

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Nguyễn Phan Lan Hồng**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI DẦU LÁ  
BÓNG (*DIPTEROCARPUS TURBINATUS*) Ở KHU VỰC  
ĐÔNG NAM BỘ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

*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



**Nguyễn Phan Lan Hồng**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI DẦU LÁ BÓNG  
(DIPTEROCARPUS TURBINATUS) Ở KHU VỰC ĐÔNG NAM BỘ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**  
**Mã số: 8420114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Nguyễn Minh Đức 
2. TS. Vũ Đình Duy 

*Hà Nội – 2023*

## LỜI CAM ĐOAN

Đề tài Luận văn của tôi về “Nghiên cứu đa dạng di truyền loài Dầu lá bóng (*Dipterocarpus turbinatus*) ở khu vực Đông Nam Bộ” do tôi cùng cả nhóm tiến hành.

Tôi xin cam đoan bộ dẫn liệu và các kết quả trong Luận văn này là trung thực và chưa được sử dụng công bố trong bất kỳ tài liệu nào.

Nguồn tài trợ để thực hiện luận văn đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đều được chỉ rõ nguồn gốc.

**Học viên**



**Nguyễn Phan Lan Hồng**

## LỜI CẢM ƠN

Đề tài nghiên cứu của tôi được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Sinh thái nhiệt đới – Trung tâm Nghiên cứu Nhiệt đới Việt-Nga. Qua đây, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban lãnh đạo các viện.

Tôi cảm ơn tới Tiến sĩ Nguyễn Minh Đức và Tiến sĩ Vũ Đình Duy, đã nhiệt tình hướng dẫn trong quá trình thực hiện luận văn. Cảm ơn những góp ý, chỉ dẫn, chia sẻ kinh nghiệm của các cán bộ nghiên cứu thuộc Viện Nghiên cứu Hệ gen và Viện Sinh thái Nhiệt đới trong quá trình thực hiện luận văn.

Trong quá trình học tập và công tác, tôi đã nhận được sự động viên, quan tâm và giúp đỡ nhiệt tình của Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo và các thầy cô khoa Công nghệ Sinh học - Học viện Khoa học và Công nghệ, bạn bè và các đồng nghiệp, nơi tôi công tác và học tập.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn tới gia đình và những người thân đã luôn bên tôi, là động lực để tôi hoàn thành luận văn.

Đề tài được tài trợ từ Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số THTETN03/21-23.

*Hà Nội, ngày 17 tháng 10 năm 2023*

**Học viên**



**Nguyễn Phan Lan Hồng**

## MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT .....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ.....	vii
MỞ ĐẦU .....	1
Đặt vấn đề .....	1
Mục tiêu và nội dung nghiên cứu.....	2
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	3
1.1. Tổng quan về họ Dầu (Dipterocarpaceae) .....	3
1.2. Loài Dầu lá bóng.....	4
1.3. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	5
1.4. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	7
Chương 2. ĐỊA ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	10
2.1. ĐỊA ĐIỂM THU MẪU.....	10
2.2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU .....	11
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	12
2.2.1. Các bước thực hiện.....	12
2.2.2. Thu thập mẫu ở thực địa.....	12
2.2.3. Tách chiết DNA.....	12
2.2.4. Trình tự nucleotide chỉ thị microsatellite .....	12
2.2.5. Nhân bản DNA bằng phản ứng chuỗi PCR (Polymerase Chain Reaction).....	13
2.2.6. Điện di .....	14
2.2.7. Phân tích số liệu.....	15
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	18
3.1. Kết quả tách chiết DNA và nhân bản PCR.....	18

3.2. Xác định kết quả các chỉ thị microsatellite .....	21
3.3. Các chỉ số đa dạng di truyền quần thể và loài Dầu lá bóng.....	22
3.3.1. Số allele và tần số allele .....	22
3.3.2. Đa dạng di truyền quần thể.....	25
3.3.2.1. Đa dạng di truyền ở locus .....	25
3.3.2.2. Chỉ số di truyền khác nhau ở quần thể.....	27
3.3.2.3. Hệ số thụ phấn cận noãn và suy giảm kích thước quần thể.....	29
3.3.2.4. Khoảng cách di truyền khác nhau và tương đồng di truyền giữa các quần thể.....	29
3.3.3. Cấu trúc di truyền quần thể Dầu lá bóng.....	30
3.3.3.1. Mức độ di truyền khác nhau ở các quần thể .....	30
3.3.3.2. Phân tích di truyền khác nhau ở mức độ phân tử.....	32
3.3.3.3. Phân tích di truyền giữa các cá thể và giữa các quần thể .....	32
KẾT LUẬN.....	38
KIẾN NGHỊ .....	38
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	40
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	41

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT**

PCR	Phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction)
DNA	Axít Deoxyribonucleotide
ARN	Axít Ribonucleotide
bp	Cặp bazơ (base pair)
BTTNVN	Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam
CITES	Công ước về buôn bán quốc tế các loài động, thực vật hoang dã nguy cấp (Convention on International Trade in Endangered Species)
CR	Rất nguy cấp (Critically Endangered)
EN	Nguy cấp (Endangered)
IUCN	Hiệp hội bảo vệ thiên nhiên quốc tế (International Union for Conservation of Nature)
KBTTN	Khu bảo tồn thiên nhiên
NJ	Neighbor-joining
VQG	Vườn quốc gia

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<b>Bảng 2.1.</b> Đặc điểm nơi thu thập mẫu DNA .....	10
<b>Bảng 2.2.</b> Trình tự nucleotide tám cặp chỉ thị SSR .....	13
<b>Bảng 3.1.</b> Số lượng allele và hệ số PIC, PD và Rp cho 8 cặp chỉ thị microsatellite .....	21
<b>Bảng 3.2.</b> Tần số allele ở mức độ locus của 8 quần thể Dầu lá bóng .....	24
<b>Bảng 3.3.</b> Thông số đa dạng di truyền ở mỗi locus microsatellite loài Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ .....	26
<b>Bảng 3.4.</b> Thông số di truyền cho 8 quần thể loài Dầu lá bóng .....	27
<b>Bảng 3.5.</b> Khoảng cách di truyền (dưới) và hệ số tương đồng di truyền (trên) .....	30
<b>Bảng 3.6.</b> Mức độ di truyền khác nhau giữa các cặp quần thể (dưới) và mức độ tin cậy ở các cặp quần thể (trên) .....	31
<b>Bảng 3.7.</b> Phân tích AMOVA của loài Dầu lá bóng .....	32



## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

<b>Hình 1.1.</b> Cây Dầu lá bóng ở Tân Phú .....	4
<b>Hình 2.1.</b> Vị trí nơi thu thập mẫu DNA loài Dầu lá bóng .....	11
<b>Hình 3.1.</b> DNA của một số mẫu vỏ cây loài Dầu lá bóng. 1-18 mẫu thu thập ở Tân Phú (trên); 1-25 mẫu thu thập ở Bình Châu, 25- 50: mẫu thu ở Phước Thuận (dưới) .....	19
<b>Hình 3.2.</b> Các băng sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide 7% với chỉ thị DT07, DT09, DT10 và Shc11; M: thang DNA 25bp; giếng 1 – 24 là các mẫu vỏ cây Dầu lá bóng ở Tân Phú .....	20
<b>Hình 3.3.</b> Không gian phân bố của 8 quần thể Dầu lá bóng .....	22
<b>Hình 3.4.</b> Cây Neighbor-joining (NJ) giữa các quần thể Dầu lá bóng .....	33
<b>Hình 3.5.</b> DeltaK của nhóm gen K từ 1 đến 10 bằng phân tích STRUCTURE cho 8 quần thể Dầu lá bóng ở Đông Nam Bộ .....	34
<b>Hình 3.6.</b> Giá trị trung bình của sắc xuất phân bố dẫn liệu (LnP(D)) và độ lệch chuẩn cho mỗi giá trị K từ 1 đến 10 dùng phân tích Structure cho 8 quần thể Dầu lá bóng và Structure Harvester .....	35
<b>Hình 3.7.</b> Mức độ trộn lẫn giữa các nhóm gen trên cơ sở phân tích STRUCTURE cho 8 quần thể Dầu lá bóng ở Đông Nam Bộ .....	36
<b>Hình 3.8.</b> Mức độ chồng lấn di truyền giữa các quần thể Dầu lá bóng .....	37

## MỞ ĐẦU

### Đặt vấn đề

Phân tích đa dạng di truyền là khái niệm ban đầu của di truyền quần thể. Đa dạng di truyền và cấu trúc di truyền có vai trò quan trọng cho mỗi loài thực vật, cho phép chúng tồn tại trong không gian và thay đổi theo thời gian với các điều kiện môi trường sống. Với mức độ đa dạng di truyền cao, chúng có khả năng thích nghi cao với biến đổi môi trường, làm giảm nguy cơ tuyệt chủng. Đa dạng di truyền phụ thuộc vào sự thụ phấn, trao đổi di truyền, chọn lọc tự nhiên, biến dị, và trôi dạt di truyền. Hiểu biết về đa dạng di truyền giữa các quần thể đóng vai trò chính cho công tác bảo tồn và quản lý nguồn tài nguyên, đồng thời áp dụng cho chương trình nhân giống.

Rừng nhiệt đới Châu Á là một trong những trung tâm đa dạng sinh học của toàn cầu. Nhiều loài cây dầu (Dipterocarpaceae) chiếm ưu thế ở đây. Khoảng trên 450 loài thuộc 13 chi của họ Dầu (Dipterocarpaceae) được tìm thấy trong rừng nhiệt đới Châu Á, các loài này đều có ý nghĩa về môi trường và thương mại. Ở Việt Nam, có khoảng 45 loài cây dầu thuộc 6 chi, xuất hiện phổ biến ở Đông Nam Bộ. Hơn nửa thế kỷ qua, các loài cây dầu đã bị ảnh hưởng mạnh bởi các hoạt động như phá rừng và quản lý rừng không bền vững do khai thác quá mức cho mục đích thương mại và dân sinh. Một số loài đang bị đe dọa, thậm chí ở mức độ nguy cấp.

Hiện nay, để bảo tồn các loài cây dầu đang bị đe dọa, thông tin về mức độ đa dạng di truyền và cấu trúc di truyền quần thể đóng vai trò quan trọng để đóng góp vào công việc đưa ra các giải pháp bảo tồn hữu hiệu. Hướng nghiên cứu này đã được thực hiện và có kết quả hữu hiệu cho nhiều loài thực vật trong những năm gần đây. Loài Dầu lá bóng đang bị đe dọa ở mức nguy hiểm, để bảo tồn loài này, chúng tôi thiếu thông tin về di truyền và cấu trúc di truyền quần thể của loài ở nước ta. Chính vì vậy, trong Luận văn này, chúng tôi điều tra tính đa dạng di truyền và cấu trúc quần

thể của loài Dầu lá bóng (*Dipterocarpus turbinatus*) ở khu vực Đông Nam Bộ, dùng các cặp chỉ thị microsatellite. Đây sẽ là cơ sở quan trọng để cung cấp các thông tin cần thiết cho công tác bảo tồn, phục hồi và quản lý bền vững loài này ở Việt Nam.

### **Mục tiêu và nội dung nghiên cứu.**

#### **- Mục tiêu nghiên cứu:**

- Đánh giá được tần số allele của các locus nghiên cứu của loài Dầu lá bóng;
- Xác định được di truyền quần thể của loài Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ;
- Xác định được di truyền khác nhau giữa các quần thể của loài Dầu lá bóng.

#### **- Nội dung nghiên cứu**

- Tần số allele cho 8 locus, như tần số allele phổ biến, alen hiếm và mức độ tương quan tần số allele ở các locus khác nhau.
- Mức độ di truyền của tám quần thể, dùng 8 cặp chỉ thị microsatellite.
- Cấu trúc di truyền dùng các thông số như khác nhau di truyền của các cặp quần thể, dòng gen, xây dựng cây Neighbor-joining, và phân tích Bayesian và phân tích DAPC (discriminant analysis of principal component).

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Tổng quan về họ Dầu (Dipterocarpaceae)

Họ Dầu (Dipterocarpaceae) gồm 680 loài với 17 chi và được chia thành ba họ phụ: Dipterocarpoideae, Pakaraimoideae và Monotoideae [1]. Họ phụ Dipteropoideae gồm khoảng 600 loài, phân bố chủ yếu ở Châu Á, bao gồm từ Sri Lanka, Ấn Độ đến Nam Trung Quốc, đảo Batan và New Guinea. Họ phụ Monotoideae gồm 39 loài thuộc 2 chi ở Châu Phi và 1 chi *Pseudomonotes* ở Nam Mỹ, và họ phụ Pakaraimoideae từ Guyana (Nam Mỹ). Ở Châu Á, họ phụ Dipterocarpoideae được chia thành 2 tông, Dipterocarpeae và Shoreae. Tông Shoreae có thành phần loài đa dạng hơn so với tông Dipterocarpeae, do số loài nhiều trong chi *Shorea* và *Hopea*. Chi *Shorea* có số loài lớn nhất và là chi có tầm quan trọng về kinh tế lớn, với khoảng 200 loài, chủ yếu phân bố ở Indonesia, trong khi đó chi *Hopea* có khoảng 100 loài [2]. Trung Quốc có khoảng 11 loài với 5 chi [3].

Ở Việt Nam, rừng có thành phần loài phong phú và đa dạng, được xếp vào 1 trong 16 vùng đa dạng sinh học cao trên thế giới [4]. Rừng nước ta có khoảng 12.000 loài thực vật bậc cao [5]. Theo Nguyễn Hoàng Nghĩa, họ Dầu (Dipterocarpaceae) có khoảng 45 loài cây dầu, với 6 chi ở Việt Nam [6]. Chi Vân vân (*Anisoptera*) có 1 loài, chi Dầu (*Dipterocarpus*) gồm 12 loài, chi Sao (*Hopea*) gồm có 11 loài, chi Chò chỉ (*Parashorea*) gồm 2 loài, chi Sến mù (*Shorea*) gồm có 8 loài và chi Táu (*Vatica*) gồm có 8 loài. Trong đó 33 loài là cây dầu đặc hữu và bản địa. Các cây dầu đều có ý nghĩa về sinh thái và kinh tế cao.

Rừng nhiệt đới được đặc trưng bởi số lượng loài cây cao, do sự xuất hiện đồng thời số loài lớn trong cùng một quần xã. Các loài cây dầu phân bố giới hạn ở vùng khí hậu nhiệt đới với lượng mưa hàng năm vượt trên 1000 mm và mùa khô kéo dài dưới 6 tháng. Do vậy, chúng hầu hết không gặp ở độ cao khoảng 1000 m so với mặt biển. Nhiều loài cây dầu chiếm ưu thế ở tầng tán và, vượt tán, và mọc hỗn giao với các loài khác. Họ dầu là một trong những họ quan trọng nhất của khu vực Đông Nam Á và Đông Nam Bộ nói riêng. Các loài cây dầu là những cây gỗ to có giá trị kinh tế và sinh thái cao. Chúng được dùng làm ván ép, sàn tàu, xây dựng nhà, đồ dùng trong nhà. Bên cạnh đó, nhựa của chúng được sử dụng để bít các khe nứt của tàu thuyền.

Thụ phần chéo chiếm ưu thế cho nhiều loài cây nhiệt đới. Tuy nhiên, tỉ lệ thụ phần chéo bị ảnh hưởng bởi mật độ cây ra hoa và tập tính của côn trùng thụ phấn [7]. Các loài cây dầu có thói quen thụ phần chéo và một số loài có mức độ đáng kể của tự thụ phần. Hoa của cây dầu là lưỡng tính và được thụ phần bởi nhiều loài côn trùng [8]. Một đặc điểm quan trọng của họ Dầu là cây ra hoa không theo mùa. Cây ra hoa rải rác trong khoảng từ 2 đến 5 năm. Ở Việt Nam, cây dầu ra hoa vào tháng 3 đến tháng 4, quả trưởng thành và rụng vào tháng 6 đến tháng 7. Quả phát tán theo gió do chúng có 2 cánh lớn hoặc di chuyển theo dòng nước, cây có thể mọc ở đầm lầy hoặc bờ sông suối.

### 1.2. Loài Dầu lá bóng

Dầu lá bóng (*Dipterocarpus turbinatus*) phát triển tự nhiên trong rừng nhiệt đới ẩm ở Campuchia, Lào, Thái Lan và Việt Nam. Ở nước ta, loài cây này được tìm thấy ở trong rừng núi thấp, thường mọc quần tụ gần sông và suối.



Hình 1.1. Cây Dầu lá bóng ở Tân Phú

Dầu bóng là cây gỗ lớn, thân tròn, thẳng, cao đến 40 m, đường kính thân cây 70 – 75 cm. Vỏ màu xám nâu bong thành những mảnh nhỏ. Tán hình nón khá dày. Lá đơn mọc cách hình trứng hay trái xoan thuôn dài. Cụm hoa dài, hoa gần như không cuống. Ống dài có 5 cánh, hai cánh dài to hơn các cánh dài khác. Nhị nhiều, dính thành vòng. Quả lớn, có 5 gờ, có 2 cánh dài phát triển. Gỗ màu nâu đỏ nhạt, thớ thô, bền. Dầu lá bóng đang được sử dụng rộng rãi trong xây dựng và đồ dùng gia đình. Chúng cũng được sử dụng như là nguồn tinh dầu có giá trị. Chúng cũng được sử dụng vì mục đích thương mại. Dầu bóng là cây nguyên liệu chế biến sơn, vecni.

Loài này đang bị đe dọa liên quan đến những hoạt động của con người như phá rừng, nơi sống của loài để phát triển đất nông nghiệp và khai thác gỗ vì mục đích thương mại và dân sinh. Cho đến nay, loài này hiện mới đang được bảo vệ trong các khu bảo tồn hoặc vườn quốc gia. Tuy nhiên, chúng vẫn đang bị đe dọa ở mức độ nguy cấp. Ở mức độ toàn cầu loài cây này đã được đưa vào danh sách các loài đang bị đe dọa ở mức độ, EN A1cd, B1+2c [9]. Ở Việt Nam, do mức độ suy giảm môi trường sống và chặt phá bừa bãi khiến cho loài cây này ở mức độ nguy cấp.

