷ lệ locus đa hình nêu trên đều là thấp và nguyên nhân do là sự mất mát về di truyền. So với kết quả của các nghiên cứu trên thì tỷ lệ P của quần thể Lan lưỡi ngựa lá thuôn phân bố tại Lang Bian có tỷ lệ locus đa hình ở mức trung bình thấp.

Xác định tính dị hợp H (Heterozygosity, H_E)

Qua nghiên cứu mức độ đa dạng gene ở 130 locus ghi nhận được, kết quả về tính dị hợp đối với các nhóm tuổi 1, 2, 3 và tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu lần lượt là $H_{E1} = 0,2960$, $H_{E2} = 0,1903$, $H_{E3} = 0,1893$ và $H_{Et} = 0,2692$.

Kết quả thu nhận được về tính dị hợp cho thấy ở nhóm 1 là cao nhất và thấp nhất là ở nhóm 3. Điều này cũng phù hợp với thực tế, vì qua khảo sát cho thấy quần thể Lan lưỡi ngựa lá thuôn có số lượng cá thể ở nhóm 1 nhiều nhất. Ngoài ra, kết quả về tính dị hợp ở nhóm 1 là kết quả của sự giao phối bằng côn trùng không những giữa các nhóm tuổi khác nhau mà ngay cả trong cùng một nhóm tuổi, do đó tính dị hợp tử hay mức độ đa dạng về di truyền cao. Đối với tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu, tính dị hợp là thấp hơn so với nhóm 1 và cao hơn so với các nhóm còn lại trong quần thể.

Tính dị hợp trong quần thể thực vật ở mỗi loài khác nhau là khác nhau. Dharmar và cộng sự (2011) đã xác định tính dị hợp tổng thể loài (H_E) của các quần thể *Withania somnifera* là 0,36. Sergei và cộng sự (2001) đã xác định tính dị hợp tổng thể loài trên đối tượng Lúa mạch hoang dại (*Hordeum spontaneum*) là 0,138. Trên đối tượng Sâm Mỹ (*Panax quinquefolia*), Jennifer và Hamrick (2004) đã xác định tính dị hợp H_E của các quần thể được bảo tồn ở Bắc California dao động trong khoảng 0,047-0,097. Ang và cộng sự (2002) xác định tính dị hợp H_E quần thể ở tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu là 0,3301 đối với loài *Paphiopedilum michranthum*; tính dị hợp H_E ở tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu là 0,3301 đối với loài *Paphiopedilum malipoense*.... Như vậy, so với tổng thể chung về tính đa hình của các loài quý hiếm nêu trên thì tính dị hợp H_{Et} của quần thể Lan lưỡi ngựa lá thuôn phân bố ở Lang Bian ở mức tổng thể loài là thấp.

Khoảng cách di truyền giữa các nhóm trong quần thể

Qua tính toán thu được kết quả như sau: khoảng cách di truyền giữa nhóm 1 và nhóm 2 là: $D_{12} = 0,49$; khoảng cách di truyền giữa nhóm 1 và nhóm 3 là: $D_{13} = 0,51$; Khoảng cách di truyền giữa nhóm 2 và nhóm 3 là: $D_{23} = 0,48$.

