

## ĐẶC ĐIỂM VÙNG GEN *rbcL* CỦA MỘT SỐ LOÀI CÂY HỌ DẦU Ở VIỆT NAM

Trần Thu Hương, Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Văn Sinh, Nguyễn Thị Phương Trang

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 07.10.2014

Ngày nhận đăng: 04.12.2014

### TÓM TẮT

*rbcL* là vùng gen lục lạp đã được nghiên cứu và chứng minh là một trong những chỉ thị phân tử hữu hiệu nhất cho các nghiên cứu về phân loài và phân tích mối quan hệ di truyền ở cấp độ loài và dưới loài. Chín loài cây họ Dầu ở Việt Nam, bao gồm Dầu đồng (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.), Dầu lông (*Dipterocarpus intricatus* Dyer), Dầu mít (*Dipterocarpus costatus* C.F.Gaertn.), Dầu song năng (*Dipterocarpus dyeri* Pierre), Chò chỉ (*Parashorea chinensis* Wang Hsie), Sao đen (*Hopea odorata* Roxb.), Sao mắt quỷ (*Hopea mollissima* C.Y.Wu), Sao hải nam (*Hopea hainanensis* Merr. et Chun) và Sao hòn gai (*Hopea hongayensis* Tardieu - Synonym *Hopea chinensis* Hand.-Mazz.) đã được phân tích đặc điểm vùng gen *rbcL*. Vùng gen *rbcL* dài 1376 bp đã được xác định trình tự bằng hai cặp mồi đặc hiệu. Kết quả giải mã trình tự vùng gen lục lạp *rbcL* của chín loài trên cho thấy có 54 vị trí sai khác nucleotide được tìm thấy, trong đó 42 vị trí mang ý nghĩa thông tin di truyền (Parsimony), theo đó khoảng cách di truyền trung bình giữa bốn loài trong chi *Hopea* là 0,33%, khoảng cách di truyền trung bình giữa các loài trong chi *Dipterocarpus* là 0,55%, khoảng cách di truyền trung bình giữa các chi là 1,9%. Kết quả cũng cho thấy chi *Hopea* và *Parashorea* chia thành hai nhánh độc lập nhưng có quan hệ gần gũi với nhau hơn so với chi *Dipterocarpus*. Trình tự *rbcL* của chín loài họ Dầu phổ biến ở Việt Nam đã được đăng ký trên ngân hàng Gen (Genbank) với số hiệu KM267143, KM267144, KM267145, KM267146, KM267147, KM267148, KM267150, KM267151, KM267152 lần lượt cho các loài *Parashorea chinensis* Wang Hsie, *Hopea odorata* Roxb., *Hopea mollissima* C.Y.Wu, *Hopea hongayensis* Tardieu, *Hopea hainanensis* Merr. et Chun, *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb., *Dipterocarpus intricatus* Dyer, *Dipterocarpus dyeri* Pierre, *Dipterocarpus costatus* C.F.Gaertn.

**Từ khóa:** *Dipterocarpaceae*, DNA lục lạp, họ Dầu ở Việt Nam, quan hệ di truyền, *rbcL*.

### MỞ ĐẦU

Họ Dầu (*Dipterocarpaceae*) bao gồm 17 chi với khoảng 680 loài chia thành ba phân họ: *Dipterocarpoideae* gồm 13 chi với khoảng 600 loài ở khu rừng nhiệt đới châu Á và Malaia; *Pakaraioideae* là đặc hữu vùng cao Guaiaman - vùng nhiệt đới Nam Mỹ và *Monotoideae* với ba chi và 30 loài ở vùng nhiệt đới châu Phi và Nam Mỹ (Kajita *et al.*, 1998). Các chi lớn nhất trong họ Dầu là *Shorea* (khoảng 250 loài), *Hopea* (105 loài), *Dipterocarpus* (70 loài) và *Vatica* (65 loài) (Dayanandan *et al.*, 1999). Các loài cây họ Dầu (*Dipterocarpaceae*) đã tạo nên một họ thực vật độc đáo và nổi tiếng của vùng nhiệt đới (Yuwa-Amornpitak *et al.*, 2006).

