

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Như Anh

**ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG VÀ CẤU TRÚC DI TRUYỀN LOÀI RE
HƯƠNG (*CINNAMOMUM PARTHENOXYLON* (Jack) Meisn.) ĐANG BỊ
ĐE DỌA TUYỆT CHỦNG Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

Hà Nội - 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Như Anh

**ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ĐA DẠNG VÀ CẤU TRÚC DI TRUYỀN LOÀI
RE HƯƠNG (*CINNAMOMUM PARTHENOXYLON* (Jack) Meisn.)
ĐANG BỊ ĐE DỌA TUYỆT CHỦNG Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC
VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. VŨ ĐÌNH DUY
2. TS. NGUYỄN MINH ĐỨC

Hà Nội - 2023

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 10 tháng 04 năm 2023
Người cam đoan

Phạm Như Anh

LỜI CẢM ƠN

Đề tài nghiên cứu của tôi được thực hiện tại phòng thí nghiệm Viện Sinh thái Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga và Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Qua đây, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban lãnh đạo Viện đã tạo điều kiện để các công việc chuyên môn của đề tài được tiến hành thuận lợi.

Khi thực hiện đề tài, tôi đã nhận được sự động viên và giúp đỡ nhiệt tình của các thầy cô, bạn bè và đồng nghiệp. Sự ủng hộ về mặt tinh thần và những chỉ dẫn, góp ý, chia sẻ kinh nghiệm, tài liệu vô cùng quý báu này khiến tôi thực sự cảm kích, biết ơn.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Vũ Đình Duy và TS. Nguyễn Minh Đức, người thầy đã tận tình hướng dẫn tôi trong quá trình hoàn thiện luận văn. Tôi xin chân thành cảm ơn những góp ý, chỉ dẫn, chia sẻ kinh nghiệm của các cán bộ nghiên cứu thuộc Viện Sinh thái Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga và Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin chân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và các thầy cô giáo Khoa Công Nghệ Sinh học - Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, những người thân và các anh chị đồng nghiệp đã luôn bên tôi, là động lực để tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành luận văn.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.06-2021.02. Chủ nhiệm TS. Vũ Đình Duy.

Hà Nội, ngày 10 tháng 04 năm 2023

Học viên

Phạm Như Anh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục đích nghiên cứu:.....	3
3. Nội dung nghiên cứu:	3
4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài:.....	3
5. Những đóng góp của luận văn:.....	3
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	5
1.1. Tình hình nghiên cứu về Re hương và các loài trong chi Quế ở Việt Nam.....	5
1.1.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái và sinh thái của các loài trong chi Quế.....	5
1.1.2. Nghiên cứu mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài trong chi Quế.....	6
1.2. Tình hình nghiên cứu về Re hương và các loài trong chi Quế trên thế giới.....	7
1.2.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh thái của các loài trong chi Quế.....	7
1.2.2. Nghiên cứu mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài trong chi Quế.....	8
1.2.3. Một số chỉ thị phân tử dùng trong phân tích đa dạng di truyền quần thể và loài thực vật.....	10
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	15
2.1.1. Đối tượng : Loài Re hương (<i>Cinnamomum parthenoxylon</i> (Jack)Meisn.).	15
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu.....	15
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.2.1. Phương pháp kế thừa	15
2.2.2. Phương pháp chuyên gia	15
2.2.3. Phương pháp tiếp cận đối tượng nghiên cứu.....	15
2.2.4. Phương pháp khảo sát thực địa.....	15
2.2.5. Phương pháp lập ô tiêu chuẩn và điều tra tầng cây gỗ lớn.....	16
2.2.6. Phương pháp điều tra tái sinh.....	16

2.2.7. Phương pháp điều tra cây đi kèm	16
2.2.8. Thu thập mẫu cho phân tích ADN.....	17
2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM	17
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu và tách chiết ADN tổng số	17
2.3.2. Thực hiện phản ứng PCR-SSR và xác định kích thước alen	18
2.4. XỬ LÝ SỐ LIỆU	19
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	20
3.1. Một số đặc điểm hình thái và sinh thái của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam	20
3.1.1. Đặc điểm hình thái của loài Re hương	20
3.1.2. Đặc điểm sinh thái của loài Re hương.....	25
3.2. Đa dạng và cấu trúc di truyền quần thể loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam	36
3.2.1. Tách chiết ADN tổng số	36
3.2.2. Phản ứng PCR-SSR, điện di sản phẩm PCR-SSR trên gel polyacrylamide 6%	36
3.2.3. Đa dạng di truyền quần thể loài Re hương ở mức độ locus	37
3.2.4. Đa dạng di truyền ở mức độ loài Re hương	47
3.2.5. Cấu trúc di truyền quần thể loài Re hương.....	49
3.3. Mối quan hệ di truyền giữa các quần thể Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam	53
3.3.1. Khoảng cách di truyền giữa 5 quần thể loài Re hương.....	53
3.3.2. Mối quan hệ di truyền giữa 5 quần thể loài Re hương.....	54
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
KẾT LUẬN	56
KIẾN NGHỊ	56
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	58
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	59

DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

ADN	Acid deoxyribonucleic
AMOVA	Phương sai phân tử
D1.3	Đường kính ngang ngực (cách mặt đất 1,3 m)
Dt	Đường kính tán trung bình (m)
FAO	Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên Hợp Quốc
Fis	Hệ số sinh sản cận loài
GPS	Garmin 64s
Hvn	Chiều cao vút ngọn (m)
Hdc	Chiều cao dưới cành (m)
He	Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng (Expected Heterozygosity)
Ho	Hệ số gen dị hợp tử quan sát (Observed Heterozygosity)
I	Chỉ số đa dạng Shimmon
N	Số mẫu phân tích
Na	Số alen trung bình trong 1 locus (No. of Different Alleles)
Ne	Số alen hiệu quả (No. of Effective Alleles)
Np	Alen hiếm
P	Phần trăm locus đa hình (Percentage of Polymorphic Loci)
PCR	Polymerase Chain Reaction
SSR	Simple Sequence Repeats
UPGMA	Phân tích Unweighted Pair Group Method

VU	Loài sẽ nguy cấp
CR	Mức độ rất nguy cấp

Các đơn vị:

BKHCN	Bộ Khoa học và Công nghệ
IUCN	The World Conservation Union
KBTTN	Khu bảo tồn thiên nhiên
VQG	Vườn quốc gia

Các quần thể:

Re hương (*C. parthenoxylon* (Jack) Meisn.)

QN	Rừng quốc gia Yên Tử, Quảng Ninh
VP	VQG Tam Đảo, Vĩnh Phúc
PT	VQG Xuân Sơn, Phú Thọ
HB	KBTTN Hang Kia – Pà Cò, Hòa Bình
TH	VQG Xuân Liên, Thanh Hóa

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Nội dung	Trang
3.1	Hình ảnh thân, lá, quả cây Re hương	21
3.2	Phân bố 5 quần thể Re hương ở miền Bắc Việt Nam	26
3.3	Kết quả điện di DNA tổng số của một số mẫu đại diện cho loài Sa mu dầu trên gel agarose 1%	36
3.4	Hình ảnh điện di 9 cặp môi SSR đa hình trên gel polyacrylamide 6%	37
3.5	Cấu trúc không gian alen của các quần thể nghiên cứu	38
3.6	Mức độ biến đổi di truyền trong loài Re hương	50
3.7	Giá trị ΔK lớn nhất theo Evanno <i>et al.</i> (2005)	52
3.8	Phân bố gen 5 quần thể Re hương trên cơ sở phân tích Bayesian	52
3.9	Mối quan hệ di truyền giữa 5 quần thể Re hương ở phía Bắc Việt Nam với các giá trị bootstrap trên các nhánh	54

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Nội dung	Trang
2.1	Địa điểm thu mẫu 5 quần thể Re hương trong nghiên cứu	17
2.2	Đặc điểm của 9 cặp môi SSR đa hình sử dụng trong nghiên cứu	18
3.1	Kết quả điều tra đặc điểm hình thái cây Re hương ở trong nghiên cứu	21
3.2	Kết quả điều tra số cây Re hương tái sinh ở các khu vực nghiên cứu	22
3.3	Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Hòa Bình	27
3.4	Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Thanh Hóa	29
3.5	Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Vĩnh Phúc	31
3.6	Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Quảng Ninh.	34
3.7	Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Phú Thọ	35
3.8	Số alen, alen hiệu quả và alen hiếm tại mỗi locus SSR cho 5 quần thể Re hương	38
3.9	Đa dạng di truyền loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam	43
3.10	Đa dạng di truyền và kết quả thắt cổ chai 5 quần thể Re hương	48

3.11	Phương sai phân tử giữa các quần thể và trong quần thể Re hương	50
3.12	Tỷ lệ phần trăm cấu trúc gen trong 5 quần thể loài Re hương	53
3.13	Khoảng cách di truyền (dưới) và hệ số tương đồng di truyền (trên) theo công thức Nei (1978)	54

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là quốc gia có mức độ đa dạng sinh học phong phú trên thế giới, với khoảng 10% số loài trên toàn thế giới. Tuy nhiên, các nguồn tài nguyên sinh học của nước ta đang bị đe dọa nghiêm trọng, trong đó có nhiều loài thực vật. Việc bảo vệ những loài thực vật nguy cấp, quý hiếm này không chỉ góp phần duy trì tính đa dạng sinh học mà còn giữ gìn nguồn tài nguyên, bảo vệ môi trường sống và phát triển kinh tế bền vững.

Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.) là loài cây gỗ quý hiếm, phân bố rải rác ở một số tỉnh của Việt Nam. Loài này có giá trị quan trọng về kinh tế và sinh thái trong các rừng nhiệt đới và cận nhiệt đới ở châu Á. Gỗ dùng trong xây dựng, đồ mỹ nghệ và tinh dầu dùng trong y dược. Đặc biệt, ở rễ chứa safron là loại tinh dầu quý dùng trong hương liệu và nước giải khát. [1], [2]. Ngoài ra, các nghiên cứu về các loài trong chi Quế (*Cinnamomum*) cho thấy hoạt tính sinh học trong việc ức chế và điều trị nhiều bệnh như ung thư, kháng khuẩn, chống nấm và chống bệnh tiểu đường [3], [4], [5]. Nhưng chỉ có một số loài trong chi Quế như Quế rành (*Cinnamomum verum*), Quế (*C. cassia*), Quế quan (*C. zeylanicum*), Long não (*C. camphora*) và Vù hương (*C. balansae*) được nghiên cứu sâu trong hướng xác định các hoạt tính sinh học tiềm năng, thành phần hoạt tính sinh học và mức độ đa dạng di truyền.

Tuy nhiên, trong những thập kỷ qua do tác động của nhiều yếu tố như: Suy giảm môi trường sống, cùng với việc khai thác để lấy gỗ, chưng cất tinh dầu, nguyên liệu làm thuốc và biến đổi khí hậu... Những điều này đã làm ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của loài Re hương trong tự nhiên. Do đó, quần thể tự nhiên của loài Re hương đến nay bị suy giảm mạnh, các quần thể còn lại bị phân mảnh trong các khu rừng thứ sinh. Trong khi đó, khả năng tái sinh của loài này không tốt [6], [7]. Theo Sách đỏ Việt Nam [8], loài Re hương được xếp vào phân hạng rất nguy cấp (CR A1a,c,d) và nằm trong nhóm IIA của Nghị định 84/2021/NĐ-CP. Hiện tại, chúng được bảo vệ trong các khu bảo tồn thiên nhiên (KBTTN), Vườn quốc gia (VQG), tuy nhiên tình trạng của chúng vẫn đang đe dọa. Do đó, việc bảo vệ, bảo tồn và phục hồi loài Re hương là cấp bách và cần được thực hiện ngay.

Thông tin về đa dạng di truyền của các loài thực vật rất quan trọng trong các nghiên cứu bảo tồn. Việc biết rõ đa dạng di truyền sẽ giúp cho các nhà khoa học hiểu rõ về nguồn gen của các loài cây, có thể quản lý tốt hơn các loài thực vật và đề xuất các biện pháp, giải pháp bảo vệ hữu hiệu các loài đang có nguy cơ tuyệt chủng. Đến hiện nay, chỉ thị sinh học phân tử ADN (ADN molecular markers) là công cụ quan trọng và đã được áp dụng rộng rãi trong các nghiên cứu đa dạng và cấu trúc di truyền quần thể thực vật [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15]. Trong số đó, Chỉ thị phân tử SSR (trình tự đơn lặp lại) là một trong những công cụ quan trọng được sử dụng trong đánh giá các biến dị và cấu trúc di truyền quần thể thực vật, bởi vì SSR là chỉ thị đồng trội, có các đoạn ADN ngắn, độ dài khoảng 2-6 nucleotide, được lặp lại trong một chuỗi ADN. Các SSR biến đổi cao trong quần thể thực vật, cho phép phát hiện sự khác biệt di truyền rất nhỏ giữa các loài và giữa các cá thể trong cùng một loài. Ngoài ra, SSR là một công cụ linh hoạt cho phép các nhà khoa học thiết kế các bộ chỉ thị phân tử đặc hiệu cho từng loài thực vật cụ thể. Việc thiết kế các bộ chỉ thị đặc hiệu giúp tăng độ chính xác và giảm thời gian phân tích [16], [17].

Một số nghiên cứu trước đây đã sử dụng bộ chỉ thị phân tử SSR để tính mức độ đa dạng di truyền và cấu trúc di truyền một số loài trong chi Quế phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển bền vững loài [14], [18] [19], [20] [21], [22] [23], [24], [25]. Tuy nhiên, nghiên cứu các biến đổi biến dị di truyền trong và giữa các quần thể Re hương ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử còn hạn chế ở nước ta. Do đó, nghiên cứu xác định mức độ đa dạng di truyền và cấu trúc di truyền quần thể của loài Re hương sẽ giúp tìm hiểu sâu hơn về nguồn gen di truyền loài cây này, từ đó giúp các nhà khoa học, quản lý đưa ra các giải pháp bảo tồn, bảo vệ và phát triển bền vững nguồn tài nguyên quý giá này. Điều này đồng nghĩa với việc giúp tăng cường năng lực quản lý tài nguyên tự nhiên, nâng cao chất lượng cuộc sống của cộng đồng địa phương và đóng góp cho sự phát triển bền vững của quốc gia. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài “**Đánh giá mức độ đa dạng và cấu trúc di truyền loài Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.) đang bị đe dọa tuyệt chủng ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam**” như một bước nghiên cứu đầu tiên nhằm cung cấp thông tin cần thiết về di truyền nguồn gen, bổ sung cơ sở

dữ liệu di truyền của loài này ở Việt Nam, đồng thời góp phần phục vụ công tác bảo tồn và sử dụng bền vững loài của cộng đồng dân cư địa phương.

2. Mục đích nghiên cứu:

- Bổ sung một số đặc điểm hình thái và sinh thái của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam (Thanh Hóa, Hòa Bình, Phú Thọ, Vĩnh Phúc và Quảng Ninh)

- Đánh giá được mức độ đa dạng và cấu trúc di truyền quần thể loài Re hương tại 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam.

3. Nội dung nghiên cứu:

Nội dung 1: Điều tra một số đặc điểm hình thái và sinh thái loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam.

Nội dung 2: Phân tích đa dạng và cấu trúc di truyền quần thể loài Re hương bằng chỉ thị phân tử SSR

Nội dung 3: Xác định mối quan hệ di truyền giữa các quần thể Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam.

4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài:

- Bổ sung một số đặc điểm hình thái và sinh thái của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam;

- Dựa trên bộ chỉ thị SSR, mức độ đa dạng và cấu trúc di truyền nguồn gen của loài Re hương đã được xác định, đây là cơ sở khoa học để hỗ trợ các nhà quản lý trong việc đưa ra các giải pháp bảo tồn và phát triển loài một cách hiệu quả hơn.

5. Những đóng góp của luận văn:

- Bổ sung cơ sở dữ liệu về đặc điểm hình thái, sinh thái của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam.

- Kết quả của nghiên cứu chỉ ra đa dạng di truyền trung bình của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam;

- Các quần thể có khoảng cách địa lý gần nhau có mối quan hệ di truyền gần nhau và hình thành những nhóm riêng.

- Công bố 01 bài báo khoa học: Genetic diversity evaluation of *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn in some nature reserves in North Vietnam using SSR markers. Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development 2(2): 41-51

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tình hình nghiên cứu về Re hương và các loài trong chi Quế ở Việt Nam

1.1.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái và sinh thái của các loài trong chi Quế

Ở Việt Nam, chi Quế (*Cinnamomum*) ghi nhận được khoảng 49 loài [1] và từ lâu nay, nhân dân ta đã sử dụng một số loài trong chi Quế làm gia vị, hương liệu, hay dược liệu trong y học. Chúng được tin dùng bởi những lợi ích mang lại cho sức khỏe đã được kiểm chứng như: giảm lượng đường trong máu, bảo vệ tim mạch, ngăn ngừa sâu răng, hỗ trợ điều trị các bệnh về hô hấp, bổ não, tăng cường trí nhớ, chống ung thư, giảm đau do viêm khớp,... Vì vậy, một số loài trong chi Quế đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu nhằm bảo tồn và sử dụng làm nguyên liệu trong các lĩnh vực nông, lâm nghiệp và y dược.

Trong chi Quế, Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.). Hoặc tên đồng nghĩa: *Laurus parthenoxylon*; *L. porrectum*; *Sassafras parthenoxylon*; *Cinnamomum simondii*; *C. porrectum*. Đây là cây gỗ, cao tới 25m, đường kính khoảng 40-60cm, vỏ màu nâu xanh sẫm ở gốc, nứt dọc, toàn thân có mùi thơm long não. Lá đơn mọc cách, phiến lá hình trứng, hình bầu dục hoặc hình trái xoan. Hoa nhỏ, màu vàng nhạt hoặc màu xanh vàng. Quả mọng, hình cầu, quả chín màu đen [1]. Re hương thuộc loại cây gỗ quý, nhiều tác dụng, gỗ có giá trị kinh tế cao, được sử dụng cho chế biến các sản phẩm mỹ nghệ và chưng cất tinh dầu [26], [8], [27]. Do đó, cùng với việc bị khai thác và phá rừng trái phép nên loài này trở nên cạn kiệt. Hiện nay, Re hương có trong danh sách của Nghị định 84/2021/NĐ-CP và Sách Đỏ Việt Nam (CR A1a,c,d) [8].