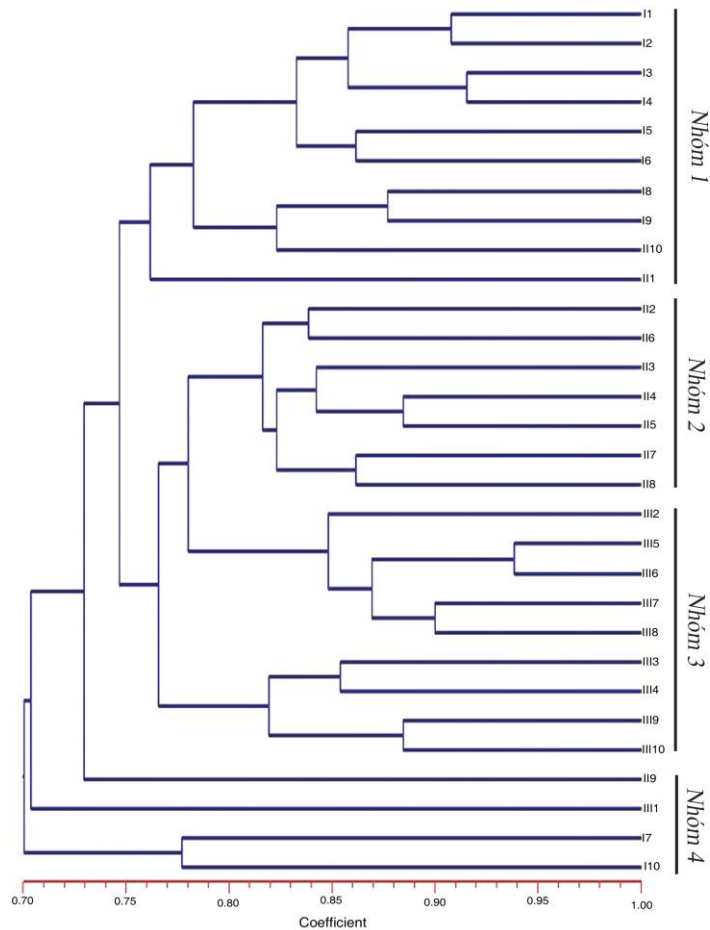
Từ kết quả trên, có thể nhận thấy khoảng cách di truyền giữa nhóm 1 và nhóm 3 là xa nhất và khoảng cách di truyền giữa nhóm 2 và nhóm 3 là gần nhất. Kết quả này có thể do các cá thể ở nhóm 3 đã già nên khả năng thụ phấn và sinh sản để tạo thế hệ mới giảm xuống. Ngoài ra, qua điều tra khảo sát và thu mẫu, bước đầu chúng tôi nhận thấy số lượng cá thể ở nhóm 3 ít hơn so với các cá thể ở nhóm 1 và nhóm 2. Qua đó gợi ra rằng, khả năng phát triển tốt đối với Lan lưỡi ngựa có lẽ nằm ở nhóm 1 và nhóm 2, nghĩa là cây có số lượng đọt nhỏ hơn 20 hay các cá thể có độ tuổi trẻ. Đối với những cá thể ở nhóm 3 (có độ tuổi già hơn) thì khả năng thụ phấn và sinh sản giảm xuống.

Mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm tuổi trong quần thể dựa trên tần số allele (G_{ST})

Qua kết quả nghiên cứu, mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm tuổi trong quần thể (G_{ST}) là 0,2125. Theo kết quả này, có thể nhận thấy mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm trong quần thể là nhỏ. Vì theo Kurt và cộng sự (2005), IPGRI và Cornel University (2003) cho rằng khi $G_{ST} \geq 0,25$ thì biệt hóa di truyền giữa các quần thể là rất lớn, nghĩa là cấu trúc của quần thể bị phá vỡ và có sự mất mát gen. Kết quả phân tích trên có thể do các thế hệ sinh trưởng và phát triển rất gần nhau, tạo điều kiện thuận lợi cho việc thụ phấn không những các cá thể trong cùng thế hệ và giữa các thế hệ khác nhau trong quần thể. Điều này cho thấy vùng phân bố tự nhiên của loài này rất nhỏ và có điều kiện sinh cảnh tương đối đồng nhất. Qua thực tế khảo sát, bước đầu nhận thấy loài Lan lưỡi ngựa lá thuôn chỉ phân bố trên 1 diện tích nhỏ gần đỉnh núi Lang Bian - Lâm Đồng.

Mối quan hệ phát sinh giữa các nhóm trong quần thể

Từ 30 mẫu đại diện cho tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu, mối quan hệ phát sinh về đa dạng di truyền của các cá thể trong quần thể nghiên cứu thể hiện ở hình 1:



Hình 1: Cây mối quan hệ phát sinh giữa các nhóm tuổi của quần thể Lan lười ngựa lá thuôn.

Thông qua sơ đồ về mối quan hệ phát sinh giữa các cá thể ở hình 1 có thể nhận thấy các mẫu khảo sát lập thành 4 nhóm khác nhau. Ngoài 3 nhóm tuổi còn có 1 nhóm khác đó là sự kết hợp giữa các cá thể khác nhau ở các nhóm khác nhau, như: 2 cá thể của nhóm 2, 1 cá thể nhóm 1 và 1 cá thể nhóm 3. Ngoài ra, giữa ở các nhóm tuổi khác nhau còn có sự xen lẫn các cá thể của nhóm tuổi này vào nhóm khác, như: ở nhóm 1 và nhóm 2 có sự tồn tại của nhóm 3.

