

**TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÙNG ITS NHÂN VÀ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA 3 LOÀI GỖ QUÝ VIỆT NAM: TRẮC (*DALBERGIA COCHINCHINENSIS*), CẨM LAI (*D. OLIVERI*) VÀ SỪA (*D. TONKINENSIS*)**

**DƯƠNG VĂN TĂNG, NGUYỄN QUỐC BÌNH, ĐINH THỊ PHÒNG**

*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam*

*Dalbergia* là một chi thực vật thuộc họ Đậu (Fabaceae) bao gồm những loài từ cây thân leo đến gỗ lớn với có trên 100 loài, nhiều loài cho gỗ có giá trị kinh tế cao. Việt Nam có 3 loài gỗ quý thuộc chi *Dalbergia* gồm: Trắc (*D. cochinchinensis*), Cẩm lai (*D. oliveri*) và Sừa (*D. tonkinensis*). Các loài này được xếp trong Sách Đỏ Việt Nam 2007, do bị khai thác mạnh mẽ trong những năm gần đây đã đẩy chúng tới nguy cơ tuyệt chủng. Vì vậy việc nghiên cứu để cung cấp thêm các dữ liệu, thông tin cho phân loại học là rất cần thiết, trong đó cấu trúc DNA đóng một vai trò quan trọng.

Trình tự ITS (Internal Transcribed Spacer) được sử dụng phổ biến cho các nghiên cứu phân tử ở thực vật và nấm. Nghiên cứu sử dụng trình tự ITS đã tách được các loài chị em của nhiều nhóm thực vật khác nhau cho thấy vùng gen này hiệu quả cho giám định loài thực vật, do chúng có tốc độ tiến hoá nhanh, mức độ đa dạng cao hơn nhiều lần các vùng ADN lục lạp. Vì vậy, ITS hiện đang được đề xuất như là vùng ADN chuẩn cho giám định thực vật. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên các trình tự ITS của 3 loài gỗ quý hiếm trên ở Việt Nam được xác định, bổ sung cho Ngân hàng gen thế giới và mối quan hệ di truyền của chúng đã được phân tích.

**I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Lá của *D. cochinchinensis*, *D. oliveri* được thu từ Đắc Lắc (VQG York Đôn) và *D. tonkinensis* thu ở Hà Nội. Các loài được nhận dạng theo miêu tả hình thái của Phạm Hoàng Hộ (1991). Tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB của Dolye and Dolye (1987). Nhân bản vùng trình tự đích bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4 của White *et al.*. Chu trình nhiệt PCR: 94°C - 3 phút, 35 chu kỳ ở 94°C - 30 giây, 58°C - 30 giây, 72°C - 1 phút và chu kỳ cuối ở 72°C cho 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp sợi đôi, sử dụng bộ Kít giải trình tự và máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer.

*Bảng 1*

**Loài và mã số Genbank của trình tự ITS được sử dụng xây dựng cây tiến hoá**

TT	Loài	Mã số genbank	TT	Loài	Mã số genbank
1.	<i>Dalbergia miscolobium</i>	EF451070	8.	<i>Dalbergia monetaria</i>	EF451073
2.	<i>Dalbergia acuta</i>	EF451064	9.	<i>Dalbergia nigra</i>	EF451075
3.	<i>Dalbergia cuiabensis</i>	EF451065	10.	<i>Dalbergia brasiliensi</i>	EF451076
4.	<i>Dalbergia elegans</i>	EF451066	11.	<i>Dalbergia decipularis</i>	EF451077
5.	<i>Dalbergia foliolosa</i>	EF451067	12.	<i>Dalbergia frutescens</i>	EF451078
6.	<i>Dalbergia villosa</i>	EF451068	13.	<i>Dalbergia congestiflo</i>	AF068140
7.	<i>Dalbergia ecastaphyll</i>	EF451072	14.	<i>Dalbergia sissoo</i>	EF451079