Theo nghiên cứu của Lê Thị Diên và đồng nghiệp [6] đã xác định rằng, các lâm phần chứa Re hương có sự đa dạng cao về thành phần các loài cây gỗ tầng cao, đồng thời chúng cũng sinh sống cùng với nhiều loài cây ưa sáng như Gò đồng, Dẻ, Hoàng đàn, Chân chim,... Cây tái sinh chủ yếu là hạt, với đa số cây có phẩm chất tốt. Tuy nhiên, số lượng cây Re hương tái sinh lại rất ít và chủ yếu đến từ chồi. Nghiên cứu khác của Phạm Hồng Ban và cộng sự [28] đã

chỉ ra ở Khu Bảo tồn Thiên nhiên Pù Hoạt, tỉnh Nghệ An có 58 loài thuộc 11 chi của họ Long não. Chi *Litsea* chiếm 18 loài, Chi Quế chiếm 15 loài, còn các chi khác có từ 1- 4 loài. Trong đó 3 loài là Bộp trái bầu dục (*Actinodaphne elliptibacca*) ở mức độ nguy cấp (EN), loài Re hương (*C. parthenoxylon*) ở mức độ rất nguy cấp (CR), Vù hương (*C. balansae*) ở mức độ sẽ nguy cấp (VU) trong Sách Đỏ Việt Nam [8]. Tương tự, tác giả Vũ Anh Tài và Nguyễn Nghĩa Thìn [29] đưa ra 156 loài thuộc 66 họ, gồm có 1 loài tuyệt chủng ngoài thiên nhiên (chưa rõ ràng), 13 loài rất nguy cấp, 61 loài nguy cấp, 81 loài và 01 thứ sẽ nguy cấp ở Hà Giang. Trong đó, họ Long não có 5 loài: Re hương ở tình trạng rất nguy cấp (CR); Gù hương, Re cam bốt và Re trắng quả to xếp ở mức sẽ nguy cấp (VU); Vù (*Endiandra hainanensis* Merr. & Metc. ex Allen) loài nguy cấp (EN).

Công trình nghiên cứu của tác giả Trần Ngọc Hải và cộng sự [30] nghiên cứu một số đặc điểm lâm học của loài Vù hương tại VQG Bến En, kết quả chỉ ra rằng Gù hương chỉ phân bố ở khu vực núi đất, từ độ cao 50m trở xuống, địa hình bằng phẳng, không có sự chia cắt lớn, độ dốc từ 10 - 25° phân bố tại các trạng thái rừng IIA, IIIA2 và Gõ - Nứa. Các loài cây đi kèm phân bố cùng Gù hương chủ yếu là cây tiên phong ưa sáng. Vù hương phân bố chủ yếu ở 2 tầng tán chính trên 12m và tầng tán dưới 12m, mật độ cây rất thấp 8-11 cây/ha và là những cây có đường kính dưới 30cm. Không gặp tái sinh tự nhiên của loài Gù hương tại khu vực nghiên cứu.

Cho đến nay, chưa có nhiều nghiên cứu đầy đủ về đặc điểm phân bố của các quần thể loài Re hương ở Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh thái của Re hương ở nhiều phân vùng địa lý khác nhau là việc làm cần thiết, có ý nghĩa quan trọng cho công tác bảo tồn nguồn gen.

1.1.2. Nghiên cứu mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài trong chi Quế

Ở nước ta, đến nay chưa có nhiều công trình nghiên cứu xác định mức độ đa dạng di truyền quần thể tự nhiên của các loài trong chi Quế, đặc biệt là loài Re hương. Nghiên cứu của tác giả Hà Văn Huân [32], cho thấy quần thể Long não có mức độ đa dạng di truyền cao và điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc nhân giống loài này sử dụng kỹ thuật PCR-RADP. Tương tự, theo hướng này Hà Thị Phúc và cộng sự [33] đã phân tích Quế

(*C. cassia*) ở hai vùng Mã Đà và Cát Tiên, Đồng Nai. Các tác giả đã chỉ ra 2 alen đa hình (1,4 kb với môi OPA4 và OPA12, 1,6 kb với môi OPA10). Các alen này chỉ có ở quần thể Mã Đà, không có ở quần thể Cát Tiên. Tuy nhiên các tác giả chưa đánh giá mức độ tương đồng di truyền giữa hai quần thể Quế ở hai vùng địa lý khác nhau. Gần đây, công trình nghiên cứu của các tác giả Nguyễn Viễn và cộng sự [34], Vũ Đình Duy và cộng sự [35] sử dụng chỉ thị phân tử SSR để đánh giá tính đa dạng di truyền loài Vù hương ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Tác giả chỉ ra mức độ đa dạng di truyền của loài Vù hương khá cao và hệ số giao phối cận huyết âm ($F_{is} < 0$). Điều này cho thấy hiện tượng giao phối cận huyết hay tự thụ phấn không xảy ra hoặc xảy ra rất thấp trong loài nghiên cứu. Đây là nguồn thông tin và cơ sở khoa học ban đầu có giá trị để đề tài kế thừa có chọn lọc cũng như định hướng nghiên cứu nhằm đáp ứng mục tiêu nghiên cứu đặt ra.

Do vậy, nghiên cứu tính đa dạng di truyền của mỗi loài thực vật là hết sức cần thiết, sẽ là cơ sở khoa học để nâng cao chất lượng di truyền và bảo tồn hữu hiệu loài đang bị đe dọa. Từ đó, chúng tôi xây dựng đề xuất nghiên cứu theo hướng này, thực hiện nghiên cứu trên đối tượng là loài Re hương đang bị đe dọa tuyệt chủng ở Việt Nam.

1.2. Tình hình nghiên cứu về Re hương và các loài trong chi Quế trên thế giới

1.2.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh thái của các loài trong chi Quế

Chi Quế (*Cinnamomum* Schaeffer) thuộc họ Long Não (Lauraceae), gồm có khoảng 250 loài, phân bố rộng Bắc và Nam bán cầu, từ châu Á đến châu Mỹ La tinh [36], [37], [38], [39]. Tuy nhiên các loài được gây trồng với mục đích kinh doanh vỏ và tinh dầu, chủ yếu phân bố ở vùng châu Á. *Cinnamomum* là một chi gồm những cây thường xanh, chiều cao lên tới 30m, vỏ cây màu xám bạc, mịn, có mùi thơm nhẹ. Lá mọc đơn, bề mặt lá có 3 gân kéo dài hợp với nhau ở mép lá. Mặt trên lá nhẵn, thơm nhẹ. Vỏ cây thường được dùng làm gia vị. Cụm hoa chùm viên chùy. Quả hình trứng, có màu xanh lúc non, khi già chuyển màu đen [40]. Theo nghiên cứu của tác giả Zhang *et al* [41] về đặc điểm cấu trúc của quần thể *C. burmannii* ở Quế Lâm, Trung Quốc. Kết quả chỉ ra rằng hầu hết cây trong quần thể chiều cao 2-8m

và đường kính từ 2-6cm, có khả năng sinh trưởng tốt đảm bảo cho việc phục hồi và duy trì tính ổn định của loài tại khu vực nghiên cứu. Tiếp đó, tác giả Zhang *et al* [42] đã nghiên cứu các chỉ tiêu tăng trưởng về chiều cao, đường kính cổ rễ và sinh khối của cây *C. bodinieri* ở giai đoạn cây con tại 6 vùng sinh thái khác nhau ở Trung Quốc. Kết quả chỉ ra rằng giai đoạn cây con của loài kéo dài từ 198- 238 ngày. Chiều cao, đường kính cổ rễ và sinh khối của cây con lần lượt là: 33,05- 84,60cm, 9,23- 13,32mm và 32,44- 109,39g. Kameyama *et al.* [43] đã nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường đối với khả năng nảy mầm và sinh trưởng của cây con Long não ở rừng lá rộng rụng lá ở phía Đông Nhật Bản, cho thấy khả năng nảy mầm của loài tỷ lệ nghịch với hệ số bức xạ của hoạt động quang hợp và độ ẩm của đất, nhưng tỷ lệ thuận với biến động hàng ngày của nhiệt độ đất. Tỷ lệ sống của cây con và sinh trưởng chiều cao tỷ lệ nghịch với hệ số bức xạ của hoạt động quang hợp và tỉ lệ thuận với độ ẩm đất. Ở lỗ trống trong rừng chiều cao của cây con cao hơn ở vị trí trong tán rừng.

1.2.2. Nghiên cứu mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài trong chi Quế

Trong những năm gần đây, nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen quần thể và loài trong các loài thuộc chi Quế phục vụ cho công tác bảo tồn, phát triển và khai thác bền vững đã được nhiều nhà nghiên cứu ở Trung Quốc, Đài Loan, Ấn Độ, Matara, Canada và Nhật Bản quan tâm [44], [45], [24], [25], [46], [18]. Yan *et al.* [44] lần đầu tiên giải mã toàn bộ hệ gen thông tin của loài *C. longepaniculatum* bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (Illumina) đã nhận dạng được 23.463 chuỗi lặp lại đơn giản (microsatellite, SSR). Các phát hiện này cung cấp những hiểu biết sâu sắc về các đoạn chứa SSR và cung cấp một bộ chỉ thị phân tử SSR sử dụng để phân tích sự khác biệt giữa các bộ gen của *C. longepaniculatum* và các loài khác trong cùng một chi, họ.

Một trong những nghiên cứu sử dụng SSR để phân tích đa dạng di truyền của các loài trong chi Quế là của tác giả Zhang *et al.* [42] Nghiên cứu này đã sử dụng 11 chỉ thị SSR để phân tích 20 loài Quế trên toàn thế giới. Kết quả cho thấy rằng SSR là một phương pháp mạnh mẽ để phân tích đa dạng di truyền của các loài Quế, từ đó giúp tăng hiểu biết về sự đa dạng gen của chi

quế. Zhong *et al.* [47] ứng dụng EST-SSR phân tích đa dạng và cấu trúc di truyền quần thể của loài Long não (*C. camphora*) ở Nam Trung Quốc. Trong nghiên cứu này, đa dạng và cấu trúc di truyền quần thể của 180 mẫu được lấy từ 41 quần thể ở Nam Trung Quốc đã được nghiên cứu với 22 chỉ thị phân tử EST-SSR. Tổng cộng, có 61 alen, $H_o = 0.45$, $H_e = 0.44$ và đa dạng gen theo Nei ($GD = 0.44$) đã được xác định. Trong số 41 quần thể hoang dã, loài *C. camphora* có trung bình 44 alen, 2,02 alen hiệu quả và H_e dao động từ 0,30 (quần thể SC) đến 0,61 (quần thể HK). Phân tích phân tử phương sai (AMOVA) chỉ ra 17% sự khác biệt di truyền giữa các quần thể và hệ số phân biệt di truyền (F_{ST}) trung bình giữa các quần thể là 0,162, cho thấy sự khác biệt di truyền đa dạng giữa các quần thể khá thấp. Cấu trúc quần thể di truyền cho thấy có hai nhóm di truyền từ 180 cá thể, đồng thời phân tích tọa độ chính (PCoA) và phương pháp phân tích UPGMA cũng cho thấy các quần thể được nhóm lại theo hai nhóm tương ứng. Các quần thể được nhóm vào nhóm I gần như được phân bố tại tỉnh Giang Tây (trừ quần thể XS ở tỉnh Giang Đông), và nhóm II chủ yếu bao gồm các quần thể từ các vùng khác, cho thấy sự phân bố địa lý đáng kể. Hơn nữa, kiểm định theo phương pháp Mantel cho thấy rằng khoảng cách địa lý và khoảng cách di truyền có mối tương quan chặt chẽ. Các kết quả này sẽ hỗ trợ cho việc quản lý bảo tồn và chương trình lai tạo *C. camphora* trong tương lai. Kameyama *et al.* [45] phân tích sự khác biệt di truyền cho loài Long não (*C. camphora*) từ 817 mẫu cây ước tính hàng trăm đến hàng ngàn năm tuổi tại Nhật Bản, Trung Quốc và Đài Loan bằng SSR. Kết quả phân tích đưa ra các khu vực địa lý khác nhau thì khác biệt di truyền khác nhau (Nhật Bản với Trung Quốc và Đài Loan) và giảm sự đa dạng di truyền ở Nhật Bản có thể được cho là sự cô lập về mặt địa lý lâu dài trong và sau thời kỳ băng hà, tác giả đưa ra một số biện pháp hiệu quả để phục hồi nguồn gen cho loài này. Wang *et al.* (2018) [48] đã sử dụng SSR để phân tích đa dạng di truyền của 15 loài Quế ở Trung Quốc. Kết quả cho thấy rằng mỗi loài Quế có một hình thái đặc trưng của chỉ thị SSR, từ đó giúp phân biệt chúng một cách chính xác. Các kết quả này cung cấp thông tin quan trọng về sự đa dạng di truyền của các loài Quế ở Trung Quốc và bảo tồn tài nguyên gen của loài cây quý này. Narayan *et al.* (2019) [49] tập trung vào việc sử dụng SSR để phân tích đa dạng di truyền của 14 loài Quế ở Ấn Độ. Tác giả

thu thập mẫu từ các vùng trồng cây quế khác nhau tại các bang ở Ấn Độ và sử dụng 13 chỉ thị phân tử SSR để phân tích đa dạng di truyền. Kết quả của nghiên cứu cho thấy rằng di truyền quần thể giữa các loài quế khác nhau rất cao và SSR đã chứng minh sự khác biệt về di truyền giữa các loài quế. Nghiên cứu này cung cấp thông tin quan trọng để đánh giá đa dạng di truyền của cây quế ở Ấn Độ và hỗ trợ việc bảo vệ và quản lý tài nguyên gen của loài cây quý giá này. Li *et al.* (2016) [50] đã sử dụng chỉ thị phân tử SSR để phân tích đa dạng di truyền của 1 loài Quế tại Trung Quốc. Kết quả cho thấy số lượng SSR và mức độ đa dạng di truyền trong các loài quế khác nhau có sự khác biệt lớn. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng phân bố địa lý và môi trường có ảnh hưởng đến di truyền nguồn gen của các loài Quế. Trong một nghiên cứu khác, Chen *et al.* (2018) [51] cho thấy rằng mức độ đa dạng di truyền của các loài quế tại Đài Loan rất cao và có liên quan mật thiết đến môi trường sống của chúng bằng phân tích SS.. Cũng theo hướng này, Gwari *et al.* (2016) [25] đã sử dụng chỉ thị RAPD và ISSR để nghiên cứu cấu trúc di truyền quần thể loài Re hương Quế (*C. tamala*) thu được từ 3 địa điểm khác nhau của Uttarakhand Himalaya, Ấn Độ. Tác giả đưa ra sự biến đổi di truyền cao trong loài Re hương Quế và các dấu hiệu ISSR hữu ích đối với các nghiên cứu sự đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền giữa các quần thể trong loài. Joyl *et al.* (2008) [18] cũng đã sử dụng chỉ thị phân tử RAPD để phân tích đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền giữa 9 loài trong chi Quế như Quế bì (*C. cassia*), *C. riparium*, *C. macrocarpum*, *C. perrotteiti*, *C. wightii*, *C. citronella*, *C. glaucense*, Quế quan (*C. verum*) và *C. malabaratum*. Kết quả gợi ý rằng các mối quan hệ di truyền trong các loài thuộc chi Quế sử dụng kỹ thuật RAPD có thể hữu ích cho việc cải thiện giống Quế này.

1.2.3. Một số chỉ thị phân tử dùng trong phân tích đa dạng di truyền quần thể và loài thực vật

Trong vài thập kỷ qua, các kỹ thuật sinh học phân tử đã có sự phát triển mạnh mẽ, tạo ra công cụ hữu hiệu cho con người nghiên cứu sự sống ở cấp độ phân tử, các kỹ thuật sinh học phân tử cũng nhanh chóng được ứng dụng trong nghiên cứu và bảo tồn đa dạng sinh học, tạo ra lĩnh vực khoa học mới như tiến hóa phân tử, di truyền bảo tồn. Để nghiên cứu đa dạng di truyền quần

thể và loài thực vật, ngoài kỹ thuật isozym, hiện nay có nhiều có kỹ thuật ADN đã được áp dụng với các phương pháp như RAPD, ISSR, SSR, ...

- Kỹ thuật RAPD

Chỉ thị phân tử RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) là một kỹ thuật phân tích di truyền phổ biến được sử dụng để nghiên cứu đa dạng gen và đa hình gen ở các loài thực vật và động vật.

Kỹ thuật RAPD được phát triển vào những năm 1990 bởi nhà di truyền học người Anh. RAPD là một kỹ thuật phân tích đa hình của các đoạn ADN được khuếch đại ngẫu nhiên bằng phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction). Kỹ thuật này được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu liên quan đến đa dạng sinh học, hệ thống phân loại, khảo sát tài nguyên gen của các loài thực vật và động vật, giúp xác định mối quan hệ giữa các loài và các quần thể sinh vật.

RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA – đa hình các đoạn ADN được khuếch đại ngẫu nhiên) do William phát minh năm 1990, Welsh và cộng sự hoàn thiện năm 1991 [31]. Phương pháp này sử dụng cùng một số cặp mồi ngẫu nhiên nhất định (thường từ 10 đến 40 cặp mồi) (mồi ngẫu nhiên là các đoạn oligo nucleotide gồm khoảng 8 đến 20 Nucleotide, đặc trưng với mỗi loài sinh vật) để thực hiện phản ứng PCR nhằm nhân các đoạn ADN đặc trưng của các mẫu nghiên cứu. Kỹ thuật này cho phép xác định các đoạn ADN khác nhau giữa các mẫu một cách nhanh chóng và hiệu quả. Nghĩa là, nếu các mẫu nghiên cứu có bộ gen giống nhau hoàn toàn, sản phẩm PCR thu được gồm các đoạn ADN hoàn toàn giống nhau về kích thước và cấu trúc. Khi bộ gen của các mẫu nghiên cứu có sự khác biệt nhau, kết quả PCR sẽ nhân được các đoạn khác biệt nhau [52], [53].

