

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ MẮM BIỂN (*AVICENNIA MARINA*) TẠI VÙNG VEN BIỂN NAM TRUNG BỘ VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ SSR

Trần Thị Hương Giang^{1,2}, Nguyễn Hồng Nhung¹, Nguyễn Đình Trọng¹, Lê Văn Tuất⁴,
Đỗ Quý Mạnh⁴, Nguyễn Quốc Huy⁴, Phạm Bích Ngọc^{1,3}, Chu Hoàng Hà^{1,3}, Đỗ Tiến Phát^{1,3*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴ Viện Sinh thái và Bảo vệ công trình

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân tích đa dạng di truyền của các cá thể mắm biển thuộc các quần thể khác nhau thu thập từ rừng ngập mặn ven biển Nam Trung Bộ nhằm mục đích phát hiện những cấu trúc di truyền khác biệt trong quần thể thông qua chỉ thị phân tử SSR để phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen, chọn lọc và cải thiện giống. Bằng chỉ thị SSR, có tổng số 42 alen được phát hiện trên tổng số 15 cá thể thuộc ba quần thể được khảo sát, và chỉ ghi nhận 2/22 chỉ thị SSR cho tính đa hình với số alen hiệu quả trung bình là 1,192. Tỷ lệ dị hợp kỳ vọng trung bình (H_E) và tỷ lệ dị hợp thu được trung bình (H_O) của cả ba quần thể đều đạt giá trị thấp, lần lượt là 0,061 và 0,030. Các kết quả phân tích cũng cho thấy cho thấy sự tương đồng di truyền ở mức độ cao giữa ba quần thể thuộc vùng Nam Trung Bộ được khảo sát. Hiện tượng trao đổi nguồn gen được ghi nhận giữa các quần thể, đặc biệt là giữa quần thể Quảng Nam và Bình Định. Khoảng cách di truyền của quần thể mắm biển ở Ninh Thuận so với hai quần thể còn lại được ghi nhận là lớn nhất. Dữ liệu được phân tích trong nghiên cứu này sẽ cung cấp thông tin hữu ích trong việc khảo sát, phân tích hiện trạng và đa dạng của quần thể mắm biển vùng Nam Trung bộ, từ đó góp phần định hướng chọn tạo và bảo tồn cây mắm biển tại các vùng ven biển này.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử SSR, đa dạng di truyền, Nam Trung Bộ, mắm biển.

MỞ ĐẦU

Rừng ngập mặn (RNM) là hệ sinh thái chuyển tiếp giữa môi trường biển và môi trường nước ngọt, có vai trò to lớn về kinh tế và sinh thái - môi trường. Tại Việt Nam, do các nguyên nhân khách quan như nước biển dâng, xâm nhập mặn,... cũng như các nguyên nhân chủ quan như phá rừng để làm đầm nuôi tôm, sản xuất nông nghiệp, đồng muối, sự đô thị hóa, khai thác tài nguyên quá mức,... diện tích và chất lượng rừng ngập mặn nước ta ngày càng giảm sút, cũng như áp lực đối với hệ sinh thái ven biển ngày càng gia tăng (VDR, 2010). Đã có nhiều nghiên cứu và giải pháp khoa học công nghệ được đưa ra để phục hồi RNM, trong đó các giải pháp kỹ thuật chính bao gồm lập bản đồ địa ngập mặn, phục hồi rừng ngập mặn suy thoái, trồng mới rừng ngập mặn... Bên cạnh đó, Nhà nước và một số tổ chức phi chính phủ cũng đưa ra và thực hiện nhiều dự án tuyên truyền nâng cao nhận thức người dân về bảo vệ và khai thác hiệu quả tài nguyên RNM, cũng như ban hành pháp luật về bảo vệ RNM...

Diện tích RNM tại vùng Nam Trung Bộ chỉ chiếm khoảng 2 ha trên tổng số 209.741 ha RNM của cả nước (Bộ NN&PTNT, 2008). Trong số các loài cây ngập mặn ở vùng Nam Trung Bộ, cùng với đước đỏ (*Rhizophora apiculata*), mắm biển (*Avicennia marina*) là một loài cây rừng ngập mặn chiếm ưu thế có phân bố rộng rãi dọc theo bờ biển nhiệt đới và cận nhiệt đới (Kathiresan, Bingham, 2001) và phân bố trải dài từ Quảng Nam tới Ninh Thuận. Sự phân bố trải dài về mặt địa lý với quy mô diện tích nhỏ đã khiến sự đánh giá đa dạng nguồn gen đối với loài này ở khu vực Nam Trung Bộ còn chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều.

