

Đánh giá đa dạng quần thể dó bầu (*Aquilaria crassna* Pierre) tại Việt Nam bằng chỉ thị phân tử ISSR

Vũ Huyền Trang, Hoàng Đăng Hiếu, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà*

Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, VAST

Nhận ngày 07 tháng 11 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 26 tháng 11 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 12 năm 2014

Tóm tắt: Cây dó bầu - *Aquilaria crassna* (Pierre) là một trong số các loài cây mang lại giá trị kinh tế và được sử dụng tại rất nhiều nước trên thế giới. Ngày nay, theo Công ước về thương mại quốc tế với các loài động, thực vật hoang dã nguy cấp (Công ước Washington) thì dó bầu nằm ở Phụ lục II trong danh sách các loài đang bị đe dọa. Trong nghiên cứu này, 91 mẫu dó bầu được thu thập tại các tỉnh phía Bắc và Nam Việt Nam. Các dòng này đã được đánh giá sự sai khác di truyền bằng 12 chỉ thị phân tử ISSR đa hình (Inter simple sequence repeat) trong tổng số 35 chỉ thị được sử dụng. Kết quả của nghiên cứu đã thu được tổng số 157 phân đoạn DNA được nhân lên, trong đó có 124 phân đoạn đa hình chiếm 78,98%. Cây phân loại được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng Jaccard, kiểu phân nhóm UPGMA. Kết quả phân tích thu được 2 nhóm chính với hệ số tương đồng Jaccard nằm trong khoảng 0,34 – 0,92, hệ số sai khác di truyền quần thể Nei $G_{st} = 0,3324$ và hệ số trao đổi gen quần thể (gene flow) $N_m = 1,0044$. Các kết quả được phát hiện rất có ý nghĩa cho công tác chọn, tạo giống và bảo tồn giống sau này.

Từ khóa: *Aquilaria crassna* (Pierre), dó bầu, ISSR, trầm hương.

1. Mở đầu

Chi Dó trầm (*Aquilaria*) thuộc họ Trầm (Thymelaeaceae) bao gồm 15 loài được tìm thấy rộng khắp châu Á và đặc biệt ở Đông Nam Á. Các loài thuộc chi Dó trầm có khả năng sinh ra “trầm hương” do chịu một số tác động dẫn tới bị tổn thương/ nhiễm bệnh mà sau đó cây sẽ tích tụ một chất dạng nhựa bao quanh vết tổn thương và có nhiều đặc tính quý. Trầm hương là sản phẩm đã được sử dụng từ hàng ngàn năm nay do có mùi hương độc đáo. Ngày nay, trầm

hương được sử dụng trong các ngành công nghiệp dược phẩm, nước hoa và sử dụng làm hương, nhang trong phong tục thờ cúng [1]. Các loài sinh ra trầm hương chủ yếu được biết đến ngày nay là *A. malaccensis*, *A. agallocha*, *A. secundaria*, *A. crassna* and *A. sinensis* [2].

Các quần thể dó bầu trong tự nhiên đang bị suy giảm một cách nghiêm trọng do sự khai thác quá mức của con người. Từ những năm 1980, loài *A. malaccensis* đã được đưa vào Sách đỏ của Liên minh Quốc tế Bảo tồn Thiên nhiên và Tài nguyên Thiên nhiên (IUCN) là một loài bị đe dọa nghiêm trọng (IUCN, 1994). Việt Nam được biết đến là nước xuất khẩu các

*Tác giả liên hệ. ĐT: 0912175636
Email: chuhoangha@ibt.ac.vn

loại trầm hương chất lượng cao, trong đó các loại trầm hương này hầu hết đều có nguồn gốc từ loài dó bầu (*A. crassna*(Pierre)). Loài dó bầu phân bố rộng rãi từ miền Trung đến miền Nam Việt Nam. Cũng giống như loài loài *A. malaccensis*, loài dó bầu cũng bị khai thác quá mức và nằm ở Phụ lục II trong danh sách các loài đang bị đe dọa theo công ước về thương mại quốc tế với các loài động, thực vật hoang dã nguy cấp [3]. Đã có rất nhiều biện pháp được triển khai để bảo vệ loài dó bầu. Năm 1995, dự án Rainforest đã được triển khai với loài dó bầu để tăng diện tích đất trồng và sử dụng bền vững trầm hương. Dự án Tree seed được triển khai năm 1997 tại tỉnh Hà Tĩnh về việc thử nghiệm khai thác trầm hương. Hiện nay, loài dó bầu tự nhiên đang được bảo vệ một cách nghiêm ngặt và được trồng rộng rãi trên cả nước.

