

GENETIC VARIATION AND OUTCROSSING RATE OF *Dipterocarpus dyeri* IN THE TAN PHU TROPICAL RAIN FOREST (DONG NAI), VIETNAM

Nguyen Minh Duc¹, Vu Dinh Duy², Dang Phan Hien², Tran Thi Viet Thanh²,
Nguyen Thi Phuong Trang¹, Nguyen Minh Tam^{2,4,*}

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST, Vietnam

²Vietnam National Museum of Nature, VAST, Vietnam

³Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 24 August 2017, accepted 11 February 2019

ABSTRACT

Dipterocarpus dyeri (Dipterocarpaceae) is widely distributed in lowland rainforests in southeastern Vietnam. Due to over-exploitation and habitat destruction in the 1980s and 1990s, this species is listed as threatened. Understanding the genetic variation and mating rate among *D. dyeri* population that occurs in forest patches is necessary to establish effectively conservation strategies for this species. To conserve the species in tropical forests, genetic diversity and mating rate were investigated using eight microsatellites (single sequence repeat, SSR) as markers. All of the eight loci were polymorphic. A total of 36 different alleles were observed across the loci screened. The SSR data indicated high genetic diversity ($N_A = 4.5$; $H_O = 0.542$ and $H_E = 0.667$) and high inbreeding value, $F_{IS} = 0.182$. The mating system parameters were determined using the mixed mating model and the results indicated high outcrossing rate ($t_m = 0.81$ and $t_s = 0.675$) and low selfing rate (0.19). Difference of $t_m - t_s$ value indicated that inbreeding contributed to selfing rate for this species in the Tan Phu tropical rain forest. The results reflected that *D. dyeri* habitat in this area has been restored and the number of individuals was high, about 500 individuals. However, seedlings were not found so far in this study. These results indicated the importance of conserving of the genetic resources of *Dipterocarpus dyeri* species in the Tan Phu rain forest. The conservation strategy should include an establishment of an ex-situ conservation site with new big population for this species from all genetic groups, which might improve its fitness under different environmental stresses.

Keywords: *Dipterocarpus dyeri*, genetic diversity, mating rate, species conservation, SSRs.

Citation: Nguyen Minh Duc, Vu Dinh Duy, Dang Phan Hien, Tran Thi Viet Thanh, Nguyen Thi Phuong Trang, Nguyen Minh Tam, 2019. Genetic variation and outcrossing rate of *Dipterocarpus dyeri* in the Tan Phu tropical rain forest (Dong Nai), Vietnam. *Tap chi Sinh hoc*, 41(1): 83–89. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v41n1.10639>.

*Corresponding author email: ngmtam58@gmail.com

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

ĐA DẠNG DẠNG VÀ THỤ PHẦN CHÉO TRONG QUẦN THỂ DẦU SONG NÀNG (*Dipterocarpus dyeri*) Ở RỪNG NHIỆT ĐỚI TÂN PHÚ (ĐỒNG NAI)

Nguyễn Minh Đức¹, Vũ Đình Duy², Đặng Phan Hiền², Trần Thị Việt Thanh²,
Nguyễn Thị Phương Trang¹, Nguyễn Minh Tâm^{2,3,*}