**Ưu điểm của kỹ thuật RAPD*

Về mặt kỹ thuật, kỹ thuật RAPD dễ thực hiện và dễ thành công do không cần biết trước trình tự bộ gen của đối tượng cần nghiên cứu, thao tác đơn giản, chất lượng ADN không cần độ tinh sạch quá cao, thời gian thực hiện nhanh, khả năng nhân bản cao.

Về mặt kinh tế, chi phí thực hiện cho kỹ thuật này thấp. Trong nghiên cứu, kỹ thuật RAPD thường được sử dụng kết hợp với những kỹ thuật cao cấp khác để đánh giá đa dạng di truyền và nhận diện chỉ thị phân tử có độ tin cậy cao [40].

**Những hạn chế của kỹ thuật RAPD*

Kỹ thuật RAPD có độ chính xác không cao, không ổn định (thể hiện ở mức độ lặp lại giống nhau thấp). Khả năng nhân bản trong phản ứng PCR cao nhưng khả năng xuất hiện đa hình thấp và độ tin cậy không cao. Khả năng nhận diện chỉ thị phân tử thấp và có độ tin cậy không cao [53], [54].

- Kỹ thuật SSR

Chỉ thị phân tử SSR (Simple Sequence Repeat) hay còn được gọi là microsatellite (vi vệ tinh) là một trong những phương pháp nghiên cứu di truyền phổ biến nhất hiện nay. Phương pháp này được sử dụng để nghiên cứu đa dạng gen và đa dạng sinh học ở các loài thực vật và động vật. Chỉ thị SSR được xây dựng dựa trên việc phân tích sự biến đổi ở các chuỗi DNA có số lần lặp lại đơn giản. Đây là những trình tự ngắn (từ 2 đến 6 nucleotide) có thứ tự lặp lại liên tiếp dao động từ 2 đến 40. Ví dụ, chuỗi DNA có đoạn lặp lại có độ dài 2 nucleotide là AG sẽ được ký hiệu là (AG) n , với n là số lần lặp lại. Do độ dài ngắn và tính phổ biến của SSR trong các loài sinh vật là khác nhau. Các trình tự lặp đơn giản rất phổ biến ở hệ gen động vật và thực vật, mật độ các trình tự dao động rất lớn. Chúng được phân bố trong hệ gen và có tính đặc trưng cho từng loài [53], [55].

Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý phản ứng chuỗi PCR với mục tiêu đầu tiên là nhận dạng các trình tự lặp lại đơn giản. Sau khi các trình tự lặp lại đơn giản này được nhận dạng, bước tiếp theo là xác định trình tự của ADN và thiết kế primer. Các trình tự gần kề và các trình tự lặp lại sẽ tạo nên SSR. SSR primer sau đó được sử dụng tương tự như các RAPD primer.

Kỹ thuật SSR có tiềm năng rất lớn do có khả năng phát hiện tính đa hình rất cao, có thể phân biệt được sự sai khác mà không xác định được bằng các marker khác như RAPD và RFLP. SSR primer có từ 1 đến 12 locus (tùy vào loài) được tổ hợp trong một ống phản ứng PCR do vậy cho phép đồng thời ghi nhận các kiểu gen có nhiều locus. Phản ứng không quá tốn kém, tiết kiệm

được thời gian và hoá chất. Primer sử dụng trong SSR dài hơn mỗi RAPD và dựa trên trình tự đặc trưng và vì thế tỏ ra đáng tin cậy khi phát hiện cùng một locus và thích hợp cho việc nghiên cứu bản đồ gen. Marker SSR là các locus đặc trưng, đa allele nên cung cấp nhiều thông tin rất có ích so việc phát hiện sự thay đổi các trình tự hiếm. SSR là loại marker đồng trội nên đã nhanh chóng thay thế RFLP và RAPD và trở thành công cụ hữu hiệu trong các ứng dụng chọn giống thực vật và nghiên cứu di truyền.

Hiện nay, SSR là chỉ thị được chọn cho các nghiên cứu hồ sơ pháp lý, di truyền quần thể và nghiên cứu động vật hoang dã. Ở thực vật SSR được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền, trong chọn cặp lai, trong xác định con lai và trong lập bản đồ liên kết phân tử.

Nhược điểm của phương pháp này là quá trình thiết kế mỗi đất, mỗi loại mỗi chỉ đặc trưng cho mỗi locus đa hình. Để xây dựng các cặp mỗi đặc hiệu cần tách dòng và đọc trình tự một số lượng lớn các đoạn ADN của genom có chứa SSR. Hiện nay, số lượng primer thiết kế cho các loại cây trồng còn hạn chế, làm giảm hiệu quả của SSR trong việc lập bản đồ gen. Một vấn đề khác cũng thường gặp phải trong sử dụng SSR là việc xác định quan hệ giữa các allele với các marker phân tử là rất khó. SSR có thể được phân bố ngẫu nhiên trong genom nhưng cũng có khi tập trung lại ở tâm động hay eo thứ cấp của nhiễm sắc thể. Điều này hạn chế việc sử dụng các mẫu dò nhiều locus trong phân tích liên kết di truyền và nghiên cứu quần thể [53].

- Kỹ thuật ISSR

Kỹ thuật ISSR (Internal simple sequence repeat) là kỹ thuật phân tích dựa trên việc nhân bản đoạn ADN nằm giữa 2 vùng lặp đơn giản. Với ISSR, mỗi là những đoạn lặp đơn giản. Nguyên lý của phương pháp này là khuếch đại những đoạn trình tự nằm giữa 2 đầu lặp đơn giản. Bộ gen của sinh vật bậc cao có nhiều đoạn ADN lặp lại, các đoạn lặp thường có kích thước ngắn (vài nucleotide), số lần lặp lại là đặc trưng cho mỗi loài, mỗi giống. Ví dụ, ở lúa có khoảng gần 1000 lần lặp lại trật tự AC/TG, khoảng trên 300 lần lặp lại trật tự GATA/CTAT. Nhiều loài cây 1 lá mầm như ngô, lúa... lặp lại đoạn CGG/GCC.

Phân tích ISSR sử dụng mỗi bộ trợ với các vùng microsatellite nên còn gọi là MP-PCR có thể kế thừa mở rộng từ các phân tích microsatellites khác để tăng khả năng lặp lại và giảm tính đa hình so với RAPD. Các chỉ thị RAPD, ISSR được dùng nhiều trong lập bản đồ, phân tích di truyền, chọn giống ở thực vật [56], [57].

Kỹ thuật ISSR được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền, nghiên cứu đặc điểm di truyền trong quần thể, lấy dấu di truyền, đánh dấu gen, xác định cây trồng, phân tích nguồn gốc, xác định sự thay đổi genome và đánh giá con lai. Kỹ thuật ISSR có một số lợi thế so với các kỹ thuật khác là có thể phân biệt được các kiểu gen gần và không cần thông tin về trình tự gen của cây nghiên cứu. Giống như RAPD, ISSR là kỹ thuật nhanh, dễ tiến hành. Nó ưu việt hơn RAPD là cho nhiều thông tin và có thể lặp lại ở các thí nghiệm do mỗi dài hơn. ISSR được dùng trong nghiên cứu đa dạng di truyền nhiều loài cây trồng khác nhau như lúa, lúa mì, kê, nho, khoai lang, mã đề, táo ta,.....

Nhược điểm chủ yếu của ISSR là tạo ra các chỉ thị trội và sự dị đồng nhất của các sản phẩm nhân bản do sự di chuyển đồng thời.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng : Loài Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack)Meisn.).

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

- Địa điểm tiến hành điều tra khảo sát và thu mẫu sinh học (lá hoặc vỏ cây) 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam: Thanh Hóa, Hòa Bình, Phú Thọ, Vĩnh Phúc và Quảng Ninh.

- Phân tích trong phòng thí nghiệm: Mẫu sinh học thu về sẽ được xử lý và phân tích tại Viện sinh thái nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga và Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp kế thừa

Nghiên cứu, kế thừa có chọn lọc các tài liệu có liên quan tại các khu vực nghiên cứu, bao gồm: Thông tin dữ liệu về đặc điểm địa hình, điều kiện tự nhiên và các công bố khoa học về loài Re hương tại các khu vực nghiên cứu.

2.2.2. Phương pháp chuyên gia

Phương pháp chuyên gia được áp dụng xuyên suốt đề tài nhằm đảm bảo độ tin cậy, chất lượng của nghiên cứu. Các chuyên gia tham vấn từ Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Khoa học Lâm nghiệp, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Trường Đại học Lâm nghiệp, TTND Việt – Nga,...

2.2.3. Phương pháp tiếp cận đối tượng nghiên cứu

Đối tượng phỏng vấn là các tổ chức, như: đơn vị chủ rừng; các cá nhân bao gồm: người dân, cán bộ địa phương, cán bộ chuyên trách thuộc đơn vị quản lý, bảo vệ rừng tại các khu vực có loài Re hương phân bố.

2.2.4. Phương pháp khảo sát thực địa

Căn cứ vào bản đồ hiện trạng rừng, tại mỗi tỉnh nghiên cứu và thông tin từ cán bộ kiểm lâm, người dân địa phương về khu vực phân bố của loài Re hương, để dự kiến các tuyến điều tra. Tuyến được bố trí hình cây, trục chính là đường đi lớn, các nhánh là các đường mòn, đường tuần tra... với chiều dài không hạn chế (tùy thuộc vào điều kiện thực tế) sao cho cắt qua nhiều loại hình tác động (từ trắng cây bụi đến rừng ít bị tác động) và thời gian

phục hồi khác nhau. Tại các khu vực có Re hương phân bố thiết lập ít nhất 03 tuyến điều tra có chiều rộng quan sát mỗi tuyến là 40 m trên bản đồ (tổng chiều dài các tuyến điều tra tối thiểu là 5,0 km/tỉnh; tổng số tuyến điều tra là 12 tuyến = 03 tuyến/tỉnh x 05 tỉnh) tiến hành thu thập các thông tin về đặc điểm phân bố của loài Re hương bao gồm: độ cao so với mực nước biển, độ dốc, hướng phơi, vị trí phân bố (chân, sườn, đỉnh...), đặc điểm lâm phần có Re hương phân bố và mức độ tập trung của loài Re hương.

2.2.5. Phương pháp lập ô tiêu chuẩn và điều tra tầng cây gỗ lớn

Trước hết khảo sát khu vực để xác định nơi có loài Re hương phân bố. Tại các trạng thái rừng tự nhiên lập OTC nơi có Re hương phân bố nhiều và chủ yếu, mỗi OTC sơ cấp có diện tích 1000m² (20x50m). Trong mỗi OTC thu thập các chỉ tiêu của tất cả các cây có đường kính ngang ngực từ 6cm trở lên, bao gồm: tên loài cây, chu vi (C) để xác định đường kính ngang ngực ($D_{1.3}$), chiều cao vút ngọn (H_{vn}), chiều cao dưới cành (H_{dc}), đường kính tán, phẩm chất cây.... Mô tả các kiểu và cấu trúc phân tầng của thảm thực vật và loài chiếm ưu thế cho mỗi tầng.

2.2.6. Phương pháp điều tra tái sinh

Cây tái sinh là những cây có $D_{1.3} < 6\text{cm}$, cây tái sinh triển vọng là cây phát triển tốt, có chiều cao 1m trở lên, ở những nơi đất trống hoặc có độ tàn che từ 0,45- 0,65. Mỗi OTC sơ cấp 1000m² chia thành 10 OTC thứ cấp bằng nhau, mỗi OTC thứ cấp gọi là 1 ô dạng bản có diện tích 100m² để điều tra tái sinh. Các chỉ tiêu điều tra cây tái sinh (có đường kính ngang ngực < 6cm) bao gồm: loài cây, đường kính gốc (D_0), chiều cao vút ngọn, phẩm chất (tốt, trung bình, xấu) và nguồn gốc tái sinh (hạt, chồi). Từ số liệu cây tái sinh thu được, tiến hành thống kê số cây/ha theo các cấp chiều cao và xác định tỷ lệ cây triển vọng (cây có chiều cao 1m trở lên) cho từng loài ưu thế.

2.2.7. Phương pháp điều tra cây đi kèm

Tại địa điểm nghiên cứu thiết lập nghiên cứu mối quan hệ của loài Re hương với các loài khác trên ô tiêu chuẩn theo phương pháp 6 cây của Thomasius (1973) [58]. Sử dụng phương pháp điều tra ô 6 cây bằng cách chọn Re hương làm cây trung tâm ô điều tra. Đo các chỉ tiêu H_{vn} , $D_{1.3}$, đường

kính tán (Dt) và khoảng cách của 6 cây gần nhất (có đường kính $D_{1.3} \geq 6$ cm) với đối tượng nghiên cứu.

2.2.8. Thu thập mẫu cho phân tích ADN

Chúng tôi đã khảo sát thực địa và thu thập được 101 mẫu lá (hoặc vỏ) của loài Re hương từ 5 quần thể, đại diện cho phạm vi phân bố tự nhiên của loài này ở miền Bắc Việt Nam (Bảng 2.1). Các vị trí lấy mẫu được ghi lại bằng GPS. Các mẫu được đánh số riêng biệt, bảo quản trong túi có chứa silicagel ở thực địa.

Bảng 2.1. Địa điểm thu mẫu 5 quần thể Re hương trong nghiên cứu

Quần thể	Ký hiệu	Nơi thu	Số mẫu	Kinh độ (Bắc)	Vĩ độ (Đông)
Quảng Ninh	QN	Rừng quốc gia Yên Tử, Quảng Ninh	20	2336326.03	391401.64
Vĩnh Phúc	VP	VQG Tam Đảo, Vĩnh Phúc	13	2371699.59	569664.79
Phú Thọ	PT	VQG Xuân Sơn, Phú Thọ	19	2338550.91	515494.31
Hòa Bình	HB	KBTTN Hang Kia – Pà Cò, Hòa Bình	19	2293578.64	389485.28
Thanh Hóa	TH	VQG Xuân Liên, Thanh Hóa	30	2194294.51	524572.19

2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

2.3.1. Phương pháp nghiền và tách chiết ADN tổng số

Mẫu (lá, thân, rễ) của loài Re hương được nghiền nhỏ bằng máy nghiền Mixer Mill MM 400 trong Nito lỏng. ADN sẽ được ly trích theo Kit QIAGEN. Kiểm tra ADN chiết xuất được bằng cách điện di trên gel agarose

1,2% và xác định nồng độ ADN trên máy Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Mỹ) [52]; [53].

2.3.2. Thực hiện phản ứng PCR-SSR và xác định kích thước alen

Thể tích mỗi phản ứng PCR là 25 μ l, trong đó chứa các thành phần và nồng độ các chất tham gia phản ứng như: 2 μ l ADN tổng số, 12,5 μ l Master Mix 2X, 1 μ l mỗi xuôi 10 μ M; 1 μ l mỗi ngược 10 μ M và 9,5 μ l 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 kì; (6) Phản ứng kết thúc hoàn toàn: 72 °C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C. 9 cặp môi SSR đa hình được sử dụng trong nghiên cứu này để phân tích đa dạng di truyền quần thể loài Re hương (Bảng 2.2). Sử dụng gel polyacrylamide 6% để xác định kích thước các alen từ sản phẩm PCR [52]; [53].

Bảng 2.2. Đặc điểm của 9 cặp môi SSR đa hình sử dụng trong nghiên cứu

Cặp môi	Trình tự nucleotide	Trình tự lặp lại	Tm (°C)	Kích thước (bp)	Tham khảo
SSR1	F: ACGAGTTTCCACCGATTACG	(ATC) ₈	55	268	Cui et al.[17]
	R: ACTCCTTTCAGCACCGATTG				
SSR2	F: TTGTTAAAAACACCAACCCCA	(TCA) ₈	55	200	
	R: CAGTGGGCCAAGTGTATCCT				
SSR3	F: ACGTGAATGTGAATGGGGTT	(AAC) ₉	55	190	
	R: TAGGCAAAGACTCCGAAGGA				
SSR4	F: ATTCGGGTCTCTCTCCCTGT	(CCT) ₇	55	250	
	R: CTCTCTCGCTGTCTCTGCCT				
SSR5	F: TGGAGAACAACCTTTGGGAGG	(CTC) ₇	55	120	
	R: TGTTCCATGTTACAGATACAG				

SSR6	F: ATATGGTCCCAACTCCCTCC	(GTC) ₇	55	200
	R: ACCGTCACCAGATCATCCAT			
SSR7	F: TCCCAACTGGACGAAGTTCT	(TGA) ₇	55	240
	R: TTTGCTCGCTGTTATGATGC			
SSR8	F: ATCCTCCCAAGGACGCTTAT	(ACCA) ₆	55	130
	R: CCTTCAAGGAAAGAAGGGCT			
SSR9	F: CACCACCTTCTCCTTCCAAA	(ACCA) ₆	55	230
	R: TTGTTGGGGTCTCCAAACTC			

2.4. XỬ LÝ SỐ LIỆU

Tất cả các chỉ số đa dạng di truyền trong quần thể như P- phần trăm locus đa hình, Na - Số alen trung bình, Np - Số alen hiếm, Ne - Số alen hiệu quả, I- hệ số đa dạng Shimmon, Ho - Hệ số gen di hợp tử quan sát, He - Hệ số gen di hợp tử kỳ vọng, F_{IS} - hệ số sinh sản cận loài,... sử dụng phần mềm Arlequin v.3.1, Genepop, Fstat 2.9.3 và GenAlex 6.5 [59], [60], [61]. Phân tích AMOVA (Variance components in the analysis of molecular variance) được thực hiện trên Arlequin 3.1. Xác định hiện tượng thắt cổ chai (Bottleneck) cho loài Re hương trên cơ sở 2 mô hình, IAM (Infinite Allele Model) và TPM (Two-Phase mutation Model) sử dụng phần mềm BOTTLENECK ver. 1.2 [62]. Phân tích UPGMA trên cơ sở khoảng cách di truyền dùng POPTREE2 [63]. Phân tích Bayesian để điều tra cấu trúc quần thể sử dụng STRUCTURE ver. 2.3.4 [64]. Thiết lập mô hình xác định số lượng quần thể tối ưu (K) dùng Structure Harv ester [65], [66].