Có trên 40 loài họ Dầu thuộc sáu chi (*Dipterocarpus*, *Hopea*, *Shorea*, *Parashorea*, *Vatica*, *Anisoptera*) được tìm thấy ở Việt Nam (Nghĩa, 2005), đây hầu hết những loài cây lấy gỗ có giá trị kinh tế cao, đồng thời còn đem lại nhiều giá trị trong

khoa học và y học. Tuy nhiên, do khai thác quá mức và chuyển đổi mục đích sử dụng đất mà diện tích rừng nói chung và diện tích rừng cây họ Dầu nói riêng đã bị suy giảm nghiêm trọng. Ở Việt Nam, các loài cây họ Dầu hiện chỉ còn gặp trong các khu bảo tồn đã được qui hoạch. Theo Viện điều tra qui hoạch rừng (1995), ở thời điểm năm 1959, diện tích các loại rừng có cây họ Dầu ở Đông Nam Bộ chiếm 49% diện tích toàn vùng, đến năm 1968 giảm xuống 36%, năm 1982 giảm còn 18% và năm 1992 chỉ còn 8%. Xét ở qui mô quốc gia, tài nguyên cây họ Dầu nói chung và tài nguyên di truyền của từng loài cây họ Dầu nói riêng đã bị suy kiệt mạnh. Hiện tại, ở Việt Nam, trong hơn 40 loài thuộc họ Dầu thì 33 loài đang bị đe dọa ở mức độ toàn cầu (Nghĩa, 2005).

Ở thực vật, hệ gen lục lạp có cấu trúc đơn bội, với lợi thế là kích thước nhỏ, số lượng bản sao lớn và di truyền ổn định qua các thế hệ nên được ứng dụng làm chỉ thị phân tử cho các nghiên cứu phân loài và mối quan hệ di truyền (Tsumua *et al.*, 1996. Mort *et al.*, 2001) đã sử dụng gen *matK* làm chỉ thị phân tử

để phân tích mối quan hệ di truyền và tiến hóa của họ Lá bỏng (Crassulaceae). Gamag *et al.*, (2006) đã xây dựng sơ đồ hình cây (Neighbour joining) mối quan hệ di truyền của các loài trong họ Dầu dựa trên giải trình tự vùng gen *trnL* – *trnF*, gen *matK* và gen *trnL* hay (Thalisa *et al.*, 2006) phân tích mối quan hệ di truyền loài Dầu ở Thái Lan sử dụng trình tự các vùng gen *trnL-trnF* và *atpB-rbcL*.

Nhằm nâng cao chất lượng cho công tác bảo tồn cũng như cung cấp thông tin về đặc điểm phân tử của một số loài họ Dầu ở Việt Nam, chúng tôi phân tích đặc điểm trình tự vùng gen *rbcL* của chín loài họ Dầu ở Việt Nam bao gồm: Dầu đồng (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.), Dầu lông (*Dipterocarpus intricatus* Dyer), Dầu mít (*Dipterocarpus costatus* C.F.Gaertn.), Dầu song năng (*Dipterocarpus dyeri* Pierre), Chò chi (*Parashorea chinensis* Wang Hsie), Sao đen (*Hopea odorata* Roxb.), Sao mặt quỷ (*Hopea mollissima* C.Y.Wu), Sao hải nam (*Hopea hainanensis* Merr. et Chun) và Sao hòn gai (*Hopea*

*hongayensis* Tardieu). Hiện nay, do mức độ suy giảm nơi cư trú, khu phân bố và chất lượng nơi sinh cư cũng như mức độ khai thác đang ngày càng gia tăng, cả chín loài này đều nằm trong danh sách những loài bị đe dọa của tổ chức Bảo tồn thiên nhiên quốc tế (IUCN 2014) ở các mức phân hạng khác nhau. Kết quả nghiên cứu bổ sung dữ liệu di truyền của các loài cây họ Dầu của Việt Nam và đã được đăng ký trên ngân hàng Gen thế giới.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Các mẫu lá hoặc vỏ cây của chín loài cây họ Dầu được thu và bảo quản trong silicagel. Mẫu sau đó được chuyển về phòng thí nghiệm Sinh học phân tử của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật và được bảo quản ở tủ lạnh sâu -76°C cho các phân tích DNA. Các mẫu tiêu bản cũng được thu để phục vụ cho công tác xác định về mặt hình thái. Danh sách và địa điểm thu mẫu được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1.** Tên loài và địa điểm thu thập chín loài Dầu ở Việt Nam

