Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
pISSN: 2588-1191; eISSN: 2615-9708
Tập 134, Số 3A, 2025, Tr. 131–146, DOI: 10.26459/hueunijard.v134i3A.7721

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA QUẦN THỂ CHÒ ĐEN (*Parashorea stellata* Kunz.) Ở THÀNH PHỐ HUẾ DỰA VÀO CHỈ THỊ PHÂN TỬ PCR-ISSR

Lê Thái Hùng, Huỳnh Kim Hiếu, Hồ Đăng Nguyên, Trần Thị Thúy Hằng, Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Hợi, Văn Thị Yến, Hoàng Huy Tuấn*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Hoàng Huy Tuấn <hhtuan@hueuni.edu.vn>

(*Ngày nhận bài: 16-01-2025; Ngày chấp nhận đăng: 20-2-2025*)

Tóm tắt. Chò đen (*Parashorea stellata* Kunz.) phân bố tự nhiên tại thành phố Huế, là một loài cây thuộc họ Dipterocarpaceae, có giá trị kinh tế và bảo tồn cao. Các thông tin sinh học của loài Chò đen đã được mô tả nhưng vẫn chưa hoàn thiện. Nghiên cứu này đã thu thập 40 mẫu lá non cây Chò đen tại 5 vùng ở thành phố Huế để phân tích đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị PCR-ISSR. Kết quả đã khảo sát được 9/15 chỉ thị ISSR có biểu hiện trên 100% mẫu nghiên cứu. Chò đen ở đây có mức độ đa dạng di truyền cấp độ quần thể (PPB = 52,3%; Na = 1,519; Ne = 1,313; *h* = 0,181; I = 0,270) thấp hơn cấp độ loài (PPB = 100%; Na = 2,000; Ne = 1,5239; *h* = 0,3404; I = 0,5225). Các quần thể tại các vùng thu mẫu có mức độ đa dạng di truyền thấp hơn toàn thành phố Huế, hệ số sai khác di truyền Nei < 0,5 (Gst = 0,2936) và hệ số trao đổi gen lớn hơn 1,0 (Nm = 1,2033). Cây phát sinh di truyền chia quần thể Chò đen thành 2 nhóm lớn có khoảng cách di truyền từ 0,79 - 1,0. Đây là dữ liệu khoa học quan trọng trong công tác chọn giống nhằm xây dựng các giải pháp bảo tồn và phát triển Chò đen ở thành phố Huế và miền Trung Việt Nam.

Từ khóa: Chò đen, đa dạng di truyền, PCR-ISSR, thành phố Huế

Genetic diversity assessment of *Parashorea stellata* Kunz. population in Hue city based on PCR-ISSR markers

Le Thai Hung, Huynh Kim Hieu, Ho Dang Nguyen, Tran Thi Thuy Hang, Nguyen Van Loi, Nguyen Hoi, Van Thi Yen, Hoang Huy Tuan*

University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Hoang Huy Tuan <hhtuan@hueuni.edu.vn>

(*Submitted: January 16, 2025; Accepted: February 20, 2025*)

Abstract. *Parashorea stellata* is naturally distributed in Hue City, is a species of the Dipterocarpaceae family, and has high economic and conservation value. Biological information on *P. stellata* has been described, but it is still incomplete. This study collected leaf samples from 40 trees in 5 different regions in Hue City to analyze genetic diversity based on PCR-ISSR markers. The results showed that 9/15 ISSR markers were expressed in 100% of the research samples. The genetic diversity of the *P. stellata* in Hue City is lower at the population level (PPB = 52.3%; Na = 1.519; Ne = 1.313; H = 0.181; I = 0.270) than at the species level (PPB = 100%; Na = 2.000; Ne = 1.5239; h = 0.3404; I = 0.5225). The populations in the sampling areas have lower genetic diversity than the whole province, with the genetic variance coefficient Nei < 0.5 (Gst = 0.2936) and the gene exchange coefficient higher than 1.0 (Nm = 1.2033). The phylogenetic tree divides the *P. stellata* population into two large groups with genetic distances from 0.79 - 1.0. The results are important scientific data in the work of selecting breeds to build solutions for the conservation and development of *P. stellata* in Hue City and Central Vietnam.

Keywords: genetic diversity, Hue city, *P. stellata*, PCR-ISSR

1 Đặt vấn đề

Cây Chò đen (*Parashorea stellata* Kunz.) là một loài thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae), được xác định là loài cây bản địa thuộc tập đoàn cây trồng phục hồi rừng ở thành phố Huế (TP Huế) [1–3]. Loài Chò đen phân bố tự nhiên ở tiểu vùng sinh thái phía Nam và Tây Nam của TP Huế, được phát hiện trong quần thể thực vật thuộc các dãy núi ven biển, bán đảo vùng Bắc Hải Vân huyện Phú Lộc, các vùng núi huyện Nam Đông và huyện A Lưới [4]. Gỗ loài Chò đen đang bị khai thác trái phép, quá mức trong thời gian qua. Hậu quả là nhiều khu rừng tự nhiên bị tàn phá, suy giảm chất lượng và thuộc tính đa dạng sinh học nghiêm trọng dẫn đến nguy cơ bị tuyệt chủng do môi trường bị huỷ hoại [5]. Hiện nay đã có nhiều văn bản pháp lý, văn bản khoa học được ban hành nhằm quản lý, bảo tồn loài. Loài Chò đen được phân hạng sẽ nguy cấp (VU A1,b,c +2b,c, B1+2a,b,c) [3, 5]. Vì vậy, những nghiên cứu về đặc điểm sinh học của loài Chò đen là thông tin quan trọng cho các hoạt động nghiên cứu liên quan để phát triển tập đoàn các cây bản địa có giá trị bảo tồn trên nhiều vùng sinh thái của TP Huế và miền Trung Việt Nam.