Trong những năm gần đây, chỉ thị phân tử đã trở thành công cụ hỗ trợ các nhà nghiên cứu rất đắc lực để đánh giá đa dạng di truyền trong loài và khác loài [4]. Trong các loại chỉ thị phân tử như: AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic), ISSR (inter simple sequence repeat) và SSR (simple sequence repeat) thì chỉ thị ISSR được sử dụng rộng rãi hơn cả để đánh giá sự sai khác di truyền ở thực vật. Chỉ thị ISSR có ưu điểm là không cần phải biết trước thông tin về trình tự nhân để thiết kế mồi. Do được thiết kế với cặp mồi dài và đặc hiệu hơn nên chỉ thị ISSR có thể dễ dàng lặp lại kết quả ở những lần thực hiện khác nhau. Ngoài ra, phương pháp ISSR chỉ cần sử dụng một lượng nhỏ DNA là có thể tiến hành [5], [6]. Do vậy, phương pháp này yêu cầu kỹ thuật đơn giản, nhanh hơn tiết kiệm chi phí so với các phương pháp khác. Phương pháp này đã được sử dụng rộng rãi trong đánh giá sự đa dạng quần thể như: thầu dầu [6], *Rauwolfia serpentina* L. [7], *A. sinensis* (Lour.) Gilg và Durian cultivars [8], *Diarsia brunnea* [9].

Vì các lợi ích kinh tế đem lại nên các loài thuộc chi dó bầu đã được nghiên cứu về rất nhiều mặt từ nuôi trồng [10], phân bố [11], định danh [12], sản xuất [13] đến các nghiên cứu về cơ chế tạo trầm. Tuy vậy, chỉ có một số ít nghiên cứu đề cập tới đánh giá đa dạng di truyền của loài dó bầu có sử dụng chỉ thị phân tử [14], [15] mặc dù chúng có thể đóng góp rất lớn vào mục tiêu khai thác bền vững và sử dụng hợp lý loài quý hiếm [16], [10]. Mặc dù loài dó bầu nằm trong Sách đỏ Việt Nam từ năm 1996, tuy nhiên không có các nghiên cứu nào về đa dạng di truyền về loài này tại Việt Nam được thực hiện.

Trong bài báo này chúng tôi xác định sự đa dạng di truyền giữa quần thể dó bầu thu tại Việt Nam cũng như sự đa dạng loài bằng chỉ thị phân tử ISSR. Nghiên cứu này cho phép các nhà nghiên cứu hiểu biết hơn về nguồn gen của chi dó bầu phục vụ cho công tác chọn, tạo giống và bảo tồn nguồn gen.

2. Vật liệu - Phương pháp

2.1. Vật liệu

Lá của các mẫu dó bầu được thu từ 4 quần thể điển hình tại các tỉnh Việt Nam, trong đó có tổng số 91 mẫu được thu (mỗi quần thể gồm 16-28 mẫu). Tất cả các mẫu lá được làm khô trong silicagel và để mát ở 4°C.

Bảng 1. Tên, số lượng các giống dó bầu thuộc 4 quần thể thu tại Việt Nam

STT	Kí hiệu	Vị trí	Số lượng mẫu
1	TQ	Tuyên Quang	18
2	HT	Hà Tĩnh	28
3	KH	Khánh hòa	27
4	PQ	Phú Quốc	18

2.2. Phương pháp

Tách chiết DNA: DNA của các mẫu dó bầu được tách chiết theo phương pháp CTAB [17]. Chất lượng DNA được xác định trên agarose 1% và độ sạch được xác định trên máy BioRad Smartspect3000 UV-Vis. Sau đó, DNA được pha loãng đến nồng độ 20 ng/μl và giữ ở -20°C.