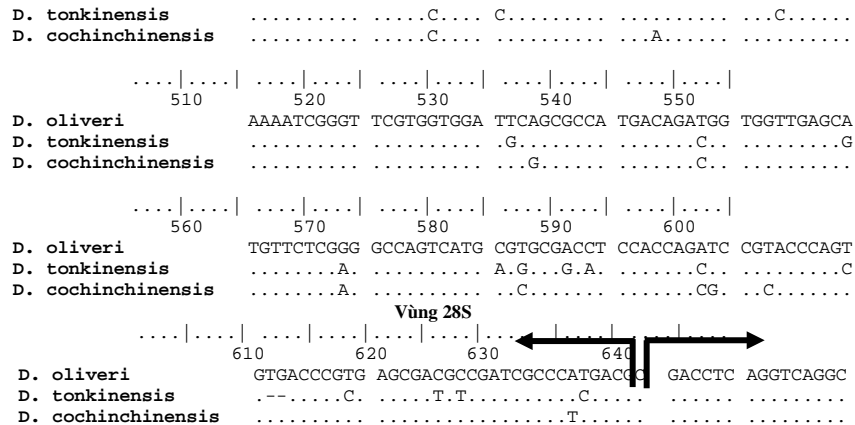
Đối chiếu trình tự xác định được với trình tự tương đồng của loài *Dalbergia congestiflora* (mã hiệu Genbank AF068140) để xác định trình tự đích. Trình tự tương đồng của 14 loài *Dalbergia* khác (Bảng 1) đã được sử dụng để phân tích quan hệ di truyền. Phân tích di truyền

bằng chương trình Clustal W (Bioedit 7.0) và phần mềm Mega 5.0. Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm PAUP\* 4.0 b10 (Swofford 2003) theo hai phương pháp: Maximum Parsimony (MP) và Maximum Likelihood (ML). Các vùng 18S, 28S ở hai đầu và 5.8S ở giữa đã bị loại bỏ trong phân tích, các khoảng trống được xử lý như dữ liệu vắng mặt. Phân tích ML sử dụng mô hình thay thế nucleotide thích hợp nhất được lựa chọn bởi chương trình ModelTest phiên bản 3.7 (Posada and Crandall, 1998). Giá trị bootstrap xác định với số lần nhắc lại mẫu là 1000.

## II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kích thước vùng trình tự ITS thu được với ba loài *Dalbergia oliveri*, *D. tonkinensis*, *D. cochinchinensis* là 614bp, 613bp và 617bp. Các trình tự này đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số: FR854137, FR854142, FR854127