### 1.3. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Trong nhiều thập niên, rừng nhiệt đới là nơi sống của nhiều loài thực vật nói chung và cây dầu nói riêng đã và đang bị suy giảm. Nhiều mảnh rừng đã bị phá hủy và bị phân cắt. Hơn nữa, các loài cây gỗ có giá trị kinh tế và thương mại đã và đang bị khai thác quá mức. Môi trường sống của nhiều loài đang bị thu nhỏ và cô lập. Số quần thể và số cá thể trong quần thể của loài cũng bị giới hạn. Hầu hết các loài đang bị đe dọa đều có số cá thể trong quần thể ít và bị cô lập [7,10,11]. Trong quần thể này, tỉ lệ thụ phấn chéo bị giảm và làm thụ phấn cận noãn. Cuối cùng, quần thể kém thích nghi với biến đổi của môi trường và tăng độ miễn cảm với dịch bệnh [7,12,13]. Kết quả này đã làm mất allele hiếm và gây suy giảm tính đa hình của mỗi locus [14]. Bởi vậy, công việc bảo vệ loài là duy trì tiềm năng tiến hóa và có tính chống chịu tốt trong môi trường thay đổi [15,16]. Trong quần thể với kích thước nhỏ và cô lập, gen phiêu bạt (genetic drift) và thụ phấn cận noãn cao gây ảnh hưởng đến tính đa dạng di truyền [17-19].

Trong vài thập kỷ gần đây, kỹ thuật sinh học phân tử đã được sử dụng rộng rãi để điều tra đa dạng di truyền và đã đóng góp cho công tác bảo tồn và

quản lý bền vững các loài đang bị đe dọa. Các kỹ thuật được sử dụng cho nghiên cứu đa dạng di truyền bao gồm đa hình độ dài các đoạn cắt hạn chế - RFLP (restriction fragment length polymorphisms) [20], đa hình DNA nhân bản ngẫu nhiên - RAPD (random amplified polymorphic DNA) [21], chuỗi lặp lại đơn giản - SSR (microsatellites or simple sequence repeats) [22], và đa hình độ dài đoạn nhân chọn lọc - AFLP (amplified fragment length polymorphisms) [23]. RAPD đã được dùng để điều tra loài cây dầu trong chi *Shorea* [24]. Đa hình độ dài đoạn nhân chọn lọc AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) đã được áp dụng để đánh giá di truyền loài *Shorea leprosula* và *S. parvifolia* ở Indonesia [25]. Kết quả đã chỉ ra loài *S. leprosula* có hệ số đa dạng di truyền cao hơn ( $H_E = 0,16$ ) so với loài *S. parvifolia* ( $H_E = 0,14$ ). Trong những vài thập kỷ gần đây, chỉ thị microsatellite đã được sử dụng nhiều và có nhiều ưu điểm hơn so với các phương pháp trên trong phân tích di truyền của một số loài cây dầu do tính đồng trội, tính đa hình cao, phổ biến trong gen nhân và dễ sử dụng với giá thành thấp [26-28].

Có rất nhiều công bố về di truyền quần thể để phục vụ cho công tác bảo vệ và phục hồi loài [29,30]. Các bài báo đã chỉ ra rằng tỉ lệ thụ phấn giữa các cá thể có quan hệ cận noãn trong quần thể nhỏ và cô lập đã làm tăng hệ số đồng hợp tử và có khả năng giảm sức đề kháng trong môi trường sống bị biến đổi. Mức độ thụ phấn cận noãn cao là nguyên nhân khiến cho mức độ đa dạng di truyền thấp. Sự suy giảm môi trường sống thường gây hạn chế dòng gen giữa các quần thể bị cô lập [31].

Kích thước quần thể nhỏ và cô lập thường liên quan đến hệ số thụ phấn cận noãn giữa các cá thể trong cùng một địa điểm [32,33]. Kết quả này có thể làm tăng tính miễn cảm với dịch bệnh trong môi trường sống của quần thể [34]. Sự phiêu bạt gen ở quần thể có số lượng cá thể ít và cô lập thường dẫn đến khả năng tuyệt chủng cục bộ của loài [17,35]. Hamrick và Godt [36] đã tổng hợp tư liệu của 449 loài thực vật thuộc 165 chi và chỉ ra sự khác nhau về di truyền giữa các nhóm loài khác nhau phụ thuộc vào dạng sống, phân bố, vị trí phân loại, phương thức thụ phấn và cơ chế phát tán hạt. Giá trị trung bình locus đa hình của 473 loài thực vật là 50% và đa dạng di truyền là 0,149 [37]. Loài phân bố rộng có giá trị đa dạng di truyền cao gấp 2 lần so với loài phân bố hẹp. Các loài cây gỗ, sinh sản hữu tính và phát tán hạt phân nhờ côn trùng thường có giá trị đa dạng di truyền cao hơn các loài với đặc điểm sống khác. Đối với quần thể,

chỉ số đa dạng di truyền là 0,113 và tỉ lệ locus đa hình là 34%. Giá trị di truyền cao thường được xuất hiện ở các loài thụ phấn nhờ côn trùng. Dù vậy, đa dạng di truyền giữa các quần thể ở các loài khác nhau có sự khác nhau đáng kể. Loài tự thụ phấn có mức độ khác nhau lớn về mặt di truyền giữa các quần thể trong loài. Mức độ thụ phấn chéo cao là yêu cầu cần thiết để cho sự tồn tại của loài trong môi trường sống, bởi vì nó cho phép cá thể thuộc các thể hệ hiện tại và tương lai đều có thể thích nghi với điều kiện môi trường sống của chúng [38]. Nghiên cứu về lịch sử phát triển quần thể của một số loài cũng đã được đề cập, cho loài *Viola cheranthifolia* (Violaceae) [39], *Chorthippus binotatus* [40].

Đa dạng di truyền cao đã được khám phá cho một số loài cây dầu như *Shorea leprosula* ở Malaysia [41,42], *S. robusta* [43], *Dryobalanops aromatica* [44], *Neobalanocarpus heimii* [45], *S. curtisii* ở Sarangor, Malaysia [46], *Hopea hainanensis* ở Đảo Hải Nam Trung Quốc [47], *Shorea javanica* ở Sumatra, Indonesia [48] và *Vateria indica* ở Malaysia [49]. Mức độ di truyền thấp cũng được quan sát ở loài *Parashorea malaanonan* ở Philippines [50], *S. platyclados* ở Malaysia [51], *H. reticulate* ở Trung Quốc [52].

#### 1.4. Tình hình nghiên cứu trong nước

Nguyễn Hoàng Nghĩa đã đưa ra danh mục các loài dầu ở nước ta, trong đó tác giả mô tả đặc điểm sinh học, sinh thái học, nơi phân bố của khoảng 45 loài dầu. Hiện trạng loài dầu đang bị đe dọa và một số biện pháp bảo tồn và quản lý một số loài dầu cũng đã được đề cập [53,54]. Nghiên cứu lâm sinh của một số loài dầu cũng được đề cập. Nguyễn Thị Hải Hồng và cộng sự đã đề cập đến chất dinh dưỡng của bầu cây ảnh hưởng đến phát triển hạt giống của Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*) và Sao đen (*Hopea odorata*) trong thời kỳ ươm giống ở Công ty Giống lâm nghiệp Nam Bộ và chỉ ra chất lượng đất mặt là một trong những yếu tố quan trọng trong sản xuất cây giống [55]. Dầu rái và sao đen sinh trưởng tốt, chiều cao >77 cm và >86 cm, và đường kính >6mm và 4,6 mm, tương ứng, khi cây 12 tháng tuổi. Bùi Trung đã quan tâm đến khả năng ra rễ của hom giâm Sao đen tại huyện A Lưới (Thừa Thiên Huế). Nồng độ NAA (axit naphthyl acetic) 1000ppm với thời gian hom giâm 5 giây có tác dụng kích thích ra rễ. Một số công trình khác đã xác định số cá thể sống sót của Sao đen và Dầu rái trồng tại Mã Đà [56]. Hoàng Phú Mỹ và Võ Đại Hải đã đánh giá mô hình trồng rừng phòng hộ hỗn giao 3 loài Dầu rái (*D. alatus*), Sao đen (*H. odorata*) và Thanh thất (*Ailanthus malabarica*) sau 5 năm thực hiện ở Đá



Giăng, huyện Sông Cầu tỉnh Phú Yên với diện tích 10 ha [57]. Kết quả chỉ ra số cá thể sống sót cao nhất đối với loài Sao đen (70,4%), tiếp theo là Dầu rái (64,8%) và Thanh thất (64,2%). Loài Dầu rái có kích thước sinh trưởng đường kính đạt 4,68 cm và chiều cao vút ngọn 2,58 m. Loài Sao đen có kích thước sinh trưởng đường kính đạt 4,53 cm và chiều cao 3,15 m. Các yếu tố trồng rừng có ảnh hưởng đến phát triển của Sao đen và Dầu rái, cũng như biến động chất lượng của 2 loài này trong mô hình phục hồi rừng tại Khu Bảo tồn Thiên nhiên – Văn hóa Đông Nai cũng được đề cập bởi Tô Bá Thanh với cộng sự và Bùi Việt Hải với cộng sự [58,59].

Nguyễn Đức Thành và cộng sự đã phân tích tính đa hình di truyền của 17 loài dầu bằng 7 chỉ thị RAPD và 4 cặp chỉ thị lục lạp, và đã khám phá chỉ số đa dạng di truyền khác nhau từ 0,18 đến 0,58 [60]. Nguyễn Đức Thành và cộng sự đã chỉ ra di truyền của loài Sao mạng (*Hopea reticulata* Tardicu) bằng chỉ thị RAPD và một số gen lục lạp là thấp [61]. Nguyễn Thị Hải Hồng và cộng sự (2012) đã phân tích mẫu lá Dầu nước (*D. alatus*) thu thập từ 10 tỉnh thuộc 3 vùng sinh thái lâm nghiệp bằng 18 chỉ thị RAPD [55].

Để bảo vệ và phát triển loài đang bị đe dọa đã có một số nghiên cứu về di truyền của một số loài cây rừng đang bị đe dọa [62-66], đặc biệt một số loài cây họ Dầu (*Dipterocarpaceae*) đang bị đe dọa tuyệt chủng [67,68]. Nguyễn Minh Đức với cộng sự [68] và Vũ Đình Duy với cộng sự [66] đã điều tra đa dạng di truyền của loài Dầu nước (*Dipterocarpus alatus*) và Dầu mít (*D. costatus*) ở một số tỉnh miền Nam Việt Nam bằng các chỉ thị microsatellite và chỉ ra sự suy giảm môi trường sống và kích thước quần thể ảnh hưởng đến tính các thông số di truyền. Mức độ đa dạng di truyền thấp đã được xác định. Dòng gen giữa các quần thể cao (>1) thường biểu hiện ở các quần thể có cùng nơi phân bố như đơn vị tỉnh [69,66]. Cụ thể, dòng gen giữa các quần thể ở vườn Quốc gia Cát Tiên, khu bảo tồn Mã Đà và rừng đặc dụng Tân Phú thuộc tỉnh Đồng Nai, có hệ số trao đổi di truyền lớn hơn 1; trong khi đó, dòng gen giữa các quần thể ở Mã Đà, tỉnh Đồng Nai, Lò Gò-Xa Mát tỉnh Tây Ninh và Bù Gia Mập tỉnh Bình Phước, có dòng gen nhỏ hơn 1. Đối với Sao đen (*Hopea odorata*) cũng có kết quả tương đồng [67]. Gen lục lạp (*matK*) đã được sử dụng để điều tra 11 loài cây dầu thuộc chi Dầu (*Dipterocarpus*) cho thấy các loài trong một chi này có quan hệ gần gũi với nhau [70]. Nguyễn Thị Phương Trang và cộng sự đã dùng 3 gen *rcbL*, *psbA-trnH* và *matK* để khảo sát di

truyền Sao hòn gai (*Hopea chinensis*), Sao hải nam (*H. hainanensis*) và Sao mặt quỷ (*H. mollissima*) và chỉ ra sự khác nhau giữa 3 loài Sao hòn gai (*Hopea chinensis*), Sao hải nam (*H. hainanensis*) và Sao mặt quỷ (*H. mollissima*) là rất thấp, (từ 0,2 đến 0,6) [69]. Nguyễn Minh Tâm và cộng sự đã phân tích tính đa dạng di truyền của loài Vên vên ở Việt Nam và đã khám phá di truyền bị ảnh hưởng từ các yếu tố liên quan đến hoạt động của con người [64]. Nghiên cứu về loài Dầu cát (*D. condorensis*) cũng cho thấy sự xói mòn di truyền liên quan môi trường sống và kích thước quần thể nhỏ [71]. Trong các nghiên cứu này, sự suy giảm các thông số di truyền liên quan đến kích thước quần thể nhỏ và số lượng quần thể ít và cô lập. Mức độ đa dạng di truyền cao cũng được xác định cho loài Dầu song nàng (*D. dyeri*) ở Đông Nam Bộ [62]. Cũng loài Dầu song nàng, Nguyễn Minh Tâm và cộng sự [63] đã xác định được mức độ thụ phấn chéo cao (trên 80%) ở Đông Nam Bộ.

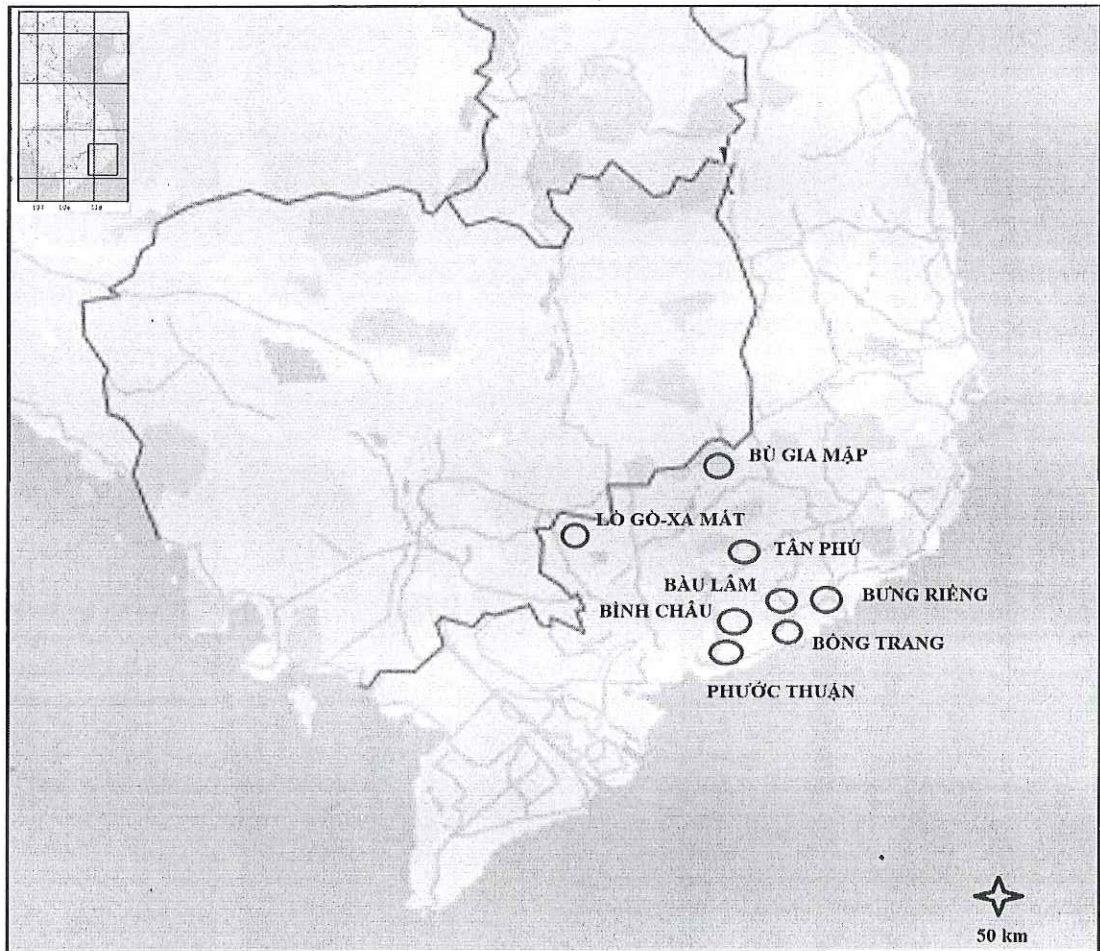
## Chương 2. ĐỊA ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỊA ĐIỂM THU MẪU

Thu mẫu cho phân tích di truyền được thực hiện tại 8 địa điểm thuộc 4 tỉnh ở khu vực Đông Nam Bộ, bao gồm Bông Trang, Bung Riềng, Bình Châu, Phước Thuận và Bàu Lâm thuộc huyện Xuyên Mộc tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu, Vườn Quốc gia Lò Gò-Xa Mát, huyện Tân Biên tỉnh Tây Ninh, Vườn Quốc gia Bù Gia Mập, huyện Bù Gia Mập tỉnh Bình Phước và rừng đầu nguồn Tân Phú, huyện Định Quán tỉnh Đồng Nai. Đặc điểm và vị trí nơi thu thập mẫu cho phân tích đa dạng di truyền quần thể và loài được trình bày ở Bảng 2.1 và Hình 2.2.

**Bảng 2.1.** Đặc điểm nơi thu thập mẫu DNA

Quần thể	Số mẫu	Nơi thu thập	Độ cao (m)	Vị trí địa lý
Bông Trang	20	Bông Trang, Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu	96-115	10°31' vĩ độ Bắc; 107°32' kinh độ Đông
Bung Riềng	22	Bung Riềng, Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu	95-122	10°33' vĩ độ Bắc 107°32' kinh độ Đông
Bình Châu	25	Bình Châu, Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu	92-112	12°30' vĩ độ Bắc 107°29' kinh độ Đông
Bàu Lâm	22	Bàu Lâm, Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu	104-130	12°28' vĩ độ Bắc 107°31' kinh độ Đông
Phước Thuận	25	Phước Thuận, Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu	120-137	10°29' vĩ độ Bắc, 107°30' kinh độ Đông
Lò Gò-Xa Mát	20	Tân Biên, Tây Ninh	16-28	11°26' vĩ độ Bắc 105°54' kinh độ Đông
Tân Phú	24	Định Quán, Đồng Nai	86-120	11°20' vĩ độ Bắc 107°25' kinh độ Đông
Bù Gia Mập	24	Bù Đăng, Bình Phước	235-334	12°10' vĩ độ Bắc 107°09' kinh độ Đông



**Hình 2.1.** Vị trí nơi thu thập mẫu DNA loài Dầu lá bóng

## 2.2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Chúng tôi thu thập 181 mẫu vỏ cây của loài Dầu lá bóng từ 8 quần thể ở khu vực Đông Nam Bộ để sử dụng cho thí nghiệm tách chiết DNA tổng số, nhân bản DNA và điện di sản phẩm PCR.