| STT | Tên khoa học                      | Tên tiếng Việt | Địa điểm thu mẫu, tọa độ                                              |
|-----|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1   | <i>Hopea hongayensis</i>          | Sao hòn gai    | Đảo Ba Mùn, VQG Bái Tử Long, Quảng Ninh 120m, 21°02'N-107°35'E        |
| 2   | <i>Hopea hainanensis</i>          | Sao hải nam    | VQG Bến En, Thanh Hóa, 100m, 19°35'N-105°30'E                         |
| 3   | <i>Hopea mollissima</i>           | Sao mặt quỷ    | Khu bảo tồn thiên nhiên Khe Rồ, Bắc Giang, 21°09'N-21°13'E            |
| 4   | <i>Hopea odorata</i>              | Sao đen        | VQG Bến En, Thanh Hóa, 100m, 19°35'N-105°30'E                         |
| 5   | <i>Dipterocarpus intricatus</i>   | Dầu lông       | Khu BTTN Bình Châu-Phước Bửu, Bà Rịa-Vũng Tàu, 100m, 10°28'N-107°35'E |
| 6   | <i>Dipterocarpus costatus</i>     | Dầu mít        | VQG Bù Gia Mập, Bình Phước 130m, 10°56'N-106°59'E                     |
| 7   | <i>Dipterocarpus dyeri</i>        | Dầu song năng  | Tân Cửu, Vĩnh Cửu, Đồng Nai 129m, 11°12'N-107°09'E                    |
| 8   | <i>Dipterocarpus tuberculatus</i> | Dầu đồng       | VQG York Đôn, Buôn Đôn, Đắk Lắk 150m, 12°47'N-107°35'E                |
| 9   | <i>Parashorea chinensis</i>       | Chò chi        | VQG Cúc Phương, Ninh Bình, 150m, 20°19'N-105°36'E                     |

## Phương pháp nghiên cứu

### Tách chiết DNA tổng số và thiết kế các cặp mồi

Mẫu lá và vỏ cây được tách chiết theo phương pháp CTAB của (Doyle & Doyle, 1987) có cải tiến để phù hợp với điều kiện Việt Nam. Kiểm tra độ sạch và hàm lượng DNA bằng đo quang phổ hấp thụ

kết hợp với điện di trên gel agarose 1%. DNA tổng số được pha loãng dùng cho phản ứng PCR ở nồng độ 10 ng/μl.

Trình tự các cặp mồi được tổng hợp dựa theo nghiên cứu của Hasebe *et al.*, (1994). Đoạn gen *rbcL* dài 1400 bp được chia thành 2 đoạn, mỗi đoạn dài

700 bp và được khuếch đại bằng 2 cặp mồi đặc hiệu khác nhau.

### Tối ưu và nhân bản gen bằng phản ứng PCR

Phản ứng nhân gen được thực hiện trong tổng thể tích là 50 µl với các thành phần gồm có: 32 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl đệm, 5 µl dNTP, 3 µl mỗi muối F (30 pM), 3 µl mỗi ngược R (30 pM), 1 µl DNA tổng số, 1 µl enzyme Taq polymerase. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy PCR system 9700 với các chu kỳ như sau: biến tính ở 95°C 3 phút, sau đó là 35 chu kỳ lặp lại: 95°C 30 giây; bắt cặp ở 56°C 1 phút, kéo dài mạch ở 72°C 1 phút, cuối cùng là 72°C trong 10 phút để kết thúc phản ứng và giữ mẫu ở 4°C.

Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, nhuộm gel bằng ethidium bromide và chụp ảnh trên hệ thống máy ảnh có chiếu ánh sáng UV.

