

## KẾT QUẢ SỬ DỤNG MỘT SỐ CHUỖI GEN LỤC LẠP TRONG NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ XUẤT XỨ CÂY LÂM NGHIỆP

Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thúy Hạnh, Trần Quốc Trọng

Viện Công nghệ Sinh học

### TÓM TẮT

Các thông tin về mức độ đa dạng và nguồn gốc di truyền (xuất xứ) rất quan trọng cho các chương trình bảo tồn nguồn gen, chọn tạo giống và phát triển các loài cây nói chung và cây lâm nghiệp nói riêng. Việc sử dụng các chỉ thị phân tử, đặc biệt là các chỉ thị DNA trong nghiên cứu đa dạng di truyền đã khắc phục được các hạn chế của các chỉ thị hình thái và enzyme về mặt số lượng các locus được nghiên cứu, tần số biến đổi thấp và chỉ thể hiện ở mức độ protein. Do DNA lục lập (cpDNA) có tính bảo thủ cao, nên các chỉ thị gen lục lập đang được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu tiến hóa, xuất xứ và phát sinh loài. Trong bài này, chúng tôi giới thiệu về kết quả nghiên cứu sử dụng một số chuỗi gen lục lập trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xuất xứ một số loài cây lâm nghiệp, trong đó có một số loài bị đe dọa. Những kết quả nhận được cho thấy: đối với các loài cây họ Dầu thì các cặp mồi *trnD-trnT*, *trnH-trnK* và *psbC-trnS* nhân các chuỗi cpDNA nằm giữa các gen tương ứng là phù hợp hơn cả. Enzyme hạn chế *TaqI* cắt được sản phẩm PCR của nhiều cặp mồi lục lập. Việc sử dụng các cặp mồi lục lập và enzyme phù hợp có thể nhận biết một số loài như cặp mồi *psbC - trnS* và enzyme *HaeIII* có thể nhận biết được loài Dầu nước (*Dipterocarpus costatus* Gaertn), còn với cặp mồi *trnH- trnK* và enzyme *RsaI* có thể nhận biết được loài Dầu mít (*Dipterocarpus alatus* Roxb). Các kết quả nhận được còn cho thấy loài Sao lá hình tim thuộc chi *Hopea* thu từ 3 địa điểm khác nhau đều có cùng nguồn gốc. Đối với cây Tràm, hai cặp mồi *trnH-trnK* và *trnM-rbcL* và hai enzyme *TaqI* và *HinfI* cho mức độ đa hình cao. Các kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng các chỉ thị gen lục lập là công cụ hữu hiệu trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xuất xứ các loài cây lâm nghiệp và việc nghiên cứu sử dụng các chuỗi gen lục lập phù hợp cho từng loài cây là cần thiết.

**Từ khóa:** Các loài cây họ Dầu, cây lâm nghiệp, cây Tràm, chuỗi gen lục lập, đa dạng di truyền, xuất xứ

### MỞ ĐẦU

Rừng là nguồn tài nguyên vô cùng quan trọng đối với mỗi quốc gia. Rừng cung cấp nguồn lâm sản cho con người, điều tiết và bảo vệ nguồn nước, cân bằng không khí, cải tạo đất và là môi trường sống của động thực vật. Trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đang phải đối mặt với nguy cơ giảm thiểu diện tích rừng do khai thác bừa bãi và nạn cháy rừng. Ở Việt Nam, theo thống kê, từ 1943 đến 1995 đã bị mất đi hơn 5 triệu ha rừng tự nhiên. Kéo theo là tính đa dạng sinh học cũng bị giảm. Nhiều loại cây quý hiếm như các loài cây họ Dầu – Dipterocarpaceae (Kim giao, Vên vên, Dầu cát, Sao lá hình tim, ...) và họ Đậu - Leguminosaeae (Gỗ đỏ, Lim xanh, Cẩm lai, Sến mặt...) đã và đang có nguy cơ tuyệt chủng.