	10	20	30	40	50	
	← 18S →					Vùng ITS1
<i>D. oliveri</i>	AA	GATCATTG	TCGATGCC	CAAATCCAGA	GAGACCCGCG	AACGCGTTTT
<i>D. tonkinensis</i>	.....	.....	.....T	.....	.....	G..A.....C
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	.....	.....A...T	..G-.....	.....	.....
	60	70	80	90	100	
<i>D. oliveri</i>	ACTACGGGGG	ACAGTCAAG	CCGCTCAGCG	GCTCGCCTTC	CCCAAATGTC	
<i>D. tonkinensis</i>	.AC..CC...	..A.....	.T..C....A	.....	..G..A...	
<i>D. cochinchinensis</i>	..C..C....	.....	.....	..C.....	..GG....	
	110	120	130	140	150	
<i>D. oliveri</i>	GGGAACGAGT	CGCGCTCCTG	CGG--TCTCG	TCCCGGCGCA	ATAAC-AACA	
<i>D. tonkinensis</i>	...CG...C	.....-..C.	..CC.....	..A..C...C...	.....	
<i>D. cochinchinensis</i>	...C.....C	..A.....C.	.....	.....	.....	
	160	170	180	190	200	
<i>D. oliveri</i>	AACCCCGGCG	CGGAACGCGC	CAAGGAAGTA	A-CAATCGTA	GGGCGTGCCC	
<i>D. tonkinensis</i>	.....	.....A.....	.....	..-.....C.	..A...C.T..	
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	.....A.....	.....	..A...T.C.	C...C.T..	
	210	220	230	240	250	
<i>D. oliveri</i>	CGTCGACCCG	GCAACGGTGC	TCGTACGGGT	GACGTGCGCAT	CA---CTCGA	
<i>D. tonkinensis</i>	.....G....	..A.....	..C.....C	.....A	-----	
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	..G.....	.....G	.....A	..ACA.....	
	260	270	280	290	300	
	← 5.8S →					
<i>D. oliveri</i>	GTCCAAAACG	ACTCTCGGCA	ACGGATATCT	CGGCTCTTGC	ATCGATGAAG	
<i>D. tonkinensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	
	310	320	330	340	350	
<i>D. oliveri</i>	AACGTAGCGA	AATGCGATAC	TTGGTGTGAA	TTGCAGAATC	CCGTGAACCA	
<i>D. tonkinensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	
	360	370	380	390	400	
<i>D. oliveri</i>	TCGAGTCTTT	GAACGCAAGT	TGCGCCCGAA	GCCATTAGGC	TAAGGGCACG	
<i>D. tonkinensis</i>	.....	.....	.....	.....C.....	C.....	
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	.....	.....	.....	C.....	
	410	420	430	440	450	
	← ITS2 →					
<i>D. oliveri</i>	CCTGCCTGGG	TGTCACCAA	TCGCTGCCCA	ACCCCTGTGC	CCGTGGCCAC	
<i>D. tonkinensis</i>	.....	.....	.....	.....C.....	..TCC.....	
<i>D. cochinchinensis</i>	.....	.....	.....	.....G..C..	..TCA.....	
	460	470	480	490	500	
<i>D. oliveri</i>	GGAGCGGGGC	GAATGTTGGC	TTCCCGTGAG	CACCGCCTCG	CGGTTGGCTG	



Hình 1: Đối chiếu trình tự ITS giữa *D. oliveri*, *D. tonkinensis* và *D. cochinchinensis*