### Giải trình tự và xử lý số liệu

Giải mã trình tự nucleotide được thực hiện bằng kit BigDye terminator v3.1 trên máy đọc trình tự ABI 3100 Avant genetic analyzer (Applied Biosystems). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Sephadex G50 (Sigma) trước khi tiến hành đọc trình tự. Kết quả trình tự hai vùng gen *rbcLa* và *rbcLc* của chín mẫu nghiên cứu sau đó được kết hợp lại thành một đoạn gen *rbcL* hoàn chỉnh dài 1400 bp bằng phần mềm Chomaz-Pro và so sánh với trình tự gen *rbcL* loài Thông đỏ bắc trên Genbank (*Taxus chinensis* AY450855.1) được sử dụng làm loài ngoài nhóm. Phần mềm ClustalW (Thomson *et al.*, 1994), GenDoc (Nicholas *et al.*, 1997) và MEGA5.2 (Tamura *et al.*, 2011) được dùng để phân tích dẫn liệu và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp tối giản (Maximum Parsimony - MP), mức độ khác biệt di truyền được tính toán theo mô hình Kimura hai tham số.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Một đoạn trình tự dài 1400 nucleotide của gen *rbcL* đã được giải mã thành công ở cả chín loài nghiên cứu. Sau khi loại bỏ những phần bị rớt ở hai đầu, một đoạn gen dài 1376 nucleotide của chín loài họ Dầu ở Việt Nam đã được lựa chọn để tiến hành phân tích. Kết quả so sánh chín loài Dầu theo mô hình Kimura hai tham số trên Mega 5.2 cho thấy có 54 vị trí sai khác (variable), trong đó 42 vị trí mang ý nghĩa thông tin di truyền (Parimony). Số cặp nucleotide tương đồng ở vị trí 449 và 450 xuất hiện

tương ứng ở vị trí codon thứ hai và vị trí codon thứ ba. Số cặp tương đồng cao nhất nhất là 453 xuất hiện ở vị trí codon thứ nhất. Tỷ số trung bình của cặp Si (đồng hoán) và Sv (dị hoán) là 1,02, trong đó tỷ số là 0,69 ở vị trí codon thứ nhất, ở vị trí codon thứ hai và thứ ba lần lượt là 2,091 và 0,58. Tần số biến đổi cao xuất hiện ở vị trí codon thứ nhất cho 4 cặp base T – T, C – C, A – A và G – G lần lượt là 118, 101, 136 và 99. Tần số này là 185, 72, 133 và 60 tương ứng ở vị trí codon thứ hai và 82, 90, 108 và 170 ở vị trí codon thứ ba, tương ứng. Quá trình thay thế nucleotide xảy ra rất phức tạp và thực tế không thể quan sát được nhưng có thể xây dựng được các mô hình xác suất khá đi và ước lượng những biến đổi ghi nhận được để tìm ra mô hình gần với thực tế nhất.

Thành phần AT dao động ở mức 55,5% (cho loài *P. chinensis*) đến 56,3% (ở hai loài *D. dyeri* và *D. tuberculatus*), trung bình là 56%. Đối với vị trí codon thứ nhất, thành phần AT dao động trong khoảng 55,3% - 55,8%, trung bình 55,6%. Thành phần AT dao động trong khoảng 69,3% - 71,2%, trung bình 70,2% ở vị trí codon thứ 2 và tương tự, vị trí codon thứ 3 có thành phần AT biến đổi trong khoảng từ 41% - 43%, trung bình 42,2%.

Thành phần base cho chín loài nghiên cứu được thể hiện ở bảng 2. Cụ thể, thành phần T(U) dao động từ 28% (ở ba loài *H. hongayensis*, *H. mollissima*, *H. odorata*) đến 28,8% (ở ba loài *D. costatus*, *D. dyeri*, *D. tuberculatus*), trung bình 28,3%. Thành phần C dao động trong khoảng 19,3% (*D. dyeri*) đến 20,1% (*P. chinensis*), trung bình 19,7%. Tương tự, thành phần A dao động ở mức 27,3% (2 loài *D. intricatus*, *D. costatus*) đến 28% (2 loài *H. hongayensis*, *H. mollissima*), trung bình 27,7%. Thành phần G dao động từ 24,2% (2 loài *H. hongayensis*, *H. hainanensis*) đến 24,4% (*H. odorata*, *D. dyeri*), trung bình 24,3%.