Các thông tin về mức độ đa dạng di truyền là yêu cầu quan trọng cho các chương trình bảo tồn, chọn tạo và phát triển các loài cây rừng. Sự biến đổi

di truyền ở các loài được đánh giá bằng các đặc điểm hình thái và đo đếm thực tế hoặc bằng nghiên cứu phân tử trong phòng thí nghiệm. Những nghiên cứu phân tử bước đầu chủ yếu tập chung vào xác định mức độ đa dạng di truyền và các thông số về giao phối với việc sử dụng các enzyme đồng phân (isozyme). Tuy việc sử dụng enzyme đồng phân là đơn giản và ít tốn kém nhưng có một số hạn chế về số lượng locus, mức độ thay đổi thấp ở một số loài, ngoài ra các enzyme đồng phân chỉ cho thấy những thay đổi đối với các gen mã hóa protein. Sự phát triển, các chỉ thị DNA như RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), microsatellite ... đã khắc phục được các nhược điểm trên. Các chỉ thị DNA không hạn chế về số lượng locus là công cụ hữu hiệu để nghiên cứu những thay đổi trong vùng mã hóa, vùng không mã và các vùng có mức thay đổi cao ở hệ gen nhân và gen tế bào chất.

Những thay đổi ở DNA lục lập (cpDNA) đã và

đang được sử dụng cho các nghiên cứu về tiến hóa, sinh thái và phát sinh chủng loài ở thực vật. cpDNA có mức độ bảo thủ trong việc thay thế các nucleotide. Điều này tạo điều kiện cho sự so sánh những thay đổi ở phạm vi rộng trong hệ phân loại thực vật. Một số chi thị cpDNA như microsatellite lục lạp (Provan *et al.*, 1997; Navascues, Emerson, 2005), một số gen như *matK*, *rbcL* (Graham, Olmstead, 2000; Kajita *et al.*, 1998), một số vùng không mã (Kajita *et al.*, 1998), một số phân đoạn của chuỗi đơn lớn (*trnC-trnD*, *trnD-trnT*, *psaA-trnS*, *petB-petD*, *trnH-psbA*, *trnS-trnG*, Magni *et al.*, 2005) và một số vùng đệm giữa các gen (*trnL-trnF*, Kajita *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2004; Plumkett *et al.*, 2004) đã được sử dụng trong các nghiên cứu về đa dạng di truyền và phát sinh loài ở thực vật.

Trong bài này chúng tôi giới thiệu một số kết quả về sử dụng các chuỗi *trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS* và *trnM-rbcL* (các chuỗi nằm giữa các gen tương ứng: *trnH*, và *trnK*, *trnD* và *trnT*, *psbC* và *trnS*, *trnM* và *rbcL*) trong nghiên cứu đa dạng di truyền và xuất xứ của một số loài cây lâm nghiệp ở Việt Nam, trong đó có cả loài bị đe dọa.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các loài cây sử dụng trong nghiên cứu bao gồm 17 loài thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae), đặc biệt là loài Sao lá hình tim (*Hopea cordata* Vidal) thuộc chi *Hopea*, ngoài ra, loài Tràm (*Melaleuca cajuputi* Powel) thuộc họ Sim Myrtaceae cũng được nghiên cứu. Các mẫu cây này do viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp.

### Phân tích phân tử

DNA genome được tách theo phương pháp CTAB của Maroof và đồng tác giả (1984) có cải tiến cho phù hợp với một số cây lâm nghiệp. Cụ thể là đệm chiết CTAB tăng lên 2 hoặc 4%, ngoài ra bổ sung thêm 2% polyvinyl pyrrolidone (PVP) và 5 mM ascorbic acid.