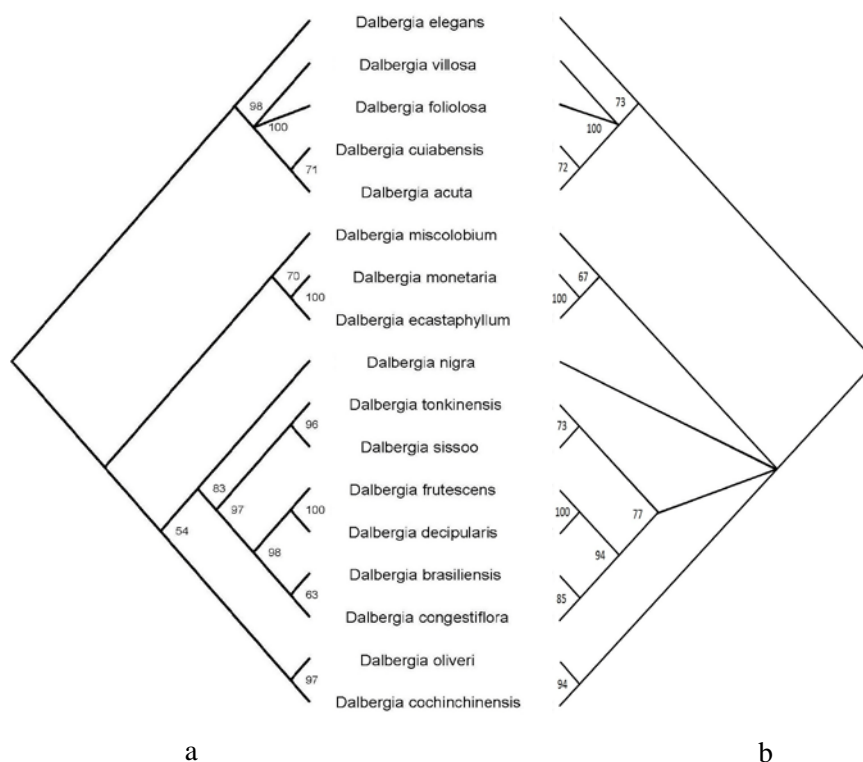
Các tiểu phần của trình tự ITS cũng đã được xác định bao gồm: vùng ITS1 có kích 232bp - 235bp, vùng ITS2 từ 211 - 213bp, vùng 5,8S có kích thước không đổi là 169bp. Có sự biến đổi trình tự cao giữa 3 loài với tổng cộng 71 vị trí nucleotide đa hình trên tổng số 623bp được so sánh, khoảng cách di truyền trung bình giữa các loài là 8,1% (Bảng 2), khoảng cách nhỏ nhất là 6,5% giữa *Dalbergia oliveri* và *D. cochinchinensis* và lớn nhất là 9,3% giữa *D. oliveri* và *D. tonkinensis*. Sự biến đổi nucleotide tập trung chủ yếu trên hai vùng không mã hóa ITS1 và ITS2 với sự khoảng cách di truyền trung bình 13,6% và 10,1%. Vùng 5.8S chỉ có 2 vị trí nucleotide đột biến trên tổng 169bp, chiếm tỷ lệ 0,8%. Đột biến chèn xóa nucleotide ở ITS1 và ITS2 là 5 và 1 tương ứng, không xuất hiện đột biến chèn xóa ở vùng 5,8S.

Bảng 2

Khoảng cách di truyền tính theo trình tự ITS và các tiểu phần của nó  
[1]: *D. oliveri*; [2]: *D. tonkinensis*; [3]: *D. cochinchinensis*

ITS	ITS1	5.8S	ITS2
[1] [2] [3]	[1] [2] [3]	[1] [2] [3]	[1] [2] [3]
[1] -	[1] -	[1] -	[1] -
[2] 0.093 -	[2] 0.159 -	[2] 0.012 -	[2] 0.109 -
[3] 0.065 0.087 -	[3] 0.109 0.140 -	[3] 0.006 0.006 -	[3] 0.077 0.116 -
Khoảng cách di truyền trung bình: 0.081	Khoảng cách di truyền trung bình: 0.136	Khoảng cách di truyền trung bình: 0.008	Khoảng cách di truyền trung bình: 0.101

Cây tiến hoá MP giữa 17 loài *Dalbergia* được xây dựng có chỉ số CI = 0.65, RI = 0.63 và RC = 0.43. Loài *D. oliveri* tạo thành một nhánh cùng *D. cochinchinensis* với giá trị bootstrap cao (94%), *D. tonkinensis* tạo thành một nhánh cùng với *D. sissoo* với giá trị bootstrap là 73%. Hai loài *Dalbergia tonkinensis*, *D. sissoo* cùng nằm trong một nhóm lớn có các loài *D. frutescens*, *D. decipularis*, *D. brasiliensis* và *D. congestiflora*. Cây tiến hóa ML có dạng hình học gần giống với cây MP và mối quan hệ di truyền của 3 loài nghiên cứu không có sự thay đổi. Tuy nhiên sự tạo nhánh giữa loài Sưa (*D. tonkinensis*) với *D. sissoo* và giữa *D. cochinchinensis* với *D. oliveri* có giá trị bootstrap cao hơn (96% và 97%) so với cây MP. Kết quả phân tích này là phù hợp với kết quả đã công bố của Ribeiro *et al.* (2007) [5].