*Hóa chất* được sử dụng cho phân tích di truyền gồm có: cồn 98%, ni tơ lỏng, agarose, tách chiết DNA tổng số dùng kit the Plant Genome DNA Extraction Kit (BioTeke, Beijing, China). Nhân bản DNA bằng phản ứng PCR dùng kit 2X Taq Master mix (Thermo, USA), kit RNase để tinh sạch sản phẩm. Xác định các sản phẩm PCR trên gel điện di 7% bao gồm TEMED, acrylamide, bis-acrylamide, DNA ladder, Loading star.

*Dụng cụ thí nghiệm:* ống falcon, micropipettr tips 10 $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000 $\mu$ l, Eppendorf tubes 0,5 ml, 1,5 ml và 2.0 ml, PCR thin-wall 0,2ml, găng tay các cỡ khác nhau. Máy nhân bản PCR: GeneAmp PCR System 9700 (Applied

Biosystems), Cối nghiền mẫu, máy đo nồng độ DNA NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA), máy đo quang phổ kế UV-1601 (UV-Visible Spectrophotometer), máy nghiền mẫu DNA Mixer mill MM 400 (Retsch), hệ thống điện di đứng a Sequi-Gen®GT DNA electrophoresis system, hệ thống điện di ngang, vortex, cân phân tích, máy ly tâm, bể ủ nhiệt, hệ thống lọc nước, máy chụp ảnh BioDocAnalyze (Biometra, Germany).

## 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Các bước thực hiện

- Thu thập mẫu để phân tích;
- Tách chiết, kiểm tra và tinh sạch DNA tổng số từ 181 mẫu từ 8 quần thể loài Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ;
- Sử dụng phương pháp PCR với 8 cặp mồi SSR;
- Điện di sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di gel polyacrylamide;
- Phân tích kết quả nghiên cứu bằng các phần mềm chuyên dụng.

### 2.2.2. Thu thập mẫu ở thực địa.

Mẫu được thu theo tuyến ở mỗi khu vực khảo sát. Chiều dài tuyến thu thập mẫu khoảng 2 đến 3 km, tùy thuộc vào sự có mặt của cây Dầu lá bóng. Do cây trưởng thành cao trên 30 m, chúng tôi chỉ thu mẫu vỏ cho phân tích di truyền. Mẫu gồm các cây trưởng thành. Do số lượng cá thể trong mỗi khu vực nghiên cứu khá lớn, mẫu được thu ngẫu nhiên. Khoảng cách hai mẫu liên tiếp tối thiểu khoảng 50 m. Tổng số 181 mẫu đã được thu thập tại 8 khu bảo vệ và vườn Quốc gia.

### 2.2.3. Tách chiết DNA

DNA tổng số được tách từ các mẫu vỏ cây dùng kit tách Plant Genome DNA Extraction Kit (BioTeke, Beijing, China). Các bước tách chiết DNA tổng số được tiến hành theo quy trình của nhà sản xuất kit của nhà sản xuất.

### 2.2.4. Trình tự nucleotide chỉ thị microsatellite

Trình tự nucleotide của tám cặp chỉ thị microsatellite sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2.2.

**Bảng 2.2.** Trình tự nucleotide tám cặp chỉ thị SSR

Chỉ thị SSR	Số lần lặp lại	Trình tự nucleotide SSR (5'-3')	Nhiệt độ gắn mỗi	Tài liệu trích dẫn
DT07	(GA) <sub>15</sub>	F: CTAAAATTTGCCCTTCC R: TTTCTCTTTGCCCTGTT	52	[27]
DT09	(GA) <sub>24</sub>	F: TAATACCAATTCCAAGATTC R: TGAGCCAATGCTATTATTTC	52	[27]
DT18	(CA) <sub>10</sub> A <sub>13</sub>	F: GATCATCCAGGAGGGGAATA R: CAGGGGAAGAAAGTCGTCAT	56	[27]
DT20	(GA) <sub>17</sub>	F: ACATCCTGCATTGGTATTTA R: AGTTTATTTTGCTTGGTTTA	52	[27]
Shc11	(CT) <sub>4</sub> CA(CT) <sub>5</sub>	F: ATCTG TTCTT CTACA AGCC R: TTAGA ACTTG AGTCA GATAC	54	[26]
Shc07	(CT) <sub>8</sub> CA(CT) <sub>5</sub> C ACCC(CTCA) <sub>3</sub> CT(CA) <sub>10</sub>	F: ATGTC CATGT TTGAG TG R: CATGG ACATA AGTGG AG	54	[26]
DT38	(GA) <sub>25</sub>	F: GCTAAAAGACTGGAAGAATA R: AGAGCTCATAATCAAAAACA	50	[27]
Shc01	(CT) <sub>8</sub> (CA) <sub>10</sub> CT(CA) <sub>4</sub> CTCA	F: CCTAT TGGCA AGGAT GTTCA R: CTTAT GAGAT CAATT TGACA G	56	[26]

### 2.2.5. Nhân bản DNA bằng phản ứng chuỗi PCR (Polymerase Chain Reaction)

Để thực hiện phản ứng PCR, nồng độ DNA tổng số của mỗi mẫu được pha thành 10ng/μl. Các chỉ thị được pha đến nồng độ 10pM. Phản ứng PCR được tiến hành trong thể tích 25μl, bao gồm 1,5 μl DNA mẫu, 12 μl Taq Master Mix, 9,5 μl nước cất 2 lần và 1 μl cho mỗi chỉ thị xuôi hoặc ngược. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Các bước tiến hành của chu trình nhiệt gồm có:

Bước 1: Biến tính ban đầu ở 94°C cho 3 phút.

Bước 2: 35 chu kỳ với 3 bước phụ:

- Nhiệt độ biến tính 94°C cho 1 phút;

- Nhiệt độ gắn môi, phụ thuộc vào mỗi cặp môi microsatellite khác nhau (Bảng 2.4);
- Kéo dài: ở nhiệt độ 72°C cho 1 phút.

Bước 3: Phản ứng kết thúc hoàn toàn, ở nhiệt độ 72°C cho 10 phút. Sau đó mẫu được bảo quản -4°C trong tủ lạnh cho đến khi phân tích tiếp theo.

## 2.2.6. Điện di

### a. Điện di trên gel agarose

Để xác định số lượng và chất lượng DNA tổng số cho mỗi mẫu, chúng tôi đo quang phổ kế trên máy NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) hoặc điện di trên gel agarose 1%. Đây là gel phổ biến và được sử dụng để xác định chất lượng DNA tổng số do giá thành rẻ và thao tác đơn giản. Chúng tôi tiến hành kiểm tra DNA bằng hệ thống điện di ngang (BIORAD, CA, USA). Đệm điện di là dung dịch TAE 1X, và nhuộm gel bằng GelRed™ Nucleic Acid gel Stain (CLEARVER, USA).

### b. Điện di gel Polyacrylamide.

Để xác định sản phẩm PCR, chúng tôi sử dụng hệ thống điện di đứng của hãng BIORAD (CA, USA) dùng gel polyacrylamide 7%. Điện di trên bản gel polyacrylamide theo nguyên tắc trao đổi điện tích dưới ảnh hưởng của điện trường. Các phân tử sinh học đều chứa các nhóm ion, do đó tại môi trường pH nào đó, tồn tại trong dung dịch như chất mang điện tích dương hoặc âm. Dưới ảnh hưởng của điện trường, các phân tử sẽ di chuyển về cực dương hoặc cực âm, phụ thuộc vào tổng điện tích của chúng. Thiết bị điện di gồm 2 phần, nguồn điện và điện di. Bộ phận điện di dùng để tách phân tử trong gel acrylamide. Gel được hình thành giữa 2 tấm kính và được cố định bởi các thanh mica nhỏ. Kích thước gel 26 x 20 cm với độ dày 1,2 mm. Tấm lọc mica được đặt vào dung dịch gel và lấy ra sau khi các giếng mẫu được tạo ra. Sau khi thiết bị điện di được lắp đặt, xung quanh bản gel được bao bởi dung dịch đệm điện di. Điện di được thực hiện trong dung dịch đệm để duy trì trạng thái ổn định quá trình ion hóa các phân tử được tách ra. Giá trị pH khác nhau có thể thay đổi tổng điện tích và do vậy làm di chuyển các phân tử.

*Chuẩn bị gel:* Gel làm giảm dòng điện đối lưu và khuếch tán những phân tử được tách ra thành từng vùng với hình dạng cụ thể. Gel polyacrylamide được

hình thành từ quá trình liên kết các phân tử acrylamide với sự xuất hiện số lượng nhỏ bis-acrylamide. Bis-acrylamide là hai phân tử acrylamide liên kết với nhau bởi nhóm methylene và được sử dụng như là chất liên kết. Các phân tử acrylamide được liên kết với nhau và tạo thành chuỗi dài. Quá trình liên kết acrylamide được khởi đầu bởi sự xuất hiện của ammonium persulphate (PER) và tetramethylenediamine (TEMED), TEMED xúc tác sự phân hủy ion persulphate để tạo ra gốc tự do. Bằng cách này chuỗi acrylamide được thiết lập. Gel chạy được thiết lập bởi 1,5M tris-Cl, pH 8,8 gồm 10% acrylamide, bổ sung PER và TEMED. Gel gồm 0,5 Tris-Cl, pH 8,8 với 4,5% acrylamide, cũng được bổ sung PER và TEMED. Gel được chuẩn bị trước một ngày, đóng gói bằng giấy bạc để tránh mất nước và bảo quản 4°C trong tủ lạnh thường.

*Điện di:* Mỗi gel được lắp vào thiết bị điện di cùng với dung dịch điện di được làm bằng Tris-Cl, glycine và hòa tan trong nước. Cầu nối dòng điện giữa gel và dung dịch điện di được làm bởi dây dẫn. Chất nhuộm trong dung dịch mẫu cho phép xác định quá trình chạy điện di. Khi chất nhuộm tới đáy của bản điện gel, dòng điện được ngắt và lấy bản gel và thực hiện quá trình nhuộm với loading dye. Thời gian điện di khoảng 3 giờ.

*Ghi nhận kết quả:* Sau khi nhuộm, bản gel được rửa vài lần bằng nước bình thường. Bản gel được chụp ảnh dưới ánh sáng UV của máy BioDocAnalyze (Biometra, Germany). Chúng tôi dùng thang chuẩn 25 bp để nhận biết kích thước các sản phẩm PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### **2.2.7. Phân tích số liệu**

Trước tiên, chúng tôi xác định hiệu quả của mỗi cặp chỉ thị microsatellite theo Anderson và cộng sự, bao gồm, hệ số đa hình (PIC – Polymorphism information content) [72]. Đặc tính chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp chỉ thị microsatellite ( $R_p$  - Resolving power) và mức khác biệt giữa các cặp cá thể ( $P_p$  - Discrimination power).

Ở đây, giá trị PIC được tính theo công thức:  $PIC = 2F(1 - F)$ , trong đó  $F$  là tần số của allele quan sát và  $(1 - F)$  tần số của allele lặn.  $D_p = 1 - \sum P_i^2$ , trong đó  $P_i$  là tần số allele của allele thứ  $i$ .  $R_p = \sum I_b$ , trong đó  $I_b = 1 - [2(|0,5 - p|)]$ , trong đó  $p$  là tỉ lệ phần trăm chứa allele. Bộ số liệu microsatellite đã được kiểm tra để xác định allele lặn bằng phần mềm Micro-Checker [73].

Tần số alen tại các locus được tính toán và kiểm định giả thuyết khi bình phương về khả năng phù hợp với phương trình Hardy-Weinberg (HWE) cũng



được thực hiện cho locus đa hình. Các thông số quan trọng trong nghiên cứu di truyền quần thể được xác định và phân tích gồm có; Số alen tại mỗi locus ( $N_A$ ), phần trăm locus đa hình ( $P\%$ ) với độ tin cậy 95%, số allele hữu hiệu ( $A_E$ ), số allele giàu ( $A_R$ ). Hệ số gen dị hợp tử quan sát ( $H_O$ ) và hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng ( $H_E$ ) dưới điều kiện cân bằng phương trình HWE. Giá trị  $A_E$  được tính theo công thức:  $A_E = 1/(1-H_e) = 1 / \sum P_i^2$ , trong đó:  $P_i$  là tần số alen thứ  $i$ .  $H_o = (\sum(\text{số } H_E/N))/k$ , trong đó:  $k$  là số quần thể và  $N$  là kích thước quần thể.  $H_E$  cho mỗi locus và quần thể được tính theo công thức:  $H_E=1-p_i^2$  với  $p$  là tần số allele. Giá trị hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng cho loài ( $H_T$ ) được tính theo công thức:  $H_T = 1-\sum p_{ai}^2$ , trong đó:  $p_{ai}$  là tần số allele trung bình của quần thể. Các chỉ số thống kê  $F$  của Wright cũng được sử dụng để đánh giá sự phân bố allele trong và được xem xét như là chỉ số Fix ( $F$ ). Giá trị  $F$  được tính bởi công thức:  $F = 1-H_O/H_E$ . Giá trị  $F$  dao động từ  $-1$  đến  $+1$ . Nếu  $F>0$ , chỉ ra sự thiếu hụt hệ số gen dị hợp tử. Giá trị  $F_{IS}$  - hệ số dư thừa gen đồng hợp tử trong mỗi locus và quần thể, và được gọi là hệ số cận noãn. Giá trị  $F$  được tính theo công thức:  $F_{IS} = [H_E-H_o]/H_E$  với  $-1<F_{IS}<1$ , trong đó  $H_E$  là chỉ số gen dị hợp tử kỳ vọng trung bình cho tất cả các quần thể nghiên cứu của loài. Giá trị khác nhau của các cặp quần thể hoặc các cặp locus ( $F_{ST}$ ).  $F_{ST}$  được tính như sau:  $F_{ST} = (H_T - H_E)/H_T$ , với  $0<F_{ST}<1$ .  $F_{IT}$  là hệ số cận noãn ở mức độ loài và được tính theo  $F_{IT} = [H_T-H_o]/H_t$  với  $-1<F_{IT}<1$ . Giá trị  $G'_{ST}$  chỉ ra mức độ khác nhau cho các cặp locus hoặc cho các cặp quần thể theo Hedrick và được tính theo công thức:  $G'_{ST} = G_{ST}/G_{STM}$ , trong đó:  $G_{ST}$  là được tính bởi công thức:  $G_{ST} = (H_T-H_E)/H_T$ , và  $G_{STM}$  là giá trị  $G_{ST}$  cao nhất [74]. Khoảng cách di truyền giữa các quần thể hoặc giữa 2 lá thể được tính theo công thức:  $D = -\ln I$ , trong đó:  $I$  là hệ số di truyền tương đồng giữa 2 quần thể hoặc cá thể, và được tính theo công thức:  $I = J_{xy}/(J_x J_y)^{1/2}$ . Ở đây,  $J_x$ ,  $J_y$  và  $J_{xy}$  là giá trị trung bình của  $j_x$ ,  $j_y$  và  $j_{xy}$  cho tất cả locus, bao gồm cả locus đồng hợp tử. Đối với 1 locus,  $j_x$  là xác suất mà 2 allele xuất hiện ngẫu nhiên từ quần thể thứ  $x$ , và  $j_x = p_{ix}^2$  cho một locus với  $i$  allele. Đối với quần thể, thứ  $y$  thì  $j_y = p_{iy}^2$  và xác suất chỉ ra rằng 2 allele là tương đồng với 1 từ quần thể thứ  $x$  và 1 từ quần thể thứ  $y$ .  $j_{xy}$  được tính theo công thức  $j_{xy} = P_{ix}P_{iy}$ . Dòng gen giữa các quần thể hoặc giữa các locus ( $N_m$ ) được tính theo công thức:  $N_m = [(1 / F_{ST}) - 1] / 4$ . Tất cả các thông số này được tính theo phần mềm GenAlEx và Fstat [75, 76]. Đa hình của locus được thực hiện bởi Cervus [77]. Hệ số thụ phấn cận noãn ( $F_{IS}$ ) được điều chỉnh tần số

allele lặn theo mô hình cận noãn ở mức cá thể (IIM) sử dụng INEst [78]. Phân tích sự khác nhau ở mức độ phân tử dùng Arlequin [79]. Kiểm định giả thiết từ phương trình Hardy-Weinberg dùng GENEPOP [80]. Phân tích nhóm gen dùng Structure và xác định nhóm gen tối ưu dùng Structure Harvester dựa trên giá trị  $\Delta K$  của Evanno et al. [81, 82, 83]. Phân tích nhóm gen cũng được thực hiện dùng phương pháp DAPC (discriminant analysis of principal component) trong *adegenet* cho phần mềm R [84]. Phân tích cây NJ cho 8 quần thể được thực hiện dùng Poptree2 [85]. Mô hình allele không xác định - infinite allele model (IAM), mô hình đột biến từng bước - stepwise mutation model (SMM) và mô hình đột biến 2 giai đoạn - two-phase mutation model (TPM) cũng được thực hiện dùng BOTTLENECK [85].

