

**ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA LOÀI SƠN ĐÀO
(*MELANORRHOEA USITATA* WALL.) Ở VIỆT NAM
TRÊN CƠ SỞ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN TRNL VÀ RBCL**

**Nguyễn Xuân Quyền^{1,2}, Trần Thị Phương Anh^{2,3}, Nguyễn Thế Cường^{2,4},
Nguyễn Thị Phương Trang^{2,4}, Nguyễn Thị Hồng Mai^{2,4}, Hoàng Lê Tuấn Anh⁵**

¹*Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an*

²*Học viện Khoa học và Công nghệ,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

⁵*Viện Nghiên cứu khoa học Miền Trung,*

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

Sơn đào (*Melanorrhoea usitata* Wall.) thuộc họ Xoài (Anacardiaceae R. Br.) là loài phân bố hẹp, có giá trị về mặt khoa học, kinh tế và y học do có gỗ tốt và dùng làm thuốc. Tuy nhiên, hiện nay loài này đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng do mức độ suy giảm nơi sống và khai thác quá mức, được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam, 2007 ở phân hạng Sẽ nguy cấp - VU. Mặc dù vậy, cho đến nay chưa có bất kỳ công trình nào nghiên cứu riêng về loài này ở Việt Nam.

TrnL và rbcL là 2 trong số 7 vùng gen lục lạp được thế giới khuyến dùng cho việc định danh và nghiên cứu mối quan hệ tiến hoá. (CBOL Plant working group, 2009).

Để giúp định danh một cách chính xác mẫu thu được cũng như góp phần tạo lập cơ sở dữ liệu di truyền cho việc quản lý các loài quý hiếm, đang bị đe dọa của Việt Nam, chúng tôi tiến hành giải mã trình tự gen *rbcL*; *trnL* của loài Sơn đào.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu lá và hoa loài Sơn đào mang số hiệu HNNY_1180, được N.X.Quyền và N.T.Cường thu ngày 18/5/2016, tại Vườn Quốc gia (VQG) Bạch Mã, xã Lộc Trì, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế toạ độ: N: 16^o 08' 31.8" E: 107^o 47' 39.2" ở độ cao 128m. Mẫu được lưu tại Phòng tiêu bản thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KHCNVN.

Tách chiết ADN tổng số: Mẫu được nghiền trong nitrogen lỏng (-196°C) thành dạng bột mịn, lấy 100mg bột để tách ADN tổng số sử dụng kit tách Dneasy plant mini kit (Qiagen, Đức).

Nhân bản ADN: Vùng gen *rbcL* dài 700 bp và vùng gen *trnL* dài khoảng 1000bp được khuếch đại bằng cặp mồi Universal. Trình tự mồi dùng nhân bản gen *rbcL* như sau: mồi xuôi F: 5'- ATGTCACCACAAACAGAGACTAA - 3', mồi ngược R: 5'-TTCGGCACAAAATACGA AACGATCTCTCCA -3'. Trình tự mồi cho nhân bản gen *trnL*: mồi xuôi F: 5'- CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG -3'; mồi ngược R: ATT TGA AAC TGG TGA CAC GAG -3'. (CBOL Plant working group, 2009).

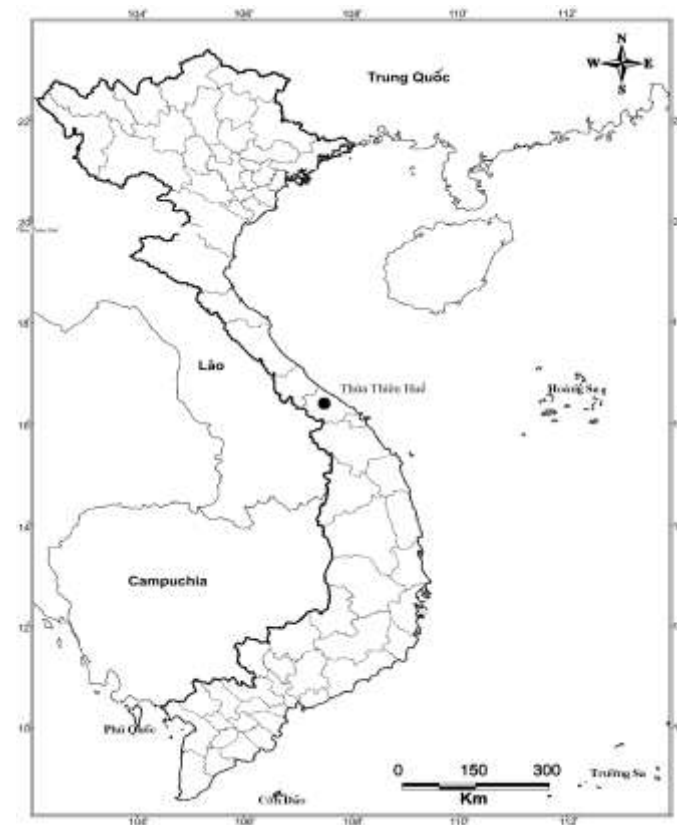
Thành phần hỗn hợp PCR 25 µl gồm: 12,5 µl PCR Master Mix 2X Promega, Hoa Kỳ); 1 µl mồi xuôi (10 pmol); 1 µl mồi ngược (10 pmol); 1 µl ADN (50 ng/ µl); 9,5 µl H₂O khử ion. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút; 30 chu kỳ (94°C trong 1 phút; 54°C trong 1 phút; 72°C trong 1 phút), 72°C trong 7 phút; bảo quản mẫu ở 4°C.