Để bảo tồn và phát triển các loài quý hiếm thì cần các nghiên cứu mở rộng quần thể với các vấn đề trọng tâm là bảo vệ diện tích rừng tự nhiên, nhân giống và dẫn giống [6]. Trong đó, sự đa dạng di truyền của loài đóng vai trò quan trọng liên quan đến quản lý, bảo tồn các quần thể [7]. Việc mô tả được phát sinh di truyền quần thể của loài đóng góp thuận lợi cho việc khám phá ra sự đa dạng hệ thực vật, cũng như việc lựa chọn các khu vực hoặc loài để ưu tiên trong công tác bảo tồn đa dạng sinh học [8]. Những nghiên cứu cho thấy một dấu hiệu di truyền phù hợp về tính đa dạng có mức độ biến đổi cao và có thể tạo ra thông tin đa locus từ bộ gen của loài [6, 9]. Phân tích lặp lại trình tự đơn giản giữa các gen (ISSR) đã mang lại một số lợi thế như khả năng khuếch đại ổn định, phát hiện nhanh và độ phân giải cao [10] nên kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi trong việc xác định nguồn gen thực vật, phân tích tính đa dạng di truyền và phân tích mối quan hệ di truyền [11, 12]. Phân tích ISSR đã được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự đa dạng di truyền của nhiều loại thực vật khác nhau như *Morinda officinalis* F.C How [13], *Coix lacrymajobi* L [14], Mentha L. [15], *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [16], *Prunus* L [17], Sapindus L. [18], *Prunus spinosa* L [19], *Hopea gregaria* [20], *Parashorea chinensis* [6], *Bouea oppsitifolia* (Roxb) Meisne. [21], Rhdodendron [22], *Aquilaria crassna* Pierre. [23]. Chính vì vậy, để cung cấp thêm những hiểu biết về đa dạng di truyền, xu hướng tiến hóa và phát sinh quần thể, nghiên cứu này đã sử dụng kỹ thuật PCR-ISSR để phân tích đa dạng di truyền quần thể Chò đen tại TP Huế, Việt Nam.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Mẫu vật nghiên cứu

Mẫu lá non của 40 cá thể Chò đen trưởng thành ở rừng tự nhiên được thu thập để phân tích di truyền. Trong đó, 10 mẫu được thu thập tại rừng của Ban quản lý rừng phòng hộ Nam Đông (ND01-ND10), 8 mẫu tại rừng của Vườn Quốc gia Bạch Mã (DBM01-DBM08), 8 mẫu tại rừng của Ban quản lý rừng phòng hộ Bắc Hải Vân (BHV01-BHV08), 4 mẫu ở rừng cộng đồng thôn Paring-Kan Sâm, Hồng Hạ (HH01-HH04), và 10 mẫu ở Ban quản lý rừng phòng hộ A Lưới và Khu Dự trữ Thiên nhiên Sao La, A Lưới (AL01-AL10) (Bảng 1).

Bảng 1. Thông tin mẫu lá loài Chò đen được thu thập phân tích di truyền

TT	Ký hiệu mẫu	Tọa độ		TT	Ký hiệu mẫu	Tọa độ	
		X	Y			X	Y
1	ND01	568132	1787319	21	BHV03	542928	1792846
2	ND02	567879	1786980	22	BHV04	542935	1792865
3	ND03	568779	1789217	23	BHV05	542924	1791892
4	ND04	568770	1789231	24	BHV06	543041	1792066
5	ND05	568782	1789237	25	BHV07	543182	1792865
6	ND06	563662	1787042	26	BHV08	543011	1792845
7	ND07	563604	1787090	27	HH01	456889	1799361

TT	Ký hiệu mẫu	Tọa độ		TT	Ký hiệu mẫu	Tọa độ	
		X	Y			X	Y
8	ND08	563299	1786913	28	HH02	457627	1798742
9	ND09	563303	1786900	29	HH03	457755	1799073
10	ND10	563280	1786838	30	HH04	456715	1793172
11	DBM01	511579	1793625	31	AL01	471524	1778136
12	DBM02	511412	1794005	32	AL02	471545	1778068
13	DBM03	511324	1794316	33	AL03	471540	1778055
14	DBM04	510165	1791772	34	AL04	471471	1778055
15	DBM05	510176	1791752	35	AL05	470270	1779492
16	DBM06	510180	1791740	36	AL06	470323	1779512
17	DBM07	510260	1791792	37	AL07	467823	1780278
18	DBM08	510202	1791783	38	AL08	470354	1779542
19	BHV01	542950	1792868	39	AL09	551026	1779521
20	BHV02	542949	1792866	40	AL10	550953	1779624

2.2 Phương pháp tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ lá cây Chò đen theo phương pháp CTAB [24]. Trình tự phân tích gồm các bước như sau: 100 mg lá Chò đen tươi được đông khô bằng Nito lỏng và nghiền thành bột mịn. Quá trình phân giải mẫu, loại bỏ các tạp chất và kết tủa DNA tổng số được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit FastPure Plant DNA Isolation Mini Kit (Vazyme). Chất lượng của DNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% và chụp ảnh bằng hệ thống đèn UV. Nồng độ của DNA tổng số được xác định trên máy NanoDrop ND-1000 (Thermo, Mỹ). Dung dịch DNA tổng số được bảo quản ở -20^{o}C để sử dụng cho các phản ứng PCR-ISSR.

2.3 Phương pháp khuếch đại phản ứng PCR-ISSR

Phản ứng PCR-ISSR được thực hiện theo mô tả của Pal, Munankarmi và cs. [25–26] với 15 mồi ISSR đã được sử dụng để khảo sát sự đa hình trong đánh giá đa dạng di truyền loài Chò đen ở TP Huế (Bảng 2). Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 25 µL chứa 2,5 mM MgCl2, 0,5 mM dNTP hỗn hợp, 0,2 µL (5 unit/µL Taq DNA polymerase (PCR Master Mix 2×, Fermentas, Đức)), 10 pmol mồi 25 đến 30 ng DNA tổng số. Quy trình khuếch đại PCR bao gồm: biến tính 94 °C /4 phút; 40 chu kỳ: 94 °C /1 phút, 37 °C /1 phút, 72 °C /2 phút và cuối cùng là 72 °C /7 phút. Sản phẩm PCR-ISSR của mỗi mồi được điện di trên agarose gel 2% và nhuộm bằng Gelred. Hình ảnh điện di được thu nhận bằng hệ thống Gel Documentation và phân tích bằng chương trình Quantity One (Bio-rad, Mỹ).