So sánh với phương pháp truyền thống, nghiên cứu đa hình bằng chỉ thị phân tử cho kết quả có độ chính xác và tin cậy cao (Li *et al.*, 2000). Hiện nay, trên thế giới và Việt Nam, một số nghiên cứu đa dạng di truyền của các loài cây thuộc rừng ngập mặn được thực hiện thông qua các chỉ thị phân tử như đa hình các đoạn DNA nhân ngẫu nhiên (RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA), đa hình độ dài các đoạn cắt giới hạn (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism) (Salvi *et al.*, 2001) và sự lặp lại các chuỗi đơn giản (SSR-Simple Sequence Repeats) (Maguire *et al.*, 2000, 2002). Các kết quả thu được rất có giá trị trong chọn tạo giống cũng như công tác bảo tồn và tái tạo nguồn gen. Hiện nay, có 26 locus SSR có sẵn cho *Avicennia marina*, được phát triển bởi hai nhóm nghiên cứu sử dụng các phương pháp dựa trên thư viện gen thông thường (Maguire *et al.*, 2000b; Geng *et al.*, 2007). Maguire và đồng tác giả (2002) đã sử dụng các chỉ thị AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) và SSR để đánh giá đa dạng di truyền quần thể mắm biển *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. tại Úc. Nhóm nghiên cứu đã nhận thấy trong 120 cá thể đại diện cho 6 quần thể mắm biển được phân tích, chỉ thị SSR

có độ dị hợp tử trung bình 0,78 trong khi đó đối với chỉ thị AFLP chỉ là 0,193. Giang và đồng tác giả (2003) cũng đã sử dụng các chỉ thị AFLP và SSR để đánh giá sự biến động di truyền của mắm biển ở khu vực Bắc Bộ và Nam Bộ, Việt Nam. Tuy nhiên, nghiên cứu của nhóm chỉ tập trung nhiều vào vùng Bắc Bộ và Nam Bộ, chưa đánh giá được cụ thể và chính xác sự đa dạng di truyền của quần thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các chỉ thị SSR để đánh giá đa dạng di truyền của quần thể mắm biển tại vùng Nam Trung Bộ, khu vực có diện tích RNM lớn và quan trọng của nước ta. Các mẫu được thu thập tập trung tại các tỉnh Quảng Nam, Ninh Thuận và Bình Định nhằm cung cấp, bổ sung thông tin về nguồn gen của loài cây này, làm cơ sở cho việc tạo mẫu bảo tồn nguồn gen và công tác chọn tạo giống cây mắm biển ở Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu thực vật

Các mẫu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu này là các mẫu lá cây mắm biển được thu thập tại 3 tỉnh Quảng Nam (QN), Bình Định (BD) và Ninh Thuận (NT).

Phương pháp

Phương pháp thu mẫu và tách chiết DNA tổng số

Từ tập hợp 140 cá thể mắm biển được thu thập tại 3 vùng RNM: Thôn Đông Xuân, xã Tam Giang, huyện Núi Thành, tỉnh Quảng Nam (15°28'27"N 108°39'20"E); xã Phú Cát, huyện Tuy Phước, tỉnh Bình Định (14°00'46"N 109°06'36"E); xã Tân Hải, huyện Hàm Tân, tỉnh Ninh Thuận (11°38'29"N 109°01'38"E), để số lượng mẫu được lựa chọn đảm bảo đại diện cho tổng thể các mẫu nghiên cứu, tiết kiệm thời gian và chi phí, chúng tôi lựa chọn ngẫu nhiên 5 cá thể mắm biển mỗi quần thể nêu trên để phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử SSR. Các mẫu lá được sử dụng trong nghiên cứu là các mẫu lá non hoặc bánh tẻ, mọc ở vị trí thứ 3 từ đầu cành. Mẫu lá được đánh dấu và bảo quản riêng biệt ở điều kiện mát suốt thời gian vận chuyển từ thực địa về phòng thí nghiệm và được lưu giữ ở nhiệt độ -80°C tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học.

DNA được tách chiết và tinh sạch từ mô lá theo phương pháp mini-CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984) có cải tiến. DNA tổng số sau đó được kiểm tra trên gel agarose 1% và đo hàm lượng, độ tinh sạch bằng máy Nanodrop (Thermo Scientific).

Phản ứng PCR-SSR

Trình tự nucleotide của các chỉ thị SSR được lựa chọn, thiết kế dựa vào các nghiên cứu trước đây và được đặt tổng hợp tại công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam), thông tin về trình tự các chỉ thị được thể hiện trên bảng 1.

Thành phần phản ứng PCR-SSR có thể tích 25 µl bao gồm: 8,5 µl nước khử ion vô trùng, 2 µl DNA khuôn (30 ng/µl), 2 µl mỗi (10 pmol), 12,5 µl dung dịch đệm PCR. Phản ứng PCR được thực hiện với 22 cặp mỗi như sau: giai đoạn khởi đầu được thực hiện ở 94°C trong 4 phút; giai đoạn khuếch đại được thực hiện trong 35 chu kỳ nhiệt, bao gồm biến tính ở 94°C trong 45 giây; gắn mỗi trong 15 giây, và kéo dài ở 72°C trong 1 phút; và giai đoạn kết thúc kéo dài được thực hiện ở 72°C trong 5 phút. Nhiệt độ gắn mỗi được thực hiện cho từng phản ứng PCR dựa trên chỉ dẫn của nhà tổng hợp mỗi (PHUSA Biochem, Việt Nam). Sản phẩm khuếch đại được phân tách trên gel agarose 1,5% (dung dịch đệm TBE 1X) ở hiệu điện thế 90V trong 2 giờ, nhuộm với Ethidium bromide, và được chụp lại dưới ánh sáng UV (Clever Scientific®, UK). Kích thước tương đối của các băng được so sánh với marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific company, USA).