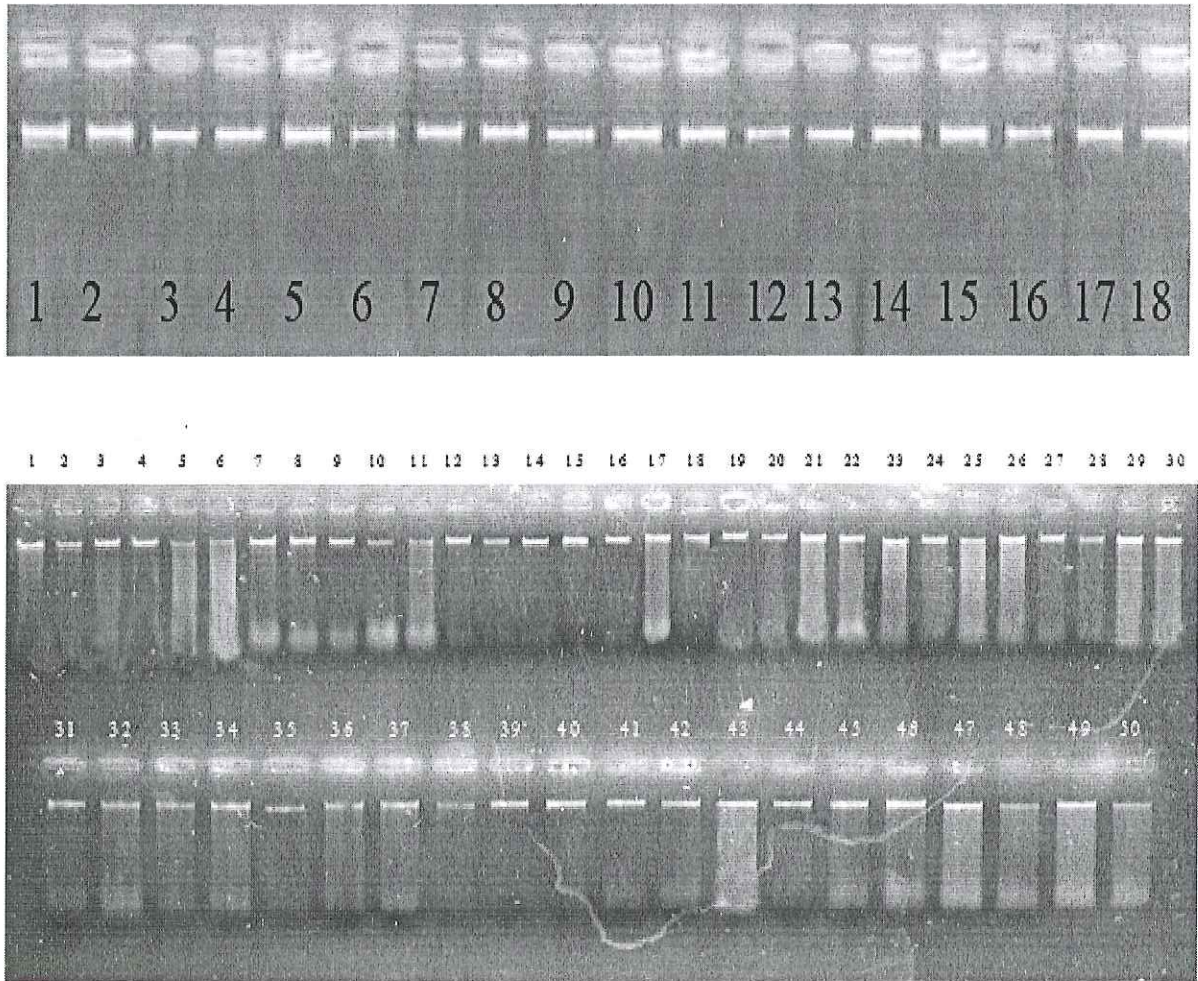
### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả tách chiết DNA và nhân bản PCR

##### Kết quả tách chiết DNA tổng số

DNA được sử dụng như là nguyên liệu cơ bản ban đầu trong nghiên cứu về công nghệ sinh học. Tách chiết DNA tổng số thành công được xem như là bước đầu tiên và quan trọng nhất cho các nghiên cứu tiếp theo như giải mã trình tự các vùng gen để xác định loài, xây dựng cây phát sinh phả hệ, chọn giống, di truyền quần thể và một số lĩnh vực sinh học phân tử khác. DNA tổng số thu được phải đảm bảo tính nguyên vẹn của phân tử, không lẫn RNA, protein hoặc các tạp chất khác. Hiện nay, nhiều quy trình tách chiết DNA rất hiệu quả đã được cải tiến và ứng dụng tùy thuộc vào đối tượng nghiên cứu. Trong nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng kit tách Plant Genome DNA Extraction Kit (BioTeke, Beijing, China) để tách chiết DNA từ vỏ cây Dầu lá bóng (*Dipterocarpus turbinatus*) thuộc họ Dầu. Để tách chiết DNA, chúng tôi tiến hành theo quy trình của nhà sản xuất. Khi tiến hành tách chiết DNA chúng tôi nhận thấy, vỏ cây có nhiều hợp chất ức chế các chất trong dung dịch chiết. Từ đó chúng tôi tiến hành một số cải tiến cho phù hợp với đối tượng tách chiết. Cụ thể, đối với vỏ cây thời gian ủ nhiều hơn. Ngoài ra, nồng độ các chất trong dung dịch tách được giảm xuống thấp nhất có thể trong quá trình tách chiết. Chúng tôi giảm sự tương tác của các chất với các hợp chất thứ cấp có trong nội bào, gây nên sự tủa DNA. Tuy nhiên nồng độ các chất vẫn phải đảm bảo được vai trò pH tối ưu là 0,8 trong dịch chiết, ức chế các enzyme phân hủy DNA có trong nội bào, giải phóng DNA khỏi sự bám dính của chất khác. Nồng độ thích hợp các chất trong dịch tách được thể hiện trong phần vật liệu và phương pháp nghiên cứu.

Chúng tôi đã tiến hành thành công việc tách chiết DNA của 181 mẫu vỏ cây Dầu lá bóng từ 8 quần thể Bông Trang, Bưng Riềng, Bình Châu, Bàu Lâm, Phước Thuận, Lò Gò- Xa Mát, Tân Phú và Bù Gia Mập. DNA của các mẫu tách được kiểm tra trên gel agarose 1%. Sản phẩm DNA của một số mẫu được trình bày ở Hình 3.1.



**Hình 3.1:** DNA của một số mẫu vỏ cây loài Dầu lá bóng. 1-18 mẫu thu thập ở Tân Phú (trên); 1-25 mẫu thu thập ở Bình Châu, 25- 50: mẫu thu ở Phước Thuận (dưới)

Kết quả điện di trên Hình 3.1 chỉ ra các băng DNA của các mẫu vỏ cây thu thập đều sáng, rõ và gọn. Rõ ràng, DNA được tách chiết từ vỏ cây có mức độ nguyên vẹn cao, ít đứt gãy. DNA được tinh sạch bằng kit RNAase để loại bỏ protein cũng như RNA trong dịch chiết.

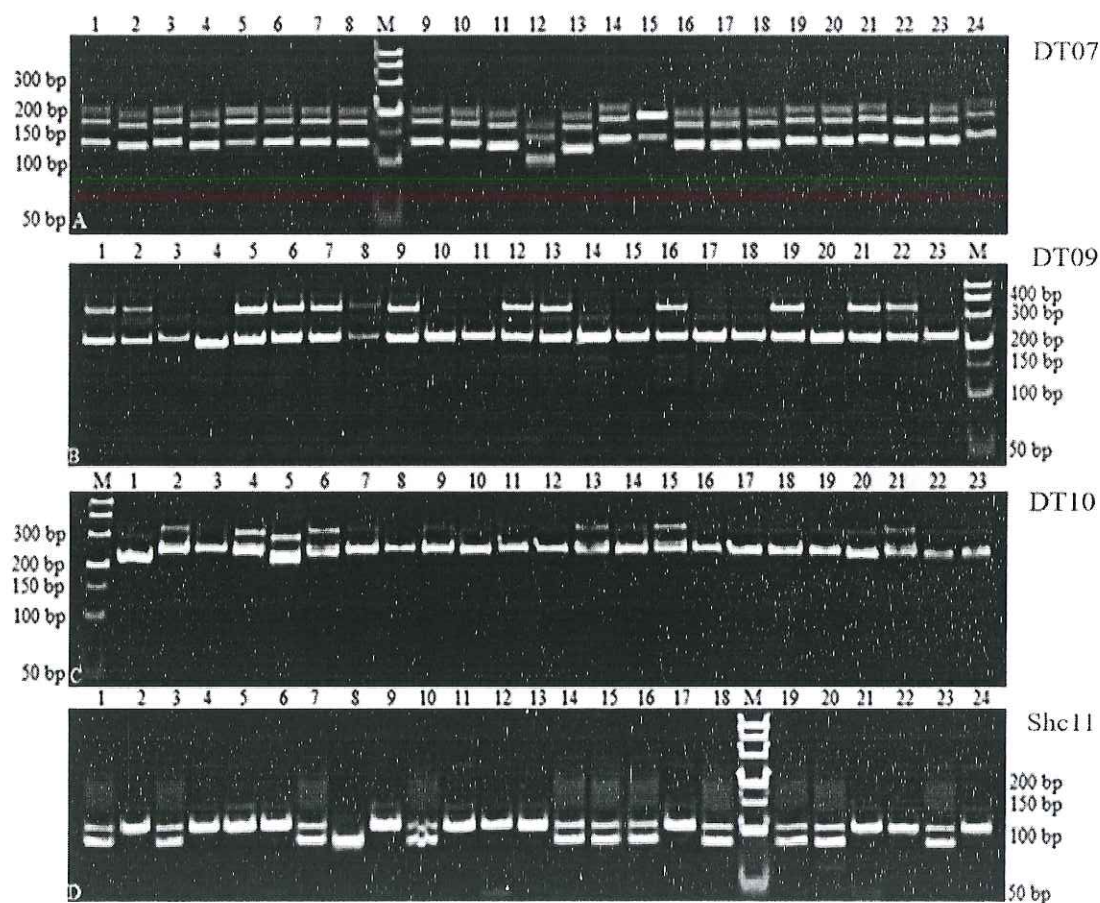
Tiếp theo, chúng tôi đo nồng độ DNA trên máy đo quang phổ kế UV-1601 (UV-Visible Spectrophotometer) ở hai bước sóng A260 và A280nm. Kết quả cho thấy, DNA của các mẫu vỏ cây đều có một đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 260nm và chỉ ra DNA đã được tinh sạch.

Kết quả đo quang phổ hấp thụ cho thấy, tỷ lệ OD 260nm/OD280nm của 181 mẫu vỏ cây đều nằm trong khoảng từ 1,8-2,0 và đáp ứng được yêu cầu cho

nghiên cứu tiếp theo. Dựa trên nồng độ DNA của từng mẫu vỏ cây, chúng tôi đã pha loãng ra nồng độ 10ng/ $\mu$ l để sử dụng cho các phản ứng PCR.

### Kết quả nhân bản PCR với chỉ thị microsatellite

Chúng tôi thực hiện phản ứng PCR cho 181 mẫu DNA từ vỏ cây với 8 cặp chỉ thị microsatellite khác nhau, trên máy GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Sau khi kết thúc phản ứng PCR, sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide 7% dùng hệ thống điện di đứng a Sequi-Gen®GT DNA electrophoresis system. Các băng vạch xuất hiện trên bản điện di được ghi lại trên hệ thống BioDocAnalyze (Biometra, Germany). Các băng sản phẩm PCR được xác định kích thước dùng phần mềm Gel-Analyzer software of GenoSens1850 (Clix Science Instruments Co., Ltd) với thang 25-bp DNA (Invitrogen). Sản phẩm PCR từ một số cặp chỉ thị microsatellite của một số mẫu vỏ cây loài Dầu lá bóng (*Dipterocarpus turbinatus*) được thể hiện ở Hình 3.2.



Hình 3.2. Các băng PCR trên gel polyacrylamide 7% dùng chỉ thị DT07, DT09, DT10 và Shc11; M: thang DNA 25bp; giếng 1 – 24 là các mẫu vỏ cây Dầu lá bóng ở Tân Phú.

### 3.2. Xác định kết quả các chỉ thị microsatellite

Chúng tôi đã nhận được 26 allele khác nhau từ 8 cặp chỉ thị microsatellite khác nhau. Kích thước của các allele khác nhau từ 96 bp đến 230 bp. Tám cặp chỉ thị microsatellite đều có đa hình. Số allele trung bình cho một cặp chỉ thị microsatellite là 3,2, khác nhau từ 3 ở ba cặp chỉ thị DT07, DT18 và Shc07 đến 5 ở cặp chỉ thị DT38. Các hệ số của PIC, PD và  $R_p$  đã được tính toán cho 8 cặp chỉ thị microsatellite đa hình (Bảng 3.1). Hệ số PIC (Polymorphic Information Content) cho biết tính đa hình của các cặp chỉ thị microsatellite. Hệ số PIC của cặp chỉ thị microsatellite nào cao thì đa hình càng cao và ngược lại.

**Bảng 3.1.** Số lượng allele và hệ số PIC, PD và  $R_p$  cho 8 cặp chỉ thị microsatellite

Locus	Số lần lặp lại	Nhiệt độ bắt cặp	Số allele	Kích thước allele	PIC	PD	$R_p$
DT07	(GA) <sub>15</sub>	52°C	2	96-109	0,366	0,759	2,748
DT09	(GA) <sub>24</sub>	52°C	3	157-181	0,352	0,816	2,868
DT18	(CA) <sub>10</sub> A <sub>13</sub>	56°C	2	140-150	0,311	0,755	2,371
DT20	(GA) <sub>17</sub>	52°C	4	212-230	0,201	0,738	2,659
Shc11	(CT) <sub>4</sub> CA(CT) <sub>5</sub>	54°C	4	162-190	0,442	0,455	2,348
Shc07	(CT) <sub>8</sub> CA(CT) <sub>5</sub> C ACCC(CTCA) <sub>3</sub> CT(CA) <sub>10</sub>	54°C	2	115-132	0,315	0,587	3,365
DT38	(GA) <sub>25</sub>	50°C	5	192-216	0,408	0,587	2,234
Shc01	(CT) <sub>8</sub> (CA) <sub>10</sub> CT(CA) <sub>4</sub> CTCA	56°C	4	146-182	0,277	0,458	2,747

*Chú thích:* PIC: hệ số đa hình, PD: hệ số khác nhau giữa các cặp cá thể,  $R_p$ : hệ số khác nhau của mỗi cặp chỉ thị microsatellite.

Hệ số PIC được xác định cho 8 chỉ thị microsatellite đều có tính đa hình. Hệ số PIC được xác định cao nhất (0,442) ở chỉ thị Shc11 và thấp nhất (0,201)

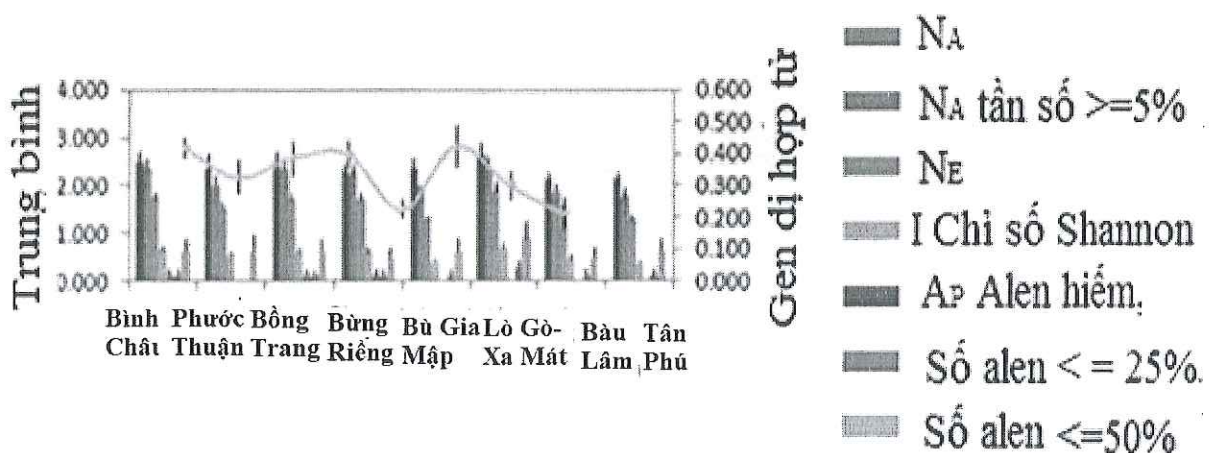
ở chỉ thị DT20, trung bình là 0,374. Hệ số PD khác nhau từ 0,455 ở chỉ thị Shc11 đến 0,816 ở chỉ thị DT07, trung bình đạt 0,644. Hệ số PD là lớn hơn 0,7 được xác định cho 4 chỉ thị DT07, DT09, DT18 và DT20 và thấp nhất cho chỉ thị Shc11 (0,455). Hệ số  $R_p$  khác nhau từ 2,348 ở Shc11 đến 3,365 ở Shc07, trung bình đạt 2,667.

Các hệ số này của loài Dầu lá bóng là cao so với các giá trị này của loài Thông Xuân Nha (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis*) ở rừng Xuân Nha [87] và 2 loài Dầu mít (*Dipterocarpus costatus*) và Dầu rái (*D. alatus*) [65]. Các hệ số này của các chỉ thị microsatellite đã khám phá đặc tính di truyền của loài Dầu lá bóng ở 8 quần thể nghiên cứu, bao gồm Bồng Trang, Bung Riềng, Bình Châu, Bàu Lâu, Phước Thuận, Lò Gò- Xa Mát, Tân Phú và Bù Gia Mập.

### 3.3. Các chỉ số đa dạng di truyền quần thể và loài Dầu lá bóng

#### 3.3.1. Số allele và tần số allele

26 allele khác nhau đã được nhận được từ 8 chỉ thị microsatellite đa hình cho 181 cây Dầu lá bóng trưởng thành ở tám quần thể nghiên cứu. Phân bố của các allele cho loài Dầu lá bóng được thể hiện ở Hình 3.3. Allele hiếm (tần số allele dưới 5%) cũng được tìm thấy ở 4 locus, bao gồm DT09 cho 4 quần thể Bình Châu, Bung Riềng, Lò Gò-Xa Mát và Tân Phú, Shc11 cho 3 quần thể Lò Gò-Xa Mát, Phước Thuận và Tân Phú, DT38 cho 2 quần thể Bồng Trang và Phước Thuận, trong khi đó locus DT20 chỉ cho một quần thể Bồng Trang.



Hình 3.3. Không gian phân bố của 8 quần thể Dầu lá bóng

Số lượng allele cho một chỉ thị microsatellite bao gồm từ 2 allele ở 3 chỉ thị microsatellite DT07, Shc07 và DT18; 3 allele ở chỉ thị microsatellite DT09; 4 allele ở 3 chỉ thị microsatellite Shc01, Shc11 và DT20, và 5 allele ở các chỉ thị microsatellite còn lại, DT38. Bảng 3.2 chỉ ra số lượng allele cho mỗi chỉ thị microsatellite tại tám quần thể Dầu lá bóng.