So sánh trên cơ sở dẫn liệu của các loài *Hopea*, kết quả cho thấy có tám nucleotide sai khác (variable) ở các vị trí thứ 48, 77, 170, 249, 426, 702, 1043, 1375, trong đó ba vị trí 48, 702, 1043 mang ý nghĩa thông tin di truyền. Khoảng cách di truyền của chín loài nghiên cứu được xây dựng bằng phần mềm Mega 5.2 (Bảng 3). Đối với các loài trong chi *Hopea* mà đại diện ở đây có bốn loài gồm *H. hongayensis*, *H. mollissima*, *H. hainanensis*, *H. odorata* đều có khoảng cách di truyền tương đối nhỏ. Khoảng cách di truyền thấp nhất được tìm thấy là 0,1% giữa hai loài Sao hóp gai (*H. hongayensis*) và Sao mặt quỷ (*H. mollissima*), điều này cũng hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu về hình thái. Sự khác biệt di

truyền giữa loài Sao hải nam (*H. hainanensis*) và Sao hòn gai (*H. hongayensis*) là 0,6%. Tỷ lệ sai khác di truyền trung bình giữa các loài trong chi *Hopea* là 0,33%. Tương tự, với bốn loài trong chi *Dipterocarpus*, kết quả so sánh trên Mega 5.2 cho thấy có 13 nucleotide sai khác lần lượt ở các vị trí số 6, 7, 14, 628, 643, 645, 646, 693, 856, 978, 1004, 1085, 1375 trong đó có năm vị trí số 7, 646, 693, 978, 1085 mang ý nghĩa thông tin di truyền (Hình 1).

Tỷ lệ sai khác di truyền trung bình giữa các loài nghiên cứu trong chi *Dipterocarpus* là 0,55%, thấp nhất là 0,2% giữa Dầu lông (*D. intricatus*) và Dầu mít (*D. costatus*), lớn nhất là 0,7% giữa Dầu lông (*D. intricatus*) và Dầu song năng (*D. dyeri*), giữa Dầu mít (*D. costatus*) và Dầu đồng (*D. tuberculatus*). Sự khác di truyền trung bình giữa hai chi *Hopea* và *Dipterocarpus* là 1,8%, giữa các chi *Hopea*, *Dipterocarpus* và *Parashorea* là 1,9%.

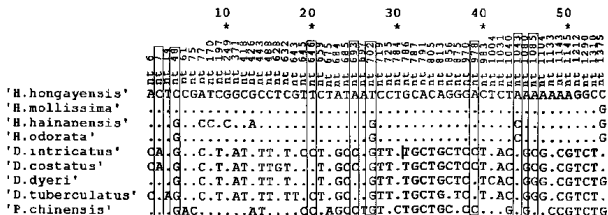
Trên cơ sở so sánh trình tự gen *rbcL*, mối quan hệ di của chín loài cây họ Dầu ở Việt Nam được xây dựng theo phương pháp tối giản (MP),

loài Thông đỏ bắc (*Taxus chinensis*), số hiệu trên Genbank AY450855.1 được dùng làm loài ngoài nhóm (Hình 2).

Kết quả phân tích có giá trị bootstrap cao (hơn 80%). Loài Sao hòn gai (*H. hongayensis*) và Sao mặt quỷ (*H. mollissima*) có quan hệ rất gần gũi với nhau, với hệ số tin cậy (bootstrap 92%). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy chi *Parashorea* có quan hệ gần gũi với chi *Hopea* hơn so với chi *Dipterocarpus*. Năm 1999, Yamazaki và đồng tác giả dựa trên giải trình tự gen *matK*, *trnL* - *trnF* đã xây dựng mối quan hệ di truyền cây họ Dầu ở Đông Nam Á, kết quả cho thấy chi *Hopea* là một chi trong nhóm lớn *Shorea* và *Parashorea*. Tuy nhiên, năm 2006, Gamage et al., đã xây dựng lại sơ đồ hình cây (Neighbour joining) mối quan hệ di truyền của các loài trong họ Dầu dựa trên giải trình tự vùng gen *trnL* - *trnF*, gen *matK* và gen *trnL* các loài trong họ Dipterocarpaceae, kết quả cho thấy *Hopea* là một chi độc lập với *Parashorea* và *Shorea*. Nghiên cứu này của chúng tôi đồng nhất với kết quả nghiên cứu của (Gamage, 2006).

Bảng 2. Thành phần base (%) của chín loài nghiên cứu.