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

²Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

³Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

Ngày nhận bài 24-8-2017, ngày chấp nhận 11-2-2019

TÓM TẮT

Dầu Song nàng (*Dipterocarpus dyeri*) là loài phân bố rộng ở rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ và Tây Nguyên và đang bị đe dọa ở cả 2 mức độ quốc gia và quốc tế liên quan đến nơi sống bị suy giảm và thu hẹp. Để bảo tồn *D. dyeri*, đánh giá đa dạng di truyền và mức độ thụ phần chéo ở rừng nhiệt đới Tân Phú trên cơ sở phân tích 8 cặp mồi microsatellite từ cây trội và cây con của chúng có ý nghĩa quan trọng và cần thiết. Kết quả phân tích đã chỉ ra mức độ đa dạng di truyền loài dầu Song nàng ở rừng nhiệt đới Tân Phú khá cao. Tất cả 8 locus đều đa hình và số alen trung bình cho mỗi locus là 4,5. Hệ số gen di hợp tử quan sát và kỳ vọng tương ứng là 0,542 và 0,667. Hệ số cận Noon là 0,182. Tương tự, hệ số thụ phần chéo đa locus và trung bình một locus của loài *D. dyeri* ở Tân Phú là khá cao tương ứng 0,81 và 0,675. Mức độ tự thụ phần là 0,19. Các kết quả này phản ánh nơi sống của loài này ở khu vực Tân Phú đã được phục hồi và số lượng cá thể ở khu vực này cũng khá cao, khoảng 500 cá thể. Tuy nhiên, không tìm thấy cây tái sinh của loài này ở khu vực Tân Phú, bảo tồn chuyên vị có vai trò quan trọng để bảo tồn bền vững loài này ở khu vực Tân Phú.

Từ khóa: *Dipterocarpus dyeri*, bảo tồn, dầu Song nàng, đa dạng di truyền, thụ phần chéo, SSRs.

*Địa chỉ liên hệ email: ngmtam58@gmail.com

MỞ ĐẦU

Dầu Song nàng, *Dipterocarpus dyeri*, phân bố ở rừng nhiệt đới Đông Nam Bộ và Tây Nguyên. Dầu song nàng có vùng phân bố khá rộng, bao gồm khu Bảo tồn Thiên nhiên-Văn hóa Đồng Nai, rừng phòng hộ Tân Phú, Vườn Quốc gia Cát Tiên (Đồng Nai), Vườn Quốc gia Bù Gia Mập (Bình Phước), Lò Gò-Xa Mát (Tây Ninh), khu Bảo tồn Thiên nhiên Bình Châu-Phước Bửu (Bà Rịa-Vũng Tàu) và một số tỉnh khác ở Tây Nguyên và đảo Phú Quốc. Loài này đang bị đe dọa ở Việt Nam và đều nằm trong Sách Đỏ thế giới (Ashton, 1998) và Việt Nam (MOST- VAST, 2007) cần phải được bảo vệ (CR A1 cd, B1 +2C).

Rừng phòng hộ Tân Phú, tỉnh Đồng Nai nằm ở 107°20' đến 107°27'30" kinh độ Đông và 11°2'32" đến 11°10' vĩ độ Bắc, với tổng diện tích trên 13.800 ha. Rừng phòng hộ đã được phục hồi sau khai thác gỗ thương mại vào những năm 1980 và 1990, với cấu trúc phân tầng, tầng tán gồm các cây gỗ lớn còn sót lại như các loài thuộc chi Dầu (*Dipterocarpus alatus*, *D. costatus*, *D. dyeri*, *D. intricatus* và *D. turbinatus*, *Hopea odorata*), Bằng lăng ổi (*Lagerstroemia calyculata*), Trường (*Pavieasia annamensis*, *Xerospermum noronhianum*), Vên vên (*Anisoptera costata*) và một số loài khác. Tầng cây gỗ nhỏ gồm có Trâm (*Syzygium* sp.),

Máu chó (*Knema* sp.), Bình linh (*Vitex* sp.). Độ tán che phủ 0,4–0,8. Tầng cây bụi gồm có sâm, cuống vàng, trung quân, cao khoảng 2–4 m. Hiện nay, *Dipterocarpus dyeri*, phân bố tập trung chủ yếu trong một mảnh rừng còn sót lại, hậu quả của quá trình phân cắt và thường bị giới hạn về kích thước. Do đó, việc duy trì tính đa dạng di truyền và môi trường sống của loài dầu song năng được xem xét như là công việc ưu tiên trong hoạt động bảo tồn.