Bảng 2. Trình tự các mồi dùng PCR-ISSR sử dụng để sàng lọc

STT	Tên mồi khảo sát	Trình tự 5′→ 3′	Mồi biểu hiện đa hình	Nguồn
1	UBC#807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	×	Pal và cs. [25]
2	UBC#808	AGAGAGAGAGAGAGAGG	×	
3	UBC#810	GAGAGAGAGAGAGAGAT		
4	UBC#811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	×	
5	UBC#812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	×	
6	UBC#825	ACACACACACACACACT	×	
7	UBC#827	ACACACACACACACACG		
8	UBC#841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	×	
9	UBC#855	TGTGTGTGTGTGTGTGRT		
10	UBC#858	ACACACACACACACACYT	×	
11	UBC#864	ATGATGATGATGATGATG		
12	UBC#888	BDBCACACACACAGACA		Munankarmi và cs. [26]
13	UBC#889	DBDACACACACACACACA		
14	UBC#873	GACAGACAGACAGACA	×	
15	UBC#835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	×	

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Phổ điện di sản phẩm PCR-ISSR của các mẫu với các mồi được phân tích theo nguyên tắc dựa vào sự xuất hiện hay không xuất hiện của các băng, đánh số "1" nếu có xuất hiện băng và số "0" nếu không xuất hiện băng. Các chỉ số đa dạng di truyền được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: số các đoạn đa hình (PNB), tỷ lệ % các đoạn đa hình (PPB), số alen quan sát được (Na), số alen có ý nghĩa (Ne), hệ số đa dạng di truyền giữa các cá thể Nei [27] và mức độ đa dạng di truyền ở mỗi vùng nghiên cứu chỉ số Shannon: $H_o = -\sum p_i log_2 p_i$ (trong đó p_i là tần số xuất hiện của sản phẩm PCR- ISSR thứ i trong quần thể), chỉ số sai khác di truyền giữa các quần thể (Gst) và chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể (Nm = 0,5(1-Gst)/Gst) [28]. Các số liệu tính toán được thực hiện bằng phần mềm PopGen 3.2 [29]. Giản đồ phả hệ của quần thể Chò đen được thực hiện bằng theo thuật toán UPGMA dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard trong chương trình NTSYS 2.1 (Exeter Software, Mỹ) [30].

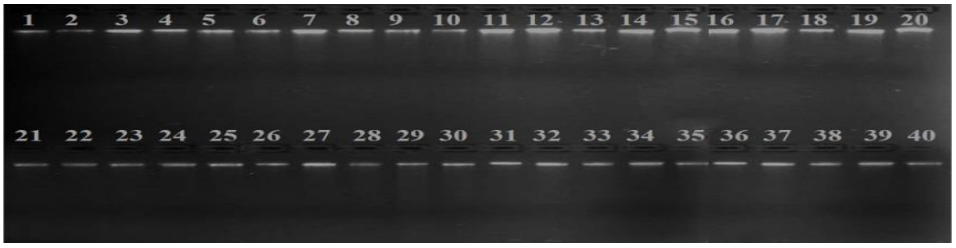
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tách chiết DNA tổng số

Kết quả điện di DNA tổng số của 40 mẫu lá Chò đen cho thấy, chất lượng DNA đảm bảo để làm nguyên liệu cho những thí nghiệm tiếp theo với một băng duy nhất, sạch, không đứt gẫy, rõ nét (Hình 1).

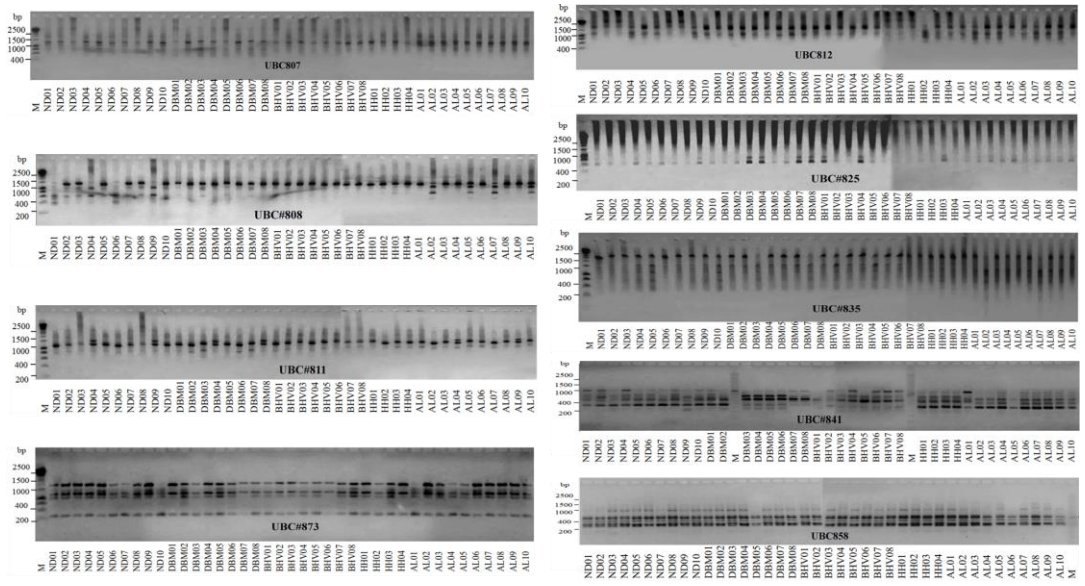
3.2 Sự đa hình của các chỉ thị PCR-ISSR

Trong 15 chỉ thị ISSR được sử dụng dựa trên khuôn DNA tổng số của lá Chò đen được thu tại TP Huế thì có 9 chỉ thị biểu hiện sự đa hình bao gồm: UBC-807, UBC-808, UBC-811, UBC-812, UBC-825, UBC-835, UBC-841, UBC-858, UBC-873 với 100% cá thể khuếch đại. Các chỉ thị này được sử dụng để đánh giá sự đa dạng của 40 mẫu lá Chò đen thu tại 5 vùng khác nhau ở TP Huế (Hình 2).



Hình 1. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ lá cây Chò đen

(*1-40 là các mẫu cây Chò đen được đánh dấu theo thứ tự)*



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm khuyến đại PCR-ISSR của các mẫu lá Chò đen

(*M: khối lượng thang chuẩn DNA có kích thước 100 - 10.000 bp)*

Tổng cộng có 52 phân đoạn DNA được nhân lên từ phản ứng PCR-ISSR của 9 chỉ thị có kích thước các phân đoạn DNA thu được dao động từ 300 - 3500 bp. Số phân đoạn được nhân lên ở mỗi chỉ thị giao động từ 2 - 9 (trung bình 5,778 phân đoạn DNA/ chỉ thị), trong đó chỉ thị UBC-808 thu được nhiều phân đoạn DNA nhất (9 phân đoạn DNA, 7 phân đoạn DNA đa hình) và chỉ thị UBC-825 thu được ít số phân đoạn DNA nhất (2 phân đoạn DNA và 1 phân đoạn DNA đa hình). Số phân đoạn DNA đa hình thu được là với 28 phân đoạn DNA chiếm 52,297%, giá trị cho mỗi chỉ thị là NPB = 1 - 7 (TB = 3,11), chiếm tỷ lệ PPB = 33,33 - 77,78%. Số alen quan sát được (Na) của quần thể Chò đen ở TP Huế dao động từ 1,333 đến 1,778 (TB = 1,519 ± 0,505). Số alen có ý nghĩa Ne = 1,177 - 1,542 (TB = 1,313 ± 0,383). Chỉ số đa dạng Shannon (I) cho từng chỉ thị PCR-ISSR dao động từ khoảng I = 0,147 - 0,452 (TB = 0,270 ± 0,191). Hệ số đa dạng gen *Nei (h)* = 0,097 đến 0,308 (TB = 0,181 ± 0,104). Trong đó, số alen quan sát được (Na), số alen có ý nghĩa cao nhất (Ne), hệ số đa dạng Shannon và hệ số đa dạng gen Nei cao nhất ở chỉ thị UBC#808 (Na = 1,778, Ne = 1,542, I = 0,452 và *h* = 0,308) và thấp nhất ở chỉ thị UBC#858 (Na = 1,333, Ne = 1,177, I = 0,147 và *h* = 0,097) (Bảng 3).