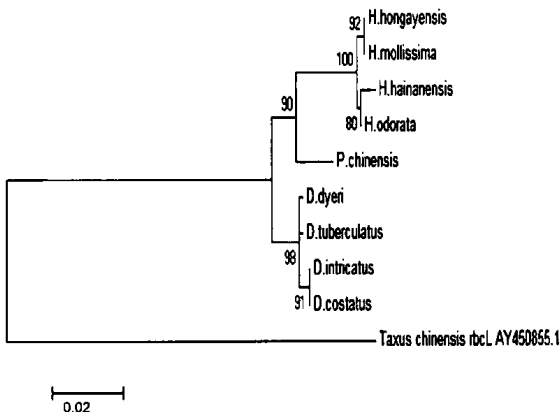
| Loài                  | T(U) | C    | A    | G    | Tổng   |
|-----------------------|------|------|------|------|--------|
| <i>H.hongayensis</i>  | 28.0 | 19.8 | 28.0 | 24.2 | 1376.0 |
| <i>H.mollissima</i>   | 28.0 | 19.7 | 28.0 | 24.3 | 1376.0 |
| <i>H.hainanensis</i>  | 28.1 | 19.8 | 27.9 | 24.2 | 1376.0 |
| <i>H.odorata</i>      | 28.0 | 19.7 | 27.9 | 24.4 | 1376.0 |
| <i>D.intricatus</i>   | 28.7 | 19.7 | 27.3 | 24.3 | 1376.0 |
| <i>D.costatus</i>     | 28.8 | 19.6 | 27.3 | 24.3 | 1376.0 |
| <i>D.dyeri</i>        | 28.8 | 19.3 | 27.5 | 24.4 | 1376.0 |
| <i>D.tuberculatus</i> | 28.8 | 19.4 | 27.5 | 24.3 | 1376.0 |
| <i>P.chinensis</i>    | 28.1 | 20.1 | 27.5 | 24.3 | 1376.0 |
| Trung bình            | 28.3 | 19.7 | 27.7 | 24.3 | 1376.0 |



Hình 1. Vị trí nucleotide sai khác của chín loài họ Dầu nghiên cứu.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền giữa chín cặp loài nghiên cứu.

|                          | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9 |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1. <i>H.hongayensis</i>  |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
| 2. <i>H.mollissima</i>   | 0.001 |       |       |       |       |       |       |       |   |
| 3. <i>H.hainanensis</i>  | 0.006 | 0.005 |       |       |       |       |       |       |   |
| 4. <i>H.odorata</i>      | 0.003 | 0.002 | 0.003 |       |       |       |       |       |   |
| 5. <i>D.intricatus</i>   | 0.029 | 0.030 | 0.031 | 0.029 |       |       |       |       |   |
| 6. <i>D.costatus</i>     | 0.028 | 0.029 | 0.030 | 0.028 | 0.002 |       |       |       |   |
| 7. <i>D.dyeri</i>        | 0.026 | 0.025 | 0.026 | 0.024 | 0.007 | 0.006 |       |       |   |
| 8. <i>D.tuberculatus</i> | 0.027 | 0.027 | 0.028 | 0.027 | 0.006 | 0.007 | 0.005 |       |   |
| 9. <i>P.chinensis</i>    | 0.024 | 0.023 | 0.024 | 0.022 | 0.018 | 0.020 | 0.019 | 0.021 |   |



Hình 2. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của chín loài họ Dầu ở Việt Nam (theo phương pháp MP)

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Gen *rbcL* là chỉ thị phân tử hữu hiệu trong phân tích tiến hóa và phân loại. Kết quả nghiên cứu đã xác định được đặc điểm phân tử vùng gen *rbcL* của chín loài họ Dầu ở Việt Nam. Mối quan hệ di truyền của

chín loài họ Dầu ở Việt Nam đã được xây dựng. Kết quả cho thấy các loài thuộc chi *Hopea* và *Parashorea* có quan hệ gần gũi với nhau hơn so với các loài trong chi *Dipterocarpus*. Nghiên cứu cũng cho thấy các loài trong chi *Dipterocarpus* có phân bố khá phức tạp với các mức độ sai khác di truyền khá chênh lệch. Trình tự gen *rbcL* của chín loài họ Dầu ở