Phản ứng ISSR: phản ứng ISSR được thực hiện với 35 môi ISSR được tổng hợp tại Invitrogen (Shanghai Invitrogen Biotechnology Co.Ltd.) theo các trình tự môi đã được công bố tại University of British Columbia Nucleic Acid-Protein Service Unit và UBC Primer Set #9. Kết quả 12 môi ISSR cho sự đa hình được sử dụng cho phản ứng PCR với 107 giống dó bầu. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Applied Biosystems (ABI) 2720 Thermal Cycler. Hỗn hợp phản ứng được thực hiện bao gồm: 20 ng DNA khuôn, 1,0 U Taq polymerase, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1,0 mM primer, and 1 x PCR buffer, và nước deion khử trùng. PCR được thực hiện với chu trình nhiệt 94°C - 5 phút; 40 chu kỳ với 94°C - 45s, 53°C - 1 phút, và 72°C - 2 phút; 72°C - 10 phút. Phản ứng PCR được lặp lại ít nhất 2 lần với mỗi mẫu DNA. Sau đó, sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và các phân đoạn được hiển thị nhờ ethidium bromide dưới điều kiện UV.

Phân tích số liệu ISSR: số liệu của nghiên cứu được ghi nhận dưới dạng nhị phân trong đó: (1) - phân đoạn DNA xuất hiện và (0) - sự vắng mặt của các phân đoạn DNA. Sau đó, các số liệu này sẽ được phân tích dựa trên phần mềm POPGENE 1.32 [18] để xác định các chỉ số đa dạng di truyền như phần trăm các phân đoạn đa hình (PPB), số alen quan sát được (Na), số alen có ý nghĩa (Ne), hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các loài, hệ số đa dạng Shannon (I) [19], chỉ số sai khác di truyền giữa các quần thể (Gst) và chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể (Nm). Chỉ số Nm giữa các quần thể được tính toán theo công thức $Nm = (1 - Gst) / 4Gst$ [20]. Phân nhóm dựa trên hệ số tương đồng Jaccard, kiểu phân nhóm UPGMA trên phần mềm NTSYSpc 2.1 [21].

3. Kết quả

Kết quả phân tích sự đa hình chỉ thị ISSR

DNA tinh sạch được pha loãng để làm khuôn cho phản ứng ISSR. 12 chỉ thị trong tổng số 35 chỉ thị ban đầu được kiểm tra cho kết quả đa hình với 10 mẫu dó bầu thuộc 4 quần thể tại Việt Nam. Sau đó, 12 chỉ thị này được sử dụng để đánh giá đa dạng 91 mẫu thuộc 4 quần thể dó bầu trên.

Bảng 2. Kết quả phân tích sự đa hình các phân đoạn DNA của 12 chỉ thị ISSR

STT	Tên môi	Trình tự 5' – 3'	Khoảng kích thước nhân lên	Tổng số phân đoạn	Số phân đoạn đa hình (NPB)	Tỷ lệ phân đoạn đa hình (PPB)	<i>h</i> + SD	<i>I</i> + SD
1	UBC863	(AGT)5	200-1500	11	11	100	0.2153+0.1634	0.3475+0.2195
2	UBC861	(ACC)5	250-1400	7	5	71.43	0.1357+0.1685	0.2221+0.2476
3	UBC873	(GACA)4	500-1250	12	8	66.67	0.1592+0.1972	0.2469+0.2767
4	UBC830	(TG)8G	400-1100	14	9	64.29	0.1654+0.1581	0.2668+0.2390
5	UBC813	(CT)8T	600-1100	11	9	81.82	0.3200 +0.1968	0.4679+0.2680
6	UBC807	(AG)8T	100-1400	14	12	85.71	0.2397 +0.2045	0.3627+0.2796
7	UBC810	(GA)8T	100-1300	14	8	57.14	0.0924+0.1190	0.1622+0.1904
8	UBC812	(GA)8A	300-1200	16	12	75.00	0.2328+0.2032	0.3502+0.2847
9	UBC815	(CT)8G	200-1800	10	10	100	0.3028+0.1579	0.4642+0.1975

