



DOI:10.22144/ctujos.2024.381

## NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC VÀ MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA GEN CCR Ở MỘT SỐ ĐỒNG KEO LÁ TRÀM (*Acacia auriculiformis*)

Nguyễn Tiến Dũng\*, Dương Văn Đoàn và Trần Thị Thu Hà

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): dungnt@tuaf.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 27/12/2023

Sửa bài (Revised): 20/02/2024

Duyệt đăng (Accepted): 12/03/2024

**Title:** Study on CCR gene structure and expression in some acacia (*Acacia auriculiformis*) clones

**Author(s):** Nguyen Tien Dung\*, Duong Van Doan and Tran Thi Thu Ha

**Affiliation(s):** Thai Nguyen University

### TÓM TẮT

Cinnamoyl-CoA reductase (CCR) là gen chính tham gia tổng hợp lignin và là chỉ thị DNA quan trọng liên quan đến hàm lượng lignin trong cây. Trong nghiên cứu này, cấu trúc và biểu hiện của gen CCR ở 7 dòng keo lá tràm do Viện Khoa học và Lâm nghiệp Việt Nam chọn lọc được đánh giá gồm: Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57. Kết quả nghiên cứu cho thấy gen CCR phân lập từ keo lá tràm Clt có độ tương đồng cao (98,8%) với trình tự gen có mã số HQ317734 công bố trên NCBI. Gen có chiều dài 3.317bp gồm 5 đoạn exon, 4 đoạn intron, mã hóa cho 319 amino axit. So với HQ317734, vùng CDS gen CCR ở dòng Keo Clt có một số vị trí bị mất một hoặc hai nucleotide như vị trí 108, 468, 630, 670, 671, 794, 796. Vị trí 420-423 thay thế ba nucleotide AAA bằng TTT và A thay bằng G ở vị trí 715. Phân tích biểu hiện gen CCR bằng qT-PCR cho thấy mức độ biểu hiện gen CCR ở 7 dòng keo nghiên cứu không có sự khác biệt đáng kể.

**Từ khoá:** *Acacia auriculiformis*, biểu hiện gen, cấu trúc gen, lignin, gen CCR

### ABSTRACT

Cinnamoyl-CoA reductase (CCR) is the main gene involved in lignin synthesis and is a DNA marker related to lignin content in plants. In this study, we evaluated the structure and expression of the CCR gene in 7 *Acacia auriculiformis* clones selected by the Vietnam Academy of Science and Forestry, named as Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 and Clt57. Research results showed that the CCR gene isolated from the Clt has a highly similar sequence (98.8%) to the sequence of HQ317734 published on NCBI. The gene is 3,317bp long, including 5 exons and 4 introns, encoding 319 amino acids. Compared to HQ317734, the CDS region of the CCR\_Clt has some positions that have been deleted one or two nucleotides such as positions 108, 468, 630, 670, 671, 794, 796. Three AAA nucleotides at position 420-423 were substituted by TTT, and A was replaced by G at position 715. Analysis of gene expression by qT-PCR showed that the level of CCR expression was not significantly different from 7 *Acacia* clones.

**Keywords:** *Acacia auriculiformis*, CCR, expression, lignin, structure

## 1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là một trong những quốc gia chế biến và xuất khẩu đồ gỗ hàng đầu thế giới. Hàng năm, ngành gỗ Việt Nam sử dụng một lượng nguyên liệu rất lớn từ nguồn gỗ trồng nội địa, trong đó gỗ keo chiếm tỷ lệ lớn (53%) (Tổng cục Lâm nghiệp, 2021).

Gỗ keo hiện đang được sử dụng làm dăm để sản xuất giấy, bột giấy, làm viên nén, gỗ dán, đồ mộc xây dựng và đặc biệt là để sản xuất các mặt hàng đồ gỗ xuất khẩu. Chính vì vậy, công tác chọn tạo giống keo tốt rất được quan tâm. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu chọn tạo giống keo được tiến hành chủ yếu vẫn bằng các phương pháp chọn lọc từ các dòng nhân giống vô tính hay các dòng nhập nội. Một số nghiên cứu đã ứng dụng chỉ thị phân tử trong một số khâu chọn giống như xác định mối quan hệ di truyền giữa các dòng bằng chỉ thị ISSR (Tuấn, 2011), RAPD (Nguyen et al., 2004), kỹ thuật sóng ứng suất trong đánh giá chất lượng gỗ (Van et al., 2022). Tuy nhiên, những nghiên cứu sâu về chất lượng gỗ ở mức độ phân tử còn rất hạn chế.