Các chuỗi *trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS* và *trnM-rbcL* được nhân bằng các cặp mồi tương ứng theo Nicolosi và đồng tác giả (2000). Phản ứng PCR với các mồi lục lạp được thực hiện với thể tích 25 µl bao gồm: 50 ng DNA genome, 10 ng mồi lục, 2 mM dNTP, 50 mM MgCl<sub>2</sub> và 0,5 đơn vị *Taq* polymerase. Các phản ứng chạy trên máy PCR PTC-100 (MJ

Research Inc, Mỹ) với chu kỳ nhiệt gồm các bước: 95°C 5 phút, 94°C 1 phút; 55 - 62°C 30 giây; 72°C 1 phút 45 giây; lặp lại 40 chu kỳ từ bước 2 đến bước 4; 72°C 7 phút; và cuối cùng giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được chạy trên gel agarose 1% sau đó nhuộm bằng Ethidium bromide, các phân đoạn DNA được quan sát dưới đèn soi cực tím và chụp ảnh bằng hệ thống chụp ảnh Polaroid GelCam.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả khảo sát trên một số loài cây thuộc họ Dầu

Bốn cặp mồi *trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS* và *trnM-rbcL*, được dùng để nhân các chuỗi cpDNA tương ứng ở 17 loài thuộc 6 chi họ Dầu: chi *Anisoptera* (1 loài), chi *Dipterocarpus* (4 loài), chi *Hopea* (4 loài), chi *Parashorea* (1 loài) chi *Shorea* (3 loài) và chi *Vatica* (4 loài). Với 4 cặp mồi này các chuỗi DNA nằm giữa các gen tương ứng trên chuỗi đơn lớn của cpDNA được nhân với độ dài tương ứng khoảng 1830, 1212, 1610, và 3000 bp (theo tính toán dựa trên trình tự cpDNA của thuốc lá - *Nicotiana tabacum* L.). Kết quả chúng tôi nhận được các phân đoạn lần lượt là: 1750, 1600, 1650, và 2700 bp, tương tự như Nicolosi và đồng tác giả (2004) đã công bố khi sử dụng các cặp mồi này trong nghiên cứu nguồn gốc và phát sinh loài ở các loài *Citrus*. Mỗi mồi đều cho các phân đoạn có độ dài tương tự nhau ở 17 loài họ Dầu nghiên cứu. Như vậy, về độ dài sản phẩm PCR của các mồi lục lạp không cho thấy sự đa hình giữa các loài. Chúng tôi đã sử dụng một số enzyme hạn chế (*TaqI*, *HinfI*, *HaeIII*, *RsaI* và *HhaI*) để cắt các sản phẩm PCR nhận được sau khi nhân bản các vùng cpDNA bằng các mồi tương ứng. Nếu ở các loài có sự khác nhau về trình tự nucleotide sẽ dẫn đến thay đổi vị trí cắt của các enzyme. Bằng phương pháp này có thể nhận được sự đa hình các vùng cpDNA ở các loài nghiên cứu. Phương pháp này đã được nhiều tác giả sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền và phát sinh loài dựa vào các chuỗi cpDNA lục lạp (Mason-Gamer *et al.*, 1995; Nicolosi *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2001, Devos *et al.*, 2003, McMillan, Sun, 2004). Kết quả sau khi cắt bằng 3 enzyme *TaqI*, *HinfI* và *HaeIII*, tổng thể đã cho 344 phân đoạn, trong đó có 234 phân đoạn đa hình (chiếm 68,02%) giữa các loài nghiên cứu (Bảng 1). Tỷ lệ đa hình của các cặp mồi với các enzyme dao động từ 42,86% (*psbC - trnS/HinfI*) đến 91,84% (*trnD- trnT/TaqI*). Các enzyme *RsaI* và *HhaI* cũng cắt sản phẩm của các cặp mồi nhưng không cho đa

hình. Như vậy, với việc sử dụng enzyme hạn chế phù hợp có thể phát hiện sự đa hình ở một số chuỗi cpDNA. Trong 4 cặp mồi và 5 enzyme sử dụng, cặp *trnD-trnT* là cặp phù hợp hơn cả cho việc nghiên cứu các cây họ Dầu. Sản phẩm PCR của cặp mồi này có thể cắt được bằng 3 enzyme *TaqI*, *HinfI* và *HaeIII* và cho tỷ lệ băng đa hình cao (73,17 đến 91,84%). Các mồi còn lại chỉ nhận được đa hình khi cắt với 1