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ SINH THÁI CỦA LOÀI RE HƯƠNG Ở 5 TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

3.1.1. Đặc điểm hình thái của loài Re hương

Thông qua các tài liệu trước đây đã ghi nhận nơi có Re hương phân bố tự nhiên, luận văn đã tiến hành điều tra hiện trạng quần thể Re hương ở 5 địa điểm ở miền Bắc Việt Nam, bao gồm: Rừng quốc gia Yên Tử (Quảng Ninh), VQG Tam Đảo (Vĩnh Phúc), VQG Xuân Sơn (Phú Thọ), KBTTN Hang Kia – Pà Cò (Hòa Bình), VQG Xuân Liên (Thanh Hóa). Kết quả điều tra đặc điểm hình thái từ 101 cá thể Re hương ở 5 địa điểm được tổng hợp ở bảng 3.1 và hình 3.1 chỉ ra Re hương là cây gỗ lớn, thường xanh, cao từ 11,8m – 16,9m, đường kính thân 19,8cm – 51,8 cm, thân hình trụ tròn, mọc thẳng đứng, phân cành cao. Vỏ màu xám nâu, nứt dọc. Cành non nhẵn, màu xanh lục, khi khô hơi đen. Toàn thân có tinh dầu thơm. Chồi thường có vảy bọc. Lá đơn mọc cách, tập trung đầu cành, không có lá kèm. Cuống lá nhẵn màu đỏ tía, dài trung bình 2,1 cm. Lá hình trái xoan hoặc trứng ngược trái xoan. Đầu và đuôi lá nhọn dần, dài trung bình từ 10,6 đến 11,1 cm, rộng từ 5,4 đến 5,6 cm. Lá trên cành chồi thường có màu xanh lục, nhẵn cả hai mặt. Lá hình trái xoan rộng. Lá trên cành già, cây trưởng thành có hình trái xoan hoặc trứng ngược trái xoan. Mặt dưới lá đôi khi có phủ một lớp phấn trắng xanh. Lá dày và cứng, giòn. Bề mặt lá có 3 gân kéo dài hợp với nhau ở mép lá. Đôi khi các gân lá không hợp nhau mà kéo dài tới tận mép lá, số gân bên nhiều hơn, có khi tới 5-6 đôi, các gân lá ở phần gốc lá song song với nhau và nổi rất rõ. Cụm hoa chùm viên chùy ở nách lá, dài 4-5 cm, phủ lông ngắn màu nâu. Bao hoa 6 thùy, có lông. Nhị hữu thụ 9, nhị lép 3, hình tam giác. Bao phấn 4 ô. Bầu nhụy hình trứng nhẵn, vòi nhụy ngắn, núm nhụy hình đĩa. Quả hình cầu, đường kính 8-10 mm, đính trên đế hoa hình chén. Re hương ra hoa tháng 3-5, mùa quả chín tháng 6-9. Lá non thường có màu xanh tím ở rìa lá.



Hình 3.1. Hình ảnh thân, lá, quả cây Re hương

Bảng 3.1. Kết quả điều tra đặc điểm hình thái cây Re hương ở trong nghiên cứu

Địa điểm	N	D _{1.3} (cm)	H _{vn} (m)	H _{dc} (m)	Dt (m)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài cuống (cm)
Rừng quốc gia Yên Tử, Quảng Ninh	20	22,1 (14,5 - 30)	14,0 (11 - 18)	9,1 (5,0 - 11)	5,0 (3,0 - 6,5)	10,6 (8,8 - 12,8)	5,6 (3,8 - 6,9)	2,1 (1,3 - 2,9)
VQG Tam Đảo, Vĩnh Phúc	13	23,8 (16 - 32,5)	14,2 (11,5 - 17,5)	6,9 (6,2 - 9)	4,8 (3,5 - 6,0)	11,1 (9 - 13)	5,5 (4 - 7)	2,1 (1,3 - 2,8)
VQG Xuân Sơn, Phú Thọ	19	31,4 (8 - 67)	16,4 (8,5 - 20)	10,4 (3,5 - 10,5)	6,2 (3,5 - 11,5)	11 (8,8 - 12,6)	5,4 (3,8 - 6,7)	2,0 (1,1 - 2,9)
KBTTN	19	19,8	11,8	7,1	4,6	10,9	5,6	2,1

Hang Kia – Pà Cò, Hòa Bình		(15-30)	(8-19)	(4,5-12)	(4-5,5)	(8,9-13,1)	(4,1-6,9)	(1,1-2,8)
VQG Xuân Liên, Thanh Hóa	30	51,8 (12-130)	16,9 (6-20)	10,9 (3-16)	7,2 (3,5-11)	10,8 (9,2-12,9)	5,4 (4,1-7,2)	2,1 (1,5-2,8)

Ghi chú: N - số cá thể; $D_{1.3}$ (cm) - đường kính trung bình đo ở 1.3m; Hvn (m) - chiều cao cây trung bình; Hdc (m) - chiều cao dưới cành trung bình; Dt (m) - đường kính tán trung bình.

Quá trình khảo sát thực địa tại 5 địa điểm nghiên cứu đã thu được số liệu của các cây Re hương tái sinh cụ thể trong bảng 3.2. Theo đó, cả 5 quần thể đều có các cây Re hương tái sinh bằng cả 2 hình thức: Tái sinh bằng hạt và tái sinh từ cây gốc. Tuy nhiên số lượng cây tái sinh theo từng loại, chất lượng cây tái sinh cũng khác nhau ở 5 khu vực nghiên cứu. Rừng quốc gia Yên Tử, Quảng Ninh có 8 cây tái sinh trong đó 7 cây tái sinh từ hạt, 1 cây tái sinh từ cây gốc. VQG Tam Đảo, Vĩnh Phúc có tổng số 23 cây tái sinh, trong đó 22 cây tái sinh bằng hạt, 1 cây tái sinh từ cây gốc. VQG Xuân Sơn, Phú Thọ có 11 cây tái sinh, trong đó 10 cây tái sinh từ hạt, 1 cây tái sinh từ cây gốc. KBTTN Hang Kia – Pà Cò, Hòa Bình có tổng số 11 cây tái sinh, trong đó 9 cây tái sinh từ hạt, 2 cây tái sinh từ cây gốc. VQG Xuân Liên, Thanh Hóa có 25 cây tái sinh, trong đó 22 cây tái sinh từ hạt, 3 cây tái sinh từ cây gốc.

Bảng 3.2. Kết quả điều tra số cây Re hương tái sinh ở các khu vực nghiên cứu

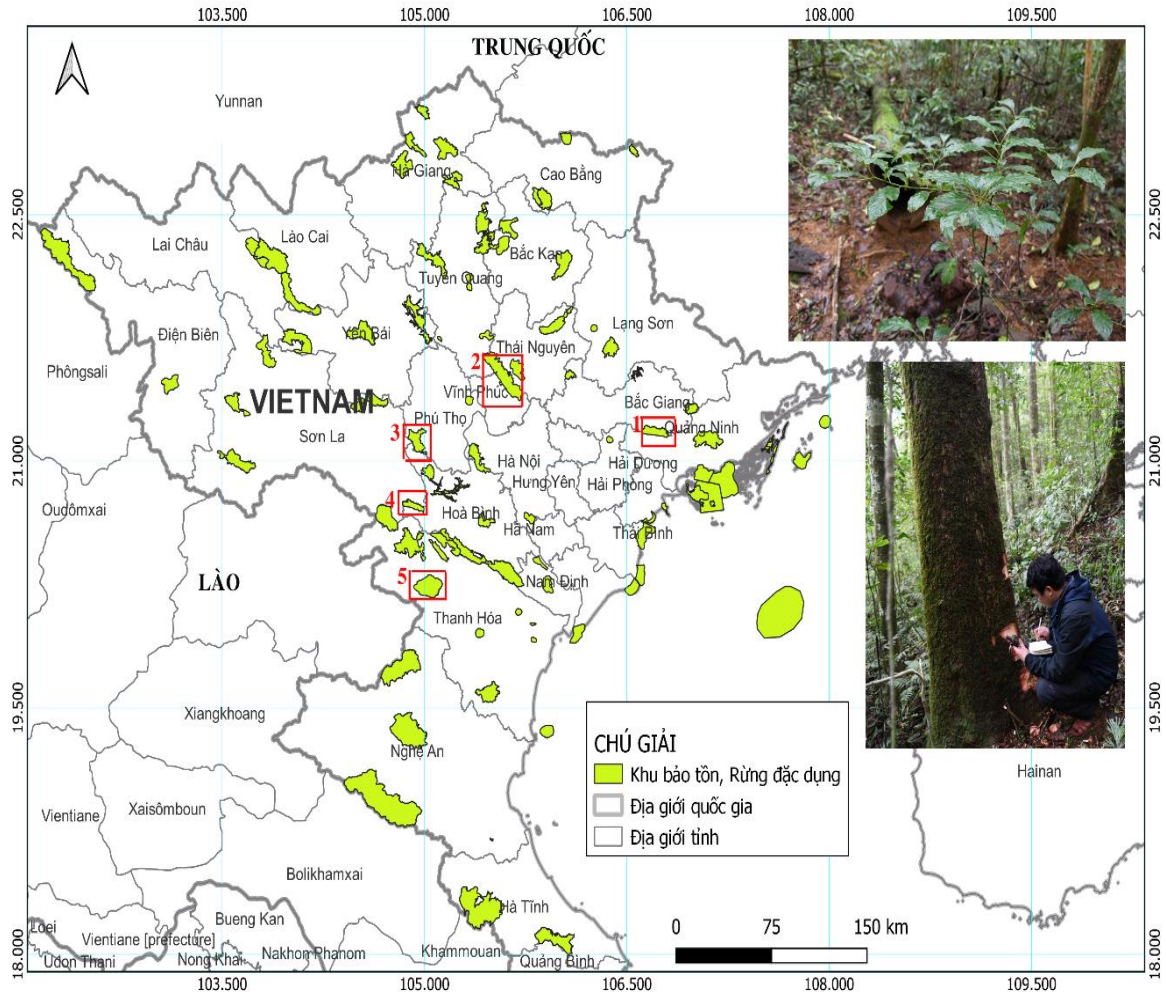
Địa điểm	TT	Nguồn gốc	Hvn (cm)	Chất lượng
Rừng quốc gia Yên Tử, Quảng Ninh	1	Hạt	100.5	Tốt
	2	Hạt	56.1	Tb
	3	Chồi từ gốc	102.6	Tốt
	4	Hạt	95.1	Tốt
	5	Hạt	88.3	Tốt
	6	Hạt	67.3	Tốt
	7	Hạt	68.3	Tb
	8	Hạt	58.3	Tốt
	9	Hạt	79.9	Tốt

VQG Tam Đảo, Vĩnh Phúc	1	Chồi từ gốc	58	Tốt
	2	Hạt	48.4	Tốt
	3	Hạt	77.4	Tb
	4	Hạt	81.9	Tb
	5	Hạt	65.7	Tốt
	6	Hạt	70	Tb
	7	Hạt	71.5	Tốt
	8	Hạt	52.9	Tốt
	9	Hạt	54.5	Tốt
	10	Hạt	91.5	Tốt
	11	Hạt	67.3	Tốt
	12	Hạt	67.9	Tb
	13	Hạt	27.7	Tốt
	14	Hạt	35	Tốt
	15	Hạt	43.3	Tốt
	16	Hạt	40.7	Tốt
	17	Hạt	91.9	Tb
	18	Hạt	35.5	Tốt
	19	Hạt	45.2	Tốt
	20	Hạt	86.2	Tốt
	21	Hạt	61	Tốt
	22	Hạt	52.2	Tốt
	23	Hạt	59.2	Tốt
VQG Xuân Sơn, Phú Thọ	1	Chồi từ gốc	162.8	Tốt
	2	Hạt	47.9	Tb
	3	Hạt	44.8	Tốt
	4	Hạt	37	Tốt
	5	Hạt	79.6	Tốt
	6	Hạt	50.9	Tốt
	7	Hạt	82.3	Tb
	8	Hạt	78	Tốt
	9	Hạt	28	Tốt
	10	Hạt	44.8	Tốt
	11	Hạt	25.3	Tốt

KBTTN Hang Kia – Pà Cò, Hòa Bình	1	Hạt	58.4	Tb
	2	Hạt	44.3	Tb
	3	Chòi từ gốc	66.4	Tb
	4	Hạt	29.8	Tốt
	5	Hạt	49.3	Tb
	6	Chòi từ gốc	70.3	Tốt
	7	Hạt	69.1	Tb
	8	Hạt	56.2	Tb
	9	Hạt	18.1	Tb
	10	Hạt	20.8	Tốt
	11	Hạt	49.4	Tb
VQG Xuân Liên, Thanh Hóa	1	Hạt	54.7	Tốt
	2	Hạt	87.6	Tốt
	3	Hạt	85.4	Tb
	4	Chòi từ gốc	56.5	Tốt
	5	Hạt	63.3	Tốt
	6	Hạt	42.5	Tb
	7	Chòi từ gốc	48.6	Tb
	8	Hạt	54.3	Tốt
	9	Hạt	39.3	Tb
	10	Hạt	41.9	Tb
	11	Hạt	36.2	Tốt
	12	Hạt	64.2	Tốt
	13	Hạt	33.5	Tb
	14	Chòi từ gốc	71.7	Tb
	15	Hạt	56.9	Tb
	16	Hạt	71.4	Tb
	17	Hạt	77.5	Tb
	18	Hạt	70.2	Tốt
	19	Hạt	34.5	Tốt
	20	Hạt	88.9	Tốt
	21	Hạt	78.9	Tb
	22	Hạt	52.9	Tb
	23	Hạt	60.2	Tốt
	24	Hạt	95.5	Tốt
	25	Hạt	79.4	Tốt

3.1.2. Đặc điểm sinh thái của loài Re hương

Kết quả điều tra cho thấy Re hương có phân bố tự nhiên tại 5 khu vực nghiên cứu (Hình 3.2), tuy nhiên cây trưởng thành và cây tái sinh trong rừng tự nhiên, cũng như rừng trồng hiện còn rất ít (rải rác trong các vườn quốc gia, khu bảo tồn). Theo điều tra cho thấy trước những năm 1990, Re hương là một trong những loài cây khá phổ biến nhưng với việc khai thác cả thân, rễ, lá để lấy gỗ và chưng cất tinh dầu cùng với việc khả năng tái sinh tự nhiên kém đã dẫn đến việc suy giảm nhanh chóng về số lượng cũng như chất lượng của loài cây này. Re hương thường mọc trong rừng ẩm nhiệt đới thường xanh trên núi đất hoặc núi đá vôi, trên đất thoát nước và nhiều mùn, lượng mưa trung bình 1.600-1.800mm, nhiệt độ 15-25°C. Cây ưa đất có độ phì cao, tầng đất dày tơi xốp và thoát nước. Loài Re hương phân bố trong rừng tự nhiên thuộc trạng thái rừng phục hồi sau nương rẫy (IIA), đặc trưng bởi lớp cây tiên phong ưa sáng mọc nhanh đều tuổi, kiểu rừng IIIA được đặc trưng bởi những quần thể đã bị khai thác nhiều, khả năng khai thác hiện tại bị hạn chế. Cấu trúc ổn định của rừng bị phá vỡ hoàn toàn hoặc thay đổi về cơ bản. Như vậy, thông qua các nhân tố điều tra cơ bản cho thấy loài Re hương hiện nay phân bố trong rừng đã qua khai thác, cấu trúc rừng bị phá vỡ, rừng đang trong giai đoạn phục hồi. Rừng chủ yếu ở trạng thái nghèo và trung bình.



Hình 3.2. Phân bố 5 quần thể Re hương ở miền Bắc Việt Nam

Từ số liệu điều tra theo phương pháp 6 cây đã chỉ ra tổ thành cây gỗ đi kèm với loài Re hương rất đa dạng (Bảng 3.3), với số lượng ở Hòa Bình (34 loài); Thanh hóa (52 loài); Vĩnh Phúc (43 loài); Quảng Ninh (15 loài); Phú Thọ (25 loài). Điều này chứng tỏ Re hương không kén chọn loài sống cùng và cây bạn đa dạng gồm những loài cây ưa sáng, ưa ẩm và phát triển nhanh như Lim xẹt, Xoan, Vàng tâm, Táo mặt quỷ ... Kết quả trên cho thấy Re hương là loài cây có mặt ngay sau khi các loài cây ưa sáng đã kiến tạo nên hoàn cảnh rừng, bởi lẽ ở giai đoạn cây con loài này chịu bóng sau khi trở thành cây tái sinh có triển vọng trở thành cây ưa sáng và vươn lên rất nhanh để tham gia tổ thành tầng tán chính trong các trạng thái rừng tự nhiên. Loài Re hương với các loài cây khác trong lâm phần điều tra có mối quan hệ chặt chẽ với nhau ở bất kỳ khoảng cách gần hay xa mức độ sinh trưởng của loài và các loài khác là khá cao.