Bảo tồn và quản lý bền vững một loài đòi hỏi các thông tin về sinh thái và di truyền ở cả 2 mức độ quần thể và loài. Thụ phấn chéo cao sẽ làm tăng hệ số gen dị hợp tử trong quần thể và duy trì được khả năng chống chịu được sâu bệnh và biến đổi khí hậu và đảm bảo được sự tồn tại của chúng trong tự nhiên. Trên thế giới đã có một số công trình đề cập đến mức độ thụ phấn chéo ở một số loài dầu và chỉ ra mức độ thụ phấn chéo khá cao đối với một số loài dầu như *Dipterocarpus tempehes* (Kenta et al., 2002), *Shorea congestiflora* và *S. trapezifolia* ở rừng nhiệt đới Srilanka (Murawskiet al., 1994), *D. obtusifolius* ở rừng khộp Thái Lan (Ghazoul, 1997), *Shorea leprosula* (Nagamitsu et al., 2001). Hiện nay, các tư liệu về sinh học sinh thái, đặc biệt đánh giá khả năng thụ phấn chéo giữa các cá thể trong quần thể của *D. dyeri* còn thiếu. Bởi vậy, trong bài báo này chúng tôi phân tích khả năng thụ phấn chéo trong quần thể *D. dyeri* ở rừng nhiệt đới núi thấp Tân Phú, tỉnh Đồng Nai trên cơ sở phân tích 8 cặp mỗi Microsatellite (SSR), góp phần cho các nhà quản lý đưa ra các giải pháp bảo tồn, phục hồi và phát triển bền vững.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Trên cơ sở khoảng cách địa lý, chúng tôi chọn ngẫu nhiên dọc theo tuyến nghiên cứu 8 cây trội dầu Song năng (*Dipterocarpus dyeri*) và được đánh số từ cây trội 1 đến cây trội 8 và được xác định vị trí địa lý và độ cao. Cây trội là cây ở độ tuổi trưởng thành, khỏe mạnh, tán cân đối, không sâu bệnh và có sản phẩm theo mục đích kinh tế. Đối với cây gỗ đòi hỏi yêu cầu sinh trưởng nhanh, đoạn thân dưới cành dài, thân thẳng tròn đều, không xoắn vặn,

cành nhánh nhỏ, góc phân cành lớn. Quả *D. dyeri* của mỗi cây trội được thu thập vào cuối tháng 4 và đầu tháng 5. Thời điểm này quả dầu đã được trưởng thành và bắt đầu rụng xuống mặt đất. Khoảng 30 quả dầu cho mỗi cây trội được thu thập. Quả dầu tròn đầy, nguyên vẹn và không sâu bệnh. Hạt được xử lý bằng thuốc diệt khuẩn trước khi gieo tại vườn ươm Biên Hòa thuộc Trung tâm Lâm nghiệp Biên Hòa (Đồng Nai). Sau 2–3 tháng hạt nảy mầm và phát triển thành cây con. Lá của mỗi cây con được sử dụng để phân tích và đánh giá khả năng thụ phấn chéo trong quần thể *D. dyeri* ở rừng nhiệt đới núi thấp Tân Phú.

DNA tổng số được tách chiết từ lá cây con bằng phương pháp CTAB (Doyle & Doyle, 1990) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Mẫu được nghiền bằng cối sứ có sử dụng nitrogen lỏng. Xác định nồng độ DNA bằng máy quang phổ kế hoặc điện di trên gel agarose 0,8%. Sau khi loại RNA bằng enzyme RNAase, nồng độ DNA được pha loãng đến 10ng/μl. Tám cặp mỗi SSR đã được sử dụng cho đánh giá đa dạng di truyền và khả năng thụ phấn chéo trong quần thể, gồm có Dipt1, Dipt2, Dipt3, Dipt4, Dipt6, Dipt7 (Isagiet al., 2002), Dipt8 (Terauchi, 1994) và Shc7 (Ujino et al., 1998). Phản ứng PCR được tiến hành với thể tích mỗi phản ứng là 25 μl trong đó chứa các thành phần gồm dung dịch đệm 1x PCR; 2,5mMgCl₂; 2mM dNTPs; 0,5 pmol cho mỗi mỗi xuôi hoặc ngược; 50 ng DNA tổng số và 0,5U *Taq* polymerase. Quá trình nhân bản được tiến hành trên máy GeneAmp PCR system 9700 theo chu trình nhiệt sau: (1) Biến tính ban đầu: 94°C trong 3 phút; (2) Biến tính: 94°C trong 1 phút; (3) Bắt cặp: 54–56°C trong 1 phút (tùy thuộc vào mỗi cặp mỗi); (4) Kéo dài: 72°C trong 1 phút; (5) Lặp lại (2) đến (4): 40 chu kỳ; (6) Phản ứng kết thúc hoàn toàn: 72°C trong 10 phút; (7) Giữ sản phẩm ở 4°C cho đến khi điện di. Điện di sản phẩm trên gel Polyacrylamide 8% trong 40 ml dung dịch đệm 1xTAE trên bộ điện di Sequi-Gen (Biorad), nhuộm GelRed™ Nucleotic Acid Gel Stain và chụp ảnh trên máy soi gel BioDocAnalyze (BIOMETRA, Analytik Jane Company). Kích thước alen

