

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT
-----o0o-----

VŨ ĐÌNH DUY

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI THÔNG ĐỔ BẮC
(*TAXUS CHINENSIS* (PILG.) REHD.) ĐANG BỊ ĐE DỌA
TRONG HỆ SINH THÁI RỪNG NHIỆT ĐỚI VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 60. 42. 0114

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN: TS. NGUYỄN MINH TÂM

Hà Nội, 2012

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học của tôi. Các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa được sử dụng công bố trong bất kỳ tài liệu nào.

Tôi xin cam đoan mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận văn này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày tháng năm 2012

Tác giả luận văn

Vũ Đình Duy

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành, quý trọng đến thầy trực tiếp hướng dẫn khoa học TS. Nguyễn Minh Tâm.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo, các cán bộ của cơ sở đào tạo sau Đại học Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã tận tâm truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt khóa học.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành đến Ban Giám đốc Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Lãnh đạo phòng Phân loại thực nghiệm và Đa dạng nguồn gen, các bạn bè đồng nghiệp đã động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong cả quá trình học tập, thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện luận văn.

Để hoàn thành bản luận văn này, tôi chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học; phòng Hệ thống học phân tử và Di truyền bảo tồn, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh; Ban lãnh đạo các khu Bảo tồn và vườn Quốc gia và chính quyền địa phương đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện đề tài.

Luận văn được thực hiện bởi Dự án BVMT.VAST: “Bảo tồn và sử dụng bền vững một số loài thông quý hiếm có giá trị kinh tế cao đang bị đe dọa tuyệt chủng và khu hệ nấm nội ký sinh có ích trong các loài nghiên cứu” và sự hỗ trợ bởi học bổng Nagao – Trung tâm nghiên cứu Tài nguyên Môi trường (CRES), Việt Nam.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn gia đình đã luôn động viên, khích lệ và là chỗ dựa vững chắc cho tôi hoàn thành khóa luận này.

NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

<i>ADN</i>	Axit deoxyribonucleit (Deoxyribonucleic acid)
<i>AFLP</i>	Đa hình độ dài các đoạn DNA nhân chọn lọc (Amplified Fragment Length Polymorphism)
<i>bp</i>	Cặp bazơ (base pair)
<i>CR</i>	Loài cực kỳ nguy cấp
<i>EDTA</i>	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
<i>Genbank</i>	Ngân hàng gen quốc tế
<i>ISSR</i>	Trình tự lặp đơn giản ngẫu nhiên (interal simple sequence repeat)
<i>matK</i>	Maturase gen
<i>ME</i>	Phương pháp tiến hóa tối thiểu (Minimum Evolution Method)
<i>MEGA</i>	Phần mềm phân tích di truyền tiến hóa phân tử
<i>MP</i>	Phương pháp tiết kiệm tối đa (Maximum Parasimony Method)
<i>NCBI</i>	Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information)
<i>NJ</i>	Phương pháp kết nối liền kề (Neighbor Joining Method)
<i>PCR</i>	Phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction)
<i>RADP</i>	Đa hình các đoạn DNA nhân ngẫu nhiên (Random Amplified Polymorphic DNA)
<i>rbcL</i>	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gen
<i>RFLP</i>	Đa hình độ dài các đoạn DNA hạn chế (Restriction Fragment Length Polymorphism)
<i>rpoC1</i>	RNA polymerase C gen
<i>SSR</i>	Trình tự lặp đơn giản (Simple Sequence Repeats)
<i>UPGMA</i>	Phân tích Unweighted Pair Group Method

UV	Ánh sáng tử ngoại
VU	Loài sễ nguy cấp
Quần thể	
BDS	Bát Đại Sơn, Quán Bạ, Hà Giang
BL	Xuân Trường, Bảo Lạc, Cao Bằng
HK	Hang Kia, Mai Châu, Hòa Bình
HLS	Hoàng Liên, Sa Pa, Lào Cai
TPT	Thài Phìn Tùng, Đồng Văn, Hà Giang
YC	Mường Lựm, Yên Châu, Sơn La