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng Kit Qiaquick gel extraction (Qiagen, Đức);

Giải trình tự bằng kit BigDye terminator v3.1, đọc trình tự bằng máy ABI 3100 Avant genetic analyzer (Applied Biosystems).



Hình 1: Ảnh chụp cành và hoa của Sơn đào (*Melanorrhoea usitata* Wall.)



Hình 2: Vị trí thu mẫu Sơn đào tại VQG Bạch Mã (Thừa Thiên - Huế)

Xác định loài bằng công cụ BLAST

Kết quả giải trình tự sợi đôi ADN nhận được sẽ được đối chiếu với nhau để tạo ra một trình tự duy nhất bằng phần mềm Chromas Pro. Trình tự thu được đã đối chiếu với các trình tự tương đồng trong cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen (GenBank) bằng công cụ BLAST (Altschul et al. 1990), để bước đầu định danh đến mức độ loài của mẫu nghiên cứu. Những trình tự nào có điểm số tương đồng cao hơn sẽ có mức độ giống nhau cao hơn, tạo cơ sở để đưa ra kết quả giám định loài cho các mẫu vật nghiên cứu.

Phân tích số liệu: Đặc điểm đoạn ADN được phân tích bằng phần mềm Mega 6.0.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc điểm loài Sơn đào *Melanorrhoea usitata* Wall.

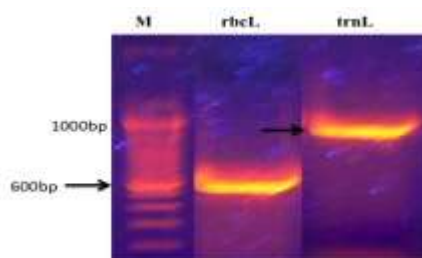
Cây gỗ nhỏ, cao khoảng 13-15 m. Lá đơn nguyên, mọc cách; phiến lá hình thuôn hay hình mác ngược, cỡ 20-30 x 7-12 cm, lúc non có lông dày ở cả 2 mặt; cuống lá dài 2-4 cm, có lông. Cụm hoa chùy, ở nách lá và đầu cành. Cánh hoa hình mác, dài 6-12 cm, có lông ở cả 2 mặt. Nhị nhiều (30 - 75 chiếc). Đế hoa hình bán cầu, nhẵn. Bầu dính trên một cuống dài 3 mm, có lông; vòi nhẵn. Quả hạch hình cầu, dẹt ở 2 đầu, nhẵn; gốc có cánh hoa đồng trường thành cánh quả xoè ra, khoảng 2 lần dài hơn quả.

Phân bố: Loài có phân bố ở Việt Nam, Lào, Campuchia, Thái Lan, Myanmar. Ở Việt Nam Sơn đào tìm thấy ở Chư Prông, Mang Yang, Đắc Đoa, Ayunpa, Pờ Tó (Gia Lai), và VQG Bạch Mã - Thừa Thiên - Huế. Sơn đào được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam (2007) ở phân hạng Sẽ nguy cấp – VU B1+2,a,b,c,d,e.

Công dụng: Gỗ Sơn đào màu nâu đỏ, dùng trong xây dựng. Nhựa màu trắng, có thể dùng làm sơn, chế vec ni, làm thuốc chữa bệnh ngoài da, bệnh giun sán. Quả độc đáo thường dùng để giáo dục các em nhỏ tìm hiểu về thiên nhiên.

2. Kết quả nhân bản vùng gen *rbcL* và vùng gen *trnL*

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel Agarose 1% cho thấy nhìn rõ 2 băng ADN kích thước 600 bp và 1000bp tương ứng với kích thước vùng gen *rbcL* và *trnL* (hình 2).



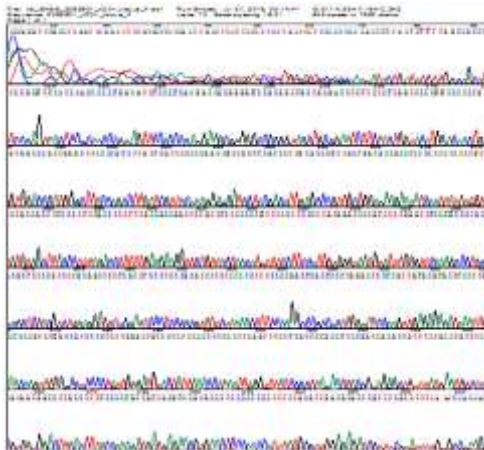
Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel Agarose 1%

3. Kết quả giải trình tự và phân tích trình tự gen

Đoạn gen *rbcL* sau khi tu chỉnh có kích thước 570 bp, mã hoá cho 150 acid amin. Tỷ lệ Guanine chiếm 24,3%, Thymine chiếm 26,5%, Adenine chiếm 25,5% và Cytosine chiếm 23,7%, không có nucleotide nào có ý nghĩa Pasimony. Đoạn gen *trnL* sau tu chỉnh dài 967 bp, mã hoá cho 322 acid amin, tỷ lệ Nucleotide Guanine chiếm 28%, Thymine chiếm 36,6%, Adenine chiếm 20,3% và Cytosine chiếm 15,1% .