được xác định bởi phần mềm Gel-Analyzer GenoSens1850 (Clinx Sci. Instruments Co. Ltd) với thang marker 50 bp DNA (Invitrogen).

Xác định tính đa dạng di truyền quần thể gồm số alen trung bình cho một locus (N_A), hệ số gen dị hợp tử quan sát (H_O) và gen dị hợp tử kỳ vọng (H_E), và hệ số cận noãn (F_{IS}) chúng tôi sử dụng GenALEX (Peakall & Smouse, 2006). Các thông số về thụ phấn, sử dụng phần mềm MLTR (Ritland, 2002) bao gồm hệ số thụ phấn chéo đa locus (t_m , multilocus outcrossing rate), hệ số thụ phấn chéo một locus (t_s , single locus outcrossing rate), hệ số thụ phấn cận noãn cây trội (F), hệ số tự thụ phấn (s) và hệ số tương quan của quan hệ hai thế hệ (r_p).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Với 8 cặp mỗi microsatellite, đã xác định 36 alen khác nhau, với kích thước dao động từ 114 bp đến 286 bp, từ 8 cây non của 8 cây trội *D. dyeri* (cây mẹ) ở Rừng phòng hộ Tân Phú. Không tìm thấy alen lặn ở tất cả các locus SSR. Tám locus nghiên cứu đều cho kết quả đa hình với loài Dầu song nòng. Số alen trung bình 4,5 cho một locus, dao động từ 3 alen ở locus Dipt1 đến 6 alen ở locus Dipt8. Giá trị đa dạng di truyền *D. dyeri* ở rừng phòng hộ Tân Phú ($H_O=0,542$ và $H_E=0,667$). Giá trị H_O và H_E tại mỗi locus được trình bày ở Bảng 1. Như vậy, đa dạng di truyền của *D. dyeri* ở Tân Phú là khá cao so với các loài khác ở Việt Nam, như Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*) với $H_O=0,209$ và $H_E=0,239$ (Nguyen Minh Tam et al., 2014); Sao đen (*Hopea odorata*) với $H_O=0,366$ và $H_E=0,356$ (Nguyen Thi Phuong Trang et al., 2014). Khi so sánh đa dạng di truyền của loài dầu Mít (*D. costatus*) với một số loài dầu khác cũng chỉ ra mức độ di truyền thấp hơn nhiều như loài *Shorea leprosula* ($H_O=0,63-0,66$, $H_E=0,69-0,71$; Ng et al., 2004), *Parashorea malaanonan* ($H_O=0,26$, $H_E=0,46$; Abasolo et al., 2009). Bên cạnh đó, số alen cho một locus (N_A) ở *D. costatus* nghiên cứu cũng thấp hơn nhiều như *S. leprosula* ($N_A=11,0-$

