

MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ LOÀI DẦU (Dipterocarpaceae) TRÊN CƠ SỞ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÙNG GEN MATK

NGUYỄN MINH ĐỨC

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

NGUYỄN MINH TÂM, DƯƠNG VĂN TĂNG, VŨ ĐÌNH DUY

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Họ Dầu (Dipterocarpaceae) bao gồm 17 chi và khoảng 680 loài chia thành ba phân họ: Dipterocarpoideae gồm 13 chi và khoảng 600 loài ở Châu Á; Pakaraimoideae với một loài duy nhất ở Guianan vùng cao nguyên của Nam Mỹ và Monotoideae với 3 chi và 30 loài ở Châu Phi và Nam Mỹ. Theo Nghĩ (2005), Dipterocarpaceae được tìm thấy ở Việt Nam bao gồm khoảng 42 loài và 6 chi bao gồm: Chi Vên vên *Anisoptera* (1 loài), Dầu *Dipterocarpus* (12 loài), Sao *Hopea* (11 loài), Chò chi *Parashorea* (2 loài), *Shorea* (8 loài) và Táo *Vatica* (8 loài). Hầu hết các loài phân bố giới hạn trong rừng rụng lá thường xanh và hỗn hợp trên đá cổ xưa phù sa, đá granit và đá bazan. Các cây họ Dầu đóng một vai trò quan trọng trong hệ sinh thái và kinh tế của khu rừng đất thấp ở Việt Nam. Gỗ cây thích hợp cho mục đích xây dựng hay làm vỏ tàu thuyền. Nhựa được sử dụng làm sơn, vecni hay sơn mài. Như một hệ quả tất yếu của việc khai thác, phá rừng, môi trường sống tự nhiên của các loài họ Dầu đang bị suy thoái nghiêm trọng. Do đó, việc quản lý và bảo tồn bền vững các loài này là nhiệm vụ cấp bách và cần thiết. Để thiết lập chiến lược bảo tồn và tái trồng rừng có hiệu quả, các mối quan hệ di truyền trong và giữa các loài cần được nghiên cứu một cách chi tiết. Việc xác định các loài Dầu theo phương pháp hình thái không phải là nhiệm vụ dễ dàng tại Việt Nam. Vì vậy, việc sử dụng chỉ thị di truyền để nhận dạng chính xác hơn nữa các loài cây họ Dầu là cần thiết. Đã có một số công trình nghiên cứu cây phát sinh phả hệ của một số loài Dầu trên thế giới trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide một số vùng gen lục lạp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng gen lục lạp (*matK*) để xác định trình tự 11 loài Dầu (Dipterocarpaceae) và cung cấp thông tin bổ sung để nâng cao giá trị bảo tồn để phát triển các loài này tại Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu cây họ Dầu tại các tỉnh Phú Thọ, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bà Rịa-Vũng Tàu và Tây Ninh (bảng 1). Mẫu được ghi số cùng với đặc điểm sinh học của cây lấy mẫu, giữ trong silica gel tại hiện trường, sau đó mẫu được bảo quản ở tủ lạnh sâu -76°C trước khi phân tích DNA tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