Bảng 3.3. Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Hòa Bình

STT	Tên cây	Số lượng	D1.3 (cm)	Hvn (m)	Hdc (m)	Khoảng cách (m)
1	Ba bét	3	15.9	10	8	7
2	Bồ đề	1	25.5	20	15	4
3	Bồ kết rừng	1	39.2	16	12	8
4	Bông đề	1	23.9	12	9	7
5	Chẹo	2	31.8	25	19	8
6	Chẹo tía	4	35.7	12	6	5
7	Dầu	1	22.3	15	10	7
8	Dâu da	3	22	10	7	5
9	Dâu rừng	1	21.7	7	4	6
10	Dẻ	7	31.8	30	25	9
11	Gạo	3	35.7	19	9	8
12	Gội	2	20.7	9	5	5
13	Khét	1	31.8	20	19	5
14	Lim xẹt	4	46.2	25	20	9
15	Mán đĩa	1	57.3	18	15	15
16	Màng tang	2	17.5	12	10	7
17	Máu chó	2	23.9	17	14	5
18	Mít rừng	1	15.9	8	6	3

19	Ngát	1	25.5	20	15	5
20	Nhội	2	22.3	6	7	4
21	Rang Mít	3	47.1	21	17	7
22	Rẻ trắng	1	44.6	21	17	13
23	Sáo bông	1	30.3	13	9	7
24	Sầu	1	67.2	15	11	8
25	Sén mật	1	90.8	20	11	5
26	Sôi	1	44.6	17	12	6
27	Son	2	29.3	17	14	7
28	Sp1	2	27.1	12	7	5
29	Sung	3	54.8	17	15	11
30	Trám đen	1	63.1	21	18	8
31	Trám trắng	7	25.5	25	20	9
32	Trầu	8	19.4	10	8	3
33	Vàng tâm	3	68.5	27	23	13
34	Xoan đào	3	25.5	25	15	12

Bảng 3.4. Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Thanh Hóa

STT	Tên cây	Số lượng	D1.3 (cm)	Hvn (m)	Hdc (m)	Khoảng cách (m)
1	Bạch Đàn	1	20.6	13.5	7.5	3.6
2	Bồ đề	1	10.8	11.0	6.0	13.5
3	Bời Lồi Nhót	1	14.7	11.6	4.5	12.6
4	Bua	2	10.8	12.0	5.0	12.0
5	Búra	3	7.0	5.0	4.0	1.8
6	Bưởi bung	1	15.0	5.0	2.5	12,0
7	Chai Lý	1	28.6	17.0	14.0	5.0
8	Chân chim	2	16.0	4.5	2.0	0,5
9	Chè đuôi lợn	2	18.0	15.0	11.0	4.5
10	Chìa vôi	2	7.0	5.0	3.0	7.2
11	Chò nâu	1	25.5	12.0	5.0	5.8
12	Chòi mòi	3	12.0	5.0	1.5	6.5
13	Chua khét	2	60.0	18.0	12.0	1.0
14	Côm tầng	3	11.4	7.0	3.0	10.5
15	Cui lá lớn	1	25.4	16.0	14.0	5.5
16	Đa nhộng vàng	2	50.0	20.0	14.0	4.5
17	Đáng chân chim	2	15.0	6.0	3.0	7.5
18	Dâu da đất	2	15.0	8.5	2.0	8,0

19	Dẻ	15	25.0	12.0	8.0	3,9
20	Dổi	3	10.2	7.0	2.5	6.0
21	Dung	1	10.9	11.0	5.0	15.6
22	Gội	8	22.0	9.0	5.0	4.5
23	Hồng rùng	2	20.0	14.0	9.0	3.5
24	Hu đay	1	10.2	7.0	3.0	4.8
25	Lá nén	6	7.0	4.5	2.0	4,0
26	Lanh Chuột	2	21.0	11.0	5.0	6.0
27	Lát Hoa	2	11.7	7.5	2.5	8.6
28	Lim xanh	10	22.0	12.0	5.0	4.3
29	Lim xẹt	3	19.8	13.0	4.5	4.0
30	Lội	1	20.1	12.0	3.5	2.6
31	Long não	2	19.8	13.5	4.5	9.0
32	Mắc khén	2	14.0	9.0	5.0	8.5
33	Mắc niễng	2	61.0	13.0	9.5	6.5
34	Màu cau	12	15.0	12.0	7.0	3.8
35	Máu chó	9	72.0	12.0	9.0	4.0
36	Mọ	2	23.0	12.0	8.0	20,0
37	Ngát	2	82.0	14.0	9.0	7.0
38	Nóng sỏ	2	65.0	12.0	7.0	8.5
39	Ốt sừng	2	11.0	4.5	1.5	7.0

40	Phân mã	4	12.0	5.0	2.0	3.0
41	quế	1	15.3	8.6	3.0	10.4
42	Re	4	22.0	10.0	6.0	3,5
43	Sâng	3	68.0	13.0	8.5	5.0
44	Sấu	1	16.5	13.0	5.0	8.0
45	Sến	4	26.9	18.3	13.0	7.0
46	Sòi phẳng	3	14.7	11.5	5.0	12.0
47	Sòi quả mọng	2	11.0	5.0	2.5	3,2
48	Tai chua	2	15.0	8.0	3.0	10.4
49	Táo mặt quỷ	16	46.0	22.0	14.0	1.5
50	Thành ngạch	1	18.1	13.0	4.4	7.5
51	Thầu tầu	4	11.0	5.0	1.7	1.5
52	Thị rừng	1	23.9	15.0	11.0	2.0

Bảng 3.5. Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Vĩnh Phúc

STT	Tên cây	Số lượng	D1.3 (cm)	Hvn (m)	Hdc (m)	Khoảng cách (m)
1	Dổi	3	25.8	8.5	3.5	6.3
2	Dung	1	50.2	11	5	15.6
3	Gội	8	15.0	8.3	5	4.1
4	Hồng rừng	2	15.1	14	9	3.5
5	Hu đay	1	28.0	7	3	4.8

6	Lá nén	6	10.9	4.5	2	5
7	Lanh Chuột	1	25.0	11	5	6
8	Lát Hoa	2	20.0	7.5	2.5	8.6
9	Lim xanh	10	10.2	9.2	3.7	7.8
10	Lim xẹt	3	17.5	12.5	5	7.5
11	Lội	1	28.6	12	3.5	2.6
12	Long nảo	2	16.6	13.5	4.5	9
13	Mắc khén	2	18.3	9	5	8.5
14	Mắc niềng	2	17.2	13	9.5	6.5
15	Màu cau	12	25.9	9.5	4.8	3.3
16	Máu chó	9	22.7	8.3	6.4	4.8
17	Mọ	1	15.4	12	8	14,3
18	Mò hoa dầy	1	21.2	14	11	7
19	Nanh Chuột	1	17,7	7.5	3.5	6
20	Ngát	2	15.6	14	9	7
21	Nóng sỏ	2	17.6	12	7	8.5
22	Ốt sừng	2	23.4	4.5	1.5	7
23	Phân mã	4	17.2	6.3	2.8	4.8
24	Quế	1	28.6	8.6	3	10.4
25	Re	3	38.4	11	6.2	8.8
26	Sâng	3	18.1	12.7	8	4.8

27	Sầu	1	17.2	13	5	8
28	Sến	4	28.2	12.6	7	5.5
29	Sồi phẳng	3	13.8	13.5	5.5	12.3
30	Sồi quả mọng	2	7.5	5	2.5	3,2
31	Tai chua	2	15.7	7.75	2.8	7
32	Táo mặt quỷ	16	16.8	13.6	9.5	4.8
33	Thành gạch	1	6.4	13	4.4	7.5
34	Thầu tầu	4	15.8	6	2.9	1.5
35	Thị rừng	1	8.2	15	11	2
36	Trám trắng	5	9.4	8.2	4.8	4.5
37	Trầu	4	10.7	11	5.5	8.5
38	Vải rừng	2	11,5	12	7.5	2.5
39	Vàng anh	3	10.6	10.3	6.7	8.2
40	Vàng tâm	2	11.2	8	4	4.8
41	Vạng trứng	1	18.3	7	4	2,5
42	Xá xị	6	6.9	6.7	3.7	0.7
43	xoan	14	8.6	8.2	4	3.9

Bảng 3.6. Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Quảng Ninh.

STT	Tên cây	Số lượng	D1.3 (cm)	Hvn (m)	Hdc (m)	Khoảng cách (m)
1	Bông bạc	3	24.3	12.5	5.5	8.2
2	Dẻ	24	34.4	12.7	5.5	3.3
3	Dẻ lỗ	5	33.4	19.2	13	5
4	Hóc quang trắng	6	30.6	17.5	14.5	5.7
5	Lìu thiù	21	32.1	19.2	11	3
6	Mỡ	78	28.5	19.7	13.5	8.4
7	Mò roi	16	17.1	15.2	9	4.9
8	Pơmu	11	26.5	13.7	7.5	3.6
9	Sao đen	6	19.5	12.5	9.5	1.7
10	Sồi	2	28.8	14.2	8	3.9
11	Táu mặt quỷ	6	26.2	16.7	9.5	4.2
12	Trúc tiết	2	22.2	10	5	6
13	Vù hương	1	26.8	10.7	3.5	9
14	Xá xị	2	24.5	14	7	4.7
15	Xoan nhừ	6	27.3	17.5	14.5	5.7

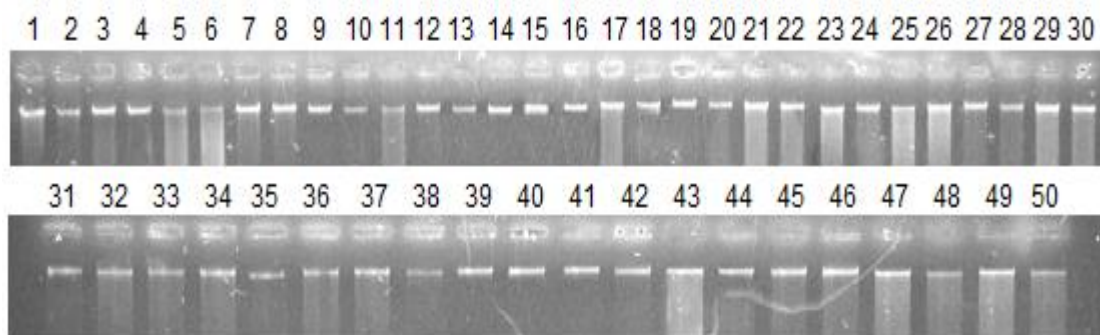
Bảng 3.7. Đặc điểm tổ thành cây gỗ đi kèm loài Re hương ở tỉnh Phú Thọ

STT	Tên cây	Số lượng	D1.3 (cm)	Hvn (m)	Hdc (m)	Khoảng cách (m)
1	Bông bạc	2	22.7	16.3	2.5	0.5
2	Cà lồ	8	42	8	4	1.1
3	Chò chỉ	7	38	16	11	4.5
4	Dẻ	14	16.4	11.8	2.5	2.3
5	Lìu thiú	4	17.3	22.9	10	2.3
6	Long bàn	2	14.2	21.9	9.3	0.9
7	Mắc niêng	7	61	13	9.5	1.5
8	Máu chó	4	72	12	9	4.3
9	Mỡ	29	13.2	23.2	6.4	6.8
10	Ngát	8	82	14	9	5.2
11	Nóng sỏ	2	65	12	7	2.5
12	Phân mã	1	22	5.5	2	3.5
13	Pơmu	4	14.5	13.1	5	3.6
14	Sâng	5	68	13	8.5	3.5
15	Sao đen	2	17.6	22.1	9.5	1.9
16	Sồi	4	20.9	24.9	4.4	2
17	Sồi dầu cứng	2	25.2	13.9	8.7	6.3
18	Sồi phẳng	2	38	9	4	3.8
19	Tấu mặt quỷ	1	18.3	20.6	7	2
20	Trúc tiết	2	15.6	17.9	8.8	3.3
21	Vàng anh	11	50	9	5.5	1.8
22	Vù hương	4	16	19.3	7.5	4.3
23	Xá xị	16	16.1	18.1	3.3	3.8
24	Xoan đào	1	40	8	5	3.6
25	Xoan nhừ	1	28.8	22.3	6.8	10

3.2. ĐA DẠNG VÀ CẤU TRÚC DI TRUYỀN CỦA QUẦN THỂ LOÀI RE HƯƠNG Ở 5 TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

3.2.1. Tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số có ảnh hưởng rất lớn và quyết định cho sự thành công của phản ứng PCR trong thí nghiệm. Tách chiết ADN tổng số nhằm mục đích thu nhận ADN ra khỏi cấu trúc tế bào. Điều quan trọng nhất là thu nhận được ADN ở trạng thái còn nguyên vẹn không bị phân hủy và không lẫn nhiều tạp chất để có nguồn nguyên liệu chất lượng tốt. Lựa chọn được phương pháp tách chiết ADN hiệu quả là bước rất quan trọng, có ảnh hưởng lớn đến các phân tích di truyền tiếp theo. Chúng tôi đã tách chiết ADN tổng số của 101 cá thể của loài Re hương từ 5 quần thể. Kết quả điện di kiểm tra ADN trên gel agarose 1% (Hình 3.3) cho thấy mỗi giếng chỉ cho một vạch băng duy nhất, các băng đậm, sắc nét thể hiện ADN đã tách chiết được. Kiểm tra hàm lượng và độ sạch của ADN tách được thì các mẫu ADN được đo quang phổ hấp thụ ở dải bước sóng 260nm và 280nm. Tỷ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} của các mẫu dao động trong phạm vi cho phép từ 1,8 đến 2,0. Kết quả này một lần nữa khẳng định các DNA tách chiết được hoàn toàn tương đối sạch và đủ tiêu chuẩn cho phân tích tiếp theo.

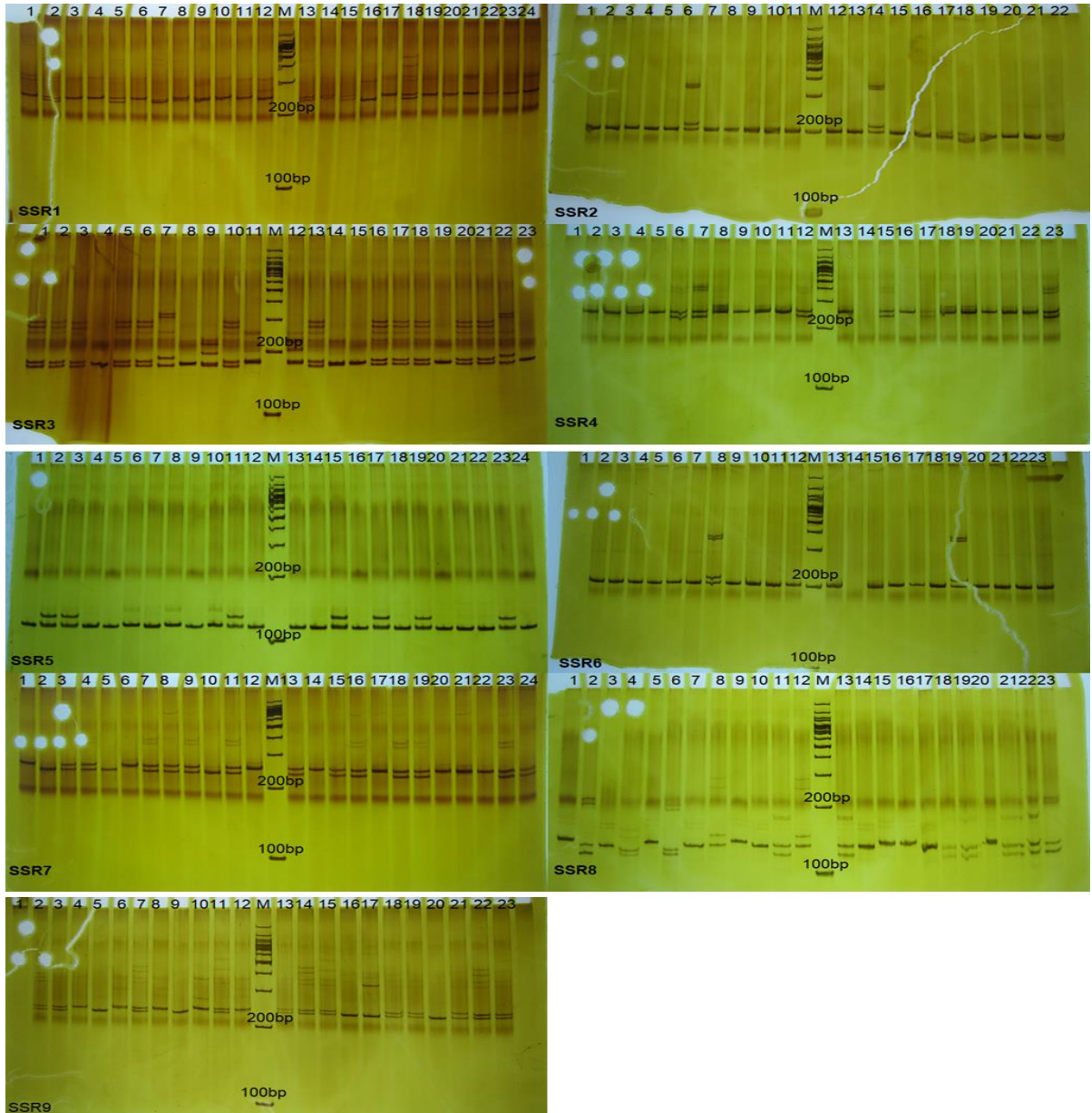


Hình 3.3. Kết quả điện di DNA tổng số của một số mẫu đại diện cho loài Sa mu dầu trên gel agarose 1%

3.2.2. Phản ứng PCR-SSR, điện di sản phẩm PCR-SSR trên gel polyacrylamide 6%

Để đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể và loài của 101 cá thể thu được từ 5 quần thể loài Re hương chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng PCR-SSR với 9 cặp môi SSR. Sau khi hoàn thành phản ứng PCR-SSR, sản

phẩm PCR - SSR được điện di trên gel polyacrylamide 6% để phân tích đa hình ADN của các mẫu nghiên cứu. Phổ điện di sản phẩm PCR - SSR trên gel polyacrylamide 6% của một số cặp mẫu được minh họa bởi **hình 3.4**

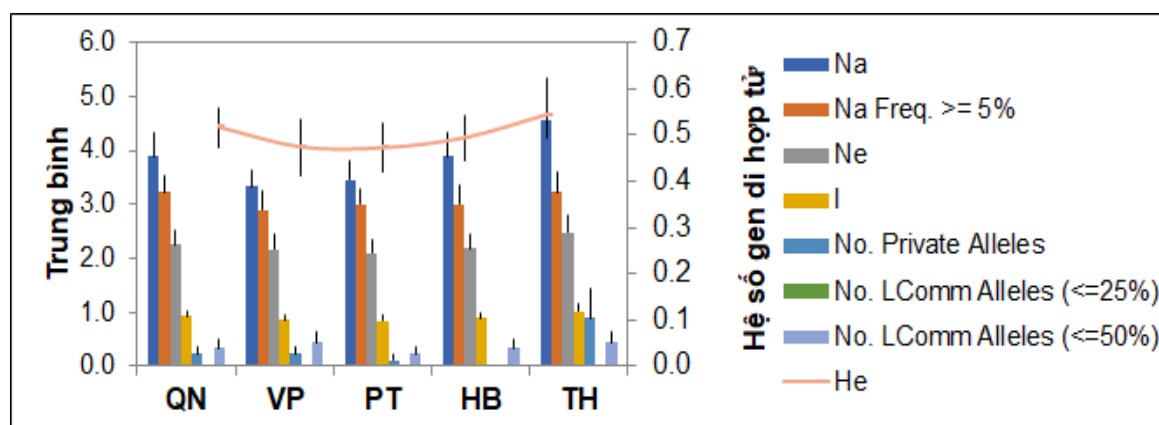


Hình 3.4. Hình ảnh điện di 9 cặp mẫu SSR đa hình trên gel polyacrylamide 6% (số 1-24 là ký hiệu mẫu; M- thang ADN ladder)

3.2.3. Đa dạng di truyền quần thể loài Re hương ở mức độ locus

Cấu trúc không gian của alen tại 5 quần thể của loài Re hương nghiên cứu được trình bày ở Hình 3.4 và bảng 3.3. Alen hiếm không ghi nhận ở quần thể Hòa Bình. Trong khi đó, quần thể Thanh Hóa ghi nhận số alen hiếm lớn

nhất ($N_p = 0,889$), tiếp theo là quần thể Quảng Ninh, Vĩnh Phúc và Phú Thọ. Giá trị các alen trung bình cho một locus (N_a , N_e , N_p và I) thấp nhất ở quần thể Vĩnh Phúc và cao nhất ở quần thể Thanh Hóa. Như vậy, mức độ trung bình alen cho mỗi locus được xem xét là vừa phải cho tất cả các quần thể của loài *Re huring* nghiên cứu.