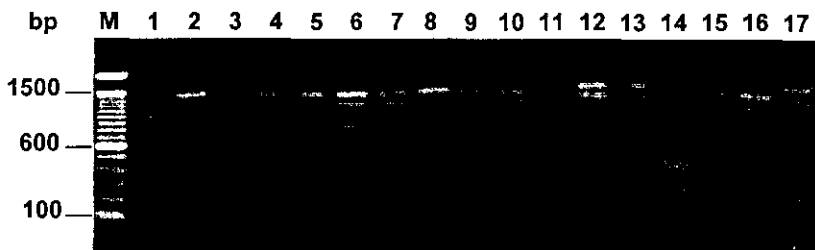
enzyme. Trong các enzyme cho sản phẩm cắt thì *HinfI* có thể cắt sản phẩm của 3 cặp mồi (*trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS*), *TaqI* cắt sản phẩm của 2 cặp mồi *trnD-trnT* và *trnM-rbcL*, hình 1 là sản phẩm PCR DNA genome 17 loài cây họ Dầu với cặp mồi *trnD-trnT* cắt bằng enzyme *TaqI*. Enzyme *HaeIII* chỉ cắt sản phẩm của cặp mồi *trnD-trnT*. Như vậy là enzyme *HinfI* cho hiệu quả hơn cả.

**Bảng 1.** Số phân đoạn nhận được sau khi cắt sản phẩm PCR của 4 cặp mồi lục lạp với DNA genome của 17 loài cây họ Dầu bằng 3 enzyme hạn chế.

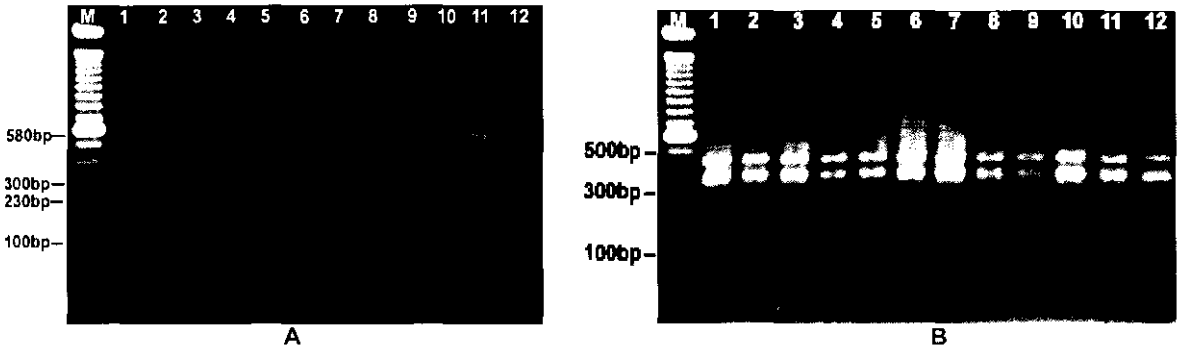
Mồi	Enzyme	Số phân đoạn nhận được	Số phân đoạn đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)
<i>trnD- trnT</i>	<i>HaeIII</i>	50	41	82,00
	<i>TaqI</i>	49	45	91,84
	<i>HinfI</i>	41	30	73,17
<i>trnH - trnK</i>	<i>HinfI</i>	48	38	79,17
<i>trnM - rbcL</i>	<i>TaqI</i>	86	41	47,67
<i>psbC - trn S</i>	<i>HinfI</i>	70	30	42,86
Tổng		344	234	68,02