Whetten and Sederoff (1995) cho rằng lignin là thành phần chính ảnh hưởng đến chất lượng nguyên liệu gỗ trong ngành công nghiệp giấy. Lignin chiếm 1/4 tổng sinh khối gỗ, đây yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng nguyên liệu và sản phẩm. Piquemal et al. (1998) cho rằng những cây gỗ bị biến đổi về đặc tính lignin, với lượng lignin giảm hoặc có thành phần giàu syringyl dễ chế biến và được ưa chuộng hơn trong sản xuất bột giấy.

Vì vậy, thay đổi về thành phần lignin là một cách tiếp cận quan trọng đối với các chương trình chọn tạo giống cây rừng. Chọn giống truyền thống dựa trên chọn lọc kiểu hình rất tốn kém và mất nhiều thời gian, hơn nữa chỉ có thể được thực hiện trên những cây trưởng thành. Chọn giống dựa trên chỉ thị DNA là công cụ hữu ích để cải thiện hàm lượng và thành phần lignin trong cây. Để phát triển các chỉ dấu DNA liên quan đến hàm lượng lignin, các nhà khoa học đã xác định được gen mã hóa enzyme cinnamoyl-CoA reductase (CCR) có khả năng điều chỉnh hàm lượng và thành phần lignin (Sukganah et al., 2013).

Năm 2015, chín dòng keo lá tràm vô tính bao gồm: Clt18, Clt7, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43, Clt57, Clt98, AA9 đã được đánh giá khảo nghiệm mở rộng tại huyện Cam Lộ tỉnh Quảng Trị cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về sinh trưởng, tính chất cơ học gỗ giữa các dòng keo lá tràm tham gia khảo nghiệm (Son và ctv., 2021). Dựa trên các kết quả công bố, nghiên cứu này tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện

gen CCR ở 7 dòng keo Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57 để làm cơ sở xác định mối tương quan giữa gen CCR và chất lượng gỗ của các dòng keo nghiên cứu.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 7 dòng keo lá tràm *Acacia auriculiformis* ký hiệu Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57 do Viện Khoa học và Lâm nghiệp Việt Nam chọn lọc và đang trồng khảo nghiệm tại huyện Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu mẫu và bảo quản

Bảy dòng keo lá tràm được thu mẫu lá non 2 tuần tuổi tại nơi trồng và bảo quản trong thùng lạnh chuyên dụng. Mẫu được đưa về lưu giữ ở -80°C tại phòng thí nghiệm để phục vụ nghiên cứu.

#### 2.2.2. Tách chiết RNA

RNA tổng số được tách từ lá bằng bộ kit TopPURE® Plant RNA extraction của hãng ABT, Việt Nam. Các bước tiến hành được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### 2.2.3. Tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp bằng bộ kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription của hãng ThermoFisher.

#### 2.2.4. Khuếch đại gen CCR

Gen CCR được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cDNA làm khuôn. Mỗi phản ứng PCR được tiến hành ở thể tích 20 µl bao gồm các thành phần sau: 10µl PCR Master mix 2X, 1,5 µl mỗi CCR\_F1 (5'- CCTCACTCTCCCACTTAGCA-3') và 1,5 µl mỗi CCR\_R (5'- CAGGGCGACTCATTCTTTG-3') (Sukganah et al., 2013), 2 µl cDNA và 6,5 µl nước khử ion. Phản ứng PCR được thực hiện bằng máy luân nhiệt PCR (Mastercycler nexus GX3, Eppendorf) trong 30 chu kỳ theo chu trình nhiệt như sau: 94 °C 1 phút, 56 °C 40 giây, 72 °C 1 phút và kết thúc kéo dài mỗi ở 72 °C 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel Agarose 0,8% sử dụng thang chuẩn 1Kb Plus DNA ladder của hãng Thermo Fisher, hiển thị kết quả bằng máy soi gel UVP GelStudio của hãng Analytik Jena.

#### 2.2.5. Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR gen CCR được tinh sạch và giải trình tự hai chiều theo phương pháp Sanger bởi công ty Apical Science. Trình tự gen và amino axit gen

CCR của dòng keo lá tràm được đối chiếu với trình tự gen CCR công bố trên ngân hàng gen NCBI bằng phần mềm Bioedit và bằng công cụ BLAST.