11,4; Ng et al., 2004), *Dryobalanops aromatica* ($N_A=5,1$; Limet et al., 2001). Tuy nhiên, cũng có kết quả di truyền của loài Dầu rái (*Dipterocarpus alatus*) ở Thái Lan thấp hơn ($H_O=0,088$, $H_E=0,092$; Changtragoon, 2001) loài dầu mít. Như vậy, sau những năm 1990, nơi sống dần dần được phục hồi và khai thác gỗ bị cấm có thể giải thích mức độ đa dạng di truyền cao của quần thể cây con ở rừng phòng hộ Tân Phú. Hơn nữa, số lượng cây trưởng thành khá cao cũng góp phần làm giảm khả năng thụ phấn cận noãn, tăng hệ số gen dị hợp tử trong quần thể *D. dyeri* ở nhóm tuổi cây con. Hệ số cận noãn của *D. dyeri* trong rừng phòng hộ Tân Phú là 0,182.

Trên cơ sở phân tích 8 cặp microsatellite ở 88 cây giống từ 8 cây trội đã chỉ ra các thông số thụ phấn chéo của loài Dầu song nòng ở rừng phòng hộ Tân Phú (bảng 2). Kết quả chỉ ra hệ số thụ phấn chéo khá cao ở cả mức độ đa locus và một locus và có ý nghĩa. Giá trị thụ phấn chéo đa locus dao động từ 0,564 ở cây trội số 7 và đến 1,0 ở 2 cây trội số 2 và 5, trung bình 0,81 (mức độ quần thể).

Tương tự, giá trị hệ số thụ phấn ở mức độ một locus dao động từ 0,437 ở cây trội số 7 đến 0,879 ở cây trội số 2, trung bình 0,675. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu thấp hơn không đáng kể so với một số loài khác đã được công bố, *Shorea congestiflora* ($t_m=0,87$; Murawski et al., 1994), *Dryobalanops aromatica* ($t_m=0,82$; Kitamura et al., 1994), *Stemonporus oblongifolius* ($t_m=0,84$; Murawski & Bawa, 1994), *Shorea leprosula* ($t_m=0,84$; Lee et al., 2000). Kết quả đã chỉ ra *D. dyeri* gồm cả 2 hình thức thụ phấn chéo nhờ côn trùng và gió, và tự thụ phấn. Ngoài ra, hệ số tự thụ phấn ở *D. dyeri* ở Tân Phú (s) là 0,19. Hệ số tương quan của quan hệ 2 thế hệ (cha con) là 0,321 và hệ số cận noãn của cây trội (F) ở Tân Phú là 0,012. Kết quả nghiên cứu chỉ ra mức độ khá tương đồng về các thông số sinh sản của *D. dyeri* ở Tân Phú so với các loài dầu khác như *Shorea congestiflora*, *Stemonporus oblongifolius* và *Shorea leprosula*; và loài Dầu song nòng gồm 2 hình thức thụ phấn chéo và tự thụ phấn, trong đó thụ phấn chéo chiếm ưu thế.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi SSR và đa dạng di truyền *D. dyeri* ở Tân Phú

Mồi SSR	Trình tự nucleotide của cặp mồi (5'-3')	Số nucleotide lặp lại	T _m (°C)	Kích thước alen (bp)	N _A	H _O	H _E
Dipt1	F: CTTCCTAAATTC CCCAATGTT R: TAATGGTGTGTGT ACCAGGCAT	(AG) ₁₅	55	193–211	3	0,485	0,624
Dipt2	F: AGTTTTATACATC ACCGCCAA R: GAAGCCCCTAAG AATTAACCTGA	(GA) ₁₇	56	114–142	4	0,523	0,697
Dipt3	F: ACAATGAAACTTG ACCACCCAT R: CAAAAGGACATA CCAGCCTAGC	(GA) ₂₄	56	224–256	4	0,57	0,68
Dipt4	F: TAGGGCATATTGC TTTCTCATC R: CTTATTGCAGTCA TCAAGGGAA	(AG) ₁₅	55	214–256	5	0,512	0,551
Dipt6	F: TGGCAAACAAGCT ACTGTTCAT R: CATGGGTTTAGCA ACCTACACA	(TA) ₈	56	258–286	4	0,552	0,639
Dipt7	F: CAGGAGGGGAAT ATGGAAAA R: AAGTCGTCATCTT TGGATTGC	(AC) ₉	54	120–150	5	0,519	0,713
Dipt8	F: ATGCTTACCACCA ATGTGAATG R: CTCGCAGCAGAA CAACTTTCTA	(GA) ₆	55	170–270	6	0,611	0,689
Shc7	F: ATGTCCATGTTTG AGTG R: CATGGACATAAGT GGAG	(CT) ₈ CA (CT) ₅ CA CCC(CT) CA) ₃ CT (CA) ₁₀	55	170–230	5	0,563	0,739
Trung bình					4,5	0,542	0,667