Kết quả trên cho thấy mối quan hệ phát sinh này có thể là do kết quả lai không những giữa các cá thể trong nhóm tuổi mà còn giữa các cá thể ở các nhóm tuổi khác nhau. Điều đó cho thấy mặc dù nền tảng di truyền của tổng thể loài tuy ở mức độ thấp, nhưng có sự tích lũy dần qua các thế hệ. Kết quả của sự lai nhau giữa các thế hệ là động lực thúc đẩy việc duy trì và gia tăng các biến dị di truyền trong quần thể nếu hạt của loài này có khả năng nảy mầm để hình thành thế hệ mới với số lượng nhiều. Đây chính là cơ sở để cho loài tồn tại và phát triển nếu chúng ta tiến hành các biện pháp bảo vệ môi trường sống, xúc tiến tái sinh tự nhiên nhằm duy trì và gia tăng số lượng cá thể trong quần thể. Ngoài ra việc thu thập, nhân giống và mở rộng vùng gây trồng bảo tồn cũng cần tiến hành thực hiện nhằm mở rộng khu phân bố cho quần thể loài.



Hình 2: Lan lưỡi ngựa (*Rhomboda lanceolata* (Lindl.) Ormd) với các nhóm tuổi khác nhau:
 1. Cây mẹ và cây con tái sinh; 2. Cây nhóm tuổi 1-1 đoạn;
 3. Cây nhóm tuổi 2-2 đoạn; 4. Cây nhóm tuổi 3-3đoạn.

KẾT LUẬN

Qua kết quả khảo sát nhận diện DNA thì có 11 môi đặc trưng nhận diện DNA đa hình. Trong đó tổng cộng 28 band có kích thước từ 200 đến 1300 bp (base pairs) được ghi nhận từ 11 môi khác nhau, tương đương 2,55 band cho mỗi môi.

Mức độ đa hình ở các thể hệ khác nhau là khác nhau, ở độ tuổi càng trẻ thì mức độ đa hình cao nhất. Trong tổng thể loài trong phạm vi nghiên cứu có tỷ lệ locus đa hình ở trung bình thấp ($P_t = 79,92\%$).

Tính dị hợp (H_{Et}) ở nhóm 1 cao nhất và thấp nhất là ở nhóm 3.

Khoảng cách di truyền giữa các nhóm tuổi trong quần thể: nhóm 1 và nhóm 3 là xa nhất và khoảng cách di truyền giữa nhóm 2 và nhóm 3 là gần nhất.

Mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm trong quần thể (G_{ST}) là: 0,2125. Theo kết quả này, có thể nhận thấy mức độ biệt hóa gene giữa các nhóm trong quần thể là nhỏ.

Mối quan hệ phát sinh giữa các cá thể ở các mẫu khảo sát lập thành 4 nhóm khác nhau. Ngoài 3 nhóm tuổi còn có 1 nhóm khác đó là sự kết hợp giữa các cá thể khác nhau ở các nhóm khác nhau.

Lời cảm ơn:

Các tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà cũng như Ban quản lý Khu du lịch Lang Bian đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc điều tra nghiên cứu và thu thập mẫu vật, Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Lâm sinh Lâm Đồng và Trung tâm Ứng dụng kỹ thuật hạt nhân trong công nghiệp đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng các trang thiết bị phục vụ nghiên cứu. Đặc biệt các tác giả gửi lời cảm ơn đến TS. Phí Hồng Hải đã có những ý kiến đóng góp đề bài báo hoàn thiện hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anatonovis J., 1984. Genetic variation within population. In Dirzor R., Sarukan J. (eds) perspectives on plant population biology. Sinauer, Sunderland, 229-241.
- Ang L., Luo Y. B., Xiong Z. T. and Song G. E., 2002. A Preliminary study on conservation genetics of three endangered Orchid species. *Acta Botanica Sinica*, 44(2): 250-252.
- Averyanov L. V. & Averyanova A. L., 2003. Updated checklist of the orchids of Vietnam. Vietnam National University Publishing House, Hanoi, Vietnam.
- Beardmore J.A., 1983. Extinction, survival and genetic variation. In: Schoenwald-Cox C.M., Chamber S.M., Macbryde B., Thomas L. (eds). *Genetics and Conservation*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, 125-151.
- Carmen M., Teresa P., Margarita C. M. and Esteban H. B., 2008. Genetic Diversity and Structure of the Endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* Populations in the South of Spain. *Silva Fennica* 42(4): 487-498.
- Ceska J. P., Afollter J. M. and Hamrich J. C., 1997. Developing a sampling strategy for *Raptisia arachiifera* based on allozyme diversity. *Conservation Biology*, 11: 1133-1139.
- Dharmar K. and John A. D. B., 2011. RAPD analysis of genetic variability in wild populations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *International Journal of Biological Technology*, 21-25.
- Hogbin P. M. and Peakall R., 1999. Evaluation of the contribution of the genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, 13: 514-522.
- Jennifer M. C. and Hamrick J. L., 2004. Genetic Diversity in Harverted and Protected Populations of Wild American Ginseng, *Panax Quinquefolius* L. (ARALIACEAE). *American Journal of Botany*, 91(4): 540-548. 2004.
- IPGRI and Cornell University, 2003. Measures of genetic diversity.
- Kurt W., Hilde N., Kirsten W. and Kahl G., 2005. *DNA Fingerprinting in plants principles, methods, and applications* (second Edition). Cpc press Taylor & Fancies group.
- Lynch M. and Milligan B. G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3 (2): 91-99.
- Milligan B. G., Leebens-M. J. and Strand A. E., 1994. Conservation genetics: Beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, 12: 844-855.
- Nei M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number individual. *Genetics* 9: 583-590.
- Nei M., and Tajima F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Nei M., and Tajima F., 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions for restriction sites data. *Genetics* 105: 207-216.
- Nei M. and Jin L., 1989. Variances of the average numbers of nucleotide substitutions within and between populations. *Molecular Biology Evolution* 6: 240-300.
- Nei M. and Miller J. C., 1990. A Simple Method for Estimating Average Number of Nucleotide Substitutions Within and Between Populations From Restriction Data. *Genetics Society of America*. 125: 873-879.
- Pvingila D., Verbylaitė R., Baliuckas V., Pliūra A. and Kuusienė S., 2005. Genetic diversity (RAPD) in natural Lithuanian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Biologija*, 3: 46-53.
- Sergei V. Bahtiyour Y., Irina S., David W. Varda Z. and Samuel M. et al., 2001. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 289-303.
- Steele P. R. and Pires J. C., 2011. Biodiversity assessment: State of the art techniques in phylogenomics and species identification. *American Journal of Botany*, 98:415-415.