Các chỉ thị PCR-ISSR đã được sử dụng trong phân tích đa dạng di truyền của các quần thể tự nhiên của một số loài các chỉ thị, UBC-807, UBC-808, UBC-811, UBC-812, UBC-825, UBC-873 cho thấy tính đa hình cao trong các nghiên cứu trên cây thân gỗ vùng núi cao và cây họ Dầu

Bảng 3. Sự đa hình các chỉ thị PCR-ISSR (n = 40) trong nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể Chò đen ở TP Huế

STT	Tên mồi	Số băng khuếch đại nhiều nhất	Khoảng kích thước băng DNA (bp)	PNB	PPB (%)	Na	Ne	*h*	I
1	UBC-807	8	580 - 3.000	4	50,00	1,500	1,276	0,172	0,263
2	UBC-808	9	390 - 3.500	7	77,78	1,778	1,542	0,308	0,452
3	UBC-811	6	350 - 1.000	4	66,67	1,667	1,480	0,251	0,359
4	UBC-812	4	1.000 - 3.500	2	50,00	1,500	1,206	0,134	0,214
5	UBC-825	2	600 - 800	1	50,00	1,500	1,332	0,199	0,294
6	UBC-835	7	550 - 2.500	3	42,86	1,429	1,221	0,139	0,214
7	UBC-841	5	400 - 1.000	2	40,00	1,400	1,235	0,134	0,201
8	UBC-858	6	700 - 2.000	2	33,33	1,333	1,177	0,097	0,147
9	UBC-873	5	300 - 1.500	3	60,00	1,400	1,212	0,117	0,176
Chỉ số quần thể		5,78	300 - 3.500	3,11	52,30	1,519 ± 0,505	1,313 ± 0,383	0,181 ± 0,104	0,270 ± 0,191
Chỉ số loài		35 – 47 (40,525)	300 - 3.500	40	100	2,000 ± 0,000	1,5239 ± 0,1081	0,3404 ± 0,0488	0,5225 ± 0,057

Ghi chú: PNB là số lượng các đoạn đa hình, PPB - Tỷ lệ % các đoạn đa hình; Na = số alen quan sát được; Ne = số alen có ý nghĩa; h = hệ số đa dạng gen; Nei; I = chỉ số Shannon.

[6, 20, 22, 23]. Kết quả khảo sát và phân tích hệ số đa dạng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu cho thấy chỉ thị PCR-ISSR phù hợp với nghiên cứu trên loài Chò đen tại TP Huế, chỉ thị UBC#808 có tính đa hình cao nhất (Hình 2 và Bảng 3). Sự đa hình của các chỉ thị PCR-ISSR giữa các cá thể trong quần thể Chò đen ở TP Huế là thấp hơn so với các nghiên cứu khác trên quần thể Ba kích (97,4%) [13], cây Thanh trà (95,29%) [21], Dó bầu (78,98%) [23], Đỗ quyên (74,10%) [22] và Chò chỉ (61,36%) [6] nhưng cao hơn đáng kể so với cây *Hopea gregaria* [20].

Mặc dù sự đa dạng di truyền của các loài thực vật quý hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng với phân bố địa lý hẹp thường được cho là thấp. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các loài thực vật quý hiếm và có nguy cơ tuyệt chủng cũng có sự đa dạng di truyền cao, số lượng quần thể ít không đồng nghĩa với sự đa dạng di truyền thấp [6, 30]. Một số loài có sự đa dạng di truyền cao ở cấp độ loài nhưng sự đa dạng di truyền thấp ở cấp độ quần thể [31]. Các kết quả nghiên cứu này đưa ra tương tự đối với loài Chò đen, đó là ở cấp độ loài, PPB = 100%, Na = 2,000 ± 0,000, Ne = 1,5239 ± 0,1081, h = 0,3404 ± 0,0488 và I = 0,5225 ± 0,0570 cho thấy Chò đen thể hiện sự đa dạng di truyền phong phú. Tuy nhiên, ở cấp độ quần thể, PPB = 52,3%, Na = 1,519 ± 0,505, Ne = 1,313 ± 0,383, h =0,181 ± 0,104 và I = 0,270 ± 0,191 cho thấy sự đa dạng di truyền tương đối thấp (Bảng 2). Theo [32], sự suy giảm đa dạng di truyền trong quần thể có thể được gây ra bởi sự trôi dạt di truyền, suy giảm kích thước quần thể và khả năng thích nghi với môi trường. Mức độ đa dạng di truyền quần thể của cây Chò đen ở TP Huế thấp hơn so với nghiên cứu của các quần thể cây họ Dầu [6], Ba kích [13] và Dó bầu [23].

3.3 Đa dạng di truyền giữa các quần thể Chò đen tại TP Huế

Kết quả phân tích sự đa hình của 5 quần thể Chò đen được thu thập tại 5 vùng nghiên cứu khác nhau tại TP Huế được thể hiện ở Bảng 3 với giá trị NPB = 8 - 22, PPB = 15,38 - 42,31%, Na = 1,1538 - 1,4231, Ne = 1,1 - 1,2810 và chỉ số Na luôn lớn hơn Ne ở tất cả các quần thể cho thấy mức độ đa hình tương đối thấp trong tất cả các quần thể. Trong đó, quần thể HH có mức độ đa hình của các phân đoạn DNA thấp nhất (NPB = 8; PPB = 15,38%; Na =1,1538 và Ne = 1,1). Ngoài trừ, giá trị Ne cao nhất ở quần thể BM (1,2810), các giá trị NPB, PPB và Na đều cao nhất ở quần thể ND (NPB = 22; PPB = 42,31% và Na = 1,4231) cho nên quần thể ND có mức độ đa hình các phân đoạn DNA cao nhất.