Hình 3.5. Cấu trúc không gian alen của các quần thể nghiên cứu, N_a : Số alen, N_e - Alen hữu hiệu, N_p - Alen hiếm, I - đa dạng Shimmon

Bảng 3.8. Số alen, alen hiệu quả và alen hiếm tại mỗi locus SSR cho 5 quần thể *Re huring*

Locus SSR1					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH
N_a	6.000	3.000	5.000	6.000	6.000
$N_a \geq 5\%$	5.000	3.000	4.000	5.000	5.000
N_e	4.167	2.331	3.780	4.247	3.822
I	1.565	0.959	1.418	1.579	1.511
N_p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
$N_a (\leq 25\%)$	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
$N_a (\leq 50\%)$	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000
H_e	0.760	0.571	0.735	0.765	0.738

Locus SSR2					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH
Na	5.000	5.000	3.000	4.000	4.000
Na >= 5%	3.000	5.000	3.000	4.000	3.000
Ne	1.961	3.596	2.329	2.456	2.416
I	0.935	1.413	0.959	1.028	1.037
Np	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=50%)	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000
He	0.490	0.722	0.571	0.593	0.586
Locus SSR3					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH
Na	4.000	3.000	4.000	3.000	3.000
Na >= 5%	4.000	3.000	4.000	3.000	3.000
Ne	2.266	1.374	2.947	1.727	1.998
I	1.057	0.536	1.191	0.753	0.840
Np	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=50%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
He	0.559	0.272	0.661	0.421	0.499
Locus SSR4					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH

Na	3.000	3.000	5.000	4.000	4.000
Na \geq 5%	3.000	2.000	4.000	3.000	3.000
Ne	1.865	1.476	1.573	1.391	1.703
I	0.815	0.586	0.793	0.596	0.810
Np	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
Na (\leq25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (\leq50%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
He	0.464	0.322	0.364	0.281	0.413
Locus SSR5					
6	QN	VP	PT	HB	TH
Na	2.000	3.000	2.000	2.000	3.000
Na \geq 5%	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
Ne	1.980	1.476	1.633	1.915	2.074
I	0.688	0.586	0.576	0.671	0.802
Np	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000
Na (\leq25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (\leq50%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
He	0.495	0.322	0.388	0.478	0.518
Locus SSR6					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH

Na	4.000	3.000	3.000	5.000	4.000
Na >= 5%	3.000	2.000	2.000	2.000	3.000
Ne	2.036	1.368	1.740	2.136	1.467
I	0.913	0.516	0.690	0.955	0.644
Np	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=50%)	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000
He	0.509	0.269	0.425	0.532	0.318
Locus SSR7					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH
Na	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
Na >= 5%	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000
Ne	1.956	1.827	2.000	1.978	1.763
I	0.682	0.645	0.693	0.688	0.624
Np	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=50%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
He	0.489	0.453	0.500	0.494	0.433
Locus SSR8					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH

Na	4.000	4.000	3.000	4.000	5.000
Na >= 5%	3.000	3.000	3.000	2.000	3.000
Ne	1.368	2.600	1.383	1.462	2.568
I	0.574	1.088	0.537	0.624	1.129
Np	0.000	0.000	0.000	0.000	2.000
Na (<=25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=50%)	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000
He	0.269	0.615	0.277	0.316	0.611
Locus SSR9					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH
Na	5.000	4.000	4.000	5.000	10.000
Na >= 5%	4.000	4.000	3.000	4.000	5.000
Ne	2.572	3.414	1.470	2.270	4.433
I	1.115	1.307	0.654	1.120	1.785
Np	0.000	0.000	0.000	0.000	5.000
Na (<=25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (<=50%)	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
He	0.611	0.707	0.320	0.560	0.774
Trung bình					
Quần thể	QN	VP	PT	HB	TH
Na	3.889	3.333	3.444	3.889	4.556

Na \geq 5%	3.222	2.889	3.000	3.000	3.222
Ne	2.241	2.162	2.095	2.176	2.471
I	0.927	0.848	0.835	0.890	1.020
Np	0.222	0.222	0.111	0.000	0.889
Na (\leq25%)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Na (\leq50%)	0.333	0.444	0.222	0.333	0.444
He	0.516	0.473	0.471	0.493	0.543

Với 9 cặp môi SSR đã tìm ra 51 alen khác nhau. Đạt 100% tỉ lệ locus đa hình cho loài Re hương ở cả 5 địa điểm nghiên cứu. Tuy nhiên, số alen cho mỗi locus đa hình là khác nhau ở mỗi locus trong mỗi quần thể. Trong đó, 6 alen ở locus SSR1 cho cả 3 quần thể (Quảng Ninh, Hòa Bình và Thanh Hóa) và 2 alen được ghi nhận cho locus SSR7 ở tất cả 5 quần thể (Quảng Ninh, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hòa Bình và Thanh Hóa) (Bảng 3.4).

Bảng 3.9. Đa dạng di truyền loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam

Quần thể	Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F
Quảng Ninh	SSR1	20	6,00	4,17	0,40	0,76	0,47
	SSR2	20	5,00	1,96	0,10	0,49	0,80
	SSR3	20	4,00	2,27	0,15	0,56	0,73
	SSR4	20	3,00	1,86	0,25	0,46	0,46
	SSR5	20	2,00	1,98	0,50	0,50	-0,01
	SSR6	20	4,00	2,04	0,50	0,51	0,02
	SSR7	20	2,00	1,96	0,55	0,49	-0,13
	SSR8	20	4,00	1,37	0,30	0,27	-0,12
	SSR9	20	5,00	2,57	0,15	0,61	0,75
Trung bình		20	3,89	2,24	0,32	0,52	0,33
Vĩnh Phúc	SSR1	13	3,00	2,33	0,69	0,57	-0,21
	SSR2	13	5,00	3,60	0,15	0,72	0,79

	SSR3	13	3,00	1,37	0,15	0,27	0,43
	SSR4	13	3,00	1,48	0,38	0,32	-0,19
	SSR5	13	3,00	1,48	0,38	0,32	-0,19
	SSR6	13	3,00	1,37	0,31	0,27	-0,14
	SSR7	13	2,00	1,83	0,54	0,45	-0,19
	SSR8	13	4,00	2,60	1,00	0,62	-0,63
	SSR9	13	4,00	3,41	0,54	0,71	0,24
Trung bình		13	3,33	2,16	0,46	0,47	-0,01
Phú Thọ	SSR1	19	5,00	3,78	0,53	0,74	0,28
	SSR2	19	3,00	2,33	0,00	0,57	1,00
	SSR3	19	4,00	2,95	0,58	0,66	0,12
	SSR4	19	5,00	1,57	0,16	0,36	0,57
	SSR5	19	2,00	1,63	0,42	0,39	-0,09
	SSR6	19	3,00	1,74	0,37	0,43	0,13
	SSR7	19	2,00	2,00	0,68	0,50	-0,37
	SSR8	19	3,00	1,38	0,32	0,28	-0,14
	SSR9	19	4,00	1,47	0,05	0,32	0,84
Trung bình		19	3,44	2,10	0,35	0,47	0,26
Hòa Bình	SSR1	19	6,00	4,25	0,37	0,76	0,52
	SSR2	19	4,00	2,46	0,00	0,59	1,00

	SSR3	19	3,00	1,73	0,42	0,42	0,00
	SSR4	19	4,00	1,39	0,32	0,28	-0,12
	SSR5	19	2,00	1,92	0,58	0,48	-0,21
	SSR6	19	5,00	2,14	0,58	0,53	-0,09
	SSR7	19	2,00	1,98	0,47	0,49	0,04
	SSR8	19	4,00	1,46	0,37	0,32	-0,17
	SSR9	19	5,00	2,27	0,42	0,56	0,25
Trung bình		19	3,89	2,18	0,39	0,49	0,14
Thanh Hóa	SSR1	30	6,00	3,82	0,63	0,74	0,14
	SSR2	30	4,00	2,42	0,23	0,59	0,60
	SSR3	30	3,00	2,00	0,20	0,50	0,60
	SSR4	30	4,00	1,70	0,43	0,41	-0,05
	SSR5	30	3,00	2,07	0,47	0,52	0,10
	SSR6	30	4,00	1,47	0,23	0,32	0,27
	SSR7	30	2,00	1,76	0,50	0,43	-0,16
	SSR8	30	5,00	2,57	0,33	0,61	0,45
	SSR9	30	5,00	4,43	0,20	0,77	0,74
Trung bình		30	4,56	2,47	0,36	0,54	0,30

Đối với quần thể Quảng Ninh, Na biến đổi từ 2 (locus SSR7) đến 6 alen (locus SSR1), trung bình 3,89 alen. Số alen hữu hiệu (N_e) biến đổi từ 1,37 (locus SSR8) đến 4,17 alen (locus SSR1), trung bình 2,24 alen. Hệ số (H_o) dao động từ 0,1 (locus SSR2) đến 0,55 (Locus SSR7), trung bình 0,46. Hệ số (H_e)

từ 0,27 (locus SSR8) đến 0,76 (locus SSR1), trung bình 0,52. Hệ số sinh sản cận noãn trong quần thể Quảng Ninh với giá trị $F = 0,33 > 0$.

Đối với quần thể Vĩnh Phúc, số alen (N_a) từ 2 (locus SSR7) đến 5 alen (locus SSR2), trung bình 3,33 alen. Số allele hữu hiệu (N_e) từ 1,37 (locus SSR6) đến 3,6 alen (locus SSR1), trung bình 2,16 alen. Hệ số (H_o) từ 0,15 (locus SSR2 và SSR3) đến 1,00 (Locus SSR8), trung bình 0,46. Hệ số (H_e) dao động từ 0,27 (locus SSR3 và SSR6) đến 0,72 (locus SSR2), trung bình 0,47. Hệ số sinh sản cận noãn không xuất hiện trong quần thể Vĩnh Phúc ($F = -0,01 < 0$).

Đối với quần thể Phú Thọ, số alen (N_a) từ 2 (locus SSR5 và SSR7) đến 5 alen (locus SSR1 và SSR4), trung bình 3,44 alen. Số alen hữu hiệu (N_e) từ 1,57 (locus SSR4) đến 3,78 alen (locus SSR1), trung bình 2,1 alen. Hệ số (H_o) từ 0,15 (locus SSR2) đến 0,68 (Locus SSR7), trung bình 0,35. Hệ số (H_e) từ 0,28 (locus SSR8) đến 0,74 (locus SSR1), trung bình 0,47. Hệ số sinh sản cận noãn trong quần thể Phú Thọ với giá trị $F = 0,26 > 0$.

Đối với quần thể Hòa Bình, số alen (N_a) từ 2 (locus SSR5 và SSR7) đến 6 alen (locus SSR1), trung bình 3,89 alen. Số alen hữu hiệu (N_e) từ 1,39 (locus SSR4) đến 4,25 alen (locus SSR1), trung bình 2,18 alen. Hệ số (H_o) từ 0 (locus SSR2) đến 0,58 (Locus SSR5 và SSR6), trung bình 0,39. Hệ số (H_e) từ 0,28 (locus SSR4) đến 0,76 (locus SSR1), trung bình 0,49. Hệ số sinh sản cận noãn trong quần thể Hòa Bình với giá trị $F = 0,14 > 0$.

Đối với quần thể Thanh Hóa, số alen (N_a) từ 2 (locus SSR7) đến 6 alen (locus SSR1), trung bình 4,56 alen. Số alen hữu hiệu (N_e) từ 1,7 (locus SSR4) đến 3,82 alen (locus SSR1), trung bình 2,47 alen. Hệ số (H_o) từ 0,2 (locus SSR3) đến 0,62 (Locus SSR1), trung bình 0,36. Hệ số (H_e) từ 0,32 (locus SSR4) đến 0,77 (locus SSR9), trung bình 0,54. Hệ số sinh sản cận noãn trong quần thể Thanh Hóa với giá trị $F = 0,30 > 0$.

Kết quả này đã chỉ ra số alen cho một locus cao xuất hiện ở quần thể Thanh Hóa ($N_a = 4,56$). Còn quần thể Vĩnh Phúc có số alen thấp nhất ($N_a = 3,33$). Số alen hữu hiệu (N_e) thấp nhất ở quần thể Phú Thọ (2,1 alen) và cao nhất ở quần thể Thanh Hóa (2,47). Tương tự, hệ số $H_o = 0,35$ và hệ số $H_e = 0,47$ ở quần thể Phú Thọ, quần thể Quảng Ninh ($H_o = 0,32$ và $H_e = 0,47$),

quần thể Vĩnh Phúc ($H_o = 0,46$ và $H_e = 0,47$), quần thể HB ($H_o = 0,39$ và $H_e = 0,49$) và quần thể Thanh Hóa ($H_o = 0,36$ và $H_e = 0,54$).

3.2.4. Đa dạng di truyền ở mức độ loài *Re* hương

Đa dạng di truyền của 5 quần thể *Re* hương được trình bày trong Bảng 3.5. Phần trăm locus đa hình của 5 quần thể là cao ($P=100\%$). Số alen (N_a) của 5 quần thể là 3,82 dao động từ 3,33 (Vĩnh Phúc) đến 4,56 (Thanh Hóa). Số alen hiệu quả (N_e) dao động từ 2,1 (quần thể Phú Thọ) đến 2,47 (quần thể Thanh Hóa), giá trị trung bình 2,23 alen. Hệ số gen dị hợp tử quan sát (H_o) và hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng (H_e) trung bình là 0,38 (0,32 - 0,46) và 0,5 (0,47 - 0,54), tương ứng. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng đa dạng di truyền loài *Re* hương đạt mức độ trung bình. Quần thể Quảng Ninh có ước lượng đa dạng di truyền thấp nhất ($H_o = 0,32$ và $H_e = 0,52$) và quần thể Vĩnh Phúc ước lượng đa dạng di truyền cao nhất ($H_o = 0,46$ và $H_e = 0,47$). Hệ số (F_{is}) là khả năng tăng kiểu gen đồng hợp tử trong mỗi locus của cây trưởng thành và cây con. Đây cũng là mức giảm dự kiến trong suốt quá trình giao phối giữa các kiểu gen dị hợp. Hệ số dị hợp tử nằm trong khoảng từ 0 (đối với các cá thể dị hợp) đến 1 (đối với các cá thể đồng hợp hoàn toàn). Hệ số sinh sản cận noãn gần tỉ lệ đồng hợp tử lặn tăng, gây ra alen lặn có hại bẩm sinh. Làm cho giống loài bị làm giảm sức chống chịu. Bốn quần thể Quảng Ninh, Phú Thọ, Hòa Bình và Thanh Hóa có giá trị F_{is} dương, cho thấy có sự dư thừa gen đồng hợp tử và giao phối cận huyết có thể xảy ra trong các quần thể này. Giá trị F_{is} cao nhất (0,33) được tìm thấy trong quần thể Quảng Ninh. Sự thiếu hụt đáng kể về dị hợp tử được phát hiện ở 4 quần thể (Quảng Ninh, Phú Thọ, Hòa Bình và Thanh Hóa), dựa trên phân tích thắt nút cổ chai của quần thể bằng phần mềm Bottleneck sử dụng 2 mô hình đột biến TPM (two – phase model) và SMM (stepwise mutation model), và kết quả gợi ý bằng chứng về sự giảm kích thước quần thể trong thời gian gần đây. Hệ số sinh sản cận noãn (F_{is}) trong quần thể Vĩnh Phúc có giá trị âm ($F_{is} < 0$), cho thấy sự vượt trội đáng kể về kiểu gen dị hợp tử trong những quần thể này hay nói cách khác trong các quần thể không xảy ra hoặc xảy ra rất thấp hiện tượng sinh sản cận noãn hoặc tự thụ phấn trong quần thể nghiên cứu. Điều này cho thấy tỷ lệ thụ phấn chéo trong quần thể này.