- Robichaux R. H., Friar E. A., Mount D. W. 1997. Molecular genetics consequences of a population bottleneck associated with reintroduction of the Mauna Kea Silverwood (*Argyroxiphium sanwicense* spp. *sanwicense* L. [Asteraceae]. *Conservation Biology*, 11: 1140-1146.
- William J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. and Tingey S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 6531 - 6535.
- Woff P. G. & Sinclair R. B., 1997. Highly differentiated populations of the narrow endemic plant Maquire Primrose (*Primula maguirei*). *Conservation Biology*, 11: 375-391.

RAPD ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF NATURAL POPULATION OF *Rhomboda lanceolata* (Lindl.) Ormd FROM LAM DONG PROVINCE

Nguyen Thuy Ha, Nong Van Tiep

University of Da Lat

Le Ngoc Trieu

Centre for Applications Nuclear Techniques in Industry

Nông Văn Duy

Tay Nguyen Institute of Biology

Tran Van Tien*

Lam Dong Silvicultural Experimentation Research centre

Vietnam Academy of Forest Sciences

SUMMARY

Three generations of the population of *Rhomboda lanceolata* (Lindl.) Ormd were collected in Lang Bian mountain, Lam Dong province, Vietnam for analysis of genetic diversity. In this research, random amplified polymorphic DNA (RADP) makers were employed to investigate the genetic variability in 30 individuals of that population, which corresponded to above three generation. With 11 primers, 28 highly reproducible and clear RAPD bands were obtained. The percentage of polymorphic loci at species level in the research was significantly quite low ($P_t = 76.92\%$); This percentage at population level was also low and ranged from 59.23 % to 64.61%. However, the first generation has a higher % P ($P_t = 64.61\%$) than its generative congener. Significant heterozygosity at species level was quite low ($H_{Et} = 0.2692$),but, at populations level, there was markedly differences between the generations. The first generation has higher values of diversity ($H_{E1} = 0.2960$, in generation 1; $H_{E2} = 0.190$, in generation 2; $H_{E3} = 0.1893$, in generation 3). Genetic variation within population was significantly quite low, with $G_{ST} = 0.2125$. Genetic distance between generations of that population were remarkably differentiated, for example: genetic distances between generations 1 and 2 was $D_{12} = 0.49$; genetic distances between generations 1 and 3 was $D_{13} = 0.51$ and genetic distances between populations 2 and 3 was $D_{23} = 0.48$. Result of UPGMA cluster analysis were recorded 4 group (including, generation 1, 2, 3 and hybridized generations).

Keywords: *Rhomboda lanceolata* (Lindl.) Ormd, Genetic diversity, RAPD

Người thẩm định: TS. Phí Hồng Hải