

ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÙNG GEN *rpoC* CỦA LOÀI TRẮC (*DALBERGIA COCHINCHINENSIS* PIERRE) VÀ SỪA ĐỎ (*DALBERGIA TONKINENSIS* PRAIN) Ở VIỆT NAM VÀ ỨNG DỤNG PHÂN LOẠI

Nguyễn Thị Hồng Mai¹, Nguyễn Mạnh Cường^{2,3}, Ngũ Trường Nhân^{3,4},
Nguyễn Phương Đại Nguyên⁴, Nguyễn Thị Phương Trang^{1,3}

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

²Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

⁴Trường Đại học Tây Nguyên

Trắc (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) và Sừa đỏ (*Dalbergia tonkinensis* Prain) thuộc chi Sừa (*Dalbergia*), họ Đậu (Fabaceae), là hai loài cây gỗ quý có giá trị kinh tế cao. Cả 2 loài này đã được xếp trong nhóm IIA và IA theo Nghị định 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ, nhằm hạn chế khai thác, sử dụng, tránh nguy cơ tuyệt chủng. Sử dụng DNA markers là một trong những phương pháp dùng để định danh loài một cách chính xác, đáng tin cậy và đã được sử dụng rất nhiều trong phân loại các loài động thực vật (CBOL Plant working group 2009). Gen *rpoC* là một trong bảy vùng gen được khuyến dùng để xây dựng mã vạch (Kress et al, 2007), phục vụ phân loại, giám định thực vật (Nguyễn Đức Thành, 2014). Trong báo cáo này, đoạn gen *rpoC* dài khoảng 600 bp của hai loài *Dalbergia cochinchinensis* và *Dalbergia tonkinensis* của Việt Nam được giải trình tự và phân tích, hỗ trợ cho phân loại học hình thái cũng như bổ sung cơ sở dữ liệu về di truyền cho hai loài cây gỗ quý của Việt Nam.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là mẫu lá cây Trắc và Sừa thu tại Buôn Ma Thuột. Ký hiệu mẫu nghiên cứu là C561L (Sừa đỏ) và C562L (Trắc) (hình 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 -30°C trước khi phân tích DNA tại Phòng thí nghiệm sinh học phân tử và Di truyền bảo tồn của Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản thực vật tại địa điểm thu mẫu cũng được thu thập giúp cho công tác xác định tên loài nghiên cứu.



Hình 1: Hình ảnh tiêu bản 2 mẫu nghiên cứu

2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách bằng kit Dneasy plant mini kit (Qiagen, Đức). Mẫu lá được nghiền trong nitơ lỏng (-196°C) thành dạng bột mịn, lấy 100mg bột mẫu để tách DNA tổng số theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR: Đoạn gen *rpoC* có chiều dài khoảng 600bp được nhân bản bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *rpoC* F: 5'- CTTCTGCGAAATCAGAGTGT TTG - 3' và *rpoC*R: 5'-CTTCTCCTTCCTCTAAATGATAAG - 3' (Kress W. J., et al, 2007). Hỗn hợp PCR với dung lượng 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 DNA (50 ng/ µl); 9,5 µl H₂O khử ion. Chu trình nhiệt PCR: 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 Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức).

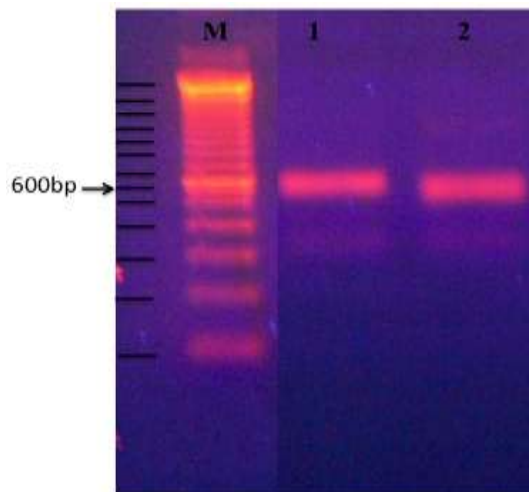
Đọc trình tự gen: Giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR bằng mồi *rpoC*-F và bộ hóa chất BigDye terminator cyclor v3.1. Đọc kết quả giải trình tự trên hệ thống ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).