Địa điểm thu thập 11 loài dầu ở Việt Nam

TT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Địa điểm thu mẫu
1	<i>Dipterocarpus dyeri</i>	Dầu song nàng	Tân Cừu, Vĩnh Cừu, Đồng Nai 129m, 11°12'N-107°09'E
2	<i>D. alatus</i>	Dầu dái	Cát Tiên, Đồng Nai 130m, 11°25'N-107°17'E
3	<i>D. intricatus</i>	Dầu lông	Tân Cừu, Vĩnh Cừu, Đồng Nai 129m, 11°12'N-107°09'E
4	<i>D. costatus</i>	Dầu mít	Tân Biên, Tây Ninh 10m, 11°21'N-106°02'E
5	<i>D. baudii</i>	Dầu Baudi	Cát Tiên, Đồng Nai 130m, 11°25'N-107°17'E
6	<i>D. obtusifolius</i>	Dầu trà beng	York Đôn, Buôn Đôn, Đắk Lắk 150m, 12°47'N-107°35'E
7	<i>D. retusus</i>	Chò nâu	Hy Cường, Lâm Thao, Phú Thọ 110m, 21°23'N-104°79'E
8	<i>D. tuberculatus</i>	Dầu đồng	York Đôn, Buôn Đôn, Đắk Lắk 180m, 12°49'N-107°32'E
9	<i>D. condorensis</i>	Dầu cát	Bình Châu, Xuyên Mộc, Bà Rịa-Vũng Tàu 100m, 10°28'N-107°35'E
10	<i>Hopea recopei</i>	So chai	Tân Cừu, Vĩnh Cừu, Đồng Nai 129m, 11°12'N-107°09'E
11	<i>Vatica odorata</i>	Táo trắng	Cát Tiên, Đồng Nai 130m, 11°25'N-107°17'E

DNA tổng số được tách từ vỏ cây bằng phương pháp CTAB. Hai cặp mồi *matK* tự thiết kế trên cơ sở vùng gen *matK* của loài *Dipterocarpus palembanicus* trong Genbank (AB295903) có trình tự như sau: *matK3F*: 5'-GGG AAA TTC CAT TTT CCC TAC-3' (mồi xuôi) và *matK3R*: 5'-GGA TGC CCT ACT GCG TTA CA-3' (mồi ngược), *matK5F*: 5'-TTA TAG GGA AAC AAA AAG CAA CGA G-3' và *matK5R*: 5'-CAG ATG GAT GGG ATG AGG TAT TAG-3'. Nhân bản gen *matK* được tiến hành trên máy Gene Amp Systems 9700. Thể tích mỗi phản ứng PCR là 25µl, trong đó chứa các thành phần gồm 12µl H₂O; 2,5µl dung dịch đệm buffer 10X; 2,5µl MgCl₂ 25mm; 2,5µl dNTPs 2,5mm; 1,25µl mồi xuôi (10mm); 1,25µl mồi ngược (10mm); 0,5µl *Taq* polymerase (5 U/µl); 2µl DNA khuôn. Quá trình nhân bản được tiến hành trên máy Gene amp PCR system 9700 theo chu trình nhiệt: (1) Biến tính ban đầu: 95°C trong 3 phút; (2) Biến tính: 94°C trong 30 giây; (3) Bắt cặp: 56°C trong 1 phút; (4) Kéo dài: 72°C trong 1 phút; (5) Lặp lại (2) đến (4) 35 chu kỳ; (6) Phản ứng kết thúc: 72°C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C.

Sản phẩm PCR được tinh sạch dùng Sephadex G50 (Hãng Sigma) và giải trình tự sử dụng kit BigDye terminator v3.1 với cặp mồi *matK3F* và *matK5F* và đọc trình tự bằng máy ABI 3100 Avant genetic analyzer (Applied Biosystems) tại Viện Công nghệ sinh học.

So sánh sự khác nhau về vị trí các nucleotide giữa các cặp loài dùng ClustalW, GenDoc. Phần mềm MEGA5 để phân tích dẫn liệu. Mức độ khác nhau được tính toán theo model hai thông số (K2P).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chiều dài của vùng gen *matK* đã được giải mã từ 1056 đến 1111bp cho 11 loài họ Dầu nghiên cứu. Thành phần GC dao động từ 32,7% cho 2 loài *Dipterocarpus baudii* và *D. alatus*, đến 33,2% cho loài *D. retusus*, trung bình 32,9%. Đối với vị trí codon thứ nhất, thành phần GC dao động từ