10	UBC825	(AC)8T	200-2000	12	10	83.33	0.1639 +0.1840	0.2616+0.2579
11	UBC814	(CT)8A	700-1100	19	17	89.47	0.2089 +0.1483	0.3387+0.2104
12	UBC811	(GA)8C	200-1400	17	13	76.47	0.2016+0.1779	0.3179+0.2491
	Tổng quần thể			157	124		0.2027 +0.1786	0.3172+0.2505
	Trung bình			13	10	78.98		

h – hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các giống; I – hệ số Shannon; SD – độ lệch chuẩn

Kết quả kiểm tra thu được tổng số 157 phân đoạn được nhân lên, trong đó 124 phân đoạn đa hình chiếm tỷ lệ 78,98% (Bảng 2). Các phân đoạn được nhân lên có kích thước từ 100 bp đến 1800 bp, số phân đoạn trên mỗi chỉ thị đạt từ 7 đến 19 với trung bình đạt 13. Trong số 12 chỉ thị thì UBC814 và UBC811 cho nhiều phân đoạn nhất với 19 và 17 phân đoạn và chỉ thị UBC861 cho số phân đoạn ít nhất là 7. Trong đó, chỉ thị UBC814 cho số phân đoạn đa hình cao nhất đạt 17 phân đoạn, ngược lại chỉ thị UBC861 cho số phân đoạn đa hình ít nhất là 5.

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền của 4 quần thể và các giống dó bầu

Hệ số đa dạng gen giữa các loài Nei và Shannon cao nhất ở chỉ thị UBC813 với $h = 0,3200$ và $I = 0,4679$. Ngược lại, chỉ thị UBC861 cho các hệ số đang dạng là thấp nhất với hệ số đa dạng Nei đạt $h = 0,1357$ và hệ số Shannon đạt $I = 0,2221$ (Bảng 2).

Với số phân đoạn đa hình (PPB) giữa các quần thể đạt từ 64 phân đoạn thuộc quần thể KH đến 90 phân đoạn thuộc quần thể HT. Trong đó, tỷ lệ phân đoạn đa hình nằm trong khoảng 45,86% đến 49,68%, chứng tỏ sự đa hình của các phân đoạn thuộc mỗi quần thể đạt mức trung bình.

Bảng 3. Các chỉ số đa dạng của 4 quần thể dó bầu

Tên quần thể	NPB	PPB (%)	Na+SD	Ne+SD	h +SD	I +SD
TQ	78	49.68	1.4968+0.5016	1.2366+0.3249	0.1454+0.1783	0.2258+0.2591
HT	90	57.32	1.5732+0.4962	1.2260+0.3190	0.1403+0.1727	0.2228+0.2475
KH	64	40.76	1.4076+0.4930	1.2027+0.3240	0.1212+0.1786	0.1855+0.2585
PQ	72	45.86	1.4586+0.4999	1.2270+0.3312	0.1373+0.1803	0.2117+0.2611

Na – Số alen quan sát được; Ne - số alen có ý nghĩa; h – hệ số đa dạng di truyền Nei giữa các giống; I – hệ số Shannon; SD – độ lệch chuẩn

Số alen quan sát được (Na) của quần thể HT là cao nhất đạt 1,5732 trong khi quần thể KH có số alen quan sát được là thấp nhất là 1,4076. Ngoài ra, số alen có ý nghĩa (Ne) nằm từ 1,2381 (quần thể PQ) đến 2,085 (quần thể CL) với trung bình đạt 1,3031, ngoài ra, ta có thể thấy ở các quần thể Na luôn lớn hơn Ne.