Việt Nam đã được công bố trên Genbank. Kết quả của nghiên cứu góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về di truyền cho các loài cây Việt Nam nói chung cũng như cho họ Dầu ở Việt Nam nói riêng.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ từ Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia Việt Nam (Nafosted - mã số 106-NN 06-2013.08), từ đề tài hỗ trợ cán bộ trẻ của Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật (mã số IEBR CBT.TS01/14).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dayanandan S, Ashton PS, Williams SM, Primack RB (1999) Phylogeny of the tropical tree family Dipterocarpaceae based on nucleotide sequences of the chloroplast *rbcl* gene. *Am J Bot* 86(8): 1182-1190.
- Doyle JJ, Doyle DJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15
- Gamage TD, Moley P, Nobuyuki I, Yamazaki T and Alfred E (2006) Comprehensive molecular phylogeny of the sub-family Dipterocarpaceae based on chloroplast DNA sequences. *Genes Genet Syst* 81: 1-12.
- Hasebe M, Omori T, Nakazawa M, Sano T, Kato M and Iwatsuki K (1994) *rbcl* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(12): 5730-5734
- Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, Tachida H, Wickneswari R, Tsumura Y, Yashimaru H, Yamazaki T (1998) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron, and the *trnL-trnF* intergenic spacer region. in chloroplast DNA. *Mol Phylogenet Evol* 10: 202-209.
- Mort ME, Soltis DE, Soltis PS, Francisco J and Santons A (2001) Phylogenetics relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data. *Am J Bot* 88:76-91.
- Nguyễn Hoàng Nghĩa (2005) *Cây họ Dầu Việt Nam*. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Nicholas KB, Nicholas HB, and Deerfield DW II (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Emblnew News* 4:14.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Mol Bio Evol* 28: 2731-2739.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrices choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tsumura Y, Kawahara T, Wickneswari R, and Yoshimura K (1996) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor Appl Genet* 93: 22-29.
- Thalisa Y, Vichitsoonthonkul T, Tanticharoen M (2006) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Thailand using *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* intergenic spacer region in chloroplast DNA. *Pak Jour Biol Sci* 9(4): 649-653.
- Yamazaki T, Suchitra C, Harada K, Clyde MM and Zakri AH (1999) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia. *The Tokyo International Forum on Conservation and Sustainable Use of Tropical Bioresource*, 121-131.
- Yuwa-Amompitak T, Vichitsoonthonkul T, Tanticharoen M, Cheevadhanarak S, Ratchadawong S (2006) Diversity of ectomycorrhizal fungi on Dipterocarpaceae in Thailand. *J Biol Sci* 6: 1059-1064

## MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *rbcl* GENE OF SOME DIPTEROCARP SPECIES IN VIETNAM

Trần Thu Hương, Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Văn Sinh, Nguyễn Thị Phương Trang

Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

### SUMMARY

The *rbcl* chloroplast DNA region has been introduced as a one of best DNA marker for the study on classification and genetic relationships of species and sub-species level. Nine Dipterocarp species in Vietnam including *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb., *Dipterocarpus intricatus* Dyer, *Dipterocarpus costatus*

C.F.Gaertn., *Dipterocarpus dyeri* Pierre, *Parashorea chinensis* Wang Hsie, *Hopea odorata* Roxb., *Hopea mollissima* C.Y.Wu, *Hopea hainanensis* Merr. et Chun, and *Hopea hongayensis* Tardieu (Synonym *Hopea chinensis* Hand.-Mazz.) were analysed based on *rbcL* characteristic sequence. A DNA region of chloroplast *rbcL* gene with 1376bp in length was sequenced using two pair of specific primers. Total 54 different nucleotide positions with 42 parsimony informative positions were found. The average of genetic distance within *Hopea* and *Dipterocarpus* genus are 0,33% and 0,55%, respectively. The average of genetic distance between *Hopea*, *Dipterocarpus* and *Parashorea* genus is 1,9%. Our result showed *Hopea* and *Parashorea* are two difference clades but they have more close relationship than *Dipterocarpus* genus. The *rbcL* sequences of nine *Dipterocarpus* species in Vietnam were submitted on the Genbank with accession numbers are KM267143, KM267144, KM267145, KM267146, KM267147, KM267148, KM267150, KM267151, KM267152 for *Parashorea chinensis* Wang Hsie, *Hopea odorata* Roxb., *Hopea mollissima* C.Y.Wu, *Hopea hongayensis* Tardieu, *Hopea hainanensis* Merr et Chun, *Dipterocarpus tuberculatus* Roxb., *Dipterocarpus intricatus* Dyer, *Dipterocarpus dyeri* Pierre, *Dipterocarpus costatus* C.F.Gaertn., respectively.

**Keywords:** chloroplast DNA, *Dipterocarpaceae*, family *Dipterocarpaceae* in Vietnam, *rbcL*, genetic relationship