Ghi chú: N_A: Số alen cho một locus, T_m: Nhiệt độ bắt cặp, H_O: Hệ số gen dị hợp tử quan sát, H_E: Hệ số gen dị hợp tử kỳ vọng.

Bảng 2. Thông số sinh sản của *D. dyeri* ở Tân Phú

Mức độ cá thể:			
Cây trội	Số cây con	Hệ số thụ phấn chéo đa locus (t_m) (SE)	Hệ số thụ phấn chéo một locus (t_s) (SE)
Cây trội 1	11	0,724 (0,087)	0,645 (0,076)
Cây trội 2	12	1,000 (0,005)	0,879 (0,087)
Cây trội 3	8	0,765 (0,104)	0,692 (0,122)
Cây trội 4	14	0,976 (0,026)	0,823 (0,075)
Cây trội 5	12	1,000 (0,001)	0,674 (0,083)
Cây trội 6	9	0,667 (0,121)	0,579 (0,102)
Cây trội 7	10	0,564 (0,036)	0,437 (0,096)
Cây trội 8	12	0,779 (0,018)	0,664 (0,022)
Mức độ quần thể:			
Hệ số thụ phấn đa locus (t_m)		0,810	
Hệ số thụ phấn một locus (t_s)		0,675	
Hệ số tự thụ phấn ($s=1-t_m$)		0,190	
Hệ số tương quan của quan hệ hai thế hệ (cha con) (r_p)		0,321	
Hệ số cận noãn của cây trội (F)		0,012	

Ghi chú: SE: Độ lệch chuẩn.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra loài dầu Song nạng, *Dipterocarpus dyeri*, ở rừng nhiệt đới núi thấp Tân Phú tỉnh Đồng Nai duy trì mức độ đa dạng di truyền cao ($N_A=4,5$, $H_o=0,542$ và $H_E=0,667$) và mức độ thụ phấn chéo chiếm ưu thế ($t_m=0,81$). Tuy nhiên, khả năng tự thụ phấn cũng đã được xác định của loài này là 0,19. Trong môi trường rừng nhiệt đới độ ẩm cao, độ che phủ khá lớn, số lượng cây tái sinh rất ít hoặc hầu như không gặp trong thời gian khảo sát, bảo tồn chuyên vị cho loài cây này cần được tiến hành, trên cơ sở thu thập hạt giống từ những cây trội có hệ số thụ phấn chéo cao ($t_m>0,7$), đảm bảo cây giống khỏe mạnh và có khả năng chống chịu được môi trường sống biến đổi.

Lời cảm ơn: Đề tài được hỗ trợ kinh phí bởi Quỹ Nafosted, mã số 106.06-2017.14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abasolo M. A., Fernando E. S., Borromeo T. H., Hautea D. M., 2009. Cross-species amplification of *Shorea* microsatellite

DNA markers in *Parashorea malaanonan* (Dipterocarpaceae). *Philippine J. Sci.*, 138(1): 23–28.

Ashton P., 1998. *Dipterocarpus dyeri*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T33011A9748202. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T33011A9748202.en>. Accessed 13 February 2017.

Changtragoon S., 2001. Evaluating genetic diversity of *Dipterocarpus alatus* genetic resources in Thailand using isozyme gene markers, In In-situ and Ex-situ conservation of commercial tropical trees (Thielges BA, Sastrapradja SD and Rimbawanto A, eds). Gadjah Mada Univ. Yogyakarta. 349–354.

Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13–15.

Ghazoul J., 1997. The pollination and breeding system of *Dipterocarpus obtusifolius*

- (Dipterocarpaceae) in dry deciduous forests of Thailand. *J. Nat. Hist.*, 31: 901–16.
- Isagi V., Kenta T., Nakashizuka T., 2002. Microsatellite loci for a tropical emergent tree, *Dipterocarpus tempehes* V. S1 (Dipterocarpaceae). *Mol. Ecol. Not.*, 2(1): 12–13.
- Kenta T., Shimizu K., Nakagawa M., Okada K., Hamid A. A., Nakashizuka T., 2002. Multiple factors contribute to outcrossing in a tropical emergent *Dipterocarpus tempehes*, including a new pollen-tube guidance mechanism for self-incompatibility. *Am. J. Bot.*, 89(1): 60–66.
- Kitamura K., Rahman M. Y. B. A., Ochiai Y., Yoshimaru H., 1994. Estimation of the outcrossing rate on *Dryobalanops aromatica* Gaertn. F. In primary and second forests in Brunei, Borneo, southeast Asian. *Plant Spec. Biol.*, 9: 37041.
- Lee S. L., Wickneswari R., Mahari M. C., Zakri A. H., 2000. Mating system parameters in a tropical tree species, *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae) from Malaysian Lowland Dipterop forest. *Biotropica*, 32: 693–702.
- Lim L. S., Wickneswari R., Lee S L., Latiff A., 2001. Genetic structure of natural populations of *Dryobalanops aromatic* Gaertn. F. (Dipterocarpaceae) in Peninsular Malaysia. In In-situ and Ex-situ conservation of commercial tropical trees (Thielges B. A., Sastrapradja S. D. and Rimbawanto A, eds). Gadjah Mada Univ. Yogyakarta. 309–324.
- MOST (Ministry of Science and Technology) and VAST (Vietnam Academy of Science and Technology), 2007. Vietnam red data book, partII. Plants.
- Murawski D., Bawa K. S., 1994. Genetic structure and mating system of *Stemonoporus oblongifolius* (Dipterocarpaceae) in Sri Lanka. *Am. J. Bot.*, 81: 155–157.
- Murawski D. A., Dayanandan B., Bawa K. S., 1994. Outcrossing rates of two endemic *Shorea* species from Sri Lankan tropical rain forests. *Biotropica*, 26(1): 23–29.
- Nagamitsu T., Ichikawa S., Ozawa M., Shimamura R., Kachi N., Tsumura Y., Muhannad N., 2001. Microsatellite analysis of the breeding system and seed dispersal in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). *Int. Plant Sci.*, 163(1): 155–159.
- Ng K. K. S., Lee S. L., Koh C. L., 2004. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Mol. Ecol.*, <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2004.02094.x>
- Nguyen Minh Tam, Vu Dinh Duy, Nguyen Minh Duc, Vu Dinh Giap, Bui T. Tuyet Xuan, 2014. Genetic variation in and spatial structure of natural populations of *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae) determined using single sequence repeat markers. *Genet. Mol. Res.*, 13(3): 5378–5386.
- Nguyen Thi Phuong Trang, Tran Thu Huong, Nguyen Minh Duc, Sierens Tim, Ludwig Triest, 2014. Genetic population of threatened *Hopea odorata* Roxb. In the protected areas of Vietnam. *J. Viet. Env.*, 6(1): 69–76.
- Peakall R., Smouse P. E., 2006. Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 208–295.
- Ritland, K., 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci. *Heredity*, 88: 221–228.
- Terauchi R., 1994. A polymorphic microsatellite marker from the tropical tree *Dryobalanops lanceolata* (Dipterocarpaceae). *Japan J. Genet.*, 69(5): 567–576.
- Ujino T., Kawahara T., Tsumura Y., Nagamitsu T., Yoshimaru H., Ratnam W., 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity*, 81: 422–428.