Phân tích số liệu

Vị trí các băng vạch trên bản điện di được mã hóa bằng số 1 (nếu xuất hiện băng vạch) và số 0 (nếu không xuất hiện băng vạch ở vị trí tương đương) và được lưu trên phần mềm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Các số liệu này sau đó được xử lý trên máy tính theo chương trình NTSYSp version pc 2.1 (Applied Biostatistics), phương pháp clustering SAHN để xác định quan hệ di truyền của các mẫu mắm biển thuộc 3 quần thể nghiên cứu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

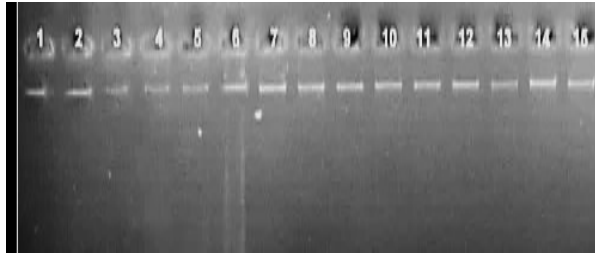
Kết quả thu thập mẫu Mắm biển tại Nam Trung Bộ và tách chiết DNA tổng số

Nhóm nghiên cứu đã thu thập được 50 mẫu Mắm biển tại thôn Đông Xuân, xã Tam Giang, huyện Núi Thành, tỉnh Quảng Nam, 50 mẫu mắm biển được thu tại xã Phú Cát, huyện Tuy Phước, tỉnh Bình Định, và 40 mẫu mắm biển tập trung tại khu vực bên ngoài đê chắn sóng được thu tại xã Tân Hải, huyện Hàm Tân, tỉnh Ninh Thuận.

Bảng 1. Tên và trình tự các mồi SSR sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Locus	Trình tự (5'-3')	Kiểu lặp	Chiều dài đoạn nhân lên (bp)	Tài liệu tham khảo
1	M3	M3	F: GGTTCCTGCAAGTATGTCAACACCCTC R: ACCTTCGATTCTCCCGAATGC	(TG) ₁₅	182	Maguire <i>et al.</i> , 2000
2	M13	M13	F:CAATGGTGATTCTCCAAAATTGCTTTG R:TGGTGAATAGATGACAGTAAGGATCAGCC	(AT) ₁₀ (GT) ₁₂	192	Maguire <i>et al.</i> , 2000
3	M40	M40	F:CCCATAGATGACGGCAATCTTATGATCC R:ACCATCCAAAATAAATAATCTCCCTCCC	(AG) ₃₂	161	Maguire <i>et al.</i> , 2000
4	M47	M47	F:TGACACCAAGGAAATCAACATGCC R:GAACCTAGCGACCAATAGATCATCCTGG	(CA) ₁₃	172	Maguire <i>et al.</i> , 2000
5	M64	M64	F:CAAACCTACCAATCAGAACACTTCAAGC R:CGATATTTGGCTAATCCACTCTGCTGACTG	(CAG) ₈	156	Maguire <i>et al.</i> , 2000
6	M76	M76	F:GCATGTTTCAGCCTCTTTGGTGCC R:CTTCCAAGTGGGATGCTCTTTGTGCG	(CA) ₂₅ (TA) ₃	168	Maguire <i>et al.</i> , 2000
7	M81	M81	F:GAATGATGATCGGATGTTGCTACTCCTG R:CAATCCCAAAGCCCCAAAATAATCC	(CA) ₉ (CT) ₁₀	164	Maguire <i>et al.</i> , 2000
8	M98	M98	F:CCCAAACCTCGTTACGATGGATGACTTC R:CTTACAGTTGCGGTAATAATGAGACGTGC	(CGG) ₈	228	Maguire <i>et al.</i> , 2000
9	Aa13	Aa13	F:CCGTTTCCATTTTCCTTTATTC R:GCACTCTACTCTCATCCC	(TG) ₁₂ (AG) ₅ T(GA) ₇	246	Teixeira <i>et al.</i> , 2003
10	Aa26	Aa26	F:GGATTAAGAATGAAGAAAGGGG R:CCAAGTGTGGAATGTTGTATCTT	(TC) ₂₂	178	Teixeira <i>et al.</i> , 2003
11	RM102.1	RM102.1	F:GGTTTTCCAGTCACGACGTGCTGCTACTGATCAGGAATG R:GTTTCAHATCCTACCACCATCAG	(TG) ₁₇	167-187	Shinmura <i>et al.</i> , 2012
12	RM102	RM102	F:GGTTTTCCAGTCACGACGTGCTGCTACTGATCAGGAATG R:GTTTCAHATCCTACCACCATCAG	(TG) ₁₇	167-187	Shinmura <i>et al.</i> , 2012
13	RM106	RM106	F:GGTTTTCCAGTCACGACGCCCTGGCTTACCCTTCTT R:GTTTAGAACCAAACCTCAAGGGTC	(GA) ₁₃	192-200	Shinmura <i>et al.</i> , 2012
14	RM121	RM121	F:GGTTTTCCAGTCACGACGTGGCCTATAGAGAAAGCGGA R:GTTTCTTCAATCCAAACAGC	(TG) ₁₇	174-183	Shinmura <i>et al.</i> , 2012
15	Kcan004	Kcan004 (AB063360)	F:TGAAGTAAAAACACTCGAAAAT R:GCGCCCTAATTAATGCTT	(CT) ₃₅	218-240	Sugaya <i>et al.</i> , 2002
16	Kcan005	Kcan005 (AB063364)	F:CGAAGATTCGAGAAGCAC R:GCTGCAATCTAGTGAGAGAAAGA	(CT) ₁₃	354-360	Sugaya <i>et al.</i> , 2002
17	Kcan009	Kcan009 (AB063361)	F:CCGGAAGTATGATGATGATCA R:AGGATGGTCTTTACAGGTTATTT	(GA) ₂₀	286-296	Sugaya <i>et al.</i> , 2002
18	Kcan011	Kcan011 (AB063362)	F:AGCCACTCAGGTGTTCTATG R:CAGGTCTCATGGCTGTGTC	(CT) ₃₄	303-339	Sugaya <i>et al.</i> , 2002
19	Kcan034	Kcan034 (AB063363)	F:CAGAAGCAGCAAGTAAGGAA R:GAAGAAGCTGAAGACAGTGA	(AG) ₂₆	250-266	Sugaya <i>et al.</i> , 2002
20	Rhst01	Rhst01	F:GCTTTGCTAGCCTGTCCATAAAAGTCC R:TTCCACAAGGTAAAGGATC	A ₁₂ A ₉ (TTA) ₁₀ (AC) ₁₀	228-243	Islam <i>et al.</i> , 2004
21	Rhst13	Rhst13	F:ATGTTGAAGGCATGGCTTGGGA R:TCTTCAGGATCCAGACCTTGG	(CT) ₁₈ (CA) ₁₂ (AT) ₃	159-165	Islam <i>et al.</i> , 2004
22	Rhst11	Rhst11	F:GTATGACTAATTGACTGTAGC R:ACTCCGACAGCATAGAGATC	(GT) ₁₇ (AT) ₆	143-149	Islam <i>et al.</i> , 2004