Hệ số đa dạng di truyền Nei của các quần thể nằm từ 1,1212 đến 0,1454, hệ số Shannon nằm từ 0,1895 đến 0,2262. Chỉ số sai khác di truyền G_{st} giữa các quần thể được tính toán sử dụng phần mềm POPGENE cho kết quả chỉ số

G_{st} đạt 0,3324 chỉ ra rằng mức độ sai khác là thấp giữa các quần thể. Dựa trên giá trị G_{st} , giá trị Nm được tính toán và đạt 1,0044 cho thấy tần số trao đổi gen thấp giữa các quần thể (Bảng 4).

Chỉ số sai khác di truyền giữa 4 quần thể $G_{st} = 0,3324$ chứng tỏ có 33,24% sự sai khác di truyền giữa các giống nghiên cứu. Mức độ trao đổi gen được thể hiện qua hệ số gene flow (Nm) giữa 4 quần thể là rất thấp 1,0044. Chỉ số này trùng với kết quả nghiên cứu trước đây với loài *Aquilaria sinensis* (Nm= 1,8292) [22]. Hệ số trao đổi gen thấp giữa các quần thể là một

đặc điểm chung ở các quần thể quý có số lượng nhỏ [23]. Ngược lại, với chọn tạo giống, sự biến động di truyền, sự đột biến, sự chọn lọc và cách ly di truyền sẽ tác động đến sự đa dạng nguồn gen [24-26].

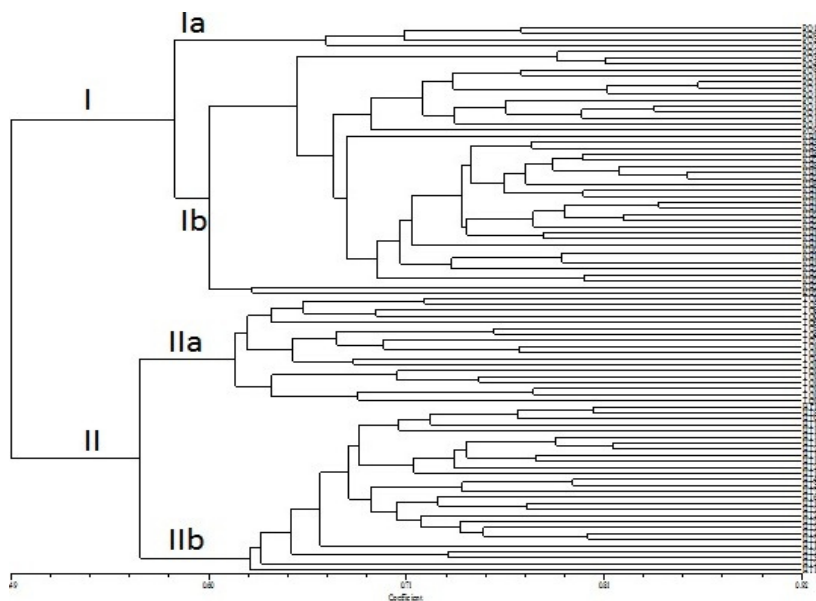
Bảng 4. Các chỉ số đa dạng của các quần thể dó bầu

Các thông số	Mean ± SD
Số lượng mẫu	91
H_T	0.2038 ± 0.0316
H_S	0.1360 ± 0.0152
G_{ST}	0.3324
Nm	1.0044

H_T - Chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các quần thể; H_S - Chỉ số đa dạng gen trung bình trong quần thể; G_{ST} - chỉ số sai khác di truyền Nei giữa các quần thể ; Nm - chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể.

Kết quả lập cây phân loại giữa các giống dó bầu

Cây phân loại được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard và thuật toán UPGMA, trong đó 91 mẫu dó bầu phân ra làm 2 lớp chính với hệ số tương đồng nằm trong khoảng từ 0,34 đến 0,92. Nhóm I bao gồm 3 quần thể PQ, KH được chia ra làm 2 phân lớp Ia và Ib. Trong đó, phân nhóm Ia có 4 giống thuộc quần thể PQ, phân nhóm Ib bao gồm 14 giống còn lại thuộc quần thể PQ và tất cả các giống quần thể KH. Nhóm II bao gồm 2 quần thể được thu thập ở miền Bắc Việt Nam và chia thành 2 phân nhóm. Phân nhóm IIa bao gồm các giống thuộc quần thể TQ và phân nhóm IIb bao gồm quần thể HT (Hình 1).