Kết quả khảo sát 4 cặp mồi *trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS* và *trnM-rbcL* với 12 loài thuộc chi *Dipterocarpus* (thí nghiệm trước chỉ làm trên 4 loài) cũng nhận được các sản phẩm PCR có độ dài tương tự như 17 loài thuộc 6 chi họ Dầu. 5 enzyme *TaqI*, *HinfI*, *HaeIII*, *RsaI* và *HhaI* đều cắt các sản phẩm PCR nhận được, tuy nhiên, tỷ lệ đa hình thấp. Tổng số phân đoạn thu được là 169 trong đó có 44 phân đoạn cho đa hình, chiếm 26%. Điều này phù hợp với thực tế là 12 loài nghiên cứu đều thuộc một chi. Kết quả nhận được cũng cho thấy sự khác biệt giữa một số loài trong cùng chi. Khi dùng enzyme *HaeIII* cắt

sản phẩm PCR của cặp mồi *psbC - trnS* đã nhận được 3 phân đoạn 580, 300 và 250 bp. Trong 12 loài nghiên cứu chỉ có duy nhất loài Dầu nước (*D. alatus Roxb*) - một loài bị đe dọa là không có phân đoạn 300 bp (Hình 2A). Sản phẩm PCR của cặp mồi *trnH-trnK* cắt bằng enzyme *RsaI* cũng cho 3 phân đoạn 450 bp, 350 bp và 280 bp, riêng loài Dầu mít (*D. costatus Gaertn*) không có phân đoạn 280 (Hình 2B). Như vậy, với cặp mồi *psbC - trn S* và enzyme *HaeIII* có thể nhận biết được loài Dầu nước, còn với cặp mồi *trnH- trnK* và enzyme *RsaI* có thể nhận biết được loài Dầu mít.



**Hình 1.** Sản phẩm PCR DNA genome 17 loài cây họ Dầu với cặp mồi *trnD-trnT* cắt bằng enzyme *TaqI*. M: Marker, 1. Vên vên, 2. Dầu nước, 3. Dầu song năng, 4. Đọt tím, 5. Trà beng, 6. Sao lá hình tim, 7. Săng đá, 8. Sao đen, 9. Sao mạng, 10. Trỏ chỉ, 11. Cà chít, 12. Sến mù, 13. Cẩm liên, 14. Tấu mật, 15. Tấu duyên hải, 16. Tấu trắng, 17. Tấu nâu.

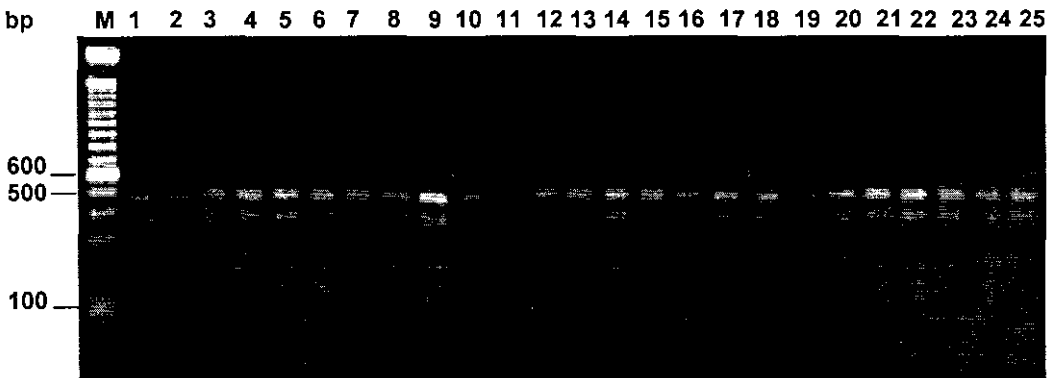


Hình 2. Sản phẩm PCR với 2 cặp mồi *psbC - trnS* cắt bằng enzyme *HaeII* (A) và *trnH- trnK* cắt bằng enzyme *RsaI* (B). M. Marker, 1. Dầu nước, 2. Dầu bao, 3. Dầu cát, 4. Dầu song vàng, 5. Dầu lông, 6. Dầu trà beng, 7. Dầu đồng, 8. Dầu lá bóng, 9. Dầu Haselt, 10. Chò nâu, 11. Dầu đọt tím, 12. Dầu mít.