Cấu trúc protein gen CCR được xây dựng bằng phần mềm Phyre 2.

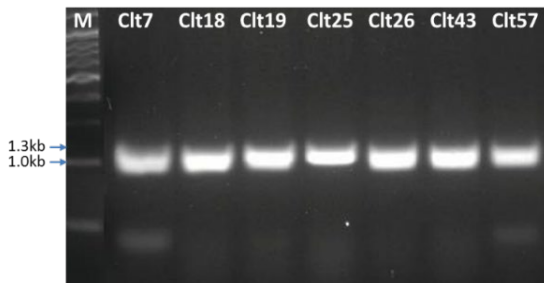
2.2.6. Phân tích định lượng gen CCR

Mức độ biểu hiện gen CCR ở các dòng keo lá tràm Clt được xác định bằng phương pháp phân tích định lượng qRT-PCR sử dụng bộ kit SYBR Green của hãng Bio-Rad, Mỹ. Phản ứng được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thực hiện trên máy real-time PCR ABI 7900 ở điều kiện 95°C/5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm 95°C/15 giây, 60°C/30 giây, 72°C/30 giây, sử dụng cặp mồi CCR\_F2 (5'-ATGTCCAAGGTTGTCTGTGTCA-3') và CCR\_R (5'-AGGGCGACTCATTCTTTG-3') (Sukganah et al., 2013). Phản ứng được thực hiện lặp lại 3 lần. Mức độ biểu hiện gen được phân tích theo phương pháp  $2^{-\Delta\Delta CT}$  của Livak and Schmittgen (2001). Gen Ubiquitin được sử dụng làm đối chứng với trình tự mồi như sau: UbFor: 5'-CACCTGGCTGACTACAACA-3' và UbRev: 5'-TTCTTCTTGCGGCAGTTGAC-3'.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

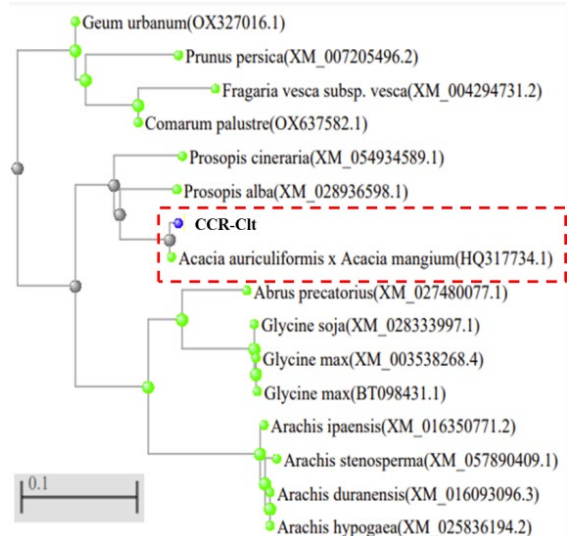
3.1. Kết quả khuếch đại gen CCR

Để khuếch đại gen CCR, cDNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu CCR\_F/CCR\_R. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy tất cả các mẫu đều cho sản phẩm PCR với một băng duy nhất có kích thước khoảng 1,3 kb (Hình 1), tương đương với kích thước lý thuyết chiều dài của vùng cDNA (Hình 3B). Kết quả này cho thấy vùng mã hóa gen CCR ở 7 dòng keo lá tràm Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57 đã được khuếch đại thành công.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen CCR trên gel agarose 0,8%

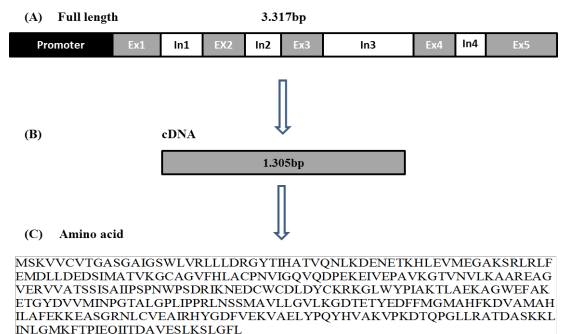
Ghi chú: M: 1kb DNA leader, Clt: các dòng keo lá tràm