Ở chỉ thị microsatellite (locus) DT07 thì cả 4 quần thể Bình Châu, Bàu Lâm, Phước Thuận và Tân Phú, tần số allele đều có tỉ lệ cao là allele96 với trên 70%, trong khi đó tần số allele này ở Bồng Trang là 62,5% và ở Bưng Riềng 55%. Tần số allele này thấp nhất được tìm thấy ở Bù Gia Mập với tần số 0,146. Tần số allele108 thấp nhất được xác định ở quần thể Phước Thuận với tỉ lệ 22,7%, và cao nhất ở quần thể Bù Gia Mập, chiếm 85,4%.

Locus DT09 gồm có 3 allele: allele157, allele167 và allele181. Cả 3 allele đều có mặt ở 4 quần thể Bình Châu, Bưng Riềng, Bàu Lâm và Lò Gò -Xa Mát. Hai allele xuất hiện ở 5 quần thể còn lại, Bồng Trang, Bù Gia Mập, Phước Thuận và Tân Phú. Allele 157 chiếm tỉ lệ cao, 60%, chỉ ở quần thể Bưng Riềng. Allele167 chiếm tỉ lệ cao nhất ở quần thể Bù Gia Mập với tần số 93,8% và Tân Phú với tỉ lệ 97,9%. Tiếp theo, allele này cũng chiếm tỉ lệ cao 72,9% ở quần thể Bình Châu, 63,6% ở Bàu Lâm và 65% ở Lò Gò-Xa Mát, 77,3% ở Phước Thuận. Allele hiếm (với tần số bé hơn 3%) được tìm thấy ở allele181 cho 4 quần thể Bình Châu, Bưng Riềng, Lò Gò -Xa Mát và Tân Phú.

Locus Shc01 gồm có 4 allele: allele146, allele158, allele176 và allele182. Ba allele được quan sát ở 3 quần thể, Bưng Riềng, Bù Gia Mập và Lò Gò-Xa Mát, và 2 allele xuất hiện ở 5 quần thể còn lại Bình Châu, Bồng Trang, Bàu Lâm, Phước Thuận và Tân Phú. Allele158 phổ biến với tần số lớn hơn 0,8 được tìm thấy ở quần thể Bình Châu (84%), Bồng Trang (91,7%), Bù Gia Mập (89,6%), Phước Thuận (95,5%) và Tân Phú (97,9%). Allele hiếm được quan sát ở quần thể Tân Phú (allele176) với tần số 0,021.

Locus Shc11 gồm có 4 allele: allele162, allele170, allele 182 và allele190. Cả 4 allele đều có mặt ở quần thể Lò Gò-Xa Mát. 3 allele xuất hiện ở 5 quần thể Bình Châu, Bồng Trang, Bưng Riềng, Bù Gia Mập và Tân Phú. Hai allele được quan sát ở 2 quần thể còn lại Bàu Lâm và Phước Thuận. Tần số allele170 chiếm ưu thế (>80%) được tìm thấy ở Bù Gia Mập và Phước Thuận. Allele hiếm được tìm thấy ở allele182 cho Bồng Trang và allele190 cho 2 quần thể, Lò Gò- Xa Mát và Tân Phú.



Locus DT38 gồm có 5 allele: allele192, allele196, allele200, allele206 và allele216. Bốn allele được xác định ở quần thể Bông Trang. 3 allele được quan sát ở 6 quần thể Bình Châu, Bung Riềng, Bàu Lâm, Bù Gia Mập, Lò Gò -Xa mát và Phước Thuận. Hai allele được quan sát ở Tân Phú. Allele phổ biến được tìm thấy tại allele200 cho quần thể Bung Riềng và Bù Gia Mập. Allele hiếm không được quan sát ở locus DT38 cho cả 8 quần thể nghiên cứu.

Locus DT20 gồm có 4 allele: allele212, allele216, allele224 và allele230. Ba allele được khám phá ở Bình Châu, 7 quần thể còn lại chỉ có 2 allele. Allele224 là allele phổ biến, được xác định ở 7 quần thể, Bông Trang, Bung Riềng, Bàu Lâm, Bù Gia Mập, Lò Gò-Xa Mát, Phước Thuận và Tân Phú, trừ quần thể Bình Châu. Không tìm thấy allele hiếm ở locus DT20.

Locus Shc07 gồm có 2 allele: allele115 và allele132. Tám quần thể nghiên cứu đều có 2 allele của locus này. Allele phổ biến được tìm thấy tại allele132 cho 5 quần thể Bung Riềng, Bù Gia Mập, Lò Gò-Xa Mát, Phước Thuận và Tân Phú. Không tìm thấy allele hiếm ở locus này.

**Bảng 3.2.** Tần số allele ở mức độ locus của 8 quần thể Dầu lá bóng

Locus	Allele	Bình Châu	Bông Trang	Bung Riềng	Bàu Lâm	Bù Gia Mập	Lò Gò-Xa Mát	Phước Thuận	Tân Phú
<b>DT07</b>	<b>96</b>	0,740	0,625	0,550	0,750	0,146	0,400	0,773	0,750
	<b>108</b>	0,260	0,375	0,450	0,250	0,854	0,600	0,227	0,250
<b>DT09</b>	<b>157</b>	0,180	0,271	0,600	0,250	0,063	0,325	-	-
	<b>167</b>	0,800	0,729	0,375	0,636	0,938	0,650	0,773	0,979
	<b>181</b>	0,020	-	0,025	0,114	-	0,025	0,227	0,021
<b>Shc01</b>	<b>146</b>	-	-	-	-	0,063	0,275	-	-
	<b>158</b>	0,840	0,917	0,575	0,750	0,896	0,600	0,955	0,979
	<b>176</b>	-	-	0,050	-	-	-	-	-
	<b>182</b>	0,160	0,083	0,375	0,250	0,042	0,125	0,045	0,021
<b>Shc11</b>	<b>162</b>	0,120	-	-	-	0,125	0,350	-	0,208
	<b>170</b>	0,700	0,771	0,600	0,614	0,833	0,425	0,886	0,771
	<b>182</b>	0,180	0,021	0,100	0,386	-	0,200	-	-

	190	-	0,208	0,300	-	0,042	0,025	0,114	0,021
<b>DT38</b>	192	0,160	0,042	0,075	0,068	-	-	0,045	-
	196	-	-	-	0,136	-	-	-	-
	200	0,760	0,708	0,825	0,795	0,833	0,450	0,705	0,792
	206	-	0,146	-	-	0,125	0,500	-	0,208
	216	0,080	0,104	0,100	-	0,042	0,050	0,250	-
<b>DT20</b>	212	0,240	-	-	-	-	-	-	-
	216	-	-	-	-	0,063	0,050	-	0,083
	224	0,640	0,958	0,925	0,932	0,938	0,950	0,864	0,917
	230	0,120	0,042	0,075	0,068	-	-	0,136	-
<b>Shc07</b>	115	0,500	0,208	0,200	0,636	0,125	0,150	0,182	0,125
	132	0,500	0,792	0,800	0,364	0,875	0,850	0,818	0,875
<b>DT18</b>	140	0,400	0,229	0,150	0,455	0,208	0,200	0,318	0,104
	150	0,600	0,771	0,850	0,545	0,792	0,800	0,682	0,896

Tương tự, locus DT18 gồm có 2 allele: allele140 và allele150. Cả 2 allele đều có mặt ở cả 8 quần thể nghiên cứu. Allele phổ biến được tìm thấy ba quần thể Bung Riềng, Lò Gò-Xa Mát và Tân Phú. Không có allele hiếm được tìm thấy ở đây.

### 3.3.2. Đa dạng di truyền quần thể

#### 3.3.2.1. Đa dạng di truyền ở locus

Thông số di truyền ở mỗi locus của loài Dầu lá bóng được trình bày ở Bảng 3.2. 5 locus microsatellite DT07, DT09, Shc01, Shc11 và DT38 đều xuất hiện allele lặn và có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ). Số allele cho một locus ( $N_A$ ) khác nhau từ 2 tại 3 locus, DT07, Shc07 và DT18 đến 5 ở locus DT38, trung bình 3,2 allele. Một locus DT09 có 3 allele và 3 locus, Shc01, Shc11 và DT20, có 4 allele. Số allele hữu hiệu ( $A_E$ ) khác nhau từ 1,3 tại DT20 đến 1,8 tại Shc11, trung bình 1,6. Số allele hữu hiệu ở 2 locus Shc01 và Shc07 là 1,5. Locus DT09 và DT18 có 1,6 allele hữu hiệu. Locus DT07 và DT38 có 1,7 allele hữu hiệu. Số allele giàu ( $A_R$ ) trung bình 2,9, khác nhau từ 2 ở 3 locus DT07, Shc07 và DT18 đến 4,3 ở DT38. Số allele giàu là 2,9, được tìm thấy ở locus DT09. Locus

Shc01 có 3 allele giàu. Locus DT20 có 3,3 allele giàu, trong khi đó Shc11 có 3,9 allele giàu.

Locus	$N_A$	$A_E$	$A_R$	$H_O$ (SE)	$H_E$ (SE)	$F_{IS}$ (SE)	Null allele	$F_{IT}$ (SE)	$F_{ST}$ (SE)	$G'_{ST}$ (SE)	H W	$N_m$ (SE)
DT07	2	1,7	2	0,250	0,397	0,372	0,216	0,483	0,178	0,277	*	1,158
DT09	3	1,6	2,9	0,350	0,340	-0,029	0,064	0,151	0,175	0,255	ns	1,178
Shc01	4	1,5	3	0,239	0,274	0,126	0,093	0,244	0,135	0,167	ns	1,595
Shc11	4	1,8	3,9	0,361	0,418	0,138	0,098	0,248	0,128	0,200	ns	1,705
DT38	5	1,7	4,3	0,354	0,388	0,088	0,077	0,193	0,114	0,166	ns	1,938
DT20	4	1,3	3,3	0,199	0,183	-0,088	no	0,017	0,097	0,101	nd	2,332
Shc07	2	1,5	2	0,336	0,325	-0,032	no	0,140	0,166	0,235	ns	1,252
DT18	2	1,6	2	0,434	0,357	0,042	no	0,107	0,068	0,080	ns	3,418
Trung bình	3.2	1,6	2,9	0,304 (0,019)	0,335 (0,018)	0,077 (0,051)		0,198 (0,049)	0,133 (0,014)	0,187 (0,025)		1,822 (0,269)

**Bảng 3.3.** Thông số di truyền ở mỗi locus microsatellite loài Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ

*Chú thích: N, số lượng mẫu thu thập;  $N_A$ , số allele trung bình cho một locus;  $N_E$ , số allele hữu hiệu;  $A_R$ , số allele giàu;  $H_O$  là chỉ số gen dị hợp tử quan sát và  $H_E$  là chỉ số gen dị hợp lý thuyết (kỳ vọng);  $F_{IS}$ , chỉ số thụ phấn cận noãn với xác suất  $*p < 0,001$ ;  $F_{IT}$ , Chỉ số cận noãn ở mức độ loài;  $F_{ST}$ , Mức độ di truyền khác nhau trong mỗi locus theo Weir và Cockerham (1984) [86];  $G'_{ST}$ , Mức độ di truyền khác nhau theo Hedrick (2005)[72]; HWE, Phương trình Hardy-Weinberg;  $N_m$ , trao đổi gen trong mỗi locus.*

Chỉ số gen dị hợp tử quan sát và gen dị hợp tử kỳ vọng đã được xác định tại tám locus microsatellite. Chỉ số gen dị hợp tử quan sát ( $H_O$ ) khác nhau từ 0,199 ở locus DT20 đến 0,434 ở locus DT18, trung bình 0,304. Locus Shc01 có chỉ số gen dị hợp tử quan sát 0,239 và locus DT07 là 0,25. 4 locus microsatellite, DT09, Shc11, DT37 và Shc07 có chỉ số gen dị hợp tử quan sát lớn hơn 0,3. Chỉ số gen dị hợp tử kỳ vọng khác nhau từ 0,183 ở locus DT20 đến 0,418 ở locus Shc11, trung bình 0,335. Locus Shc01 có chỉ số  $H_E$  0,274. 7 locus microsatellite còn lại có chỉ số  $H_E$  đều lớn hơn 0,3.

### 3.3.2.2. Chỉ số di truyền khác nhau ở quần thể

Ở quần thể, thông số di truyền quần thể được biểu hiện ở Bảng 3.3. Số lượng allele một locus microsatellite trung bình cho mỗi quần thể ( $N_A$ ) là 2,9, dao động từ 2,1 allele ở Bàu Lâm và Tân Phú đến 2,6 ở Lò Gò-Xa Mát. Giá trị  $N_A$  ở Bung Riềng là 2,2, ở Bù Gia Mập và Phước Thuận là 2,4, trong khi đó ở 2 quần thể Bình Châu và Bồng Trang là 2,5 allele. Số lượng allele hữu hiệu một locus microsatellite là thấp nhất ( $A_E$ ) ở 2 quần thể Bù Gia Mập và Tân Phú, và cao nhất (1,9) xuất hiện ở Lò Gò-Xa Mát, trung bình 1,6 allele hữu hiệu cho mỗi quần thể. Số allele giàu ( $A_R$ ) cũng được xác định cho mỗi quần thể nghiên cứu. Số allele giàu cho mỗi quần thể trung bình 2,3, khác nhau từ 2 ở Tân Phú đến 2,6 ở Lò Gò-Xa Mát. Quần thể Bàu Lâm có 2,1 allele giàu và quần thể Bung Riềng có 2,2 allele giàu. Quần thể Bù Gia Mập và quần thể Phước Thuận có 2,3 allele. Quần thể Bình Châu có 2,4 allele giàu và quần thể Bồng Trang có 2,5 allele giàu.

**Bảng 3.4.** Thông số di truyền cho 8 quần thể loài Dầu lá bóng

Quần thể	N	P (%)	$N_A$	$A_E$	$A_R$	$H_o$ (SE)	$H_E$ (SE)	$F_{is}$ (SE)	$F_{is}$ IIM	P giá trị của mô hình thắt cổ chai (bottleneck)		
										IAM	TPM	SMM
Bình Châu	25	100	2,5	1,7	2,4	0,425	0,417	0,108	0,030	0,006	0,027	0,191
Phước Thuận	24	100	2,4	1,5	2,3	0,297	0,326	0,110	0,050	0,191	0,230	0,726
Bồng Trang	20	100	2,5	1,7	2,5	0,344	0,385	0,132	0,082	0,019	0,230	0,371
Bung Riềng	22	100	2,2	1,7	2,2	0,381	0,391	0,064	0,048	0,019	0,014	0,125
Bù Gia Mập	24	100	2,4	1,3	2,3	0,193	0,225	0,164	0,103	0,902	0,990	0,994
Lò Gò-Xa Mát	20	100	2,6	1,9	2,6	0,350	0,421	0,194	0,038	0,014	0,037	0,156
Bàu Lâm	22	100	2,1	1,5	2,1	0,295	0,300	0,037	0,027	0,098	0,191	0,371
Tân Phú	24	100	2,1	1,3	2	0,146	0,213	0,335	0,073	0,808	0,844	0,973
Trung Bình		100	2,4	1,6	2,3	0,304 (0.019)	0,335 (0.018)	0,129	0,056			

Chú thích: N: số lượng mẫu thu thập; P: phần trăm locus microsatellite đa hình,  $N_A$ : số lượng allele cho một locus microsatellite,  $A_E$ : số lượng allele hữu

hiệu cho một locus,  $A_R$ : Số lượng allele giàu cho một locus,  $H_E$ : chỉ số gen dị hợp tử quan sát và kỳ vọng và  $H_O$ : chỉ số gen dị hợp tử quan sát,  $F_{IS}$ : chỉ số fix,  $F_{IS}IIM$ : chỉ số thụ phân cận noãn được hiệu chỉnh với allele lặn, Mô hình IAM: thiếu hụt chỉ số gen dị hợp tử, kiểm định với 1 tail, Mô hình TPM: vượt trội gen dị hợp tử với kiểm định 1 tail, Mô hình SMM: vượt trội chỉ số gen dị hợp tử với kiểm định 1 tail, SE: Độ lệch chuẩn.

Chỉ số gen dị hợp tử quan sát và chỉ số gen dị hợp tử kỳ vọng cho mỗi quần thể đã được ghi nhận. Chỉ số gen dị hợp tử quan sát ( $H_O$ ) dao động từ 0,146 ở Tân Phú đến 0,425 ở Bình Châu, trung bình 0,304. Giá trị  $H_O$  tại Quần thể Bù Gia Mập là 0,193, và giá trị  $H_O$  tại Phước Thuận và Bàu Lâm tương ứng là 0,297 và 0,295. Các quần thể còn lại có giá trị  $H_O$  là lớn hơn 0,3. Tương tự, giá trị  $H_E$  khác nhau từ 0,213 tại Tân Phú đến 0,421 tại Lò Gò-Xa Mát, trung bình 0,335. Quần thể Bù Gia Mập có giá trị  $H_E$  là 0,225 và quần thể Bình Châu có giá trị  $H_E$  là 0,417. Các quần thể còn lại có giá trị  $H_E$  từ 0,3 đến 0,391.

Loài Dầu lá bóng có các giá trị đa dạng thấp ( $H_E = 0,304$ ;  $H_E = 0,335$ ) khi so sánh với các loài dầu khác ở Đông Nam Á, như, *Shorea leprosula* duy trì chỉ số gen dị hợp tử kỳ vọng  $H_E = 0,709$  [41],  $H_E = 0,686$  [89], chỉ số gen dị hợp tử quan sát  $H_O = 0,63 - 0,66$ , và chỉ số gen dị hợp tử kỳ vọng  $H_E = 0,69 - 0,71$  [42]; *S. robusta* với chỉ số gen dị hợp tử quan sát  $H_O = 0,68$ , và chỉ số gen dị hợp tử kỳ vọng  $H_E = 0,68$  [43], *Dryobalanops aromatica* với giá trị  $H_O = 0,572$ , và giá trị  $H_E = 0,607$  [44]; *Dr. beccarii* với giá trị  $H_O = 0,406$ , và giá trị  $H_E = 0,404$  [26], Dầu song nàng *Dipterocarpus dyeri* với giá trị  $H_O = 0,527$  và giá trị  $H_E = 0,601$  [63]. Số allele cho một locus microsatellite là thấp so với loài dầu *Dryobalanops aromatica* với giá trị  $N_A = 5,1$  hoặc  $N_A = 6,54$  [44]; *S. leprosula* với giá trị  $N_A$  dao động từ 11,0 đến 11,4 [42]. Tuy nhiên, kết quả thu được của loài Dầu lá bóng có mức độ đa dạng di truyền tương đương với một số loài cây họ Dầu đang bị đe dọa, như *Parashorea malaanonan* ( $H_O = 0,26$ ,  $H_E = 0,46$ ; [50]), *S. javania* ( $H_O = 0,281$ ,  $H_E = 0,477$ ; [48]), *D. alatus* ( $H_O = 0,209$ ,  $H_E = 0,239$ ; [69]), *D. costatus* ( $H_E = 0,152$ ; [66]), *H. odorata* ( $H_O = 0,366$ ,  $H_E = 0,356$ ; [67]). Đa dạng di truyền liên quan đến mức độ suy giảm nơi sống và bị suy giảm thông qua phiêu bạt di truyền và tăng tính đồng hợp tử cho allele phổ biến. Số lượng allele giàu cũng bị suy giảm ở Dầu lá bóng Đông Nam

Bộ. Các thông số di truyền cao phản ánh tính thích nghi tốt với môi trường và duy trì tiềm năng tiến hóa. Dầu lá bóng là loài đang bị đe dọa và có đa dạng di truyền thấp. Có thể nguyên nhân là nơi sống bị thu hẹp và suy giảm mạnh, đồng thời số lượng cá thể cho mỗi quần thể cũng bị suy giảm do khai thác nơi sống để phát triển nông nghiệp và khai thác gỗ vì mục đích thương mại và dân sinh.