Trong thí nghiệm với 50 mẫu của loài Sao lá hình tim (*Hopea cordata* Vidal - chi *Hopea*), một loài cây quý hiếm và đang bị đe dọa ở mức rất nguy cấp, 4 cặp mồi *trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS*, và *trnM-rbcL* cũng cho các sản phẩm có kích thước tương ứng là 1750, 1600, 1650 và 2700 bp và cũng không cho đa hình ở cả 50 mẫu được thu từ 3 địa điểm khác nhau. Sau khi cắt các sản phẩm PCR bằng 5 enzyme *TaqI*, *HinfI*, *HaeIII*, *RsaI*, và *HhaI* không nhận được đa hình giữa các mẫu nghiên cứu. Hình 3 là kết quả cắt sản phẩm PCR của cặp mồi *trnD - trnT* bằng enzyme *HaeII* ở một số mẫu cây Sao lá hình tim. Điều này chứng tỏ 50 mẫu Sao lá hình tim có cùng một nguồn gốc.

Những kết quả nhận được từ các thí nghiệm

khảo sát một số chuỗi cpDNA trên một số loài cây họ Dầu cho thấy: các cặp mồi cho sản phẩm PCR ổn định ở các loài cây họ Dầu nghiên cứu; việc dùng enzyme hạn chế cắt các sản phẩm PCR của các cặp mồi có thể nhận được sự đa hình về chuỗi cpDNA ở các loài khác nhau; cặp mồi *trnD- trnT* và enzyme *TaqI* cho tỷ lệ các phân đoạn đa hình cao nhất; và có thể sử dụng các cặp mồi lục lạp và enzyme phù hợp để nhận biết một số loài như cặp mồi *psbC - trnS* và enzyme *HaeIII* có thể nhận biết được loài Dầu nước, còn với cặp mồi *trnH- trnK* và enzyme *RsaI* có thể nhận biết được loài Dầu mít. Các kết quả nhận được còn chỉ ra rằng các mẫu Sao lá hình tim thuộc chi *Hopea* thu từ 3 địa điểm khác nhau đều có cùng nguồn gốc.



Hình 3. Sản phẩm PCR DNA genome của 25 mẫu Sao lá hình tim với cặp mồi *trnD - trnT* cắt bằng enzyme *HaeII*: M: Marker; 1 - 9. Các mẫu thu từ Thủy triều 1, Cam Hải Đông; 10 - 17. Các mẫu thu từ Thủy triều 2, Cam Hải Đông; 18 - 25. Các mẫu thu từ Tân Xá, Cam Hải Tây. Các địa danh này thuộc Cam Ranh, Khánh Hòa.



**Hình 4.** Sản phẩm PCR DNA genome 12 xuất xứ Tràm với cặp mồi *trnH-trnK* cắt bằng enzyme *Hinf*I: M: Marker; 1. Đồng Hới, 2. Huế, 3. Đà Lạt, 4. Vũng Tàu, 5. Phú Quốc, 6. Long An, 7, 8. Quảng Trị, 9. U Minh Thượng, 10. Hà Tĩnh, 11. Đại Lải, 12. Thái Nguyên.