Hình 2. Sơ đồ cây thể hiện mối tương đồng di truyền gen CCR giữa keo lá tràm Clt và một số loài khác

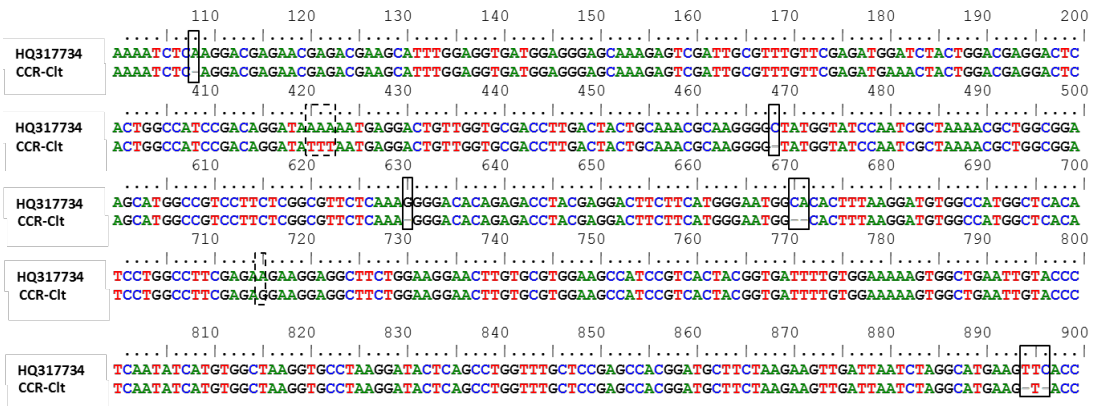
3.2. Trình tự và cấu trúc của gen CCR ở các dòng keo lá tràm

Từ kết quả khuếch đại vùng gen mã hóa, sản phẩm PCR (Clt7) được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự được kiểm tra và đối chiếu với trình tự gen CCR công bố trên ngân hàng gen NCBI cho thấy trình tự gen CCR khuếch đại có độ tương đồng với một số loài khác thuộc chi Arachis, Prosopis, Glycine, Prunus, Acacia,... Trong đó, dòng keo lá tràm Clt có độ tương đồng cao nhất (98,8%) với trình tự gen CCR ở loài keo lai *Acacia auriculiformis x Acacia mangium* đã công bố có mã số HQ317734 trên ngân hàng gen NCBI (Hình 2). Theo đó gen CCR có chiều dài 3.317 bp gồm 5 đoạn exon và 4 đoạn intron (Hình 3A). Bao gồm vùng promoter (903 bp), vùng gen mã hóa (1.305bp) và vùng khung đọc mở (906bp). Gen CCR mã hóa 319 amino axit (Hình 3 và 4).



Hình 3. Cấu trúc gen CCR và trình tự amino axit





**Hình 5. Vị trí sai khác nucleotide trên trình tự gen CCR ở dòng keo lá trà Clt so với trình tự tham chiếu HQ317734 trên ngân hàng gen**

**A**

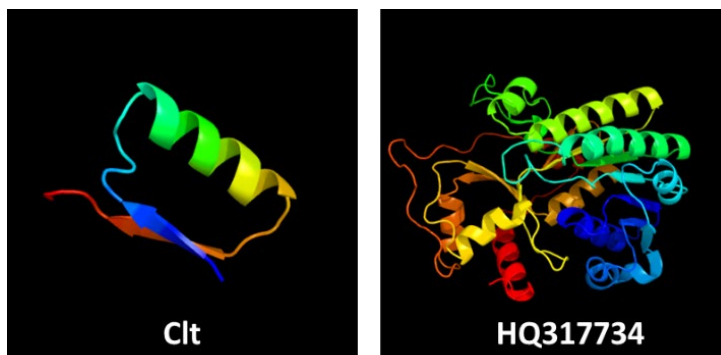
MSKVVCVTGASGAIGSWLVRLLDRGYTIHATVQNLRTTRRSIWREWREQRVDCVCSRTNYWTRTPSWPPARAAP  
 ASSIWRVPTSSVRFKIQRRREWSRRTKGRKTVERQREKQGWKVGWRRRRYRRLFRVPTGHPTGYLMRTVGATLTTA  
 NARGMVSNSRNSNAGGESRVGICEGDRVRRRYDKSRHRLRPSHSAQAQFKHGRPSRRSQRDTEYEDFFMGMLHGCG  
 HGSHPGLREEGGFWKELVRGSHPSLRKFCGKSGSIVSISCGGGAYGYSAWFAPSHGCFLEVDVSRHEVPPLSKSSPML  
 LKVRRAWAF