Phương pháp mini-CTAB (Saghai-Marouf *et al.*, 1984) có cải tiến được sử dụng để loại bỏ hết các hợp chất thứ cấp và lượng lớn polysaccharide có trong mẫu. Kết quả điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8% cho thấy các mẫu DNA thu được không bị đứt gãy và có độ đồng đều cao (Hình 1). Băng vạch DNA trên gel có độ sáng đồng đều và sắc nét. Chỉ một vài mẫu có xuất hiện của phần ADN đứt gãy, ví dụ giếng 6 trên hình 1. Các mẫu DNA này, được tinh sạch một lần nữa bằng kit GeneJet Gel Extraction Kit® (Thermo scientific) để đảm bảo độ tinh sạch cho các phản ứng PCR. Sau khi tinh sạch các mẫu DNA được chuyển sang đo nồng độ DNA và kiểm tra tỷ lệ A260/A280. Nồng độ DNA thu được dao động từ trên 400 ng/μl đến dưới 2000 ng/μl. Độ tinh sạch DNA dựa trên chỉ số A260/A280 cho kết quả từ 1,8 đến 2,2.



Hình 1. Chất lượng DNA tổng số của 15 mẫu mắm biển được thu thập từ 3 vùng địa lý khác nhau (Các mẫu được đánh số T1-T5 thuộc quần thể Quảng Nam, T6-T10 thuộc quần thể Bình Định, T11-T15 thuộc quần thể Ninh Thuận)

Như vậy, nhóm nghiên cứu đã tách chiết thành công DNA từ các mẫu lá thu thập được. Trong số đó, 15 mẫu DNA thuộc 3 quần thể được lựa chọn ngẫu nhiên làm đại diện để đánh giá đa dạng di truyền của các quần thể mắm biển.