**Kết quả khảo sát trên loài Tràm (họ Sim)**

Trong các thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng 4 cặp mồi, *trnD-trnT*, *psbC-trnS* và *trnM-rbcL* để nghiên cứu 12 xuất xứ của loài Tràm có ở Việt Nam. Kết quả nhận được cho thấy, trong số 4 cặp mồi chỉ có hai cặp *trnH-trnK* (Hình 4) và *trnM-rbcL* cho các phân đoạn cpDNA đa hình sau khi cắt sản phẩm

PCR của các cặp mồi này với hai enzyme *Taq*I và *Hinf*I (Bảng 2). Cặp mồi *trnH-trnK* cho tỷ lệ đa hình rất cao (88,23 - 100%). Như vậy, để nghiên cứu loài Tràm thì việc sử dụng 2 cặp mồi *trnH-trnK*, *trnM-rbcL* và 2 enzyme *Taq*I và *Hinf*I sẽ rất có hiệu quả. Kết quả phân tích bước đầu với 4 chuỗi gen lục lạp cho thấy 12 xuất xứ Tràm của Việt Nam có mức độ đa dạng khá cao.

**Bảng 2.** Số phân đoạn nhận được sau khi cắt sản phẩm PCR của 4 cặp mồi lục lạp với DNA genome của 12 xuất xứ Tràm bằng 2 loại enzyme cắt hạn chế.

Mồi	Enzyme	Số phân đoạn nhận được	Số phân đoạn đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)
<i>trnH-trnK</i>	<i>Taq</i> I	15	15	100
	<i>Hinf</i> I	34	30	88,23
<i>trnD-trnT</i>	<i>Taq</i> I	24	0	0
	<i>Hinf</i> I	36	0	0
<i>psbC-trnS</i>	<i>Taq</i> I	36	0	0
	<i>Hinf</i> I	24	0	0
<i>trnM-rbcL</i>	<i>Taq</i> I	24	0	0
	<i>Hinf</i> I	20	14	70
Tổng		213	59	27,70

**KẾT LUẬN**

Từ những kết quả nhận được về nghiên cứu khảo sát một số chuỗi gen lục lạp trong nghiên cứu đa dạng di truyền và nguồn gốc một số cây lâm nghiệp chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Ở cây họ Dầu, sản phẩm PCR của cặp mồi *trnD-trnT* cắt bằng enzyme *Taq*I cho tỷ lệ đa hình cao nhất; enzyme *Hinf*I có thể cắt sản phẩm PCR của

những cặp mồi hơn cả. Chính vì vậy, cặp mồi *trnD-trnT* và hai enzyme *Taq*I và *Hinf*I phù hợp cho nghiên cứu đa dạng di truyền ở các loài cây họ Dầu.

Sử dụng một số chuỗi gen lục lạp và enzyme giới hạn phù hợp có thể nhận biết được một số loài cây: với cặp mồi *psbC-trnS* và enzyme *Hae*III có thể nhận biết được loài Dầu nước, còn với cặp mồi *trnH-trnK* và enzyme *Rsa*I có thể nhận biết được loài Dầu mít.

Loài Sao lá hình tim thuộc chi *Hopea* thu từ 3 địa điểm khác nhau đều có cùng nguồn gốc.

Đối với loài Trâm, hai cặp mỗi *trnH-trnK* và *trnM-rbcL* và hai enzyme *TaqI* và *HinfI* cho mức độ đa hình cao.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với trợ giúp kinh phí từ đề tài 6.106.06 thuộc Chương trình nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên giai đoạn 2006 - 2008.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Devos N, Tyteca D, Raspe O, Wesselingh RA, Jacquemart AL (2003) Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 243: 85-97.

Graham SW, Olmstead RG (2000) Utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the basal angiosperms. *Am J Bot* 87(11): 1712-1730.

Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, Tachida H, Wicckneswari R, Tsumura Y, Yoshimaru H, Yamazaki T (1998) Molecular phylogeny of Dipetrocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matL*, *trnL* intron, and *trnL-trnF* intergenic spacer regions in chloroplast DNA. *Mol Phylogenet Evol* 10(2): 202-209.

Magni CR, Ducouso A, Caron H, Petit RJ, Kremer A (2005) Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae. *Molecular Ecology* 14: 513-524.