Hình 2: Cây tiến hoá ML (a) và MP (b)

Sự đa dạng cao của vùng ITS hệ gen nhân thực vật đã được chỉ ra từ rất sớm (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996). Các kết quả nghiên cứu của Ribeiro *et al.* trên 3 chi *Aeschynomene*, *Ochopodium* và *Dalbergia* thuộc họ Đậu cũng đã cho thấy khoảng cách di truyền trung bình khá cao giữa các loài trên vùng gen ITS. Vì vậy, vùng trình tự ITS rất hữu ích cho nghiên cứu phát sinh loài. Vùng trình tự ITS có số lượng bản sao lớn trong hệ gen nhân, nên thích hợp cho giám định các mẫu bảo tàng (thường cho hàm lượng ADN thấp). Chúng tôi cũng đã nhân bản thành công bằng kỹ thuật PCR đối với các mẫu như gỗ khô, mở ra triển vọng phát triển phương pháp giám định phân tử cho mẫu gỗ khô.

### III. KẾT LUẬN

Một vùng trình tự đầy đủ ITS thuộc hệ gen nhân của ba loài gỗ quý Trắc (*D. cochinchinensis*), Cẩm lai (*D. oliveri*) và Sưa (*D. tonkinensis*) ở Việt Nam đã được xác định và bổ sung cho Ngân hàng trình tự ADN gen quốc tế. Phân tích quan hệ di truyền sử dụng trình tự ITS cho thấy *D. tonkinensis* có họ hàng gần nhất với *D. sissoo* và nằm trong một nhóm lớn với các loài *D. frutescens*, *D. decipularis*, *D. brasiliensis* và *D. congestiflora*. Loài *D. cochinchinensis* họ hàng gần nhất với *D. oliveri*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alvarez I., J.F. Wendel, 2003: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434.
2. Baldwin B.G., 1992: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1): 3-16.
3. Bộ KH&CN, Viện KHCNVN, 2007: *Danh lục đỏ Việt Nam*. NXB. KHTN&CN, Hà Nội.

4. **Lê Trần Bình, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Quang Huấn**, 2003: Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu tài nguyên sinh vật Việt Nam. NXB. KH&KT, Hà Nội.
5. **Ribeiro R.A., M. Lavin, J.P. Lemos-Filho, C.V. Mendonc, F.R.D. Santos, M.B. Lovato**, 2007: *Systematic Botany*, 32(4): 762-771.
6. **White T.J., T. Burns, S. Lee, J. Taylor**, 1990: *In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic, San Diego, 315-322.

*Lời cảm ơn:* Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài “Nghiên cứu mối quan hệ di truyền một số loài cây gỗ quý thuộc chi Trắc (*Dalbergia*) bị đe dọa tuyệt chủng bằng chỉ thị phân tử”. Chúng tôi xin bày tỏ lời cảm ơn Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam và Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này.

**THE NUCLEAR ITS NUCLEOTIDE SEQUENCES AND PHYLOGENETIC  
RELATIONSHIP OF THREE VALUABLE WOOD SPECIES IN VIETNAM:  
*DALBERGIA COCHINCHINENSIS*, *D. OLIVERI* AND *D. TONKINENSIS***

**DUONG VAN TANG, NGUYEN QUOC BINH, DINH THI PHONG**

SUMMARY

The nuclear ITS region DNA sequences of three species *Dalbergia oliveri*, *D. tonkinensis* and *D. cochinchinensis* were determined with full length 614bp, 613bp and 617bp respectively. Comparing the sequences showed 71 variable sites with seven nucleotide insert and deletion mutations. The level of genetic diversity in the ITS region between three species is high with average genetic distance is 8.1%. Mutations occurred mostly on the ITS1 and ITS2. MP and ML evolutionary tree of the three studied-species and 14 other species belonging to genus *Dalbergia* was built which indicated that species *D. cochinchinensis* and *D. oliveri* have close relatives with each other and distant one with *D. tonkinensis*. Species *D. tonkinensis* is closely related to species *D. sissoo*.