Bên cạnh đó, chỉ số đa dạng gen Nei của các quần thể h = 0,0601 - 0,1565; chỉ số Shannon của các quần thể I = 0,089 - 0,2258. Các giá trị h và I thấp nhất ở quần thể HH (h = 0,0601 và I = 0,089) nhưng cao nhất ở quần thể BM (Ne = 1,2810; h = 0,1565 và I = 0,2258) cho thấy quần thể HH có mức độ đa dạng thấp nhất và BM là quần thể Chò đen có sự đa dạng cao nhất ở TP Huế (Bảng 4).

Bảng 4. Các chỉ số đa dạng di truyền của 5 quần thể cây Chò đen tại TP Huế

STT	Tên quần thể	Ký hiệu	NPB	PPB (%)	Na ± SE	Ne ± SE	*h* ± SE	I ± SE
1	Bạch Mã	DBM	19	36,54	1,3654 ± 0,0769	1,2810 ± 0,0616	0,1565 ± 0,0335	0,2258 ± 0,0480
2	Bắc Hải Vân	BHV	21	40,38	1,4038 ± 0,0783	1,2371± 0,0547	0,1406 ± 0,0298	0,2121 ± 0,0434
3	Nam Đông	ND	22	42,31	1,4231 ± 0,0789	1,2487 ± 0,0551	0,1478 ± 0,0301	0,2229 ± 0,0438
4	Hồng Hạ	HH	8	15,38	1,1538 ± 0,0576	1,1000 ± 0,0383	0,0601 ± 0,0227	0,0890 ± 0,0334
5	A Lưới	AL	17	32,69	1,3269 ± 0,0749	1,1957 ± 0,0528	0,1142 ± 0,0288	0,1714 ± 0,0417

Ghi chú: PNB là số lượng các đoạn đa hình, PPB - Tỷ lệ % các đoạn đa hình; Na = Số alen quan sát được; Ne = số alen có ý nghĩa; h = hệ số đa dạng gen Nei; I = chỉ số Shannon.

Dựa trên các chỉ số đa dạng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu trong các tổng thể thu tại các vùng khác nhau, hệ số di truyền và khoảng cách di truyền giữa các quần thể đã được xác định. Hệ số tương quan di truyền Nei lớn (0,8844 - 0,9584) và khoảng cách di truyền thấp (0,0425 - 0,1228) giữa các quần thể cho thấy mối quan hệ gần giũ về mặt di truyền giữa các quần thể thu tại các vùng nghiên cứu khác nhau. Trong đó, quần thể DBM có khoảng cách di truyền xa hơn các quần thể khác, tiếp đến là quần thể ND. Hai quần thể BHV và AL có mối quan hệ gần gũi với nhau nhất về mặt di truyền và gần gủi với HH hơn so với ND và DBM (Bảng 5).

Sự phân hóa gen và dòng gen là những chỉ số quan trọng để đánh giá cấu trúc di truyền của loài. Trong nghiên cứu này, giá trị Ht ở Chò đen (0,1753 ± 0,0064) thấp hơn xu hướng chung đối với các loài cây thân gỗ sống lâu năm (Ht = 0,28) [33]. Giá trị Gst thể hiện sự sai khác di truyền giữa các tổng thể nghiên cứu, kết quả ở bảng 6 cho thấy Gst = 0,2936, nghĩa là 29,36% tổng số biến thể di truyền xảy ra giữa các quần thể và 70,64% xảy ra trong các quần thể là phù hợp với các nghiên cứu trước đây, giá trị này thường nhỏ hơn 0,5 [13, 35–37].

Bảng 5. Ma trận tương quan di truyền giữa các quần thể Chò đen ở TP Huế

Tên quần thể	ND	DBM	BHV	HH	AL
ND	***	0,9131	0,9465	0,9179	0,9309
DBM	0,0909	***	0,9459	0,8947	0,8844
BHV	0,0550	0,0556	***	0,9414	0,9584
HH	0,0856	0,1113	0,0603	***	0,9379
AL	0,0716	0,1228	0,0425	0,0641	***

Ghi chú: Các số liệu phía trên là hệ số tương quan di truyền Nei; Số liệu phía dưới là khoảng cách di truyền Nei.

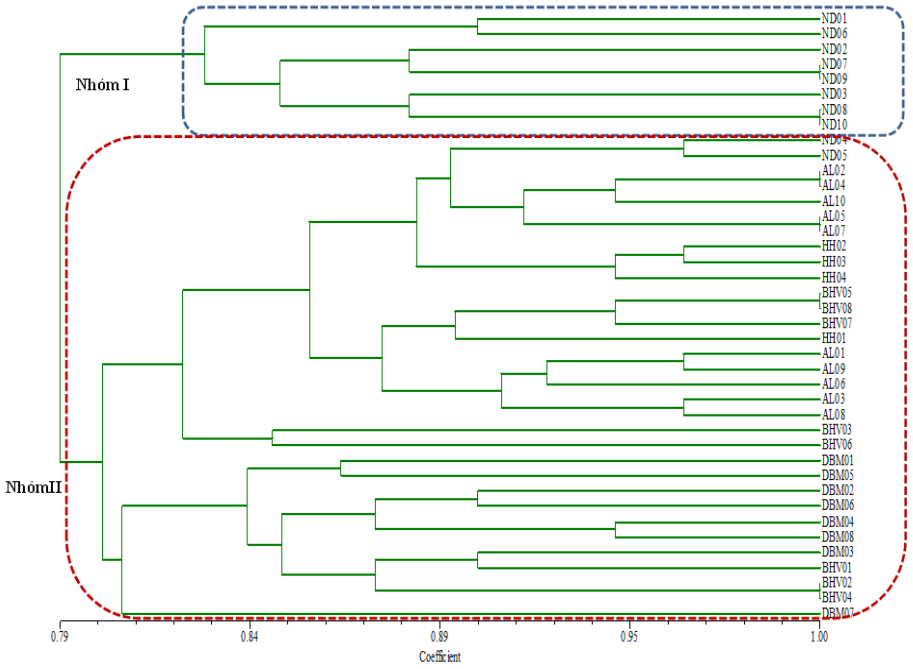
Bảng 6. Chỉ số đa dạng di truyền của các quần thể Chò đen tại TP Huế

STT	Thông số	Ký hiệu	Trung bình ± SE
1	Số lượng mẫu		40
2	Số lượng quần thể		5
3	Chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các quần thể	H_T	0,1753 ± 0,0064
4	Chỉ số đa dạng gen trung bình trong tổng thể	H_S	1,239 ± 0,0033
5	Chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các quần thể	G_{ST}	0,2936
6	Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể	Nm	1,2033