Bảng 3.10. Đa dạng di truyền và kết quả thất cổ chai 5 quần thể Re hương

Quần thể	Na	Ne	P%	Ho	He	F _{IS}	P của thất cổ chai	
							TPM	SMM
Quảng Ninh	3,89	2,24	100	0,32	0,52	0,33	0,05*	0,02*
Vĩnh Phúc	3,33	2,16	100	0,47	0,46	-0,01	0,67	0,05*
Phú Thọ	3,44	2,10	100	0,35	0,47	0,26	0,04*	0,03*
Hòa Bình	3,89	2,18	100	0,39	0,49	0,14	0,03*	0,02*
Thanh Hóa	4,56	2,47	100	0,36	0,54	0,30	0,04*	0,02*
Trung bình	3,82	2,23	100	0,38	0,50	0,20		

Đa dạng di truyền cao trong một loài là kết quả của lịch sử tiến hóa và môi trường địa lý sinh thái của loài đó. Các loài có mô hình phân bố rộng, kích thước quần thể lớn, tuổi thọ dài, và chủ yếu là lai xa, cùng với các giai đoạn diễn thế, thường duy trì tính đa dạng di truyền cao [67], [68]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy loài Re hương có $Na = 3,82$ và $Ne = 2,23$ thấp hơn so với loài Long não phân bố Nhật Bản ($Na = 13,37$ và $Ne = 3,78$) và với loài Long não phân bố Trung Quốc ($Na = 21,73$ và $Ne = 9,51$) [22], [23] nhưng cao hơn loài Vù hương ở Việt Nam ($Na = 1,9$ và $Ne = 1,5$) [14]. Các kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy loài Re hương thể hiện mức độ đa dạng di truyền vừa phải ($Ho = 0,38$ và $He = 0,5$). Mức độ đa dạng di truyền cao ở các loài thuộc chi Quế khác dựa trên các chỉ thị SSR đã được báo cáo, chẳng hạn như phân tích $Ho = 0,57$ và $He = 0,62$ từ 104 cây trưởng thành của ba quần thể Long não (Meiji Jingu (Shinto Shrine), Kajiya Plantation, and Manazuru Peninsula) ở Nhật Bản [22] mức độ đa dạng di truyền của 300 cây Long não ở Trung Quốc với $Ho = 0,73$ và $He = 0,88$ và 504 cây Long não với $Ho = 0,614$ và $He = 0,714$) [23]. Tuy nhiên, tính đa dạng di truyền thấp đã được ghi nhận ở một số loài chi Quế khác, chẳng hạn như loài Vù hương ở Việt Nam ($Ho = 0,244$, $He = 0,264$) [14], loài Long não ($Ho = 0,3449$, $He =$

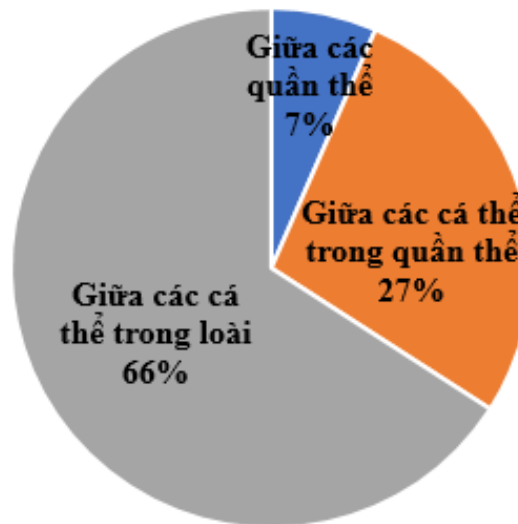
0,4254) [69]. Các loài Chi quế phân bố rộng rãi và có tuổi thọ cao. Các loài có vùng phân bố hẹp hoặc các loài có nguy cơ tuyệt chủng có xu hướng giảm khả năng biến đổi di truyền và duy trì mức độ đa dạng di truyền thấp [67], [70]. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng loài Re hương có tính đa dạng di truyền trung bình. Môi trường sống của nó bị suy thoái và bị cô lập. Phá rừng và khai thác loài Re hương quá mức có thể có tác động lớn đến sự biến đổi di truyền, ảnh hưởng đến số lượng alen trong tất cả các quần thể được nghiên cứu. Sự giảm đa dạng alen do quy mô quần thể nhỏ. Mặt khác, hai quần thể Phú Thọ và Quảng Ninh có đa dạng di truyền thấp so với các quần thể còn lại. Những kết quả này cho thấy rằng sự xáo trộn và phân mảnh môi trường sống cao có tác động tiêu cực đến sự biến đổi di truyền trong quần thể.

Hơn nữa, kết quả của chúng tôi cho thấy hệ số cận huyết (Fis) dương đáng kể ở hầu hết các quần thể. Những yếu tố này gợi ý rằng sự tồn tại của giao phối cận noãn xảy ra có thể làm giảm sự đa dạng di truyền trong quần thể loài Re hương. Điều này có thể chủ yếu là do sự phát tán phấn hoa hạn chế. Để ngăn chặn tình trạng giao phối cận noãn và từng bước khôi phục quy mô quần thể Re hương trong tương lai, thu hái hạt giống từ quần thể tự nhiên tập trung vào vườn giống địa phương sẽ để tăng vốn gen của thế hệ con cháu trong quần thể tự nhiên.

3.2.5. Cấu trúc di truyền quần thể loài Re hương

Phân tích AMOVA của các quần thể Re hương cho thấy mức độ biến đổi di truyền giữa các cá thể trong loài cao hơn (66%) so với giữa các cá thể trong cùng quần thể (27%). Mức độ khác nhau 7% giữa 5 quần thể Quảng Ninh, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hòa Bình và Thanh Hóa của loài Re hương ở 5 tỉnh phía Bắc Việt Nam (Hình 3.5, Bảng 3.6. Mức độ đa dạng di truyền trong một quần thể loài Re hương cũng ảnh hưởng đến khả năng thích nghi của loài với môi trường sống. Nếu mức độ thay đổi phương sai phân tử giữa các cá thể trong quần thể là thấp, điều này có thể là dấu hiệu cho thấy sự giảm bảo toàn biến dị di truyền. Tuy nhiên, biến dị di truyền là nguồn gốc của đa dạng trong loài, giúp đảm bảo sự ổn định và khả năng thích nghi của loài với môi trường sống và các yếu tố môi trường khác. Công tác cải thiện giống cũng đòi hỏi sự bảo tồn nguồn gen và vật liệu di truyền. Biến dị di truyền là

nguồn nguyên liệu quan trọng cho công tác cải thiện giống, giúp tăng thu di truyền và mang lại lợi ích lâu dài. Bảo tồn nguồn gen trong quần thể hoặc các xuất xứ khác nhau của loài cũng là yếu tố quan trọng để đảm bảo sự sống còn của loài trong tương lai. Việc duy trì và sử dụng bền vững các nguồn gen và vật liệu di truyền là một phần quan trọng trong công tác bảo tồn di truyền học và phát triển bền vững của nông nghiệp, y học và công nghệ sinh học.



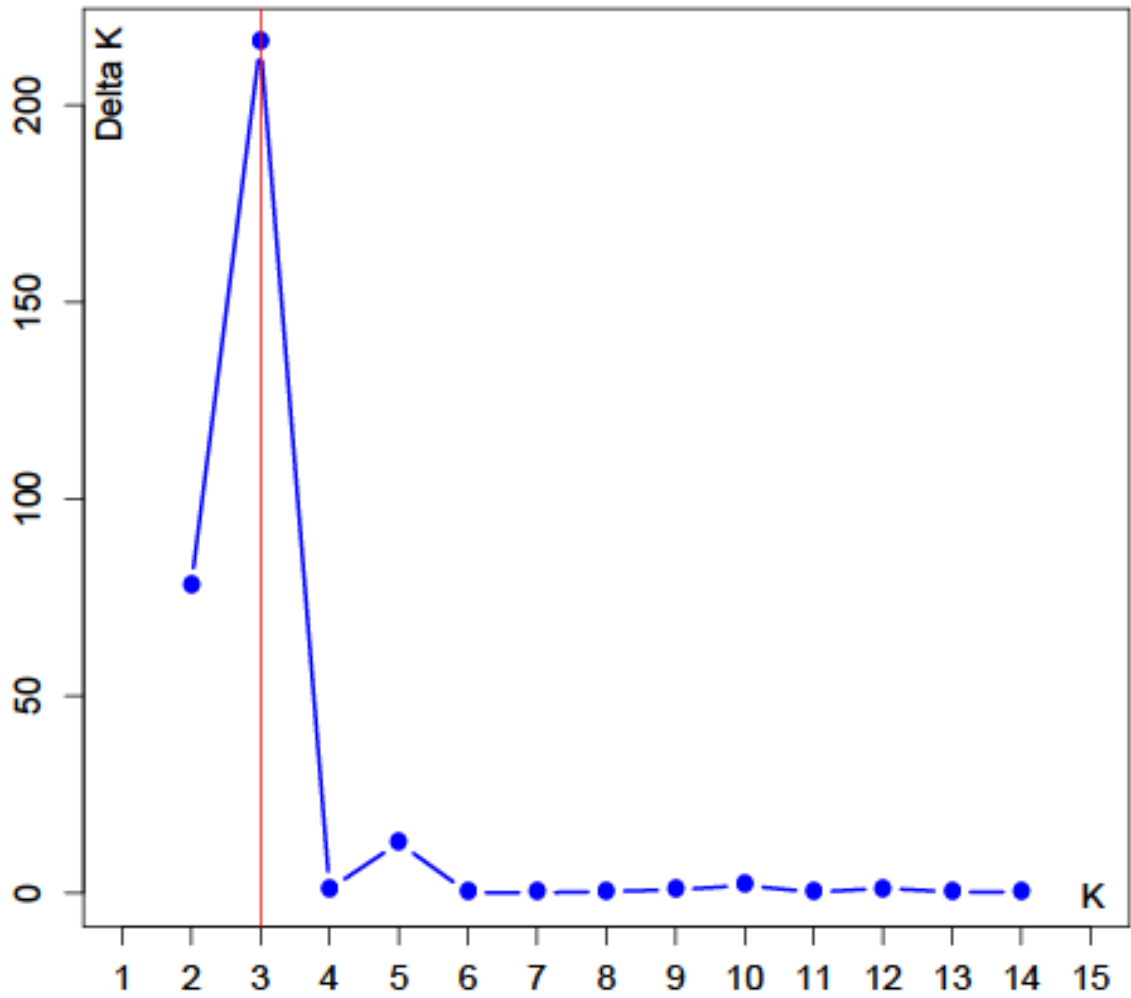
Hình 3.6. Mức độ biến đổi di truyền trong loài Re hương

Bảng 3.11. Phương sai phân tử giữa các quần thể và trong quần thể Re hương

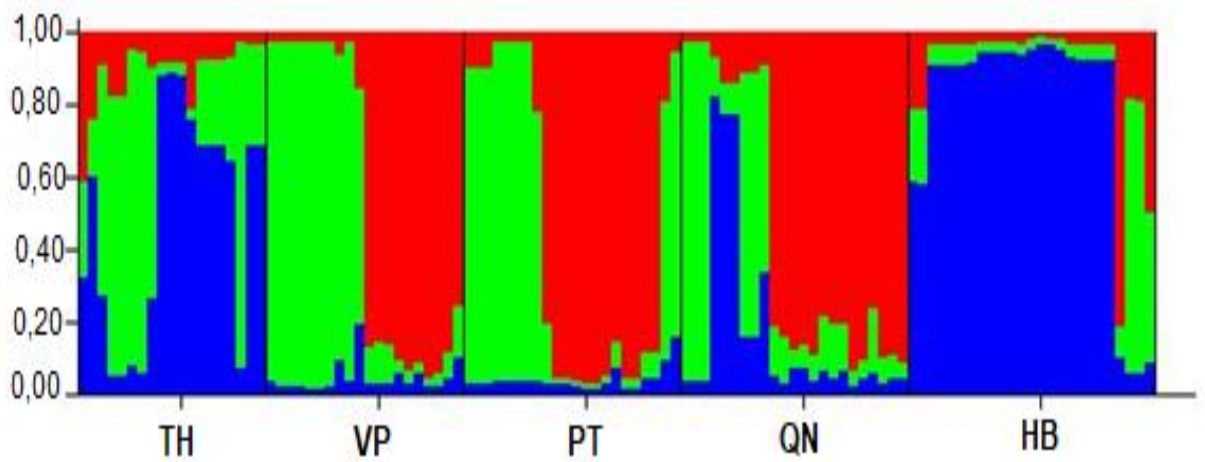
	Mức tự do (df)	Tổng bình phương	Mức độ khác nhau	Tỉ lệ (%)	Mức ý nghĩa
Giữa các quần thể	4	38,343	9,586	7%	<0,001
Giữa các cá thể trong quần thể	96	292,345	3,045	28%	<0,001
Giữa các cá thể	101	167,500	1,658	66%	<0,001
Tổng	201	498,188		100%	

Phân tích cấu trúc di truyền của quần thể loài Re hương được thực hiện bằng phương pháp STRUCTURE, với sự phân chia thành 3 nhóm cụm di truyền khác nhau dựa trên mô hình Bayes. Giá trị ΔK cao nhất ($\Delta K = 215,9$) được ghi nhận tại $K=3$ (Hình 3.6 và Hình 3.7), mỗi cá thể trong mỗi quần thể

được chỉ định vào một trong ba cụm di truyền (màu xanh lá cây, xanh da trời và đỏ). Quần thể Vĩnh Phúc, Phú Thọ và Quảng Ninh chứa nhóm gen thứ nhất (đỏ) là 45,4%; 53,6,5% và 56,1%, tương ứng. Quần thể Thanh Hóa, Vĩnh Phúc và Phú Thọ chứa nhóm gen thứ hai (màu xanh lá cây) là 40,8%; 46,9% và 42,6%, tương ứng. Quần thể Hòa Bình và Thanh Hóa chứa 49%, 76% gen thuộc nhóm thứ ba (xanh da trời), quần thể Quảng Ninh chứa 15,7% và quần thể Vĩnh Phúc chứa 7,7% ở nhóm gen này (Bảng 3.7). Kết quả này chỉ ra cho thấy sự phân bố di truyền của quần thể loài này có sự đa dạng và phức tạp. Kết quả phân tích cấu trúc di truyền của quần thể Re hương cho thấy sự tồn tại của ba nhóm cụm di truyền khác nhau trong loài này. Đây có thể là kết quả của quá trình tiến hóa và tương tác giữa các cá thể trong quần thể với môi trường sống. Việc nắm bắt và hiểu rõ về cấu trúc di truyền của quần thể Re hương là cơ sở quan trọng để phát hiện ra mối quan hệ di truyền giữa các nhóm cá thể, đồng thời cung cấp thông tin cần thiết cho việc bảo tồn và quản lý di truyền học của loài này. Đồng thời, việc áp dụng phương pháp STRUCTURE trong nghiên cứu di truyền cũng cho thấy tính ứng dụng và tiềm năng của các công cụ phân tích di truyền học hiện đại trong nghiên cứu sinh học đa dạng và đóng góp vào công tác bảo tồn di truyền học của các loài trong tự nhiên.



Hình 3.7. Giá trị ΔK lớn nhất (215,9) theo Evanno *et al.* (2005)



Hình 3.8. Phân bố gen 5 quần thể Re hương ($K=3$) trên cơ sở phân tích Bayesian

Bảng 3.12. Tỷ lệ phần trăm cấu trúc gen trong 5 quần thể loài Re hương

Quần thể	Nhóm gen I (đỏ)	Nhóm gen II (xanh lá cây)	Nhóm gen III (xanh da trời)
Thanh Hóa	10,2	40,8	49
Vĩnh Phúc	45,4	46,9	7,7
Phú Thọ	53,6	42,6	3,8
Quảng Ninh	56,1	28,2	15,7
Hòa Bình	10,9	13,1	76

3.3. MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN GIỮA CÁC QUẦN THỂ RE HƯƠNG Ở 5 TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

3.3.1. Khoảng cách di truyền giữa 5 quần thể loài Re hương

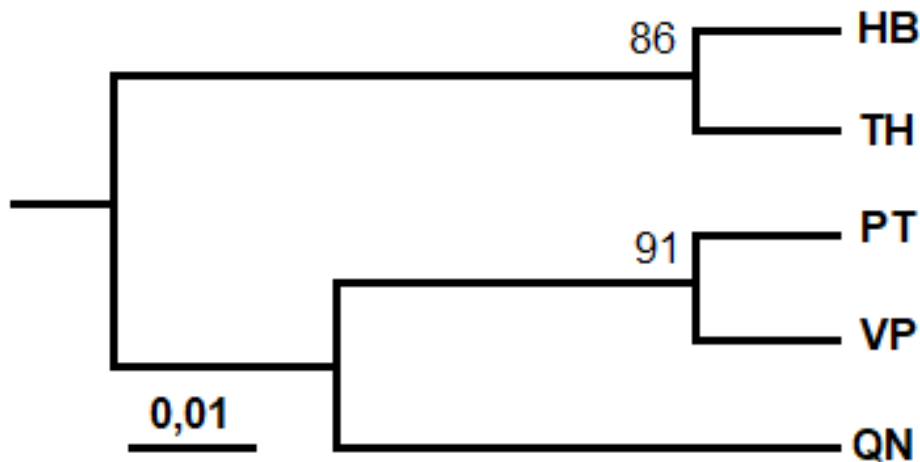
Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra khoảng cách di truyền giữa các quần thể Re hương nằm trong khoảng từ 0,03 (Phú Thọ/Vĩnh Phúc) đến 0,20 (Vĩnh Phúc/Hòa Bình) (Bảng 3.8). Khoảng cách di truyền theo Nei 1978 có giá trị thấp được tìm thấy giữa các cặp quần thể (Phú Thọ/Vĩnh Phúc) (0,03), Vĩnh Phúc/Quảng Ninh (0,08) và Thanh Hóa/Phú Thọ (0,08). Giá trị cao nhất của khoảng cách di truyền theo Nei 1978 được tìm thấy giữa các cặp quần thể Vĩnh Phúc/Hòa Bình (0,20). Tương tự, mức độ tương đồng di truyền của các cặp quần thể thay đổi từ 0,82 (Hòa Bình/Vĩnh Phúc) đến 0,97 (Phú Thọ/Vĩnh Phúc). Hệ số tương đồng di truyền đối với 2 quần thể là Vĩnh Phúc và Phú Thọ được ghi nhận là lớn nhất (0,97), hệ số tương đồng di truyền tương đối thấp hơn các cặp quần thể khác đó là 0,82 của cặp quần thể Hòa Bình với quần thể Vĩnh Phúc.