Hình 1. Cây phân loại 91 giống dó bầu dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard

Chỉ thị ISSR rất thích hợp cho việc đánh giá đa dạng một lượng lớn các loài thực vật. Trong đó, nghiên cứu này được thực hiện lần đầu tiên tại Việt Nam. 12 chỉ thị đa hình được lựa chọn trong số 35 chỉ thị để đánh giá sự đa dạng giữa các giống dó bầu. Kết quả đánh giá thu được

tổng số 157 phân đoạn, trong đó có 124 phân đoạn đa hình chiếm 78,98% chứng tỏ chỉ thị ISSR rất có ý nghĩa để đánh giá đa dạng các giống dó bầu.

Các quần thể dó bầu tại Việt Nam phân bố rải rác và có thể tìm thấy trên các đỉnh núi và

rừng tại Việt Nam. Chính vì sự phân bố rải rác này dẫn tới sự suy giảm số lượng loài và sự mất sự đa dạng nguồn gen do giảm không gian sống và giảm cơ hội giao phối giữa các cá thể [27], [28]. Một lý do khác gây giảm đa dạng di truyền đó bầu là sự tác động của con người vì các giá trị kinh tế.

Kết quả trong nghiên cứu này chỉ ra rằng ISSR có thể được sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa các cá thể và quần thể đó bầu. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng và sự trao đổi nguồn gen của các quần thể đó bầu là thấp ($Gst = 0,3324$; $Nm = 1,0044$). Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể thấp là do sự xa cách về mặt vật lý của các quần thể đó bầu tại Việt Nam cũng như sự khai thác quá mức của con người.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen và Phòng Công nghệ tế bào thực vật- Viện Công nghệ sinh học trong giai đoạn 2010-2014 thuộc đề tài Quỹ khoa học quốc gia về Khoa học và Công nghệ (Nafosted) với mã số: 106.06-2010.28.

Tài liệu tham khảo

- [1] Kakino M, Sugiyama T, Kunieda H, Tazawa, .. Maruyama H, Tsuruma K, Araki Y, Shimazawa M, Ichihara K, Mori H, and Hara H (2012) Agarwood (*Aquilaria crassna*) extracts decrease high-protein high-fat diet-induced intestinal putrefaction toxins in mice. *Pharm. Anal. Acta* 3: 1-7.
- [2] Akter S, Islam TM, Zulkefeli M, Khan IS (2013) Agarwood Production - A Multidisciplinary Field to be Explored in Bangladesh. *Inter. J. Pharm. Life Sci* 2: 22-32.
- [3] Okudera Y, Ito M (2009) Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria calli*, cell suspension cultures. *Plant Biotechnol* 26: 307-315.
- [4] Godwin ID, Aitken EAB, Smith LW (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524-1528.
- [5] Liu L, Zhao L, Gong Y, Wang M, Chen L, Yang J, Wang Y, Yu E, Wang L (2008) DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP marker. *Sci. Hortic* 116: 240-247.
- [6] Wang Z, Liao L, Yuan X, Guo H, Guo A, Liu J (2013) Genetic diversity analysis of cynodon dactylon (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. *Biochem. Syst. Ecol* 46: 108-115.
- [7] Padmesh PP, Jayakumari SS, Kuttapetty MM, Kuttanappilly SPJ, Apian S (2012) ISSR analysis reveals high intraspecific variation in *Rauvolfia serpentina* L. - A high value medicinal plant. *Biochem. Syst. Ecol* 40: 192-197.
- [8] Vanijajiva O (2012) The application of ISSR markers in genetic variance detection among Durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand, *Proc. Eng* 32: 155-159.
- [9] Luque C, Legal L, Machkour-M'Rabet S, Winterton P, Gers C, Wink M (2009) Apparent influences of host-plant distribution on the structure and the genetic variability of local populations of purple clay (*Diarsa brunea*). *Biochem. Syst. Ecol* 37: 6-15.
- [10] Nakashima EMN, Nguyen MTT, Le TQ, Kadota S (2005) Field survey of agarwood cultivation at Phu Quoc Island in Vietnam. *J. Trad. Med* 22: 296-300.
- [11] Jensen A, Meilby H (2012) Assessing the Population Status of a Tree Species Using Distance Sampling: *Aquilaria crassna* (Thymelaeaceae) in Northern Lao. *Int. J. For. Res.* 2012, 265831-265842.
- [12] Kumeta Y, Ito M (2011) Genomic organization of δ -guaiene synthase genes in *Aquilaria crassna* and its possible use for the identification of *Aquilaria* species. *J. Nat. Med* 65: 508-513.
- [13] Lee SY, Weber J, Mohamed R (2011) Genetic variation, molecular authentication of selected *aquilaria* species from natural populations in Malaysia using RAPD, SCAR Markers. *Asian J. Plant. Sci* 10: 202-211.
- [14] Lee SY, Weber J, Mohamed R (2011) Genetic variation, molecular authentication of selected *aquilaria* species from natural populations in Malaysia using RAPD, SCAR Markers. *Asian J. Plant. Sci* 10: 202-211.
- [15] Zou M, Xia QZ, Lu C, Wang H, Ji MJ, Wang QW (2012) Genetic diversity and differentiation of