**B**

HQ317734	MSKVVCVTGASGAIGSWLVRLLDRGYTIHATVQNLKDENETKHLEVMGAKSRLRLFEMDLLDEDSIMATVKGCAGVFH	80
Clt	MSKVVCVTGASGAIGSWLVRLLDRGYTIHATVQNLRTTRRSIWREWREQRVDCVCSRTNYWTRTPSWPPARAAPASSI	80
HQ317734	LACPNVIGQVDPEKEIVEPAVKGTVNVLKAAREAGVERVVATSSISAIIPSNWPSDRIKNECDWCDLDYCKRKLWYWP	160
Clt	WRVPTSSVRFKIQRRREWSRRTKGRKTVERQREKQGWKVGWRRRRYRRLFRVPTGHPTGYLMRTVGATLTTANARGMVSN	160
HQ317734	IAKTLAEK-----AGWEFAKETGYDVVMINPGTALGPLIPPLNLSMAVLLGVLKGDTETYEDFFMGMAHFKDVAMAHIL	235
Clt	RSNAGGESRVGICEGDRVRRRYDKSRHRLRPSHSAQAQFKHGRPSRRS-----QRDTEYEDFFMGMA-LHGCGHGSHP	233
HQ317734	AFEKKEASGRNLCVEAIRHYGDFEIVKVAELYPQYHVAKVPKDTQPGLLRATDASKKLINLGMKFTPIEQIITDAVESLKS	315
Clt	GLREEGGFWKELVRGSHPSLRKFCGKSGSIVSISCGGGAYGYSAWFAPSHGCFLEVDVSRHEVPPPLSKSSPMLLKVRRA	313
HQ317734	LGFL	319
Clt	WAF-	316

**Hình 6. Trình tự amino axit của gen CCR ở dòng keo lá trà Clt**

Ghi chú: (A) và so sánh trình tự amino axit của dòng keo lá trà Clt với trình tự loài keo lai HQ317734. (B) Trình tự đánh dấu thể hiện amino axit tương đồng.



**Hình 7. Cấu trúc 3D chuỗi amino axit của gen CCR ở dòng keo lá trà Clt và keo lai HQ317734 được dự đoán bởi phần mềm Phery 2**



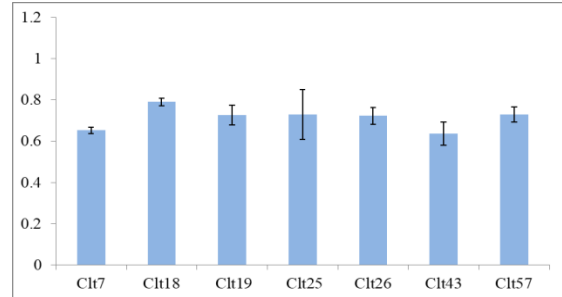
Gen CCR ở dòng keo lá tràm Clt mã hóa cho 316 amino axit có trình tự như trong Hình 6A. So sánh với loài keo lai mã số HQ317734 cho thấy tỷ lệ tương đồng trình tự chuỗi amino axit chỉ đạt 29,38% (Hình 6B). Điều này do sự thay đổi một số nucleotide trên vùng CDS (Hình 5) đã dẫn đến sự thay đổi trình tự amino axit (Hình 6, 7).

**3.3. Biểu hiện của gen CCR ở các dòng keo lá tràm Clt**

Để đánh giá mức độ biểu hiện của gen CCR ở các dòng keo lá tràm, thí nghiệm tiến hành phân tích định lượng bằng phương pháp real time PCR (qRT-PCR). Kết quả phân tích mức độ biểu hiện của gen CCR ở 7 dòng keo Clt7, Clt8, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43, Clt57 được trình bày ở Hình 8.

Mặc dù mức độ biểu hiện gen CCR có sự biến động giữa các dòng keo Clt, tuy nhiên kết quả phân

tích thống kê ANOVA so sánh giữa các dòng keo Clt cho thấy giá trị  $F < F_{crit}$  (Bảng 2). Điều này có nghĩa là mức độ biểu hiện của gen CCR ở 7 dòng keo lá tràm trong nghiên cứu này có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.