Kết quả khuếch đại các chỉ thị SSR và sự đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị SSR

Sản phẩm khuếch đại được sử dụng trong chỉ thị SSR bao gồm loại đơn hình và loại đa hình; trong đó băng đơn hình là băng có mặt trong tất cả các cá thể nghiên cứu, và băng đa hình là băng xuất hiện ở một số cá thể nhất định (Hình 2). Trong nghiên cứu này, có tổng số 42 alen được quan sát trên tổng số 22 locus được phát hiện. Trong số này có 20/22 locus, bao gồm RM121, Kcan005, Kcan011, Kcan034, M3, M40, M47, M81, M98, M64, Aa13, Aa26, M76, M13, RM102.1, Rhst01, Rhst13, Rhst11, RM102, RM106 cho kết quả đơn hình. Locus Kcan009 có số alen quan sát được là lớn nhất (17). Trong khi đó, các mồi SSR như M3, M40, M47,... được sử dụng trong nghiên cứu của Maguire và đồng tác giả (2000) trên quần thể mắm biển ở Australia và Séc đã được ghi nhận có độ đa hình cao và chỉ ra được mức độ đa dạng di truyền cao của các quần thể nghiên cứu. Các chỉ thị Aa13 và Aa26 cũng được Teixeira và đồng tác giả (2003) sử dụng hiệu quả để đánh giá đa dạng di truyền của quần thể mắm trắng (*Avicennia alba*) tại vùng Đồng bằng sông Cửu Long, với tỷ lệ dị hợp tử thu được (H_0) nằm trong khoảng 0,26-0,86. Các chỉ thị SSR như Rhst01, Rhst13, Rhst11 được cho là hiệu quả trong việc đánh giá đa dạng di truyền của các quần thể đang ở Nhật Bản với tỷ lệ dị hợp tử kỳ vọng (H_E) cao (trong khoảng 0,113-0,473) và đa hình cao cũng được chúng tôi sử dụng. Tuy nhiên, kết quả ghi nhận được đối với các chỉ thị này là một băng đơn hình duy nhất. Tương tự, các chỉ thị Rhst01, Rhst13, Rhst11 dùng để đánh giá đa dạng di truyền cây đước xanh (*Rhizophora mucronata*) ở vùng Ấn Độ Dương - Tây Thái Bình Dương được Shinmura và đồng tác giả (2012) sử dụng như các marker đa hình. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ thu được các kết quả đơn hình. Điều này một lần nữa cho thấy cần phát triển và ứng dụng đa dạng các chỉ thị trong nghiên cứu đặc điểm di truyền cây mắm biển.

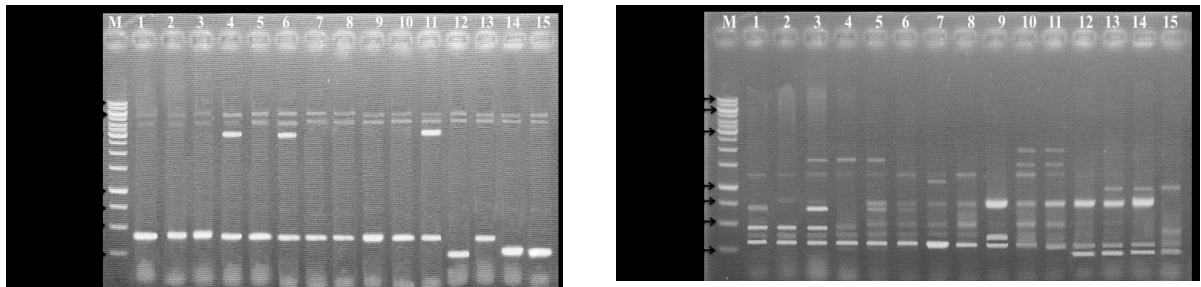
Có 23 alen trên tổng số 42 alen quan sát được ở quần thể Quảng Nam (QN) và Bình Định (BD). Alen Kcan004-5, Kcan009-6 và Kcan009-12, và Kcan009-17 chỉ xuất hiện ở quần thể Ninh Thuận (NT). Alen Kcan009-7 và Kcan009-11 chỉ xuất hiện ở quần thể Quảng Nam (QN). Một số alen xuất hiện với tần số cao như Kcan009-4 (0,29), Kcan009-13 (0,23), trong khi đó cũng có những alen xuất hiện với tần số rất thấp như Kcan009-1 (0,059), Kcan009-3 (0,059).

Tỷ lệ dị hợp tử H_0 thu nhận được khi phân tích bằng chỉ thị SSR Kcan004, Kcan005, Kcan009, Kcan011, Kcan034 (bảng 1), ở các quần thể mắm biển so với các nghiên cứu khác như Sugaya và đồng tác giả (2002) trên cây *Kandelia candel* (L.) Druce tại đảo Amami-O-Shima ở Quần đảo Tây Nam của Nhật Bản, tỷ lệ dị hợp tử H_0 của cây mắm biển dao động trong khoảng từ 0,018 đến 0,056 (bảng 3) và tỷ lệ dị hợp tử H_0 của cây *Kandelia candel* (L.) Druce dao động trong khoảng 0.250 đến 0.938. Số lượng phân đoạn chúng tôi thu nhận được khi phân tích bằng các chỉ thị SSR này có dao động trong khoảng từ 1 đến 17 alen, ở nghiên cứu của Sugaya và đồng tác giả (2002), mỗi locus là đa hình từ 3-9 alen, tỷ lệ đa hình với chỉ thị Kcan004 và Kcan009 trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu trên. Điều này chứng tỏ chỉ thị SSR này rất có hiệu quả trong phân tích đa dạng ở quần thể cây mắm biển.