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Nội dung	Trang
2.1	Địa điểm và số mẫu thu thập cho phân tích cpSSR	22
2.2	Danh sách các loài Thông dùng xác định phân tích vị trí phân loại	23
2.3	Trình tự các nucleotide của 6 cặp mồi cpSSR	24
2.4	Các cặp mồi sử dụng để xác định vị trí phân loại giữa các taxon	24
3.1	Cấu trúc tuổi quần thể của loài Thông đỏ bắc	38
3.2	Đa dạng di truyền quần thể của loài Thông đỏ bắc	42
3.3	Hệ số tương đồng di truyền (trên) và khoảng cách di truyền (dưới) theo Nei (1987) ở mức độ quần thể và	44

	loài của loài Thông đỏ bắc	
3.4	Phân tích AMOVA (khác nhau ở mức độ phân tử) của loài Thông đỏ bắc	46
3.5	Thành phần bazơ (%) của 3 vùng gen rpoC1, rbcL, matK của 20 loài Thông	52

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Nội dung	Trang
1.1	Hình ảnh về loài cây Thông đỏ bắc (<i>Taxus chinensis</i>)	19
2.1	Bản đồ chỉ ra địa điểm nghiên cứu loài Thông đỏ bắc	24
3.1	Hình ảnh ADN tổng số đại diện của loài Thông đỏ bắc	39
3.2	Phổ điện di sản phẩm PCR của 6 cặp mồi cpSSR trên gel polyacrylamide 5%	39
3.3	Cấu trúc không gian alen của các quần thể nghiên cứu	41
3.4	Phân tích NJ trên cơ sở khoảng cách di truyền giữa các quần thể của loài Thông đỏ bắc	44
3.5	Phân tích UPGMA trên cơ sở khoảng cách di truyền từ 148 cá thể từ 6 quần thể của loài Thông đỏ bắc	45
3.6	Vị trí phân loại của 14 loài Thông nghiên cứu theo phương pháp NJ trên cơ sở vùng gen matK	54
3.7	Vị trí phân loại của 17 loài Thông nghiên cứu theo phương pháp NJ trên cơ sở vùng gen rbcL	55
3.8	Vị trí phân loại của 14 loài Thông nghiên cứu theo phương pháp NJ trên cơ sở vùng gen rpoC1	55
3.9	Vị trí phân loại của 14 loài Thông nghiên cứu theo phương pháp NJ trên cơ sở kết hợp 3 vùng gen rpoC1, matK và rbcL	56

MỤC LỤC

	Trang
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Những từ viết tắt	iii
Danh mục các bảng	iv
Danh mục các hình	v
MỞ ĐẦU	1
MỤC TIÊU VÀ Ý NGHĨA KHOA HỌC	3
1. Mục tiêu nghiên cứu	3
2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Khái niệm về quần thể thực vật	4
1.2. Tính đa dạng di truyền của quần thể thực vật	4
1.3. Ảnh hưởng của phân cắt nơi sống đến đa dạng di truyền thực vật	5
1.4. Đa dạng di truyền trong quần thể nhỏ và cô lập	5
<i>1.5. Một số kỹ thuật sinh học phân tử thường được dùng trong nghiên cứu đa dạng di truyền ở thực vật</i>	<i>7</i>
1.5.1. Kỹ thuật isozyme	7
1.5.2. Kỹ thuật RAPD	7
1.5.3. Kỹ thuật RFLP	8
1.5.4. Kỹ thuật AFLP	9
1.5.5. Kỹ thuật SSR	9
1.5.6. Kỹ thuật ISSR	10
1.6. Tình hình nghiên cứu ngoài nước và trong ngoài nước về đa dạng di truyền và tiến hóa phân tử	11
1.6.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	11
1.6.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam	16
1.7. Một số đặc điểm của loài Thông đỏ bắc	18
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.1. Vật liệu nghiên cứu	20
2.2. Địa điểm, thời gian và phương pháp nghiên cứu	23
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu	23
2.2.2. Thời gian nghiên cứu	24
2.2.3. Phương pháp khảo sát thực địa	24
2.2.4. Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm	24
2.2.4.1. Tách chiết ADN tổng số	24
2.2.4.2. Nhân bản ADN	25
2.2.4.3. Phân tích số liệu	26
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	27