**Hình 8. Biểu hiện của gen CCR ở các dòng keo lá tràm nghiên cứu**

**Bảng 2. Kết quả phân tích thống kê ANOVA mức độ biểu hiện của gen CCR ở 7 dòng keo lá tràm Clt**

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,0485619	6	0,0080937	2,4177335	0,0814072	2,847726
Within Groups	0,0468667	14	0,0033476			
Total	0,0954286	20				

Cinnamoyl-CoA Reductases (CCR) là một chất xúc tác quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp monolignols ở thực vật. Hoạt động của CCR lần đầu tiên được báo cáo trong nghiên cứu của Wengenmayer et al. (1976) ở cây đậu tương (*Glycine max*). Mặc dù lignin có vai trò quan trọng với sự sống của thực vật nhưng trong ngành công nghiệp sử dụng sinh khối thì lignin gây ra những khó khăn nhất định. Sự hiện diện của lignin làm giảm khả năng tiêu hoá thức ăn (Fontaine et al., 2003) và cản trở quá trình đường hoá bằng enzyme (Chen & Dixon, 2007; Van Acker et al., 2013). Do đó, trong sản xuất, ta phải tốn chi phí xử lý để làm giảm tính rắn chắc của thành tế bào thực vật đối với các enzyme phân giải xenlulose (Hu & Ragauskas, 2012; Leu et al., 2013).

Keo là cây gỗ cung cấp nguyên liệu chính cho ngành công nghiệp giấy. Tuy nhiên, hàm lượng lignin trong gỗ keo chiếm tỷ lệ lớn trong tổng sinh khối gỗ, đây lại là thành phần không mong muốn trong quá trình chuyển đổi gỗ thành bột giấy và giấy (Whetten & Sederoff, 1995). Hàm lượng và thành phần lignin trong gỗ có ảnh hưởng đến hiệu suất và chất lượng của sản phẩm (Piquemal et al., 1998). Những thay đổi về số lượng hoặc chất lượng lignin là một khía cạnh quan trọng đối với các chương trình chọn tạo giống cây rừng. Nhân giống truyền thống, dựa trên việc đo lường các đặc điểm lignin và chọn

lọc kiểu hình rất tốn kém và chỉ có thể được thực hiện trên những cây trưởng thành. Do đó, chọn lọc dựa trên biến thể DNA có thể là một công cụ hữu ích để cải thiện hàm lượng và thành phần lignin trong cây. Mặt khác, điều khiển quá trình biểu hiện của gen CCR cũng cho hiệu quả cao trong nghiên cứu ở cây thuốc lá chuyển gen (Piquemal et al., 1998; Ralph et al., 1998; O’Connell et al., 2002) và Arabidopsis (Goujon et al., 2003). Cây chuyển gen có biểu hiện gen CCR thấp nhất và lignin giảm 50% so với cây thông thường. Các kết quả này cho thấy hoàn toàn có thể điều khiển mức độ biểu hiện của gen CCR trong cây keo để kiểm soát hàm lượng lignin phù hợp với quá trình sản xuất bột giấy.

Trong nghiên cứu này, gen CCR được phân lập từ cây keo lá tràm có trình tự tương đồng cao (98,8%) với gen CCR (HQ317734) được công bố trên ngân hàng gen NCBI. Một số vị trí bị mất hoặc thay thế nucleotide so với trình tự công bố. Mặc dù, kết quả khảo nghiệm của Sơn và ctv. (2021) cho thấy có sự khác biệt về sinh trưởng của các dòng keo lá tràm Clt7, Clt18, Clt26 có sinh trưởng nhanh và năng suất cao hơn các dòng còn lại nhưng trong phạm vi nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của gen CCR ở 7 dòng keo cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa. Tuy nhiên, để có kết luận chính xác hơn cần tiến hành thêm nghiên cứu biểu hiện gen ở các bộ phận khác như thân, cành và đặc biệt là xác định hàm lượng lignin ở các dòng keo nói trên.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cấu trúc và mức độ biểu hiện của gen CCR ở 7 dòng keo lá tràm Clt7, Clt18, Clt19, Clt25, Clt26, Clt43 và Clt57 cho thấy gen CCR có chiều dài 3.317bp gồm 5 đoạn exon và 4 đoạn intron, có độ tương đồng cao (98,8%) với trình tự gen CCR công bố trên ngân hàng gen NCBI (mã số HQ317734). Mức độ biểu hiện của gen CCR ở lá các dòng keo không có sự khác biệt ý nghĩa. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy có thể dựa trên biểu