Số alen trung bình trên một locus (N_a) của mỗi quần thể được khảo sát là tương đương nhau, dao động trong khoảng 1,5 - 1,64 (Bảng 2). Số alen hiệu quả trung bình trên một locus (N_e) cũng không có sự khác biệt nhiều giữa các quần thể. Giá trị này thể hiện sự đa dạng alen thấp hơn so với nghiên cứu của Maguire và đồng tác giả (2003) về các quần thể mắm biển trên thế giới. Nghiên cứu của Maguire và đồng tác giả (2000) đã chỉ ra rằng, thông thường, số alen có xu hướng tăng theo mức độ lặp lại của locus tiểu vệ tinh. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả không ghi nhận được sự tăng số lượng alen trên các locus khảo sát khác nhau.

Tính dị hợp (đa dạng gen) trung bình (H_0) của ba quần thể ở Nam Trung Bộ được khảo sát thấp hơn nhiều (0,03) so với nghiên cứu của Giang và đồng tác giả (2003) cho sáu quần thể mắm biển ở Việt Nam. Cụ thể là, tính dị

hợp (H_o) của quần thể Ninh Thuận (0,056) cao hơn so với hai quần thể còn lại (0,018) (bảng 2), tuy nhiên, tính dị hợp của cả ba quần thể này đều rất thấp. Sự đa dạng di truyền tương đối thấp ở các quần thể mắm biển ở vùng Nam Trung bộ có thể là kết quả của sự suy thoái rừng ngập mặn ở vùng Nam trung bộ và sự di thực trong quá trình trồng mới và phục hồi rừng ngập mặn.



A **B**
Hình 2. Sản phẩm PCR với cặp mồi Kcan004 (bên trái) và cặp mồi Kcan009 (bên phải);
M: ladder 1 kb (Thermo Scientific®);
1-15: các mẫu mắm biển thuộc 3 quần thể quan sát

Bảng 2. Biến động di truyền của ba quần thể mắm biển dựa trên dữ liệu SSR

Quần thể	N ^a	Tỷ lệ đa hình (%)	N _a ^b	N _E ^c	H _E ^d	H _o ^e
Quảng Nam	5	9,09	1,50	1,179	0,06	0,018
Bình Định	5	9,09	1,64	1,169	0,058	0,018
Ninh Thuận	5	9,09	1,64	1,229	0,065	0,056
Trung bình		9,09	1,59	1,192	0,061	0,030

^a Số cá thể khảo sát trong mỗi quần thể; ^b Số alen trung bình trên một locus; ^c Số alen hiệu quả trung bình trên một locus; ^d Tỷ lệ dị hợp kỳ vọng; ^e Tỷ lệ dị hợp thu được.

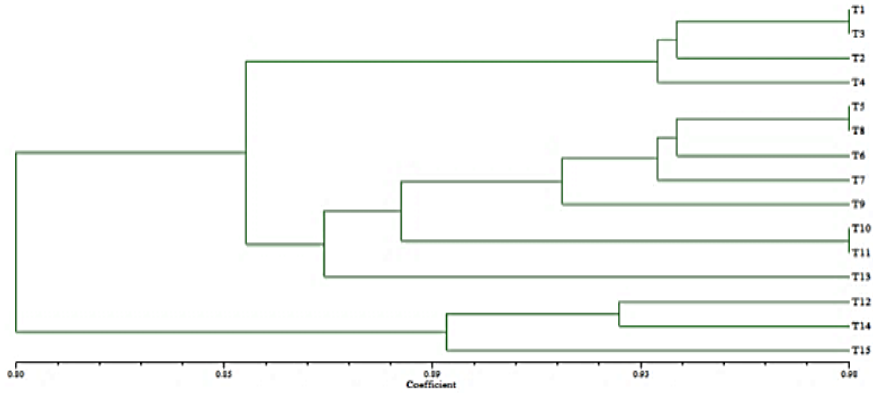
Nhóm tác giả cũng tính toán hệ số tương đồng di truyền và xây dựng biểu đồ (sơ đồ hình cây) thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu.

Bảng 3. Hệ số tương đồng di truyền giữa 15 cây mắm biển nghiên cứu

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
T1	1.00														
T2	0.95	1.00													
T3	0.98	0.93	1.00												
T4	0.93	0.93	0.95	1.00											
T5	0.90	0.86	0.93	0.88	1.00										
T6	0.90	0.86	0.88	0.88	0.95	1.00									
T7	0.88	0.88	0.86	0.86	0.93	0.93	1.00								
T8	0.88	0.88	0.90	0.90	0.98	0.93	0.95	1.00							
T9	0.86	0.86	0.83	0.83	0.90	0.90	0.93	0.93	1.00						
T10	0.83	0.83	0.81	0.81	0.88	0.88	0.90	0.90	0.88	1.00					
T11	0.81	0.81	0.79	0.83	0.86	0.90	0.88	0.88	0.86	0.98	1.00				
T12	0.81	0.81	0.79	0.79	0.86	0.86	0.88	0.88	0.90	0.83	0.81	1.00			
T13	0.81	0.81	0.79	0.79	0.86	0.86	0.88	0.88	0.86	0.88	0.86	0.86	1.00		
T14	0.79	0.79	0.76	0.76	0.79	0.79	0.81	0.81	0.83	0.76	0.74	0.93	0.88	1.00	
T15	0.81	0.81	0.79	0.79	0.76	0.76	0.79	0.79	0.76	0.74	0.71	0.86	0.86	0.93	1.00