3.1. Hiện trạng quần thể, loài Thông đỏ bắc	27
3.1.1. Phân bố của loài Thông đỏ bắc	27
3.1.2. Cấu trúc nơi sống	28
3.1.3. Cấu trúc quần thể	35
3.2. Đa dạng di truyền quần thể và loài	37
3.2.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số và điện di sản phẩm PCR	37
3.2.2. Đa dạng di truyền trong và giữa các quần thể của loài Thông đỏ bắc	39
3.2.3. Hệ số tương đồng di truyền và khoảng cách di truyền	42
3.2.4. Phân bố không gian di truyền	43
3.2.5. Phân tích AMOVA	45
3.3. Mức độ tiến hóa phân tử của một số loài Thông	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

MỞ ĐẦU

Loài Thông đỏ bắc (*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd.) thuộc chi Thông đỏ (*Taxus*), họ Thông đỏ (Taxaceae) là loài quý hiếm có giá trị đặc biệt về mặt y học được sử dụng để sản xuất taxol (hợp chất chữa bệnh ung thư) [64], xây dựng nhà cửa, đóng đồ dùng gia đình, thủ công mỹ nghệ và làm cảnh. Các loài này phân bố ở vùng núi đá vôi và núi đất phía Bắc Việt Nam.

Theo các tiêu chí mới của IUCN 2010 [36] loài này cần được xếp vào bậc sắp bị tuyệt chủng VU A2ac, B2ab (i-v), đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam với bậc sắp bị tuyệt chủng VU A1a, c, B1+2b, c [2] và Loài này thuộc nhóm IIA: Thực vật rừng hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại của nghị định số 32/2006/NĐ-CP ngày 30/3/2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm [3]. Mặc dù, một số quần thể của chúng là đối tượng đã được bảo vệ trong một số khu bảo tồn, nhưng chúng vẫn đang ở trong tình trạng bị đe dọa. Các tác giả đã chỉ ra rằng Thông đỏ bắc hiện chỉ còn khoảng 250 cá thể, phân bố tản mạn, với kích thước quần thể rất nhỏ. Thông đỏ bắc hiện có mặt tại một số địa điểm như Quán Bạ, Đồng Văn (Hà Giang), Sapa (Lào Cai), Bảo Lạc (Cao Bằng), Yên Châu (Sơn La), Hang Kia - Pà Cò (Hoà Bình). Đã có một số biện pháp bảo vệ loài này với các hình thức khác nhau, như bảo vệ nguyên vị tại một số khu bảo tồn và chuyển vị (giâm hom) [7]. Tuy nhiên, các nhà quản lý và các nhà khoa học còn thiếu các thông tin quan trọng về đa dạng di truyền ở cả 2 mức độ quần thể và loài, đặc biệt các yếu tố ảnh hưởng xấu đến sự tồn tại của chúng liên quan đến tác động của con người. Điều này rất khó để nâng cao hiệu quả của công tác bảo tồn và sử dụng bền vững loài Thông nghiên cứu. Để góp phần đưa ra các giải pháp bảo tồn và phục hồi loài thì việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền quần thể loài Thông có ý nghĩa quan trọng. Mức độ đa dạng di truyền không những chỉ ra khả năng tồn tại của loài ở hiện tại và tương lai, mà còn chỉ ra tiềm năng tiến hoá của loài. Ngày nay, kỹ thuật công nghệ sinh học được sử dụng rộng rãi, nhanh và có hiệu quả trong việc đánh giá mức độ đa