hiện của gen CCR để đánh giá chất lượng gỗ thông qua hàm lượng lignin. Mặt khác, đây là cơ sở để tiếp cận cải tiến chất lượng giống keo thông qua kỹ thuật di truyền.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài mã số 106.06-2019.319.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen, F., & Dixon, R. A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat Biotechnol*, 25, 759–761.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1316>
- Fontaine, A. S., Bout, S., Barrière, Y., & Vermerris, W. (2003). Variation in cell wall composition among forage maize (*Zea mays* L.) inbred lines and its impact on digestibility: analysis of neutral detergent fiber composition by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 51, 8080–8087.  
<https://doi.org/10.1021/jf034321g>
- Goujon, T., Ferret, V., Mila, I., Pollet, B., Ruel, K., Burlat, V., Joseleau, J.P., Barriere, Y., Lapierre, C., & Jouanin, L. (2003). Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta*, 217, 218–228.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-003-0987-6>
- Hu, F., & Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenerg Res*, 5, 1043–1066.  
<https://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>
- Leu, S. Y., Zhu, J. Y., Gleisner, R., Sessions, J., & Marrs, G. (2013). Robust enzymatic saccharification of a Douglas-fir forest harvest residue by SPORL. *Biomass Bioenergy*, 59, 393–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.014>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods*, 25(4), 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- O’Connell, A., Holt, K., Piquemal, J., Grima-Pettenati, J., Boudet, A., Pollet, B., Lapierre, C., Petit-Conil, M., Schuch, W., & Halpin, C. (2002). Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res*, 11, 495–503.  
<https://doi.org/10.1023/A:1020362705497>
- Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O’connell, A., Schuch, W., GrimaPettenati, J., & Boudet, A. M. (1998). Down-regulation of cinnamoylCoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J*, 13, 71–83.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00014.x>
- Ralph, J., Hatfield, R.D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C., & Boudet, A.M. (1998). NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignifications enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 12803–12808.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.12803>
- Son, Đ. H., Hà, V. Đ., Kiên, N. Đ., Chinh, N. V., Nhật, H. H., Hiệu, T. V., Quân, D. H., Giang, L. T., & Tùng, Đ. T. (2021). Đánh giá sinh trưởng của các dòng vô tính Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* Cunn. Ex. Benth) trong khảo nghiệm mở rộng tại Cam Lộ, Quảng Trị. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2, 126-130.
- Sukganah, A., Choong, C. Y., Russell, J., Neale, D., & Wickneswari, R. (2013). Nucleotide sequence analysis of two lignin genes in *Acacia auriculiformis* × *Acacia mangium* hybrid for enhancement of wood pulp quality. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 1369-1381. DOI 10.1007/s11295-013-0640-x.
- Tuấn, Đ. V. (2011). Nghiên cứu mối quan hệ di truyền của Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* Cunn. Ex. Benth) ở Đông Nam Bộ bằng chỉ thị RAPD và SSR. *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Công nghệ Lâm nghiệp với phát triển rừng bền vững và biến đổi khí hậu năm 2011*, trang 13-22.
- Tổng cục Lâm nghiệp. (2021). *Báo cáo Nguồn cung gỗ keo nguyên liệu của Việt Nam: Thực trạng và xu hướng*, Hà Nội, 2021, trang 1-7.
- Van Acker, R., Vanholme, R., Storme, V., Mortimer, J. C., Dupree, P., & Boerjan, W. (2013). Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell

- wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels*, 6: 46.
- Van, D. D., Schimleck, L. R., Tran, D. L., & Vo, H. D., (2022). Radial and among-clonal variations of stress-wave velocity, wood density, and mechanical properties in 5-year-old *Acacia auriculiformis* clones. *Bioresources*, 17(2), 2084-2096.
- Wengenmayer, H., Ebel, J., & Grisebach, H. (1976). Enzymic synthesis of lignin precursors: purification and properties of a cinnamoyl-CoA:NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). *Eur J Biochem*, 65, 529–536.
- Whetten, R., & Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 1001–1013.