Maroof SMA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1984) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosome location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5466-5470.

Mason-Gamer RJ, Holsinger KE, Jansen RK (1995) Chloroplast DNA haplotype variation within and

among populations of *Coreopsis grandiflora* (Asteraceae). *Mol Biol Evol* 12(3): 371-381.

McMillan E, Sun G (2004) Genetic relationships of tetraploid *Elymus* species and their genomic donor species inferred from polymerase chain reaction-restriction length polymorphism analysis of chloroplast gene regions. *Theor Appl Genet* 108: 535-542.

Mohanty A, Martin JP, Aguinalde I (2001) Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theor Appl Genet* 103: 112-117.

Navascues M, Emerson BC (2005) Chloroplast microsatellites: measure of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology* 14: 1333-1341.

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Mafa SL, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular marker. *Theor Appl Genet* 100: 1155-1166.

Noguchi J, Hong DY, Grant WF (2004) The historical evolutionary development of *Hemerocallis middendorffii* (Hemerocallidaceae) revealed by non-coding regions in chloroplast DNA. *Plant Syst Evol* 247: 1-22.

Pardo C, Cubas P, Tahiri H (2004) Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). *Plant Syst Evol* 244: 93-119.

Plumkett GM, Wen J, Lowry II PP (2004) Intrafamilial classifications and characters in Araliaceae: Insights from the phylogenetic analysis of nuclear (ITS) and plastid (*trnL-trnF*) sequence data. *Plant Syst Evol* 245: 1-39.

Provan J, Corbett G, McNicol JW, Powell W (1997) Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 40: 104-110.

## STUDY OF GENETIC DIVERSITY AND PROVENANCE OF FOREST TREES BY USING CHLOROPLAST GENE SEQUENCE ANALYSIS

Nguyễn Đức Thành\*, Nguyễn Thủy Hạnh, Trần Quốc Trọng

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

The information on level of genetic diversity and origin is very important for the conservation of gene source and varietal production, selection and development of the plant species in general and forest

\* Author for correspondence: Tel./Fax: 84-4-7561662; E-mail: [pcg-ibt@hn.vnn.vn](mailto:pcg-ibt@hn.vnn.vn)

trees in particular. The use of molecular markers, especially, DNA markers in the study of genetic diversity has overcome the limitations of morphology and enzyme markers in term of number of investigated loci, low rate of variation, and the expression at protein level. As chloroplast DNA (cpDNA) is highly conserved, the chloroplast gene markers are widely using in the studies of evolution, origin and phylogeny of plant. In this paper, we present the results on the use of chloroplast gene sequences in the study of genetic diversity and origin of some forest trees, including endangered species. The obtained results showed that, for the Dipterocarp species, primer pairs *trnD-trnT*, *trnH-trnK* and *psbC-trnS* amplified cpDNA sequences between respective genes are the most suitable. Restriction enzyme *TaqI* proved to be the most effective for cutting the PCR products of investigated primer pairs. It's possible to recognize some species by the use of suitable chloroplast primers and restriction enzymes: with primer pairs *psbC-trnS* and enzyme *HaeIII*, the *Dipterocarpus alatus* Roxb can be recognized and the *Dipterocarpus costatus* Gaertn can be recognized by using primer pairs *trnH-trnK* and enzyme *RsaI*. The investigated results also indicated that the *Hopea cordata* collected from three different locations have the same origin. For the *Melaleuca cajuputi*, primer pairs *trnH-trnK* and *trnM-rbcL* and the enzyme *HinfI* gave higher polymorphic level. The results of this study indicated that the chloroplast markers are an effective tool for the study of genetic diversity and origin of forest tree species and the study of the suitable chloroplast sequences for each species are very important.

**Keywords:** Chloroplast gene sequence, Dipterocarp species, forest trees, genetic diversity, *Melaleuca cajuputi* Powel, provenance