34,5% (*Vatica odorata*) đến 37,1% (*D. retusus*), trung bình 35,8%. Tương tự, thành phần GC dao động từ 31,5% (*D. baudii*) đến 33,8% (*Vatica odorata*), trung bình 32,6% đối với vị trí codon thứ 2; GC dao động từ 28,8% (*Hopea recopei*) đến 30,9% (*V. odorata*), trung bình 30,1% đối với vị trí codon thứ 3. Thành phần các base cho mỗi loài Dầu nghiên cứu được trình bày ở bảng 2. Thành phần A dao động từ 29,2% (*D. retusus* và *Vatica odorata*) đến 29,8% (*Hopea recopei*), trung bình 29,5%. Tương tự, thành phần T dao động từ 37,5% (*H. recopei*) đến 37,8% cho 3 loài cùng chi *Dipterocarpus* (*D. baudii*, *D. alatus* và *D. dyeri*), trung bình 37%; C dao động từ 17,7% (*D. baudii*) đến 18,2% (*V. odorata*), trung bình 18% và G dao động từ 14,8% cho 6 loài Dầu, trung bình 14,9%.

Bảng 2

Thành phần base (%) vùng *matK* của 11 loài cây họ Dầu

Loài	T	C	A	G	Tổng cộng
<i>Dipterocarpus alatus</i>	37,8	17,9	29,6	14,8	1062
<i>D. condorensis</i>	37,7	18,1	29,5	14,8	1062
<i>D. baudii</i>	37,8	17,7	29,5	15,0	1132
<i>D. intricatus</i>	37,7	18,0	29,6	14,8	1062
<i>D. dyeri</i>	37,8	18,0	29,4	14,9	1056
<i>D. retusus</i>	37,6	18,1	29,2	15,1	1111
<i>D. coscatus</i>	37,7	18,0	29,6	14,8	1062
<i>D. tuberculatus</i>	37,5	18,1	29,5	14,8	1064
<i>D. obtusifolius</i>	37,6	18,0	29,5	14,9	1064
<i>Hopea recopei</i>	37,5	17,9	29,8	14,9	1068
<i>Vatica odorata</i>	37,7	18,2	29,2	14,8	1064
Trung bình	37,7	18,0	29,5	14,9	1073.4

Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, 1090 vị trí được sử dụng cho phân tích tiến hóa. Trong số 59 vị trí biến đổi (Variable), giá trị mang thông tin (Parsimony informative) chiếm 18 vị trí. Số cặp nucleotide tương đồng trung bình là 1047. Số cặp tương đồng cao nhất là 351, xuất hiện ở vị trí codon thứ hai và thấp nhất là 347 ở vị trí codon thứ ba. Hệ số trung bình của cặp Si (transition) và Sv (transversion) là 1,08. Hệ số này đối với vị trí codon thứ nhất là 1,53, thứ hai và thứ ba là 0,57 và 1,19, tương ứng. Tần số cao xuất hiện ở vị trí codon thứ nhất cho 4 cặp base, T-T, C-C, A-A và G-G là 129, 69, 97 và 55, tương ứng. Tần số này là 125, 68, 112 và 46 tương ứng ở vị trí codon thứ hai và 142, 51, 100 và 53 tương ứng ở vị trí codon thứ ba. Sự khác nhau giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo mô hình Kimura 2P đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài nghiên cứu (bảng 3).