### 3.3.2.3. Hệ số thụ phấn cận noãn và suy giảm kích thước quần thể

Chỉ số thụ phấn cận noãn ( $F_{IS}$ ) là sự gia tăng tỉ lệ các cá thể mang gen đồng hợp tử trong mỗi locus microsatellite. Đây cũng là mức giảm dự kiến trong suốt quá trình thay đổi giữa các kiểu gen dị hợp quan sát và gen dị hợp tử kỳ vọng. Chỉ số thụ phấn cận noãn trong khoảng từ 0 đến 1. Thụ phấn cận noãn tạo ra sự gia tăng tỉ lệ đồng hợp tử lặn, dẫn đến xuất hiện của một số allele lặn có hại bẩm sinh, do đó làm giảm sức chống chịu của loài. Bảng 3.3 chỉ ra mức độ chỉ số thụ phấn cận noãn thấp được xác định ở 5 locus microsatellite DT07, Shc01, Shc11, DT38, DT18, trong khi đó 3 locus microsatellite còn lại có hệ số âm (thụ phấn chéo), bao gồm DT09, DT20 và Shc07. Chỉ số thụ phấn cận noãn cao ( $F > 0,3$ ) được xác định ở locus DT07 và quần thể Tân Phú. Mô hình thụ phấn cận noãn ( $F_{ISIIIM}$ ) được sử dụng để hiệu chỉnh chỉ số thụ phấn cận noãn FIS, và chỉ ra giá trị  $F_{ISIIIM}$  khác nhau từ 0,027 ở quần thể Bàu Lâm đến 0,103 ở quần thể Bù Gia Mập, trung bình 0,056. Chỉ số thụ phấn cận noãn cho loài ( $F_{IT}$ ) trung bình là 0,198 (Bảng 3.2) và chỉ ra chỉ số gen đồng hợp tử vượt trội so với chỉ số gen dị hợp tử.

Phân tích mô hình thắt cổ chai quần thể ở Bảng 3.3 cho thấy không tìm thấy sự thiếu hụt gen dị hợp tử ở tám quần thể loài Dầu lá bóng ở Đông Nam Bộ ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.2.4. Khoảng cách di truyền khác nhau và tương đồng di truyền giữa các quần thể

Mức độ di truyền khác nhau và mức độ tương đồng di truyền giữa tám quần thể Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ được ghi nhận ở Bảng 3.5. Khoảng cách di truyền cao nhất (0,165) được tìm thấy cho cặp Bù Gia Mập và Bung Riêng và thấp nhất (0,015) cho cặp quần thể Bàu Lâm và Phước Thuận, trung bình 0,081.

**Bảng 3.5.** Mức độ di truyền khác nhau (dưới) và mức độ tương đồng di truyền (trên)

Quần thể	Bình Châu	Phước Thuận	Lò Gò-Xa Mát	Bung Riềng	Bù Gia Mập	Tân Phú	Bàu Lâm	Bồng Trang
Bình Châu		0.958	0.897	0.978	0.891	0.863	0.960	0.944
Phước Thuận	0.043		0.961	0.931	0.955	0.936	0.985	0.982
Lò Gò-Xa Mát	0.109	0.040		0.902	0.894	0.912	0.905	0.897
Bung Riềng	0.022	0.071	0.103		0.848	0.848	0.922	0.895
Bù Gia Mập	0.115	0.046	0.112	0.165		0.932	0.921	0.942
Tân Phú	0.147	0.066	0.092	0.164	0.070		0.875	0.922
Bàu Lâm	0.040	0.015	0.100	0.082	0.082	0.133		0.976
Bồng Trang	0.058	0.018	0.109	0.111	0.059	0.082	0.024	

Tương tự, kết quả chỉ ra sự tương đồng di truyền của các cặp Dầu lá bóng ở Bảng 3.5. Tương đồng di truyền lớn nhất được quan sát cho cặp quần thể Bình Châu và Bung Riềng (0,978) và thấp nhất (0,848) được xác định cặp quần thể Bình Châu/Tân Phú, trung bình 0,922.

### 3.3.3. Cấu trúc di truyền quần thể Dầu lá bóng

#### 3.3.3.1. Mức độ di truyền khác nhau ở các quần thể

Di truyền khác nhau ở các cặp quần thể ( $F_{ST}$ ) của loài Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ ( $F_{ST}$ ) được ghi nhận ở Bảng 3.6. Mức độ di truyền khác nhau ở cặp quần thể Bung Riềng và Bình Châu là thấp nhất ( $F_{ST} = 0,026$ ) với độ tin cậy  $p = 0,05$  và cao nhất xuất hiện ở cặp quần thể Bù Gia Mập và Bung Riềng với giá trị  $F_{ST} = 0,157$  với độ tin cậy  $p = 0,001$ , trung bình 0,082. Giá trị này là thấp được tìm thấy cho các cặp quần thể cùng khu vực phân bố. Chẳng hạn giá trị  $F_{ST}$  cho các cặp ở Bình Châu-Phước Bửu, như Bình Châu và Phước Thuận là 0,046 và cặp Bàu Lâm và Bồng Trang là 0,48. Mức độ di truyền khác nhau cao hơn được ghi nhận ở các cặp quần thể khác tỉnh trong khu vực Đông

Nam Bộ. Chẳng hạn, giá trị  $F_{ST}$  cho cặp Bù Gia Mập và Bưng Riêng là 0,157 và cặp Lò Gò-Xa Mát và Bồng Trang là 0,123. Kết quả này phản ánh có sự trao đổi di truyền giữa các quần thể Dầu lá bóng liên quan đến khoảng cách địa lý. Mức độ khác nhau di truyền giữa các quần thể của loài Dầu lá bóng là tương tự khi so sánh với một số loài cây dầu đang bị đe dọa như *D. alatus* ( $F_{ST} = 0.266$ , [69]), *H. odorata* ( $F_{ST} = 0.26$ , [67]), and *Dr. beccarii* ( $F_{ST} = 0.308$ , [44]). Khác nhau di truyền giữa các quần thể thường bị ảnh hưởng bởi sự trao đổi gen và sự phiêu bạt di truyền.

**Bảng 3.6.** Di truyền khác nhau giữa ở các cặp quần thể (dưới) và mức độ tin cậy ở các cặp quần thể (trên)

Quần thể	Bình Châu	Phước Thuận	Lò Gò-Xa Mát	Bưng Riêng	Bù Gia Mập	Tân Phú	Bàu Lâm	Bồng Trang
Bình Châu		+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
Phước Thuận	0.046		++	+++	++	+++	+	+
Lò Gò-Xa Mát	0.081	0.082		+++	+++	+++	++	+++
Bưng Riêng	0.026	0.068	0.081		+++	+++	++	+++
Bù Gia Mập	0.118	0.098	0.122	0.157		+++	+++	++
Tân Phú	0.095	0.083	0.072	0.107	0.086		+++	+++
Bàu Lâm	0.047	0.027	0.095	0.080	0.110	0.111		++
Bồng Trang	0.067	0.037	0.123	0.62	0.101	0.097	0.048	

Chú thích: Phần dưới là giá trị  $F_{ST}$ , phần trên là mức độ tin cậy  $^+p < 0,05$   $^{++}p < 0,01$   $^{+++}p < 0,001$



### 3.3.3.2. Phân tích di truyền khác nhau ở mức độ phân tử

Phân tích di truyền khác nhau ở mức độ phân tử (AMOVA) của 181 cá thể của 8 quần thể được ghi nhận ở Bảng 3.7.

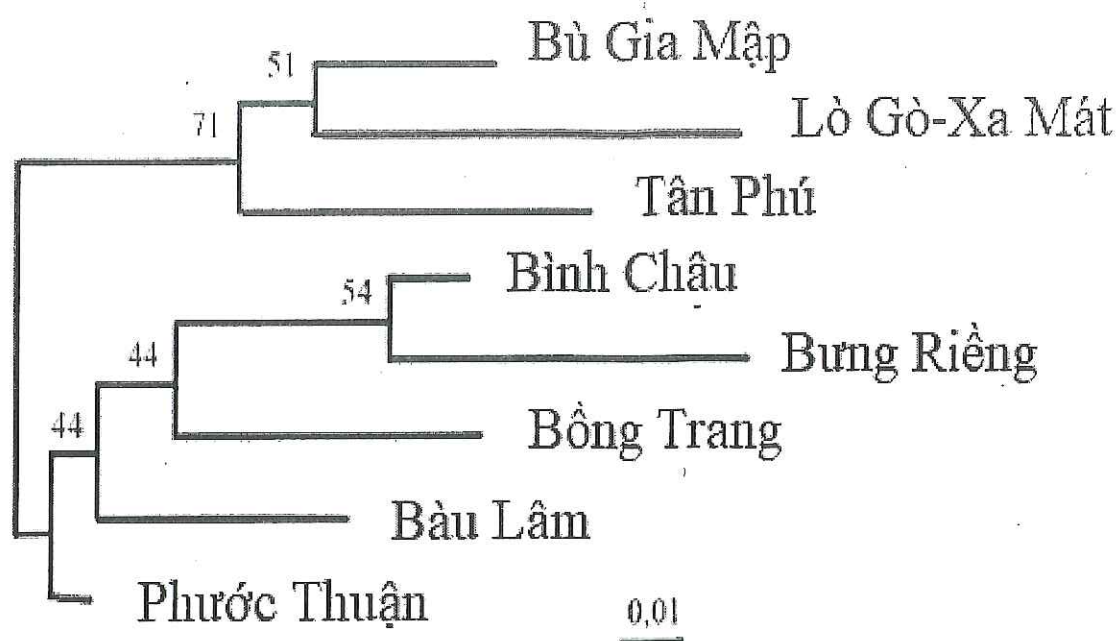
Hệ số di truyền khác nhau là 13% giữa các quần thể của Dầu lá bóng ở Đông Nam Bộ, và có độ tin cậy  $p < 0,01$ . Hệ số di truyền khác nhau trong các cá thể của loài Dầu lá bóng là cao, chiếm 77%. Kết quả phân tích AMOVA cũng tương tự như phân tích mức độ di truyền khác nhau giữa các quần thể là thấp, giá trị  $F_{ST} = 0,133$  và  $G'_{ST} = 0,187$ . Dòng gen ( $N_m$ ) giữa các quần thể Dầu lá bóng là cao, với giá trị  $N_m = 1,822$ .

**Bảng 3.7.** Kết quả phân tích AMOVA của loài Dầu lá bóng

	Mức tự do	Tổng bình phương	Mức độ khác nhau	Tỉ lệ (%)	Mức ý nghĩa
Giữa các quần thể	7	75,169	0,204	13	$p < 0,001$
Giữa các cá thể trong mỗi quần thể	173	263,049	0,157	9,99	$F_{IS}=0,115$ $F_{ST}=0,130$ $F_{IT}=0,230$
Trong các cá thể	181	218,500	1,207	77	
Tổng	361	556,718	1,568		

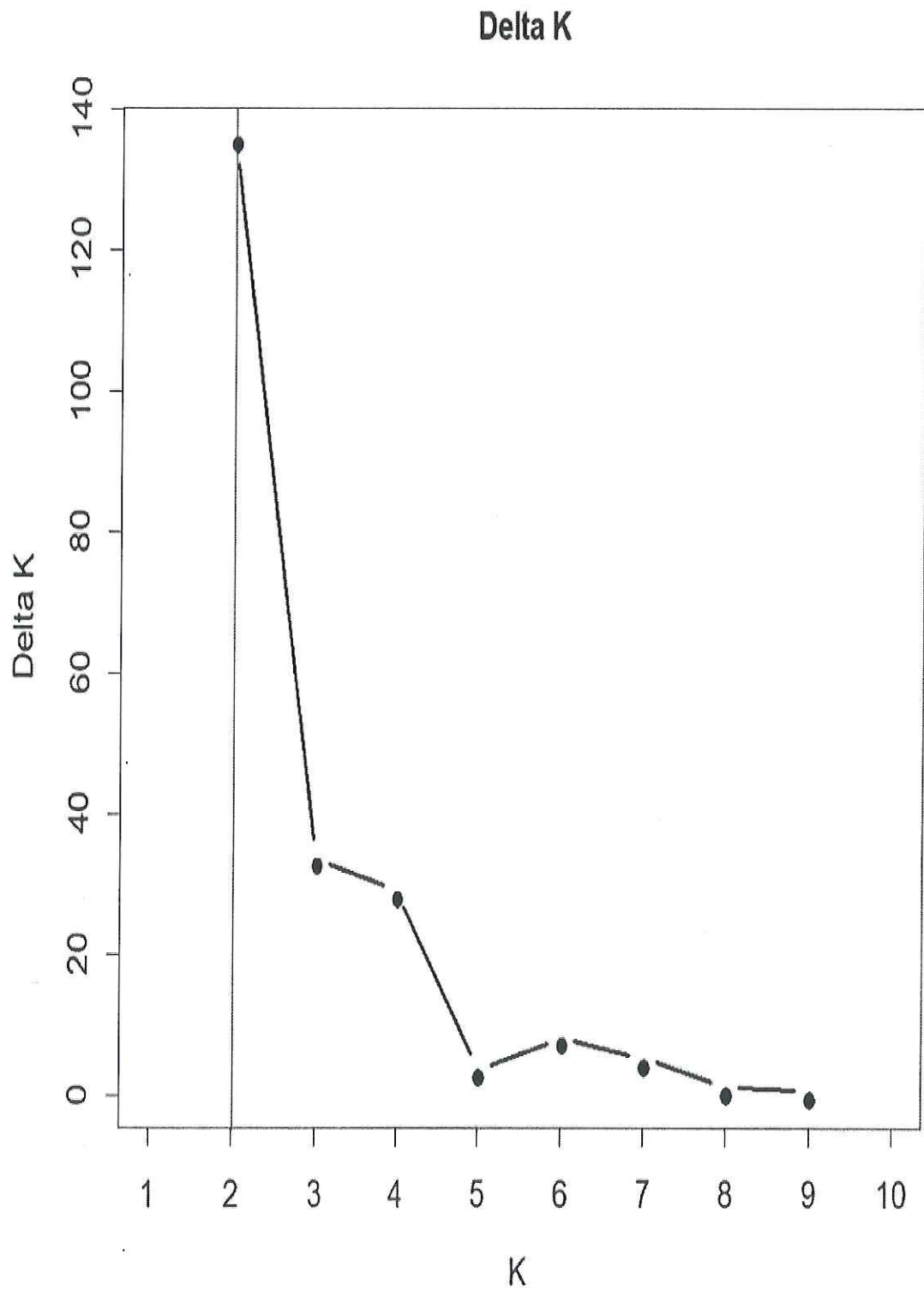
### 3.3.3.3. Phân tích di truyền giữa các cá thể và giữa các quần thể

Phương pháp Neighbor-joining (NJ) sử dụng chỉ số khác nhau di truyền giữa các quần thể ( $F_{ST}$ ) đã ghi nhận 2 nhóm gen chủ yếu, nhóm gen thứ nhất gồm có 3 quần thể ở 3 tỉnh Đông Nam Bộ, Bù Gia Mập (Bình Phước), Lò Gò-Xa Mát (Tây Ninh) và Tân Phú (Đồng Nai), và nhóm gen thứ hai 2 gồm có 5 quần thể ở tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu, bao gồm Bình Châu, Bung Riềng, Bông Trang, Bàu Lâm và Phước Thuận (Hình 3.4). Tuy nhiên, ở nhóm 1, quần thể Bù Gia Mập có quan hệ gần gũi với Lò Gò-Xa Mát, và ở nhóm thứ 2 hai quần thể Bình Châu và Bung Riềng có quan hệ gần gũi với nhau.