Dòng gen đề cập đến sự di chuyển của gen trong và giữa các quần thể, có tương quan tiêu cực với sự khác biệt gen và cực kỳ quan trọng đối với sự chuyển giao quần thể và tiến hóa của thực vật [38]. Wright chỉ ra rằng sự khác biệt di truyền giữa các quần thể chỉ đóng vai trò trong quá trình đồng nhất hóa khi giá trị Nm lớn hơn một [39]. Nếu giá trị Nm nhỏ hơn 1, điều đó cho thấy dòng gen bị hạn chế, dẫn đến sự khác biệt di truyền giữa các quần thể tăng lên. Theo [38], giá trị Nm thấp giữa các quần thể nghiên cứu là đặc điểm chung ở các quần thể quý hiếm có số lượng nhỏ. Trong nghiên cứu này, Nm là 1,2033, cho thấy sự di chuyển của dòng gen giữa các vùng nghiên cứu trong quần thể cây Chò đen ở TP Huế là rất lớn. Các quần thể Chò đen được sử dụng để thu mẫu là những vùng phân bố hẹp thuộc các dạng địa hình núi cao, khoảng cách giữa vùng là không lớn dẫn đến sự gia tăng phát tán quần thể và tăng cường sự trao đổi gen trong các quần thể địa phương. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến sự đa dạng di truyền cao giữa các cá thể trong loài nhưng lại có sự khác biệt di truyền thấp giữa các quần thể.

3.4 Cây phát sinh di truyền loài Chò đen tại TP Huế

Sự đa dạng di truyền phản ánh các đặc điểm của loài về nguồn gốc, tiến hóa và thích nghi với môi trường [41, 42]. Mức độ đa dạng có thể phản ánh tiềm năng tiến hóa của loài [43]. Các loài có sự đa dạng di truyền cao có khả năng thích nghi tốt hơn và sức đề kháng mạnh hơn với những thay đổi của môi trường [44]. Theo quan điểm của Nei và cs. [45] trong phân tích phát sinh di truyền quần thể số lượng băng đa hình của các alen tối thiểu là 50 để có thể xây dựng được cây phát sinh loài. Với 52 băng DNA thu được từ 9 chỉ thị PCR-ISSR cho 40 cá thể Chò đen tại Huế cây phát sinh di truyền được xây dựng dựa trên phương pháp UPGMA bằng phầm mềm NISYSpc21 (Hình 3).



Hình 3. Cây UPGMA thể hiện mối quan hệ giữa các cá thể Chò đen dựa trên chỉ thị ISSR ở TP Huế

Cây phát sinh di truyền của 40 mẫu cây chò đen thu thập tại 5 vùng khác nhau ở TP Huế (Hình 3) cho thấy, các cá thể được thu thập tại cùng một vùng nghiên cứu có mối quan hệ di truyền rất gần gũi với nhau và có xu hướng hội tụ trong cùng một nhóm trên cây phát sinh. Với hệ số tương đồng Jaccard nằm trong khoảng 0,79 đến 1,0 quần thể Chò đen thu tại TP Huế phân thành 2 nhóm. Nhóm I gồm 8 cá thể Chò đen thuộc vùng ND; nhóm II gồm 32 cá thể Chò đen còn lại thuộc các vùng DBM, BHV, ND, HH và AL. Điều này có nghĩa là quần thể cây Chò đen tại TP Huế có mức độ đồng đều di truyền cao, ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố sinh thái, lập địa tại các vùng phân bố sinh thái khác nhau. Kết quả này phù hợp với phân tích dựa trên các chỉ số hình thái giải phẫu và chỉ thị phân tử của quần thể Chò đen tại miền Trung, Việt Nam [46], cho thấy sự đồng nhất cao về hình thái và di truyền của loài.

Nhìn chung, sự đa dạng di truyền của một loài càng lớn thì khả năng phục hồi của loài đó trước những thay đổi của môi trường càng lớn. Sự khác biệt về cấu trúc di truyền giữa các quần thể thực vật có thể cải thiện khả năng chống chịu với môi trường bất lợi, mở rộng phạm vi phân bố và tăng cường khả năng thích nghi của chúng [6]. Các kết quả trong nghiên cứu này trên các quần thể Chò đen cho thấy mức độ tiến hóa và sự ổn định di truyền cao trong quần thể. Cùng với, giá trị kinh tế cao, các quần thể tự nhiên của loài Chò đen đang bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi áp lực khai thác, sự xáo trộn và phá hủy môi trường sống bởi con người dẫn đến sự suy giảm về số lượng, sự phân tán quần thể nghiêm trọng và thoái hóa di truyền gia tăng [6]. Đây sẽ là những bất lợi lớn đối với công tác phục hồi và bảo tồn loài khi quần thể của loài bị suy giảm nếu không có các giải pháp quản lý bảo vệ kịp thời. Kết quả này cũng phù hợp với các nhận định của

các tác giả khác khi nghiên cứu trên các loài cây thân gỗ và họ Dầu trong thời gian gần đây [6, 47, 48]. Chính vì vậy, việc tìm ra nguyên nhân của sự mất đa dạng sinh học của loài liên quan đến mối quan hệ giữa chọn lọc tự nhiên, dòng gen giữa các quần thể, các đặc điểm sinh học và các nguyên nhân khác là cần thiết để cung cấp các giải pháp có hiệu quả trong bảo tồn các loài thực vật quý hiếm, bao gồm cả loài Chò đen ở TP Huế và miền Trung Việt Nam.

4 Kết luận

Nghiên cứu này bước đầu đã chỉ ra rằng chỉ thị PCR-ISSR là phù hợp trong đánh giá đa dạng di truyền loài Chò đen ở TP Huế. Mức độ đa hình cao được tìm thấy ở cấp độ loài nhưng lại thấp ở cấp độ quần thể. Các quần thể loài Chò đen tại các vùng nghiên cứu có mức độ đa dạng di truyền thấp hơn so với quần thể Chò đen trên toàn TP Huế. Các chỉ số đa dạng di truyền cho thấy mức độ tương đồng di truyền cao nhưng lại có xu hướng trao đổi gen lớn giữa các quần thể địa phương tại TP Huế. Sự đồng nhất với mức độ đa dạng di truyền thấp có thể làm giảm khả năng tồn tại của quần thể Chò đen tại TP Huế trong điều kiện thay đổi của môi trường sống và các yếu tố khác. Do đó, cần phải thực hiện các biện pháp tích cực để bảo tồn, phát triển loài Chò đen khỏi sự suy giảm tính đa dạng di truyền. Kết quả từ nghiên cứu này đã cung cấp cơ sở khoa học để xác định cá thể Chò đen đầu dòng trong xây dựng nguồn vật liệu di truyền góp phần cải thiện và bảo tồn loài tại TP Huế, miền Trung Việt Nam.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí thông qua đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Đại học Huế (Mã số: DHH2024-02-184).