Trình tự các đoạn gen *rbcL* và *trnL* của Sơn đào (*Melanorrhoea usitata*) đã được đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số tương ứng là KY202641 và KY067416.

Kết quả tìm kiếm và so sánh trình tự nghiên cứu thu được với các trình tự tương đồng trên ngân hàng genbank bằng công cụ Blast cho thấy 2 đoạn ADN thu được từ mẫu nghiên cứu thuộc vùng gen *rbcL* và *trnL*. Độ tương đồng (query cover) cao nhất của vùng gen *rbcL* là với loài *Gluta malayana* (họ Xoài) với 97%. Điểm số query cover cao nhất của vùng gen *trnL* là với loài *Gluta tourtour* với 99%.



Hình 3. Hình ảnh các peak trong giải trình tự gen *rbcL* của loài Sơn đào



Hình 4. Hình ảnh các peak trong giải trình tự vùng gen *trnL* loài Sơn đào

4. Thảo luận

Họ Xoài (Anacardiaceae R. Br.) trên thế giới có 70 chi khoảng 600 loài, ở Việt Nam có khoảng 70 loài. Các nghiên cứu về phân tử cho họ Xoài trên thế giới mới chỉ chủ yếu tập trung vào các chi *Pistacia*, *Toxicodendron*, *Mangifera*, *Rhus*, *Semecarpus*, *Dracontomelon* và *Gluta* (Wannan, 2006). Hầu như chưa có nghiên cứu về phân tử nào cho chi *Melanochyla* và loài *Melanorrhoea usitata* Wall.. B.S Wannan (2006) đã sử dụng vùng gen *rbcL* để đánh giá mối quan hệ di truyền của nhiều chi thuộc họ Xoài nhưng lại không có số liệu của chi *Melanochyla*. Chúng tôi đã so sánh vùng gen *rbcL* của loài Sơn đào (*Melanorrhoea usitata*) của Việt Nam với 03 loài thuộc họ Xoài khác có dữ liệu trên Genbank gồm *Gluta laccifera*, *Gluta wallichii*, *Gluta malayana*. Kết quả cho thấy Sơn đào (*Melanorrhoea usitata*) của Việt Nam khá gần gũi với chi *Gluta* với chỉ số khoảng cách di truyền là 0,007. So sánh dựa trên trình tự vùng gen *trnL* thì loài Sơn đào của Việt Nam có quan hệ gần gũi với loài *Gluta tourtour* với mức độ tương đồng di truyền là 99%. Tuy nhiên số liệu này chưa chính xác bởi ở đây chỉ so sánh với 03 loài thuộc chi *Gluta* mà không có số liệu của các loài thuộc chi khác để so sánh. Tuy vậy nhận định ban đầu cũng có thể cho thấy chi *Melanochyla* có quan hệ gần gũi với chi *Gluta*.

III. KẾT LUẬN

Trình tự 2 đoạn gen *rbcL* và *trnL* với kích thước lần lượt là 600bp và 1000bp của loài Sơn đào (*Melanorrhoea usitata*) ở Việt Nam đã được giải trình tự và được đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số tương ứng là KY202641 và KY067416. Có thể đưa các trình tự này vào cơ sở dữ liệu các loài cây quý của Việt Nam để nhận biết và so sánh với các loài khác trên thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J.**, 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403–410.
2. **Wannan B. S.**, 2006. Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. *Blume* 51 (165-195).
3. **Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam**, 2007. Sách Đỏ Việt Nam - Phần II. Thực vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 38-39.
4. **CBOL Plant working group**, 2009. ADN barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 12794-12797.

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *MELANORRHOEA USITATA* WALL IN VIETNAM BASED ON TRNL AND RBCL SEQUENCES

Nguyen Xuan Quyen, Tran Thi Phuong Anh, Nguyen The Cuong,
Nguyen Thi Phuong Trang, Nguyen Thi Hong Mai

SUMMARY

Melanorrhoea usitata Wall. (Anacardiaceae R. Br.) is known as valuable species for science, economy and medicine because of their good timber and medicinal value. However, this species was listed in Vietnam Red Data Bbook (2007) because of its decreased habitat and being over-exploited. Up to now, there has been no research for *Melanorrhoea usitata* in Vietnam. The aim of the present study is to sequence rbcL and trnL ADN regions of *Melanorrhoea usitata* for exact identification. The obtained sequences of rbcL and trnL were submitted to Genbank with accession number KY202641 and KY067416, respectively.