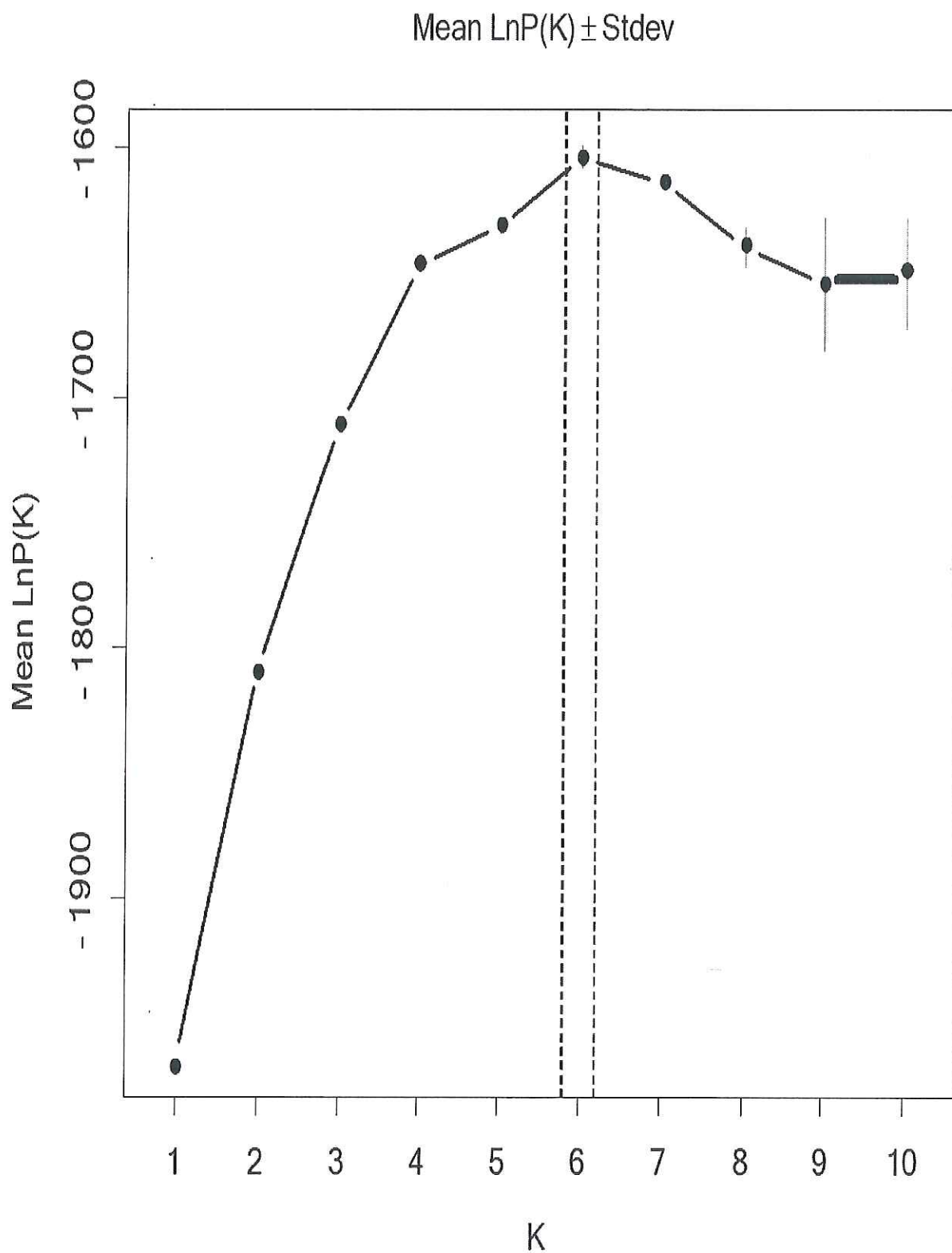


**Hình 3.4.** Cây Neighbor-joining (NJ) giữa các quần thể Dầu lá bóng

Phân tích Bayesia đã ghi nhận 3 đỉnh tại  $K = 2, 3$  và  $4$  (Hình 3.5). Tuy nhiên, Hình 3.6 cho thấy rằng mô hình  $K=2$  không chỉ ra giá trị sắc xuất cực đại  $[\text{LnP}(D)]$ , mô hình này vẫn ủng hộ giá trị  $\text{deltaK}$  cao nhất (134,9).  $K = 2$  có giá trị  $\text{deltaK}$  cao nhất (134,9), tiếp theo  $K=3$  với  $\text{deltaK}=33,7$  và  $K=4$  với  $\text{deltaK}=29,1$ .

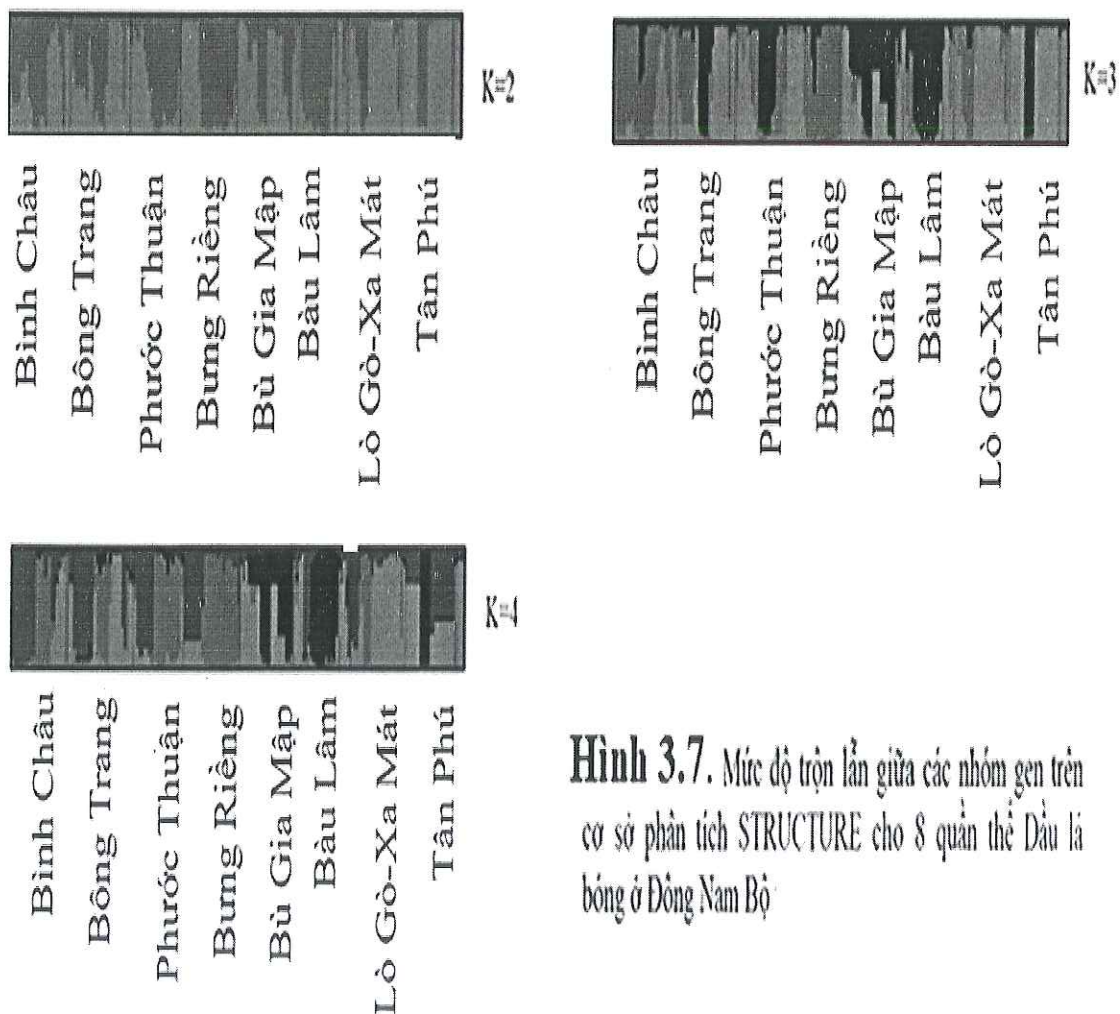


**Hình 3.5.** DeltaK của nhóm gen K từ 1 đến 10 bằng phân tích STRUCTURE cho 8 quần thể Dầu lá bóng ở Đông Nam Bộ



**Hình 3.6.** Giá trị trung bình của sắc xuất phân bố dẫn liệu ( $\text{LnP}(D)$ ) và độ lệch chuẩn cho mỗi giá trị  $K$  từ 1 đến 10 dùng phân tích Structure cho 8 quần thể Dầu lá bóng và Structure Harvester.

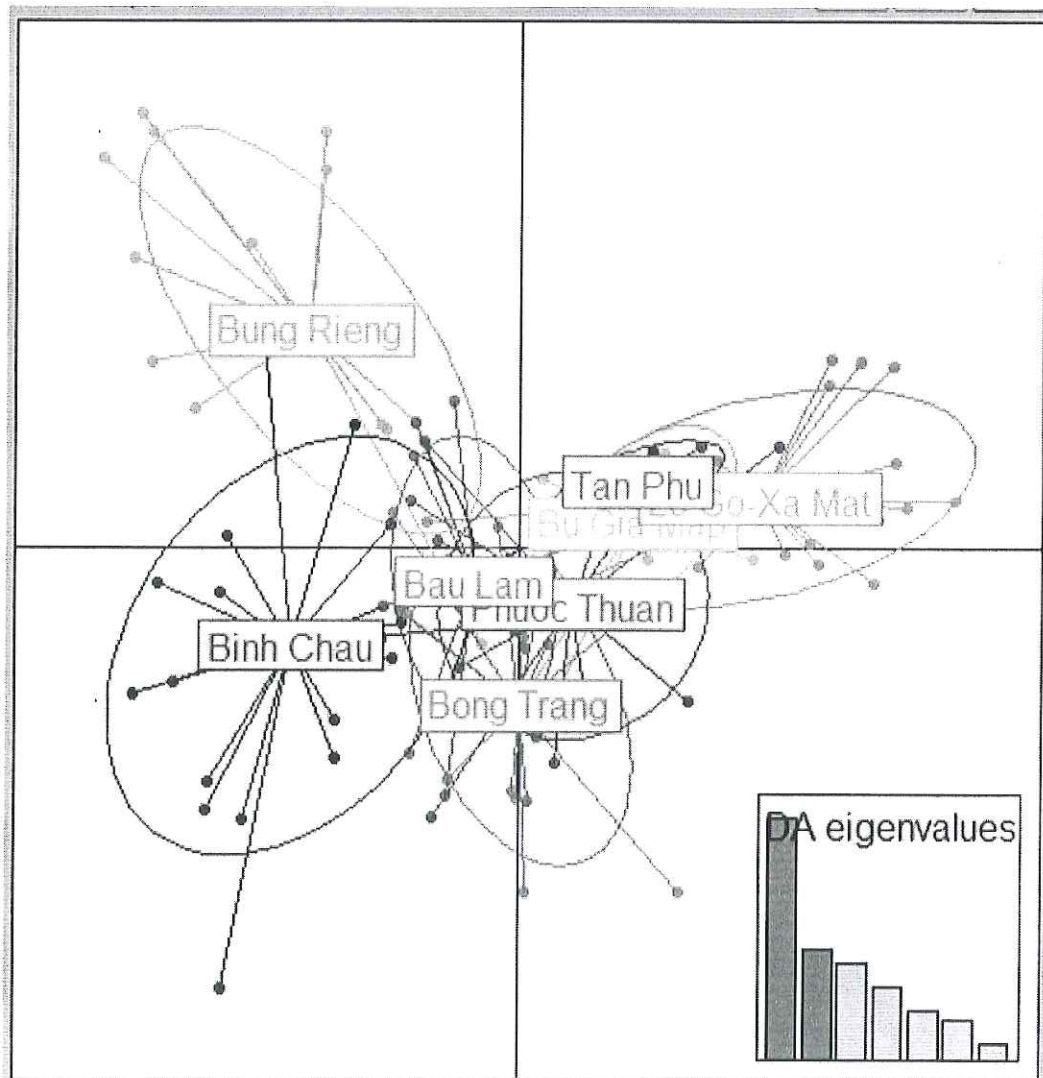
Tuy nhiên, số nhóm gen tối ưu là  $K=2$ , với giá trị  $\Delta K$  Cao nhất ( $\Delta K=134,9$ ) được nhận từ kết quả phân tích bởi phần mềm Structure Harvester. Tại  $K=2$ , mức độ trộn lẫn của mỗi cá thể và mỗi quần thể trong mỗi nhóm gen được ghi nhận ở Hình 3.7. Tỷ lệ phần trăm gen có nguồn gốc ban đầu (ancestry) của mỗi cá thể và mỗi quần thể trong 2 nhóm gen được thể hiện bởi ở mỗi màu sắc. Nhóm thứ nhất (màu xanh da trời) phổ biến cho Tân Phú, Bù Gia Mập và Lò Gò-Xa Mát. Nhóm thứ 2 biểu hiện màu nâu phổ biến với 5 quần thể còn lại ở Bình Châu-Phước Bửu, bao gồm Bông Trang, Bàu Lâm, Bung Riềng, Bình Châu và Phước Lâm. Tại  $K=3$ , ba nhóm gen được hình thành từ 181 cá thể của 8 quần thể. Nhóm gen thứ nhất gồm 3 quần thể Bình Châu, Bông Trang và Bung Riềng. Nhóm thứ hai gồm 2 quần thể Bù Gia Mập và Bàu Lâm và nhóm thứ 3 gồm ba quần thể còn lại, Phước Thuận, Lò Gò-Xa Mát và Tân Phú.



**Hình 3.7.** Mức độ trộn lẫn giữa các nhóm gen trên cơ sở phân tích STRUCTURE cho 8 quần thể Dầu lá bông ở Đồng Nam Bộ

Tại  $K=4$ , 181 cá thể được tách ra 4 nhóm gen khác nhau. Nhóm gen thứ nhất gồm có 2 quần thể Bình Châu và Phước Thuận. Nhóm 2 gồm 2 quần thể Bung Rieng và Bông Trang. Nhóm thứ 3 gồm có Tân Phú và Lò Gò-Xa Mát và nhóm thứ 4 gồm có 2 quần thể còn lại Bù Gia Mập và Bàu Lâp.

Phân tích DAPC đã ghi nhận sự chõng lãn giữa các quần thể của loài Dầu lá bóng (Hình 3.8). Năm quần thể ở Bà Rịa – Vũng Tàu có mức độ chõng lãn cao và phản ánh giá trị  $F_{ST}$  giữa các quần thể này là thấp. Giá trị  $F_{ST}$  trung bình cho các cặp quần thể ở Bà Rịa-Vũng Tàu là 0,058 (0,026-0,081) và chỉ các cặp quần thể khác là 0,082 (0,046-0,101).



**Hình 3.8.** Mức độ chõng lãn giữa các quần thể Dầu lá bóng

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã xác định được 26 allele khác nhau từ 8 quần thể Dầu lá bóng (*Dipterocarpus turbinatus*) ở Đông Nam Bộ. Allele hiếm đã được xác định tại 4 locus DT09, DT20, DT38 và Shc11. Allele có tần số cao (>80%) đã được xác định tại tất cả các locus nghiên cứu.
2. Loài Dầu lá bóng có tính đa dạng di truyền khá cao ở cả 4 quần thể, Bình Châu, Phước Thuận, Bồng Trang và Lò Gò – Xa Mát và thấp ở 4 quần thể còn lại. Hiện tượng suy giảm kích thước quần thể cũng đã được xác định ở 3 quần thể Bình Châu, Bung Riềng và Lò Gò-Xa Mát bằng phân tích Bottleneck. Sự suy giảm tính đa dạng di truyền ở loài Dầu lá bóng cũng đã được ghi nhận, liên quan nơi sống của chúng bị phá hủy hoặc bị suy giảm. Hơn nữa, loài này cũng bị khai thác quá mức vì mục đích thương mại.
3. Đã ghi nhận được 2 nhóm kiểu gen khác nhau, một nhóm gồm 3 quần thể Tân Phú, Bù Gia Mập và Lò Gò-Xa Mát, và nhóm thứ 2 gồm 5 quần thể ở Bà Rịa-Vũng Tàu, liên quan đến khu vực phân bố của loài và có thể liên quan đến khoảng cách địa lý.

### KIẾN NGHỊ

Như kết quả đã được ghi nhận, có thể nhận thấy rằng để bảo tồn cây Dầu, giảm mức độ thụ phấn cận loài thông qua việc duy trì số lượng quần thể, tăng mức độ thụ phấn chéo và trao đổi di truyền giữa các quần thể của mỗi loài là điều cần thiết. Để bảo tồn và phát triển bền vững nguồn gen của Dầu lá bóng đang bị đe dọa ở nước ta, chúng tôi có kiến nghị sau:

Các quần thể có tính đa dạng di truyền cao, như quần thể Bình Châu, Bồng Trang, Bung riềng và Lò Gò-Xa Mát được xem xét ưu tiên cho công tác bảo tồn nguyên vị và chuyển vị. Bảo tồn nguyên vị để duy trì tính đa dạng của các quần thể này. Bảo tồn chuyển vị với hình thức thu thập hạt tạo cây giống trong vườn ươm, đây là nguồn cây giống để bổ sung cho bốn quần thể có tính đa dạng di truyền thấp hơn (Tân Phú, Bà Rịa-Vũng Tàu, Bù Gia Mập và Phước Thuận).

Hơn nữa, tăng số lượng cá thể sẽ làm giảm hiện tượng thất cố chai và sinh sản cận noãn trong một số quần thể như Bung Riêng và Lò Gò-Xa Mát. Trong thời gian tới 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 mỗi quần thể Dầu lá bóng ở khu vực Đông Nam Bộ. Nghiên cứu này cần tiếp tục tiến hành và mở rộng để hiểu rõ hơn về mức độ mức độ thụ phấn chéo để góp phần bảo tồn hữu hiệu loài này ở Việt Nam.



**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

Nguyen Minh Duc, Nguyen Phan Lan Hong, Nguyen Huy Hoang, Tran Thi Huong Giang, Nguyen Thi Thuy Huong, Vu Dinh Duy, Nguyen Minh Tam (2023). Genetic Variation and Evolutionary History of the Threatened *Dipterocarpus turbinatus* C.F.Gaertn. Detected Using Microsatellites. Diversity 2023, 15, 894 (<https://doi.org/10.3390/d15080894>).

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Maury-Lechon G., Curtet L., 1998, Biogeography and Evolutionary Systematics of Dipterocarpaceae, *In: A Review of Dipterocarps: Taxonomy, ecology and silviculture*. Appanah S., Turnbull J.M. (eds), Bogor, Indonesia. ISBN 979-8764-20-X.
2. Ashton P.S., 2004, Dipterocarpaceae, *In: Tree Flora of Sabah and Sarawak*. Soepadmo E., Saw L.G., Chung R.C.K. (eds.), Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia. ISBN 983-2181-59-3.
3. Ng C.H., Chai Ting Lee, Lee S.L., Tnah L.H., Kevin Kit Siong Ng K.K.S., 2013, Isolation and characterization of microsatellite markers for *Shorea platyclados* (Dipterocarpaceae), *Applications in Plant Sciences*, 1(7).
4. WCMC (World Conservation Monitoring Centre), 1992, Global biodiversity: see set and offspring fitness, *Evolution*, 43, pp. 1097-1109.
5. Nguyễn Tiến Bản (ed.), 2003, *Cheklis of plant species of Vietnam*, V2, Agriculture House, Hanoi.
6. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2005, *Cây họ Dầu Việt Nam*, NXB Nông nghiệp.
7. Barrett S.C.H., Kohn J.R., 1991, Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation, *In: Falk DA, Holsinger KE (eds) Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, Oxford, pp. 3–30.
8. Momose K., Yumoto T., Nagamitsu T., Kato M., Nagamasu H., Sakai S., Harrison R., Itioka T., Hamid A.A., Inoue T., 1998, Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in Sarawak, Malaysia. I. Characteristics of the plant-pollinator community in a lowland dipterocarp forest, *American Journal of Botany*, 85, pp.1477-1501.
9. MOST (Ministry of Science and Technology) and VAST (Vietnamese Academy of Science and Technology), 2007, *Vietnam red data book*, partII. Plants, NXB Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
10. Frankham R., 1995, Relationship of genetic variation to population size in wildlife, *Conservation Biology*, 10, pp. 309-317.