Lời cám ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Ban QLRPH Bắc Hải Vân, VQG Bạch Mã, Ban QLRPH Nam Đông, Ban QLRPH A Lưới, Khu DTTN Sao La, Cộng đồng xã Hồng Hạ đã hỗ trợ điều tra, thu thập mẫu vật. Cảm ơn TS. Đặng Thanh Long, Viện Công Nghệ sinh học, Đại học Huế đã hướng dẫn, hỗ trợ chia sẽ thông tin trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

1. Hoang, V. S., Xia, N., Vu, V. D, Luu, H. T. (2013), *A New species of Hopea (Dipterocarpaceae) from Vietnam, Global Journal of Botanical Science* 1, 29–33, Doi: 10.12974/2311-858X.2013.01.01.5.
2. Hoang, V. S., Xia, N. (2019), *Taxonomy and distribution of Parashorea (Dipterocarpaceae) in Vietnam, Bioscience Discovery*, 10(2), 46–52.
3. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), *Sách đỏ Việt Nam: Phần 2-Thực vật*. Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, Việt Nam.

4. Lê Thái Hùng, Ngô Tùng Đức, Trần Nam Thắng, Đinh Tiến Tài (2020), Đặc điểm thành phần loài và chỉ số đa dạng sinh học của thực vật thân gỗ ưu hợp cây họ dầu thuộc rừng kín thường xanh ở huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế, *Tạp Chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế,* 4(1), 1776–1786, https://doi.org/10.46826/huaf-jasat.v4n1y2020.371.

5. Ly, V., Nanthavong, K., Hoang, V. S., Vu, V. D., Barstow, M., Nguyen, H. N., Pooma, R., Newman, M. F. (2017), *Parashorea stellata. The IUCN Red List of Threatened Species in 2017,* https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T32626A2822394.en.

6. Xu, Y., Liu, S., Finnegan, P. M., Liu, F., Ali, I., Zhang, H., Yang, M. (2024), *Geographical variation and genetic diversity of Parashorea chinensis germplasm resources, Frontiers in Plant Science,* 14, Doi: 10.3389/fpls.2024.1452521.

7. Andayani, N., Morales, J. C., Forstner, M. R., Supriatna, J., and Melnick, D. J. (2001), *Genetic variability in mtDNA of the silvery gibbon: implications for the conservation of a critically endangered species, Conservation Biology,* 15(3), 770–775, Doi: 10.1046/j.1523- 1739.2001.015003770.x.

8. Patel, H. K., Fougat, R. S., Kumar, S., Mistry, J. G., Kumar, M. (2015), *Detection of genetic variation in Ocimum species using RAPD and ISSR markers, 3 Biotech,* 5(5), 697–707, Doi: 10.1007/s13205-014-0269-y.

9. Anne, C. (2006), *Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects*, *Genetica,* 127(1–3), 101–120, Doi: 10.1007/s10709-005-2485-1.

10. Sabir, J. S., Abo-Aba, S., Bafeel, S., Zari, T. A., Edris, S., Shokry, A. M. (2014), *Characterization of ten date palm (Phoenix dactylifera L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers, C R Biol,* 337, 6–18, Doi: 10.1016/j.crvi.2013.11.003.

11. Nguyễn Đức Thành (2014), *Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật, Tạp chí sinh học,* 36(3), 265–294, Doi: 10.15625/0866-7160/v36n3.5974.

12. Kostas, S., Hatzilazarou, S., Pipinis, E., Vasileiadis, A., Magklaras, P., Smyrnioudis, I., (2021), *Economou, Propagation of Pistacia lentiscus var. Chia genotypes and determination of their ornamental traits combined with a genetic analysis using ISSR markers*, *Agronomy,* 11(205), Doi: 10.3390/agronomy11020205.

13. Hoàng Đăng Hiếu, Chu Thị Thu Hà, Phạm Bích Ngọc, Lâm Đại Nhân, Nguyễn Thị Thúy Hường, Chu Hoàng Hà (2016), *Sử dụng chỉ thị ISSR trong việc đánh giá đa dạng di truyền ở quần thể Ba kích tại Quảng Ninh, Tạp chí Sinh học,* 38(1), 89–95. Doi: 10.15625/0866-7160/v38n1.7103.

14. Fu, Y. H., Yang, C., Meng, Q., Liu, F., Shen, G., Zhou, M., Ao, M. (2019), *Genetic diversity and structure of Coix lacrymajobi L. from its world secondary diversity center, southwest China, Int. J. Genomics,* 9815697, Doi: 10.1155/2019/9815697.

15. Çelik, C., Seraj, N. A., Yasak, S., Karakurt, Y., Telci, I., Sevindik, E. (2024), *Molecular characterization and genetic relationships in different Mint (Mentha L.) species with ISSR marker technique*, *Biology Bulletin,* 51, 959–968, Doi: 10.1134/ S106235902360616X.

16. Zou, M. L., Xia, Z. Q., Lu, C., Wang, H. Y., Ji, J. M., Wang, W. Q. (2012), *Genetic diversity and differentiation of Aquilaria sinensis (lour.) gilg revealed by ISSR and SRAP markers*, *Crop Science,* 52, 2304–2313, Doi: 10.2135/cropsci2011.10.0576.

17. Wu, W., Chen, F., Yeh, K., Chen, J. (2018), *ISSR analysis of genetic diversity and structure of Plum varieties cultivated in Southern China, Biology,* 8(1), Doi: 10.3390/ biology8010002.

18. Sun, C., Jia, L., Xi, B., Wang, L., Weng, X. (2019), *Natural variation in the fatty acid composition of Sapindus spp. seed oils. Ind., Crops Prod,* 102, 97–104, Doi: 10.1016/ j.indcrop.2017.03.011.

19. Gülay, M., Sevindik, E., Sofyalıoglu, E., Cayır, M. E., Filiz, E. (2023), *Molecular characterization of Prunus spinosa L. (Rosaceae) populations from the west black sea region in Turkey using Inter-simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction, Erwerbs-Obstbau,* 65, 2337–2343, Doi: 10.1007/s10341–023–00939-z.

20. Nurislami, A., Restu, M., Tuheteru, F., Albasri, Larekeng, S. (2023), *Polymorphism Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) primers for genetic diversity for pooti plants (Hopea gregaria), IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,* 1277, Doi: 10.1088/1755-1315/1277/1/012038.