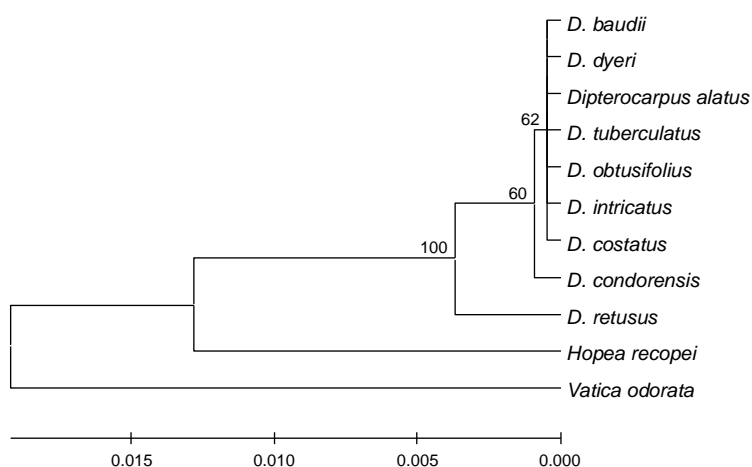
Bảng 3

Hệ số khác nhau giữa các cặp loài Dầu nghiên cứu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>D. condorensis</i>										
<i>D. baudii</i>	0.002									
<i>Dipterocarpus alatus</i>	0.002	0.002								
<i>D. intricatus</i>	0.001	0.001	0.001							
<i>D. dyeri</i>	0.003	0.003	0.003	0.002						
<i>D. retusus</i>	0.007	0.008	0.008	0.007	0.009					
<i>D. coscatus</i>	0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.007				
<i>D. tuberculatus</i>	0.003	0.003	0.003	0.002	0.004	0.009	0.002			
<i>D. obtusifolius</i>	0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.007	0.000	0.002		
<i>Hopea recopei</i>	0.025	0.025	0.025	0.024	0.026	0.031	0.024	0.026	0.024	
<i>Vatica odorata</i>	0.039	0.039	0.039	0.038	0.040	0.041	0.038	0.040	0.038	0.033

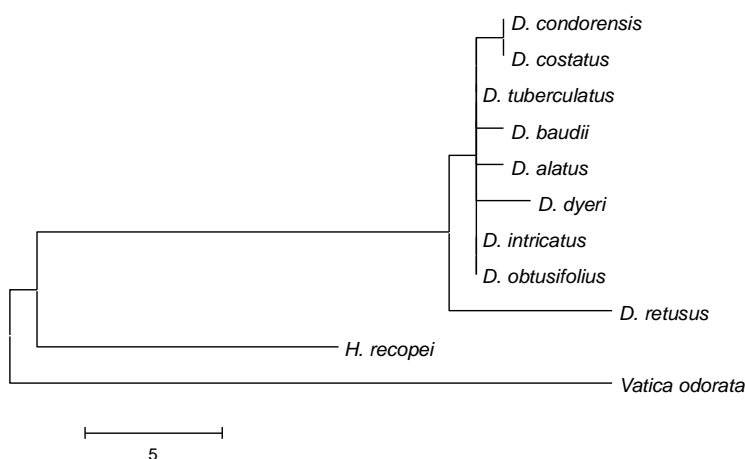
Mức độ sai khác thấp nhất được tìm thấy giữa các cặp loài thuộc cùng một chi được thu thập cùng một vùng nghiên cứu. Chẳng hạn, loài Dầu cát (*Dipterocarpus condorensis*) và Dầu lông (*D. intricatus*) là 0,1%. Hệ số này cũng được tìm thấy ở các cặp loài Dầu lông với các loài Dầu baudi (*D. baudi*), Dầu rái (*D. alatus*) và một số cặp Dầu khác. Tuy nhiên có sự khác nhau có ý nghĩa được tìm thấy trong chi này ở hai vùng địa lý khác nhau, chẳng hạn Chò nâu (*D. retusus*) phân bố ở phía Bắc Việt Nam với các loài ở Đông Nam Bộ như Dầu cát, Dầu rái, Dầu mít với hệ số từ 0,7 đến 0,9%. Sự khác nhau lớn được tìm thấy giữa các chi trong họ Dầu, ví dụ So chai (*H. recopei*) và Dầu cát là 2,5% hoặc Táo trắng (*Vatica odorata*) và Dầu rái có hệ số sai khác là 3,9%. Tuy nhiên, không có sự sai khác được tìm thấy ở một số cặp loài trong chi *Dipterocarpus* như Dầu cát và Dầu mít, Dầu lông và Dầu đồng hoặc Dầu trà beng.