- Aquilaria sinensis (Lour.) Gilg revealed by ISSR and SRAP markers. *Crop Sci.* 52, 2304-2313.
- [16] Kiet LC, Kessler PJA, Eurlings M (2005) A new species of *Aquilaria* (Thymelaeaceae) from Vietnam. *Blumea* 50: 135-141.
- [17] Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull* 19:11-15.
- [18] Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997) POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- [19] Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 70: 3321-3323.
- [20] Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- [21] Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1. Exeter Publishing, Setauket, NY.
- [22] Zou M, Xia QZ, Lu C, Wang H, Ji MJ, Wang QW (2012) Genetic diversity and differentiation of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg revealed by ISSR and SRAP markers. *Crop Sci.* 52, 2304-2313.
- [23] Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- [24] Fischer M and Matthies D (1998) Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. *Am. J. Bot* 85: 811-819.
- [25] Sun M and Wong KC (2001) Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *Am. J. Bot* 88: 2180-2189.
- [26] Li QM, Xu ZF, He TH (2002) Ex situ genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China. *Biol. Conserv* 106: 151-156.
- [27] Cao PJ, Yao QF, Ding BY, Zeng HY, Zhong YX, Fu CX, Jin XF (2006) Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Biochem. Syst. Ecol* 34: 231-239.
- [28] Qiu YX, Hong DY, Fu CX, Cameron KM (2004) Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochem. Syst. Ecol* 32: 583-596.

Using ISSR Markers to Evaluate Genetic Diversity of *Aquilaria crassna* (Pierre) Populations in Vietnam

Vũ Huyền Trang, Hoàng Đăng Hiếu, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà

National Key Laboratory of Gene Technology, Institute of Biotechnology

Abstract: *Aquilaria crassna* (Pierre ex Lec) is a rare species which has greatly economic value. Nowadays, it is listed as an endangered species in the Appendix II (The Convention on International Trade in endangered Species of wild Flora and Fauna). In this study, 91 samples of *A. crassna* were collected from northern and southern provinces of Vietnam, followed by a detailed analysis using 12 in total 35 inter-simple-sequence-repeat (ISSR) diversity markers. The results have showed that there were totally 157 fragments amplified, 124 fragments of which were polymorphic accounted for 78,98%. Dendrogram which were constructed via genetic similarity matrix using the UPGMA algorithm showed two major groups. Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.34 to 0.92. the result revealed a Nei's genetic differentiation index (G_{ST}) of 0.3324 and estimated the gene flow (Nm) of 1,0044 at the species level for *A. crassna*. These results are usefull informations for collecting, breeding and conservation of *A. crassna* in present and future researchs.

Keywords: *Aquilaria crassna*, ISSR, Genetic diversity.