21. Lê Y Phụng, Văn Quốc Giang, Nguyễn Lộc Hiền, Trần Văn Hâu, Huỳnh Kỳ (2018), *Khảo sát đặc điểm hình thái và đặc tính di truyền bằng dấu chỉ thị phân tử ISSR của các giống Thanh Trà ((Bouea oppositifolia (Roxb.)) Meisne.) tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long, Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 54(1), 50–60, Doi: 10.22144/ctu.jvn.2018.008.

22. Đỗ Thị Thu Lai, Nguyễn Thị Thùy Linh, Đinh Trường Sơn, Nguyễn Thị Kim Lý, Phạm Thị Minh Phượng (2018), *Đánh giá đa dạng nguồn gen Đỗ quyên bằng chỉ thị ISSR, Tạp chí khoa học công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* 18(96), 115–121.

23. Vũ Huyền Trang, Hoàng Đăng Hiếu, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2014), *Đánh giá đa dạng quần thể dó bầu (Aquilaria crassna Pierre) tại Việt Nam bằng chỉ thị phân tử ISSR, Tạp chí khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học tự nhiên và công nghệ,* 30(4), 58–64.

24. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987), *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochemical Bulletin* 19, 11–15.

25. Pal, D., Malik, S. K., Kumar, S., Choudhary, R., Sharma, K. C., Chaudhury, R. (2013), *Genetic Variability and Relationship Studies of Mandarin (Citrus reticulata Blanco) Using Morphological and Molecular Markers, Agric Res.,* 2(3), 236–245.

26. Munankarmi, N. N., Rana, N., Bhattarai, T., Shrestha, R. L., Joshi, B. K., Baral, B., Shrestha, S. (2018), *Characterization of the Genetic Diversity of Acid Lime (Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle) Cultivars of Eastern Nepal Using Inter-Simple Sequence Repeat Markers, Plants,* 7(2), 46. Doi: 10.3390/plants7020046.

27. Nei, M. (1973), *Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 70(12), 3321–3323, Doi: 10.1073/pnas.70.12.3321.

28. Slatkin, M., Barton, N. H. (1989), *A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow, Evolution,* 43(7), 1349–1368, https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02587.x.

29. Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B. J., Ye, Z. H., Mao, J. X. (1997), *Popgene, the UserFriendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.*

30. Rohlf, F. J. (2000), *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1. Exeter Publishing, Setauket, NY.*

31. Schwartz, O. A. (1985), *Lack of protein polymorphism in the endemic relict Chrysosplenium iowense (Saxifragaceae), Canadian Journal of Botany,* 63, 2031–2034, Doi: 10.1139/b85-284.

32. Jin, Z. X., and Li, J. M. (2007), *ISSR analysis on genetic diversity of endangered relic shrub Sinocalycanthus chinensis, The Journal Applied Ecology,* 18(2), 247–253, Doi: 10.3969/j.issn.1673-5102.2007.01.013.

33. Zou, Y. P., Ge, S., Wang, X. D. (2001), *Molecular markers in systematic and evolutionary Botany, Beijing: Science Press.*

34. Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Sherman-Broyles, S. L. (1992), *Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species, New Forest*, 6, 95–125, Doi: 10.1007/ BF00120641.

35. Pillai, P. P., Sajan, S. J., Menon, M. K., Jayakumar, P. S. K., Subramoniam, A. (2012), *ISSR analysis reveals high intraspecific variation in Rauvolfia serpentina L. – A high-value medicinal plant, Biochemical Systematics and Ecology,* 40, 192–197, https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.10.019.

36. Yu, H. H., Yang, L. Z., Sun, B., Liu, N. R. (2011), *Genetic diversity and relationship of endangered plant Magnolia officinalis (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms, Biochemical Systematics and Ecology,* 39(2), 71–78, https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.12.003.

37. Zhang, Q. D., Gao, M. L., Yang, P. Y. (2010), *Genetic diversity and structure of a traditional Chinese medicinal plant species, Fritillaria cirrhosa (Liliaceae) in southwest China and implications for its conservation, Biochemical Systematics and Ecology*, 38(3), 236–242, https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.029.

38. Slarkin, M. (2003), *Gene flow in natural populations, Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics,* 16, 393–430, Doi: 10.1146/annurev.es.16.110185.002141.

39. Wright, S. (1931), *Evolution in Mendelian populations, Genetics,* 16(2), 97–159, Doi: 10.1093/genetics/16.2.97.

40. Slatkin, M. (1985), *Rare alleles as indicators of gene flow, Evolution,* 39(1), 53–65, https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb04079.x.

41. Li, E. X., Yi, S., Qiu, Y. X., Guo, J. T., Comes, H. P., Fu, C. X. (2008), *Phylogeography of two East Asian species in Croomia (Stemonaceae) inferred from chloroplast DNA and ISSR fingerprinting variation, Molecular Phylogenetics Evolution,* 49(3), 702–714, Doi: 10.1016/j.ympev.2008.09.012.

42. Szczecińska, M., Sramko, G., Wołosz, K., and Sawicki, J. (2016), *Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species Pulsatilla patens (L.) mill in east central Europe*, *PloS One,* 11(3), e0151730, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730.

43. Frankel, O., and Soulé, M. E. (1981), *Conservation and evolution, Cambridge University Press, Oryx,* 16(4), Doi: 10.1017/S0030605300017853.

44. Li, B. J., Wang, J. Y., Liu, Z. J., Zhuang, X. Y., Huang, J. X. (2018), *Genetic diversity and ex-situ conservation of Loropetalum subcordatum, an endangered species endemic to China, BMC Gennmic Data,* 19(12), Doi: 10.1186/s12863-018-0599-6.

45. Nei, M. (1978), *Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals, Genetics,* 89, 583–590, Doi: 10.1093/genetics/89.3.583.

46. Le, T. H., Doan, Q. T., Van, T. Y., Nguyen, V. L., Hoang, H. T. (2024), *Morphological and Molecular Characteristics of Parashorea stellata Kurz. in Central Vietnam, Asian Journal of Plant Sciences,* 23(412–424), Doi: 10.3923/ajps.2024.412.424.

47. Garcıa-Verdugo, C., Caujape´-Castells, J., Mairal, M., Monroy, P. (2019), *How repeatable is microevolution on islands? Patterns of dispersal and colonization-related plant traits in a phylogeographical context, Annals of Botany,* 123, 557–568, Doi: 10.1093/aob/ mcy191.

48. Jaros, U., Tribsch, A., Comes, H. P. (2018), Diversification in continental island archipelagos: new evidence on the roles of fragmentation, colonization and gene flow on the genetic divergence of Aegean Nigella (*Ranunculaceae*), *Annals of Botany,* 121, 241–254, Doi: 10.1093/aob/mcx150.