Bảng 3.13. Khoảng cách di truyền (dưới) và hệ số tương đồng di truyền (trên) theo công thức Nei (1978)

Quần thể	Thanh Hóa	Vĩnh Phúc	Phú Thọ	Quảng Ninh	Hòa Bình
Thanh Hóa	-	0,84	0,92	0,91	0,94
Vĩnh Phúc	0,18	-	0,97	0,92	0,82
Phú Thọ	0,08	0,03	-	0,90	0,84
Quảng Ninh	0,1	0,08	0,1	-	0,89
Hòa Bình	0,06	0,20	0,18	0,12	-

3.3.2. Mối quan hệ di truyền giữa 5 quần thể loài Re hương

Phân tích UPGMA (Unweighted Pair Group Method) dựa trên ma trận kiểu gen (genotype) từ 9 cặp mồi SSR cho mỗi quần thể trong loài Re hương đã được thực hiện thông qua phần mềm Poptree. Kết quả phân tích này đã tiết lộ mối quan hệ di truyền giữa 5 quần thể Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam trên khoảng cách di truyền, như được biểu đồ hóa trong hình 3.8.



Hình 3.9. Mối quan hệ di truyền giữa 5 quần thể Re hương ở phía Bắc Việt Nam với các giá trị bootstrap trên các nhánh

Cây phát sinh chủng loại quan hệ di truyền của 5 quần thể Re hương xác định được hai nhánh chính. Nhánh 1 gồm 3 quần thể (Phú Thọ, Vĩnh Phúc và Quảng Ninh) có mối quan hệ mật thiết với nhau. Trong nhánh này, quần thể Phú Thọ và quần thể Vĩnh Phúc có quan hệ gần gũi với nhau nhất giá trị ủng hộ 91%. Nhánh 2 gồm hai quần thể Hòa Bình và Thanh Hóa nằm trên một nhánh riêng với giá trị ủng hộ 86% và xa hơn đối với nhánh 1. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy rằng, các quần thể Re hương có khoảng cách địa lý gần nhau thường hình thành các nhóm riêng biệt. Điều này có liên quan đến việc trao đổi gen giữa các quần thể thông qua phương tiện phát tán hạt và hạt phấn, như gió, côn trùng hoặc động vật.

Qua phân tích UPGMA, ta có thể nhận thấy cấu trúc di truyền của các quần thể Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam. Kết quả này cung cấp thông tin về sự đa dạng di truyền giữa các quần thể, có thể đồng hóa hoặc phân tách chúng theo địa lý hoặc môi trường sống. Đây là một bước quan trọng trong việc hiểu về cấu trúc di truyền của loài Re hương trong vùng nghiên cứu, đồng thời cung cấp dữ liệu cơ sở cho việc đề xuất các chiến lược bảo tồn và quản lý di truyền học của loài này trong khu vực miền Bắc Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu đã đạt được, đề tài rút ra một số kết luận sau:

1. Xác định được 101 cá thể trưởng thành và 79 cá thể tái sinh cùng với một số đặc điểm hình thái của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam. Các loài cây bạn đi kèm với Re hương đa dạng (Chủ yếu là các loài cây ưa sáng, mọc nhanh): ở Hòa Bình (34 loài); Thanh Hóa (52 loài); Vĩnh Phúc (43 loài); Quảng Ninh (15 loài); Phú Thọ (25 loài).

2. Đã được phát hiện 51 alen từ 9 cặp mỗi SSR của 101 cá thể thuộc 5 quần thể Re hương. Mức độ đa dạng di truyền trung bình của loài Re hương ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam đã được tính toán với các chỉ số $N_a = 3,82$; $N_e = 2,23$; $H_o = 0,38$ và $H_e = 0,5$. Phân tích hiện tượng thắt nút cổ chai (bottleneck) đã chỉ ra sự suy giảm kích thước quần thể ở 4 quần thể. Mức độ khác nhau ở mức độ phân tử xuất hiện cao giữa các cá thể trong loài (66%) và thấp nhất giữa các quần thể (7%). Ba nhóm gen khác nhau đã được xác định dựa trên phân tích Bayesian.

3. Cây phát sinh chủng loại quan hệ di truyền của 5 quần thể Re hương xác định được hai nhánh chính. Nhánh 1 gồm 3 quần thể (Phú Thọ, Vĩnh Phúc và Quảng Ninh) và Nhánh 2 gồm hai quần thể Hòa Bình và Thanh Hóa.

KIẾN NGHỊ

Nhằm bảo tồn nguồn gen di truyền của loài Re hương đang bị đe dọa ở nước ta, chúng tôi đề xuất kiến nghị sau đây:

- Bảo tồn ngoại vi loài Re hương là cần thiết và nên được tiến hành sớm có thể.

- Thu thập quả từ quần thể với các thông số di truyền cao để phòng tránh được thu phần cận Noon. Điều này sẽ làm tăng tính đa dạng di truyền cho mỗi quần thể. Đây là nơi bảo tồn và quản lý để Re hương sinh trưởng và phát triển và phòng tránh tiềm năng xói mòn nguồn gen của các quần thể Re hương. Như vậy, thu thập loài Re hương được xem như là nguồn tư liệu để tái tạo lại và cần thiết để duy trì bảo tồn bền vững loài Re hương ở nước ta.

- Cần thiết lập vườn ươm để tạo cây giống để bổ sung sự thiếu hụt về cấu trúc tuổi của quần thể và tăng số lượng cá thể trong quần thể. Hướng nghiên cứu này cần tiếp tục góp phần bảo tồn hữu hiệu loài đang bị đe dọa ở nước ta.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Vu Dinh Giap, Khuat Thi Minh Hien, **Pham Nhu Anh**, Pham Mai Phuong, Vu Dinh Duy. 2022. Genetic diversity evaluation of *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn in some nature reserves in North Vietnam using SSR markers. Vietnam Journal of Agriculture and Rural Development 2(2): 41-51

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Kim Đào, 2010, *Thực vật chí Việt Nam - Họ Long não (Lauraceae)*, NXB Khoa học và Kỹ Thuật, 20, tr. 22-234.
2. Balijepalli MK., Buru AS., Sakirolla., Pichika MR., 2017, *Cinnamomum* genus: A review on its biological activities. *Int J Pharm Pharm Sci*, 9(2), pp. 1–11.
3. Xu S., Zhong QY., Wei Q., 2014, Anti-hepatoma effect of safrole from *Cinnamomum longepaniculatum* leaf essential oil in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 7, pp. 2265–72.
4. Kim EC., Kim HJ., Kim TJ., 2015, Water extract of *Cinnamomum cassia* suppresses angiogenesis through inhibition of VEGF receptor 2 phosphorylation. *Biosci Biotech Bioch*, 79(4), pp. 617–624.
5. Li H., Ge Y., Luo Z., Zhou Y., Zhang X., Zhang J., Fu Q., 2017, Evaluation of the chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of distillate and residue fractions of sweet basil essential oil, *J Food Sci Technol* 54(7), pp. 1882–1890.
6. Lê Thị Diên, Phạm Minh Toại, Lê Phú Ánh, 2010, Nghiên cứu một số đặc điểm tái sinh của loài Re Hương tại Vườn quốc gia Bạch Mã. *Tạp chí khoa học Đại học Huế*, 2, tr. 33-41.
7. 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), tr. 323-329.
8. Bộ Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007, *Sách đỏ Việt Nam, Phần 2: Thực vật*, NXB Khoa học Công nghệ Việt Nam, Tr. 289-290.
9. De Verno, L. L., and A. Mosseler. 1997. Genetic variation in red pine (*Pinus resinosa*) revealed by RAPD and RAPD-RFLP analysis. *Can. J. For. Res.* 27:1316–1320.
10. Bouajila, A., Abang, M. A. Haouas, S. Udupa, S. Rezgui, S. Baum, M. and Yahyaoui, A. 2007. Genetic Diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as Revealed by Pathotype, AFLP, and Microsatellite Analyses. *Mycopath.*, 163: 281-294.

11. Tam NM, Trang NTP, Hoa NT. 2011. Genetic diversity of an endangered species *Fokienia hodginsii* (Cupressaceae). *Afr. J. Biotechnology* 10(71): 15838-44
12. Zhang X, chen G, Ma Y, Ge J, Sun W. 2015. Genetic diversity and population structure of *Buddleja crispa* Bentham in the Himalaya-Hengduan mountains region revealed by AFLP. *Biochemical systematics and ecology* 58: 13-20.
13. Vu DD, Shah SNM, Pham MP, Bui VT, Nguyen MT, Nguyen TPT, 2020, De novo assembly and Transcriptome characterization of an endemic species of Vietnam, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, including the development of EST-SSR markers for population genetics, *BMC Plant Biology*, pp. 20-358.
14. Cui B, Vu DD, Vu DG, Bui TTX, Rahman SU, Pham MP, Nguyen MT, Nguyen VS, Shah SNM, Tran VT, 2022, Genetic diversity and population structure of *Cinnamomum balansae* Lecomte inferred by microsatellites, *Open Life Sciences*, 17, pp. 323–332.
15. Nguyen MT, Vu DD, Dang HP, Bui TTX, Nguyen HPL, Nguyen MD, 2021, Population genetic structure and demographic history of the dipterocarp species *Anisoptera costata* Korth revealed by microsatellite analysis. *Planta*, 253(3), pp. 66.
16. Pandey M, Geburek T. 2009. Successful cross-amplification of *Shorea* microsatellites reveals genetic variation in the tropical tree, *Shorea robusta* Gaertn. *Hereditas* 146: 29-32.
17. Monteiro ER, Mangolin CA, das Neves AF, Orasmo GR, da Silva JGM, sa Siva Machado MFP. 2015. Genetic diversity and structure of populations in *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) in the Caatinga biome as revealed by heterologous microsatellite primers. *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 7-12.
18. Joy P., Maridass M., 2008, Inter species relationship of *Cinnamomum* species using RAPD marker analysis, *Ethnobotanical Leaflets*, 12, pp. 476-480.
19. Kuo DC, Lin CC, Ho KC, Cheng YB, Hwang SY, Lin TP. 2010. Two genetic divergence centers revealed by chloroplastic DNA variation in

- populations of *Cinnamomum kanehirae* Hay. *Conserv Genet* 11: 803–812.
20. Lee SC, Chiou SJ, Yen JH, Lin TY, Hsieh KT, Yang JC. 2010. DNA Barcoding *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. Based on the partial non-coding ITS2 region of ribosomal genes. *J Food Drug Anal* 18(2): 128-135
 21. Ho KY, Hung TY. 2011. Cladistic relationships within the genus *Cinnamomum* (Lauraceae) in Taiwan based on analysis of leaf morphology and inter-simple sequence repeat (ISSR) and internal transcribed spacer (ITS) molecular markers. *African Journal of Biotechnology* 10(24): 4802-4815.
 22. Kameyama Y, 2012. Development of microsatellite markers for *Cinnamomum camphora* (Lauraceae). *American Journal of Botany*: e1–e3
 23. Kameyama Y., Furumichi J., Li JX., Tseng YH., 2017, Natural genetic differentiation and human-mediated gene flow: the spatiotemporal tendency observed in a long-lived *Cinnamomum camphora* (Lauraceae) tree. *Tree genet genomes*, pp. 13- 38.
 24. Abeysinghe PD, Samarajeewa NGCD, Li G, Wijesinghe KGG. 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
 25. Gwari G., Bhandari U., Naik G., Haider SZ., Chauhan N., 2016, Genetic diversity in *Cinnamomum tamala* Nees. accessions through DNA fingerprinting using molecular markers. *Indian J Agric Res*, 50(5), pp. 46-450.
 26. Nguyễn Tiên Bản, 2003, *Danh lục các loài thực vật Việt Nam - Tập II*, NXB Nông nghiệp.
 27. Lã Đình Mối, Lưu Đàm Cư, Trần Minh Hợi, Trần Huy Thái, Ninh Khắc Bản, 2001, *Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam, Tập I*. Nxb. Nông nghiệp.

28. Phạm Hồng Ban, Nguyễn Anh Dũng, 2017, Đa dạng thành phần loài thực vật họ Long não ở Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Hoạt, *Tạp chí khoa học công nghệ Nghệ An*, 2, tr. 5-9.
29. 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), tr. 323-329.
30. 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, tr. 176-185.
31. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1999, Một số loài cây bị đe dọa ở Việt Nam, NXB Nông thôn.
32. 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, tr. 1-9.
33. 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, tr. 1-6.
34. Nguyễn Viễn, Phạm Mai Phương, Bùi Thị Tuyết Xuân, Hoàng Thị Thu Trang, Abeysinghe PD, Samarajeewa NGCD, Li G, Wijesinghe KGG, 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), pp. 201-208.
35. Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, Nguyễn Văn Sinh, Phạm Mai Phương, Tạ Thị Thu Hà, Nguyễn Viễn, Lê Văn Quang, 2021, Đánh giá đa dạng di truyền và hiện tượng thất cổ chai ở quần thể Vù hương (*Cinnamomum balansae* Lecomte) tại tỉnh Phú Thọ bằng chỉ thị phân tử SSR, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 1, tr. 3-9.
36. Kostermans AJGH., 1961, The new world species of *Cinnamomum* Trend (Lauraceae), *Reinwardia*, 6, pp. 17-24.32.
37. Willis JK., 1973, *A Dictionary of the flowering plants and ferns*, 8th edn., Cambridge Uni. Press, Cambridge.

38. Li, X.W., Li, J., Huang, P.H., Wei, F.N., Cui, H.B. & van der Werff, H. (2008). Lauraceae. In: Wu, Z.Y., Raven, P.H. & Hong, D.Y. (eds) Flora of China, vol. 7, pp. 102–254. Beijing: Science Press and St Louis: Missouri Botanical Garden Press.
39. Choudhury D., Biswas R., Mandal P., Das AP., 2013, Diversity of *Cinnamomum* Schaeffer (Lauraceae) in terai and duars region of West Bengal, India. *Pleione*, 7(2), pp. 441 - 448.
40. Sein CC., Mitlöhner R., 2011, *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn: ecology and silviculture. CIFOR, Bogor, Indonesia.
41. Zhang ZH., Liang SC., Gang HU., 2007, Structure of *Cinnamomum burmannii* population in karst hills of guilin, *J Trop Subtrop Bot*, 15(4), pp.307-314.
42. Zhang Y., Wei XL., Wang L., Chen MF., University G, 2014, Growth variability of *Cinnamomum bodinieri* seedlings from different geographical provenances. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 27(5), pp. 2162-2167
43. Kameyama Y., Nakajima H., 2018, Environmental conditions for seed germination and seedling growth of *Cinnamomum camphora* (Lauraceae): the possibility of regeneration in an abandoned deciduous broad-leaved forest, eastern Japan. *J For Res*, 23(3), pp. 1-5.
44. Yan K., Wei Q., Feng R., Zhou W., Chen F., 2017, Transcriptome analysis of *Cinnamomum longepaniculatum* by high-throughput sequencing, *Elect J Biotechnol*, 28, pp. 58–66.
45. Kameyama Y., Furumichi J., Li JX., Tseng YH., 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.
46. Sandigawad AM., Patil CG., 2011, Genetic diversity in *Cinnamomum zeylanicum* Blume. (Lauraceae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *Afri J Biotechnol*, 10(19), pp. 3682-3688.
47. Zhong Y., Yang A., Li Z., Zhang H., Liu L., Wu Z., Li Y., Liu T., Xu M., Yu F., 2019, Genetic Diversity and Population Genetic Structure of *Cinnamomum camphora* in South China Revealed by EST-SSR Markers.

- Forests, 10(11), pp. 1019
48. Wang Y, Dai PP, Guo SS, Cao JQ, Pang X, Geng ZF, Du SS. 2018. Supercritical carbon dioxide extract of *Cinnamomum cassia* bark: toxicity and repellency against two stored-product beetle species. *Environ Sci and Pollut R.* 25(22): 22236-22243.
 49. Narayan MS, Srivastava N, Gupta AK, et al. Assessment of genetic diversity of fourteen cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) accessions in India using simple sequence repeat markers. *Int J Agric Environ Biotechnol.* 2019;12(1):127-135.
 50. Li, Y.Q., Kong, D.X., Lin, X.M., Xie, Z.H., Bai, M., Huang, S.S., Nian, H., Wu, H., 2016. Quality evaluation for essential oil of *Cinnamomum verum* leaves at different growth stages based on GC–MS, FTIR and microscopy. *Food Anal. Methods* 9 (1), 202–212.
 51. Chen, C.; Zheng, Y.; Zhong, Y.; Wu, Y.; Li, Z.; Xu, L.A.; Xu, M. Transcriptome analysis and identification of genes related to terpenoid biosynthesis in *Cinnamomum camphora*. *BMC Genom.* 2018, 19, 550.
 52. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2002, *Sinh học phân tử*, NXB Giáo dục.
 53. Khuất Hữu Thanh, 2005, *Kỹ thuật gen – Nguyên lý và ứng dụng*, NXB Khoa học và kỹ thuật.
 54. Nguyễn Đức Thành, 2003, *Chuyển gen ở thực vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
 55. Morgante M., Hanafey M., Powell W., 2002, Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet*, 30,pp. 194–200.
 56. Nguyen Minh Tam, Nguyen T. phuong Trang, Nguyen Thi Hoa (2009). Genetic variation in threatened conifer *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* using ISSR markers: Implication for conservation. *Tạp chí Sinh học* 31(2): 66-72
 57. Williams JGK., Kublelik AR., Livak KJ., Rafalski JA., Tingey S V., 1990, DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc Acid Res*, 18, pp. 6531-6535.
 58. Thomasius, H (1973), *Wald, Landeskultur und Gesdlschaft Steinkopf*, Dresden. 439pp.

59. Goudet J., 2001, FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
60. Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005, Arlequin v. 3.0. an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics online*, 1, pp. 47-50.
61. Peakall R., Smouse PE., 2012, GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*, 28(19), pp. 2537-2539.
62. Piry S, Luikart G, Cornnet JM (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502-503.
63. Takezaki N., Nei M., Tamura K., 2010, Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular biology and evolution*, 27(4), pp. 747-752.
64. Pritchard JK., Stephens M., Donnelly P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155, pp. 945-959.
65. Earl DA., Holdt BM., 2012, Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, pp. 359-361.
66. Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study, *Mol Ecol*, 14, pp. 2611-2620.
67. Hamrick JL., Godt MJW., 1996, Effects of history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci*, 351, pp. 1683-1685.
68. White TL, Adams WT, Neale DB. 2007. *Forest genetics*. CABI Publishing, Boston, MA, USA. 149-186.
69. 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* 16(6): 568-571

70. Nyborn H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143-1155.