Phân tích mối quan hệ di truyền trên cơ sở dữ liệu *matK* của 11 loài dầu nghiên cứu theo phương pháp NJ (Neighbor-Joining) thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Mối quan hệ di truyền của 11 loài Dầu theo phương pháp NJ

Các loài thuộc chi dầu *Dipterocarpus* có quan hệ mật thiết với nhau, với giá trị bootstrap 100%. Loài Chò nâu (*D. retusus*) được xác định là loài chị em của các loài còn lại trong chi Dầu *Dipterocarpus*.



Hình 2. Mối quan hệ di truyền của 11 loài Dầu theo phương pháp MP

Phân tích trên cơ sở phương pháp Maximum parsimony (MP) đã tìm thấy 130 cây parsimony với kích thước 61 (hình 2). Kết quả phân tích đã chỉ ra chỉ số CI (Consistency Index), RI (Retention Index) tương ứng là 0,9672 và 0,8888. Cây thứ nhất được trình bày ở hình 2. Kết quả về mối quan hệ theo phương pháp này tương tự như phương pháp NJ.

III. KẾT LUẬN

11 loài Dầu (Dipterocarpaceae) thuộc 3 chi *Dipterocarpus*, *Hopea* và *Vatica* ở 4 tỉnh Đông Nam Bộ và Phú Thọ đã được giải mã vùng gen *matK* với kích thước trên 1000bp. Kết quả nghiên cứu chỉ ra mức độ khác nhau thấp được tìm thấy giữa các cặp loài cùng chi *Dipterocarpus*. Các loài cùng chi *Dipterocarpus* đều hình thành một nhánh tiến hóa riêng và có quan hệ gần gũi với nhau. Loài Chò nâu (*D. retusus*) được xác định là loài chị em với các loài khác trong chi *Dipterocarpus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Doyle J. J., Doyle J. L., 1987. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
2. Kajita T., Kamiya K., Nakamura K., Tachida H., Wickneswari R., Tsumara Y., Yashimaru H., Yamazaki T., 1998. Mol. Phy. Evol., 10: 202-209.
3. Kamiya K., Harada K., Tachida H., Aston P. S., 2005. Am. J. Bot., 92 (5): 775-88.
4. Kimuram., 1980. J. Mol. Evol., 16: 111-120.
5. Lee H. L., Jansen R. K., Timothy W., Kim C. K. J., 2007. Moleculrar Bilogy and Evolution, 24 (5): 1161-1180.
6. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G., 1997. Nucl. Aci. Res., 24: 4876-4882.
7. Yuwa-amornpitak T., Vichitsoonthonkul T., Tanticharoenm., 2006. Pakistan J. Biol. Sci., 9 (4): 649-653.

PHYNOGENY OF SOME DIPTEROCARPUS (*Dipterocarpaceae*) USING NUCLEOTIDE SEQUENCES OF MATK

NGUYEN MINH DUC, NGUYEN MINH TAM, DUONG VAN TANG, VU DINH DUY

SUMMARY

We investigated the systematic position of 11 dipterocarp species (Dipterocarpaceae) in provinces: Dong Nai, Dak Lak, Tay Ninh and Phu Tho based on analysis of *matK* region. DNA total was extracted from inbarks. The nucleotide sequence of *matK* was determined with 1056-1111bp, an average of 1073bp and used to analysis of phylogeny of 11 dipterocarp species (eight in *Dipterocarpus* genus, one in *Hopea* and one *Vatica*) using neighbor joining method. The analysis indicated low interspecific divergence among *Dipterocarpus* species, ranging from 0 to 0.9%. The high gene distance was found between *Vatica/Dipterocarpus* or *Hopea/Dipterocarpus*. All *Dipterocarpus* species formed monophyletic clade with bootstrap value of 100%.