Hệ số tương đồng di truyền phản ánh quan hệ di truyền của các cá thể mắm biển khác nhau. Hai cá thể mắm biển càng gần nhau về mặt di truyền thì hệ số tương đồng di truyền giữa chúng càng lớn và ngược lại. Kết quả phân tích tương đồng di truyền được thể hiện trên bảng 3. Hệ số tương đồng giữa các quần thể nằm trong khoảng 0,71 đến 0,98. So với kết quả nghiên cứu về đa dạng quần thể mắm biển ở một số vùng ven biển Việt Nam của Giang và đồng tác giả (2003) với hệ số tương đồng giữa các quần thể là 0,96-0,98, hệ số tương đồng

di truyền trong nghiên cứu này cho thấy, mặc dù sự đa dạng di truyền giữa các quần thể được ghi nhận là chưa cao, nhưng cũng đã bắt đầu xuất hiện các cách biệt di truyền giữa các quần thể. Kết hợp với quan sát thực địa và nghiên cứu của Nguyễn Xuân Hòa và đồng tác giả (2010) có thể thấy sự suy thoái diện tích rừng ngập mặn và trồng mới tập trung hoặc phân tán rừng ngập mặn là nguyên nhân dẫn đến sự giảm tính đa dạng di truyền quần thể. So sánh sự tương đồng di truyền giữa cả ba quần thể khảo sát cũng cho kết quả tương tự. Có các cặp cá thể thuộc hai quần thể khác nhau như cặp cá thể T5 và T8 có hệ số tương đồng di truyền cao (0,98), cặp cá thể T10 và T11 có hệ số tương đồng di truyền là 0,98, cặp cá thể T3 và T8 có hệ số tương đồng là 0,9. Điều này được giải thích thông qua sự trao đổi nguồn gen, có thể là do quá trình di thực giữa các tỉnh trong vùng Nam Trung Bộ.



Hình 3. Cây phân loại lập dựa trên hệ số tương đồng di truyền của các cá thể mấm biển thuộc ba quần thể Quảng Nam, Ninh Thuận, Bình Định

(Trong đó: T1: QN-MT05, T2:QN-M09, T3:QN-MT24, T4:QN-M29, T5:QN-MT35, T6:BD-MT01, T7:BD-M11, T8:BD-M19, T9:BD-M25, T10:BD-MT28, T11:NT-M09, T12:NT-MT12, T13:NT-M15, T14:NT1-M21, T15: NT-M32)

Dựa vào cây phân loại được xây dựng dựa trên các dữ liệu về khoảng cách di truyền có thể thấy rõ ràng sự phân chia thành hai nhánh lớn riêng biệt, một nhóm bao gồm ba cá thể thuộc quần thể mấm biển ở Ninh Thuận (T12, T14, T15), và nhóm còn lại là các cá thể của hai quần thể mấm biển ở Quảng Nam và Bình Định.

KẾT LUẬN

Như vậy, trong tổng số 22 chỉ thị SSR được sử dụng trong nghiên cứu chỉ có hai chỉ thị cho tính đa hình, với số alen hiệu quả trung bình trên tổng số locus quan sát là 1.192. Các kết quả phân tích dựa trên dữ liệu SSR cho thấy sự tương đồng di truyền ở mức độ cao giữa ba quần thể thuộc vùng Nam Trung Bộ được khảo sát. Hiện tượng trao đổi nguồn gen được ghi nhận giữa các quần thể, đặc biệt là giữa quần thể Quảng Nam và Bình Định. Khoảng cách di truyền của quần thể mấm biển ở Ninh Thuận so với hai quần thể còn lại được ghi nhận là lớn nhất. Dữ liệu được phân tích trong nghiên cứu này sẽ cung cấp thông tin hữu ích trong việc khảo sát, phân tích hiện trạng và đa dạng của quần thể mấm biển vùng Nam Trung Bộ, từ đó góp phần định chọn tạo và bảo tồn cây mấm biển tại vùng ven biển Nam Trung Bộ Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Viện Sinh thái và Bảo vệ công trình đã hỗ trợ chúng tôi thu nhập mẫu tại các địa điểm quan sát; xin chân thành cảm ơn Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện cho nhóm nghiên cứu hoàn thành các thí nghiệm. Kinh phí cho nghiên cứu này được hỗ trợ từ đề tài “Nghiên cứu giải pháp khoa học công nghệ để phục hồi và phát triển rừng ngập mặn ven biển Nam Trung Bộ nhằm ứng phó với biến đổi khí hậu” Mã số: BDKH.19/16-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Geng QF, Lian CL, Tao JM, Li Q, Hogetsu T (2007). Isolation and characterization of 10 new compound microsatellite markers for a mangrove tree species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Mol Ecol Notes* 7: 1208-1210.