11. Godt M.J.W., Johnson B.R., Hamrick J.L., 1996, Genetic diversity and population for multiple size of four southern Appalachian plant species, *Conservation Biology*, 10, pp. 796-805.
12. Hamilton W.D., 1982, Pathogens as causes of genetic diversity in their host population biology of clonal organisms, *Proceedings of the Royal Society of London*, pp. 232, pp. 35-57.
13. Kathrin S., Malcolm H., (eds.) 1991, *Economic and ecological sustainability of tropical rain forest management*, UNESCO, Paris.
14. Byers D.L., Meagher T.R., 1992, Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility, *Heredity*, 68, pp. 353-359.
15. Falk, D.A., Holsinger, K.E., (Eds.) 1991, *Genetic and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, New York, NY, USA, pp. 283.
16. Millar I.C., Libby J.W., 1991, Strategies for conserving clinal, ecotypic and disjunct population diversity in widespread species", In Falk DA and Holsinger, KE (eds.), *Genetic and conservation of rare plants*, Oxford University Press, New York, pp.149-170.
17. Bahulikar R.A., Lagn M.D., Kulkarnu B.G., Pandit S.S., Suresh H.S., Rao M.K.V., Ranjekar P.K., Gupta V.S., 2004, Genetic diversity among spatially isolated populations of *Eurya nitida* Korth (Theaceae) based on inter-single sequence repeats, *Current Science*, 86(6), pp. 824-831.
18. Kinnison M.T., Hendry A.P., Stockwell C.A., 2007, Contemporary evolution meets conservation biology II: Impediments to integration and application, *Ecological Research*, 22, pp. 947-954.
19. Van Rossum F., Triest L., 2007, Fine-scale spatial genetic structure of the distylous *Primula veris* in fragmented habitats, *Plant Biology*, 9, pp. 374-382.
20. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal Human Genetics*, 32, pp.314-331.
21. Welsh J., McClelland M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleotide Acids Research*, 18, pp.7213-7218.
22. Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics, *Plant Journal*, 3, pp. 175-182.

23. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleotide Acids Research*, 23, pp. 4407-4414.
24. Harada K., Kinoshita A., Abshukor N.A., Tachida H., Yamazaki T., 1994, Genetic variation estimated in three *Shorea* species by the RAPD analysis. *Japan Journal of Genetics*, 69, pp.713-718.
25. Cao C.P., Gailing O., Siregar I.Z., Siregar U.J., Finkeldey R., 2009, Genetic variation in nine *Shorea* species (Dipterocarpaceae) in Indonesia revealed by AFLPs, *Tree Genetics & Genome*, 5, pp. 407–420.
26. Terauchi R (1994). A polymorphic microsatellite marker from the tropical tree *Dryobalanops lanceolata* (Dipterocarpaceae), *Japan Journal of Genetic*, 69, pp. 567-576.
27. Ujino T., Kawahara T., Tsumara Y., Nagamitsu T., Yoshimaru H., Ratnam W., 1998, Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species, *Heredity*, 81, pp. 422–428.
28. Isagi V., Kenta T., Nakashizuka T., 2002, Microsatellite loci for a tropical emergent tree, *Dipterocarpus tempehes* V. S1 (Dipterocarpaceae), *Molecular Ecology Notes*, 2(1), pp. 12–13.
29. Alves E.M., Artero A.S., Sebbenn A., Figueira M., 2003, Mating system in a natural of *Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex Spreng.) by microsatellite markers. *Genetic Molecular Biology*, 26(3), pp. 373-379.
30. Picanco-Rodrigues D., Astolfi-Filho S., Lemes M.R., Gribel R., Sebbenn A.M., Clement C.R., 2015, Conservation implications of the mating system of the Pampa Hermosa landrace of peach palm analyzed with microsatellite markers *Genetic Molecular Biology*, 38(1), pp. 59-66.
31. Petit C., Arnal H., Darmency Y., 2015, Effects of fragmentation and population size on the genetic diversity of *Centaurea cyanus* (Asteraceae) populations. *Plant Ecological Evolution*, 148(2), pp. 191-198.
32. Vecchi-Staraz M.D., Laucou V., Bruno G., Lacombe T., Gerber S., Bourse T., Boselli M., This P., 2009, Low level of pollen- mediated gene flow from cultivated to wild grapevine: Consequences for the evolution of the endangered subspecies *Vitis vinifera* L. subsp. *Silvestris*, *Journal of Heredity*, 100(1), pp. 66-75.

33. Gijbels P., Hert K.D., Jacquemyn H., Honnay O., 2015, Reduced fecundity and genetic diversity in small populations of rewarding versus deceptive orchid species: a meta-analysis, *Plant Ecology and Evolution*, 148(2), pp. 153-159.
34. Bijlsma R., van Arendonk R., Woolliam J.A., 2000, A general procedure to predict rates of inbreeding in populations undergoing mass selection, *Genetics*, 154, pp. 1865-77.
35. Kawase D., Tsumura Y., Tomaru N., Seo A., Yumoto T., 2010, Genetic structure of an endemic Japanese conifer, *Sciadopitys verticillata* (Sciadopityaceae), by using microsatellite markers, *Journal of Heredity*, 101(3), pp. 292-297.
36. Hamrick J.L., Godt M.J.W., 1989, Allozyme diversity in plant species, In: Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 43-63.
37. Hamrick J.L., Godt M.J.W., Murawski D.A., Loveless M.D. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology, In Falk D.A., Holdingsinger E.K. (eds.). *Genetic and conservation of rare plants*, Oxford University Press, New York, pp. 163-211.
38. Ortergo J., Bonal R., Munoz A., 2010, Genetic consequences of habitat fragmentation in long lived tree species: The case of the mediterranean holm oak (*Quercus ilex*, L.), *Journal of Heredity*, 101(6), pp. 717-726.
39. Rodriguez-Rodriguez P., Fernandes de Castro A.G., Seguí J., Traveset A., Soa P.A., 2018, Alpine species in dynamic insular ecosystems through time: conservation genetics and niche estimates of the endemic and vulnerable *Viola cheiranthifolia*. *Annals of Botany*, 20, pp. 1-15, doi: 10.1093/aob/mcy185.
40. Noguerales V., Cordero P.J., Ortergo J., 2017, Testing the role of ancient and contemporary landscapes on structuring genetic variation in a specialist grasshopper, *Ecology and evolution*, doi: 10.1002/ece3.2810.
41. Rimbawanto A., Isoda A.K., 2001, Genetic structure of *Shorea leprosula* in a single population revealed by microsatellite markers. In: Thielges B.A., Sastrapradja S.D. and Rimbawanto A. (eds.), *Ex-situ and In-situ*

- conservation of commercial tropical trees: The contribution of genetic resource conservation to tree breeding, biotechnology, and future commercial plantation programs*, Yogyakarta, Indonesia, pp. 331–338.
42. Ng K.K.S., Lee S.L., Tsumura Y., Ueno S., Ng C.H., Lee C.T., 2004, Expressed sequence tag-simple sequence repeats isolated from *Shorea leprosula* and their transferability to 36 species within the Dipterocarpaceae, *Molecular Ecology Resources*, 2(1), pp. 393-8. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02238.x.
  43. Pandey M., Geburek T., 2009, Successful cross-amplification of *Shorea* microsatellites reveals genetic variation in the tropical tree, *Shorea robusta* Gaertn, *Hereditas*, 146, pp. 29–32.
  44. Harada K., Dwiyantri F.G., Siregar I.S., Subiakto A., Chong L., Diway B., Lee Y.F., Ninomiya I., Kamiya K., 2018, Genetic variation and genetic structure of two closely related dipterocarp species, *Dryobalanops aromatic* C.F.Gaertn. and *D. Beccarii* Dyer, *The Journal of Botanical Garden Horticulture*, 16, pp. 179–187.
  45. Naito Y., Konuma A., Iwata H., Suyama Y., Seiwa K., Okuda T., Lee S.L., Norwati M., Tsumura Y., 2005, Selfing and inbreeding depression in seeds and seedlings of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), *Journal of Plant Research*, 118, pp. 423-430.
  46. Obayashi K., Tsumura Y., Ihara-Ujino T., Niiyama K., Tanouchi H., Suyama Y., Washitani I., Lee C.T., Lee S.L., Muhammad N., 2002, Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis, *International Journal Plant Science*, 163, pp. 151–158. doi 10.1086/324549.
  47. Wang C., Ma X., Ren M., Tang L., 2020, Genetic diversity and population structure in the endangered tree *Hopea hainanensis* (Dipterocarpaceae) on Hainan Island, China, *PLoS ONE*, 15(11), e0241452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241452>.
  48. Rachmat H.H., Kamiya K., Harada K., 2012, Genetic diversity, population structure and conservation implication of the endemic Sumatran lowland dipterocarp tree species (*Shorea javanica*), *International Journal of Biodiversity Conservation*, 4, pp. 573–583.

49. Ismail S.A., Ghazoul J.G., Kushalappa C.G., Uma Shaanker R., Kettle C.J., 2014, Fragmentation Genetics of *Vateria indica*: implications for management of forest genetic resources of an endemic dipterocarp, *Conservation Genetics*, Published on line, doi: 10.1007/s10592-013-0559-7.
50. Abasolo M.A., Fernando E.S., Borrromeo T.H., Hautea D.M., 2009, Cross-species amplification of *Shorea* microsatellite DNA markers in *Parashorea malaanonan* (Dipterocarpaceae), *Philippine Journal of Science*, 138(1), pp. 23-28.
51. Muhammad AJ, Cannon CH, Wickneswari R., 2016, Cross-species amplification of microsatellite DNA markers in *Shorea playtyclados*, *Journal of Forestry Research*, 27, pp. 27–32.
52. Ying C., Jiyu D., Siqi Z., Mingxun R., Liang T., 2022, Genetic diversity of *Hopea reticulata* tardieu based on SSR markers, *Journal of Tropical Biology*, 13(2), pp. 127-135.
53. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997, *Bảo tồn nguồn gen cây rừng*. NXB Nông thôn.
54. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1999, *Một số loài cây bị đe dọa ở Việt Nam*, NXB Nông thôn.
55. Nguyễn Thị Hải Hồng, Trần Nhật Nam, Nguyễn Thị Lệ Hà, 2012, Nghiên cứu đa dạng di truyền cây dầu rái (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) bằng kỹ thuật RAPD, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, pp. 1-4.
56. Bùi Trung, 2010, Tìm hiểu tác động của auxin và gibberelline đến khả năng ra rễ của hom giâm Sao đen, *Tạp chí Khoa học lâm nghiệp*, 1, pp. 1-7.
57. Hoàng Phú Mỹ, Võ Đại Hải, 2013, Đánh giá mô hình rừng trồng phòng hộ hỗn giao giữa Dầu rái, Sao đen và Thanh thất tại huyện Sông Cầu, tỉnh Phú Yên, *Tạp chí KHLN*, 1, pp. 2601-2609.
58. Tô Bá Thanh, Bùi Việt Hải, Phạm Xuân Hoàn, 2014, Ảnh hưởng của các yếu tố trồng rừng đến sinh trưởng của rừng trồng Sao đen (*Hopea odorata*) và Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*) trong các mô hình phục hồi

- rừng tại khu Bảo tồn Thiên nhiên Đồng Nai, *Tạp chí KHLN*, 3, pp. 3433-3441.
59. Bùi Việt Hải, Tô Bá Thanh, Phạm Xuân Hoàn, 2014, Biến động chất lượng cây trong các mô hình rừng trồng sao đen (*Hopea odorata*) và Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*), *Tạp chí KHLN*, 1, pp. 3129-3138.
  60. Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thúy Hạnh, Trần Quốc Trọng, 2007, Kết quả sử dụng một số chuỗi gen lục lạp trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xuất xứ cây lâm nghiệp, *Công nghệ sinh học*, 5(1), pp. 77-83.
  61. Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Văn Phương, Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2009, Đa dạng di truyền của loài Sao mạng (*Hopea reticulate* Tardicu) dựa trên phân tích một số chuỗi DNA lục lạp và chỉ thị RAPD, *Công nghệ sinh học*, 7(2), pp. 203-210.
  62. Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy, Nguyen Minh Duc, Tran Thi Viet Thanh, Dang Phan Hien, Nguyen T. Phuong Trang, Nguyen Phan Lan Hong and Nguyen Trung Thanh, 2019, Genetic variation and outcrossing rates of the endangered species *Dipterocarpus dyeri*. *Journal of Tropical Forest Science*, 31(2), pp. 259-267.
  63. Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy, Nguyen Minh Duc, Dang Phan Hien, Phan Ke Long, Bui Xuan Phuong, 2020, Microsatellite analysis reveals genetic diversity of the endangered *Dipterocarpus dyeri*. *Journal of Forest Research*, 25(3), pp. 198-201.
  64. Tam Minh Nguyen, Duy Dinh Vu, Hien Phan Dang, Xuan Thi Tuyet Bui, Hong Phan Lan Nguyen, Duc Minh Nguyen, 2021, Population genetic diversity and demographic history of the dipterocarp species *Anisoptera costata* Korth revealed by microsatellite analysis, *Planta*, 253(66), <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03584-6>.
  65. Dinh Duy Vu, Thi Tuyet Xuan Bui, Minh Tam Nguyen, Dinh Giap Vu, Minh Duc Nguyen, Van Thang Bui, Xiaohua Huang, Yi Zhang (2017). Genetic variation in two threatened species: north taxad pine (*Taxus chinensis*) and south taxad pine (*Taxus wallichiana*), *Journal of Forestry Research*, 28(2), pp. 265-272.
  66. Dinh-Duy Vu, Thi Tuyet Xuan Bui, Minh Duc Nguyen, Syed Noor Muhammad Shah, Dinh-Giap Vu, Yi Zhang, Minh Tam Nguyen, Xiao-Hua Huang, 2019, Genetic diversity and conservation of the two



- threatened dipterocarps (Dipterocarpaceae) in southeast Vietnam, *Journal of Forestry Research*, 30(5), pp. 1823-1831  
<https://doi.org/10.1007/s11676-018-0735-1>.
67. Nguyen Thi Phuong Trang, Tran Thu Huong, Nguyen Minh Duc, Sierens Tim, Ludwig Triest (2014) Genetic population of threatened *Hopea odorata* Roxb. In the protected areas of Vietnam. *Journal of Vietnam Environment*, 6(1), pp. 69-76.
68. Nguyen Minh Duc, Vu Dinh Duy, Bui Thi Tuyet Xuan, Bui Van Thang, Nguyen Thi Hai Ha, Nguyen Minh Tam, 2016, Genetic structure in threatened *Dipterocarpus costatus* populations in lowland tropical rainforests of southern Vietnam, *Genetics and Molecular Research*, 15 (4), <http://dx.doi.org/10.4238/gmr15048821>.
69. Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy, Nguyen Minh Duc, Vu Dinh Giap and Bui T. Tuyet Xuan, 2014, Genetic variation in and spatial structure of natural populations of *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae) determined using single sequence repeat markers, *Genetics and Molecular Research*, 13(3), pp. 5378-5386.
70. Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Minh Tâm, Dương Văn Tăng, Vũ Đình Duy, 2013, Mối quan hệ di truyền của một số loài dầu (Dipterocarpaceae) trên cơ sở xác định trình tự nucleotide của vùng gen MatK. *Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5*, pp. 47-51.
71. Duc Minh Nguyen, Hong Lan Phan Nguyen, Tam Minh Nguyen, 2022, Genetic structure of the endemic *Dipterocarpus condorensis* Pierre revealed by microsatellite markers, *AoB PLANTS*, 14, pp. 1-9, <https://doi.org/10.1093/aobpla/plac007>.
72. Anderson J.A., Churchill J.E., Autrique S.D., Tanksley S., Sorrells M.E., 1993, Optimizing parental selection for genetic linkage maps, *Genome*, 36, pp. 181-188.
73. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley D.F., 2004, Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data, *Molecular Ecology Notes*, 4, pp. 435-538.
74. Hedrick P.W., 2005, A standardized genetic differentiation measure, *Evolution*, 59, pp.1633-1638.

75. Peakall R., Smouse P.E., 2006, GENALEX 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes*, 6, pp. 288-295.
76. Goudet J., 2001, FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Accessed 19 Nov 2015.
77. Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007, Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment, *Molecular Ecology*, 16, pp. 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
78. Chybicki I.J., Burczyk J., 2009, Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficient, *Journal of Heredity*, 100, pp. 106–113.
79. Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005, Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis, *Evolutionary Bioinformatics*, Online 1, pp. 47-50.
80. Rousset F., 2008, GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Research*, 8, pp. 103–106.
81. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155, pp. 945–959.
82. Earl D.A., Holdt B.M., 2012, Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the jor Evanno method, *Conservation Genetics Research*, 4, pp. 359–361.
83. Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study, *Molecular Ecology*, 14, pp. 2611–2620.
84. Jombart T., Devillard S., Balloux F., 2010, Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations, *BMC Genetics*, 11, 94.
85. 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 Evolution*, 27(4), pp. 747–52.

86. Piry S., Luikart G., Cornnet J.M., 1999, Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size frequency data, *Journal of Heredity*, 90, pp. 502–503.
87. Nguyen Minh Tam, Phan Ke Loc, Vu Dinh Duy, 2015, Genetic diversity in Xuan nha pine (*Pinus armandii* subsp. *xuannhaensis* L.K. Phan), *Research Journal of Biotechnology*, 10(3), pp. 30-36.
88. Weir B., Cockerham C., 1984, Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution*, 38, pp.1358–1370.
89. Keiya I., Irsyal Y., Anto R., Istiana P., 2001, Estimation of genetic variation of *Drybalanops oblongifolia* Dyer. (Dipterocarpaceae) planted in Peninsular Malaysia. In: Thielges BA, Sastrapradja SD and Rimbawanto A (eds.), *In-situ and ex-situ conservation of commercial tropical trees: The contribution of genetic resource conservation to tree breeding, biotechnology, and future commercial plantation programs*, Yogyakarta, Indonesia, pp. 377–384.