Islam MS, Lian C, Kameyama N, Wu B, Hogetsu T (2004). Development of microsatellite markers in *Rhizophora stylosa* using a dual-suppression-polymerase chain reaction technique. *Mol Ecol Notes* 4(1): 110-112.

Kathiresan K, Bingham BL (2001). Biology of mangroves and mangrove ecosystems *Adv Marin Biol* 40:81. doi:10.1016/S0065-2881(01)40003-4

Le HG, Hong PN, Tuan MS, Harada K (2003). Genetic variation of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.(Avicenniaceae) in Vietnam revealed by microsatellite and AFLP markers. *Genes Genet Syst* 78(6): 399-407.

- Li B, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH (2000). Construction of silkworm RAPD molecular linkage map. *Yi Chuan Xue Bao* 27(2): 127-132.
- Maguire TL, Edwards KJ, Saenger P, Henry R (2000b). Characterisation and analysis of microsatellite loci in a mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Theor Appl Genet* 101(1-2): 279-285.
- Maguire TL, Saenger P, Baverstock P, Henry R (2000a). Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Mol Ecol* 9(11): 1853-1862.
- Maguire TL, Peakall R, Saenger P (2002). Comparative analysis of genetic diversity in the Mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet* 104: 388-398.
- Parani MM, Lakshmi S, Elango N, Ram CS Anuratha, Parida A (1997). Molecular phylogeny of mangrove II. Intra- and inter-species variation in *Avicennia* revealed by RAPD and RFLP markers. *Genome* 40: 487-495.
- Saghai-Marooof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RWL (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(24): 8014-8018.
- Salvi ND, George L, Eapen S (2001). Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 6: 113-119.
- Shinmura Y, Wee AK, Takayama K, Meenakshisundaram SH, Asakawa T, Adjie B, ... Salmo III SG (2012). Isolation and characterization of 14 microsatellite markers for *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) and their potential use in range-wide population studies. *Conserv Genet* 4(4): 951-954.
- Sugaya T, Takeuchi T, Yoshimaru H, Katsuta M (2002). Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Kandelia candel* (L.) Druce. *Mol Ecol Notes* 2(1): 65-66.
- Teixeira S, Arnaud-Haond S, Duarte CM, Serrão E (2003). Polymorphic microsatellite DNA markers in the mangrove tree *Avicennia alba*. *Mol Ecol Notes* 3(4): 544-546.
- VDR (2010) Báo cáo Phát triển của Việt nam (VDR) 2011: Quản lý tài nguyên thiên nhiên. Báo cáo của đội tác phát triển trong Hội nghị nhóm Tư vấn Việt Nam, Hà Nội, 7-8/12/2010.

SURVEYING GENETIC DIVERSITY OF POPULATIONS OF AVICENNIA MARINA IN THE SOUTH-CENTRAL COASTAL AREA OF VIET NAM USING SSR MARKERS

Giang Tran Thi Huong^{1,2}, Nhung Nguyen Hong², Trong Nguyen Dinh², Tuat Le Van⁴, Huy Nguyen Quoc⁴, Ngoc Pham Bich^{2,3}, Ha Chu Hoang^{2,3}, Phat Tien Do^{2,3*}

¹ Institute of Biotechnology - Viet Nam Academy of Science and Technology

² Institute of Genome Research - Viet Nam Academy of Science and Technology

³ Graduate University of Science and Technology - Viet Nam Academy of Science and Technology

⁴ Institute of Ecology and Works Protection

SUMMARY

The genetic diversity analysis of different *Avicennia marina* populations in the South-Central coastal area of Viet Nam was performed using SSR markers for genetic resource conservation, mangrove breeding and improvement. The total 42 alleles were detected with 22 SSR markers for 15 individual samples from three populations of *A. marina*. Of which, two out of 22 markers exhibited polymorphism, with the average effective alleles per locus was 1.192. The average expected heterozygosity (H_E) and the average observed heterozygosity (H_O) of *A. marina* populations were reached at low values between 0.061 and 0.030, respectively. Our results also showed a high level of genetic similarity among the three populations in the South Central region surveyed. Moreover, there was the exchange in genetic resources among the tested populations, specifically between populations from Quang Nam and Binh Dinh. In addition, the largest genetic distance was observed between the samples collected from Ninh Thuan region. Our results also provided the useful information to survey and analyze the diversity profile of *A. marina* in the South-Central coastal area of Viet Nam, thereby contributing to the further strategies for mangrove restoration and development.

Keywords: SSR marker, genetic diversity, South-central coastal area, *Avicennia marina*.

* Author for correspondence: Tel: +84.374212304; Email: dtphat@ibt.ac.vn