Phân tích số liệu: Sử dụng công cụ Blast (Basic Local Alignment Search Tool) để xác định loài. Sử dụng các phần mềm Clustal và Mega 5.0 (Tamura K., et al 2011) để phân tích trình tự thu được.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả nhân bản vùng gen *rpoC*

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel Agarose 1% cho thấy rõ một băng DNA kích thước khoảng 600 bp tương ứng với kích thước vùng gen *rpoC* dự kiến (hình 2).



Hình 2: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel Agarose 1%
M. DNA ladder 100 bp (Invitrogen), 1. Mẫu Trắc, 2. Mẫu Sưa đỏ

Kết quả phân tích trình tự gen *rpoC*

Kết quả phân tích cho thấy 2 đoạn DNA mà chúng tôi nghiên cứu bắt cặp cao nhất với loài *Dalbergia cochinchinensis* và *Dalbergia tonkinensis* với tỷ lệ tương đồng là 99%, cho thấy đã thành công trong việc khuếch đại và giải mã đúng trình tự vùng gen *rpoC* của mẫu nghiên cứu, đồng thời chứng tỏ khả năng nhận dạng loài của gen *rpoC* là rất cao.

Đặc điểm phân tử vùng gen *rpoC*

Đoạn gen *rpoC* sau khi tu chỉnh có kích thước 511bp đã được dùng để phân tích và so sánh với 2 loài khác trên Genbank và 1 loài *Pterocarpus santalinus* khác chi. Kết quả phân tích trên phần mềm Mega cho thấy đoạn gen *rpoC* của Sưa đỏ mã hoá được cho 170 acid amin. Tỷ lệ Guanine chiếm 22,9%; Thymine chiếm 30,9%; Adenine chiếm 29,7%; Cytosine chiếm 16,4%. Đoạn *rpoC* của Trắc mã hoá cho 170 acid amin, tỷ lệ Guanine chiếm 23,5 %; Thymine chiếm 31,3%; Adenine chiếm 28,8%; Cytosine chiếm 16,4%. Thành phần A và thành phần T không có sự dao động lớn. Thành phần C và G có khoảng dao động lớn lần lượt 16,4% đến 22,9% và 16,4% đến 23,5%. Phát hiện 8 vị trí biến đổi (variable) tương ứng ở các vị trí 54 (G->A); 62 (A->G); 64(A->T); 70(A->G); 74(A->C); 238(A->G); 290(A->G); 369(C->T) ở cả hai loài Sưa đỏ và Trắc), trong đó giá trị mang thông tin (Parsimony informative) chiếm 1 vị trí là 54 (G->A). Số cặp nucleotide tương đồng trung bình là 503. Hệ số trung bình của cặp Si (Transition) và Sv (transversion) là 1.0. Hệ số này đối với vị trí codon thứ nhất, thứ hai và thứ ba tương ứng là 1.

Sự khác nhau giữa 2 loài Trắc (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) và Sưa đỏ (*Dalbergia tonkinensis* Prain) và các loài thuộc chi Sưa trên cơ sở phân tích theo mô hình Kimura 2P chỉ ra mức độ khác nhau của các cặp loài nghiên cứu. Khoảng cách di truyền của loài Trắc (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) so với các loài thuộc chi Sưa là *Dalbergia tonkinensis* Prain ; *Dalbergia odorifera* và *Dalbergia sissoo* lần lượt là 0.0159; 0.0079; 0.0079. Khoảng cách di truyền của loài Sưa đỏ (*Dalbergia tonkinensis* Prain) so với các loài thuộc chi Sưa là *Dalbergia cochinchinensis* Pierre; *Dalbergia odorifera* và *Dalbergia sissoo* lần lượt là 0.0159; 0.0079; 0.0079. Khoảng cách di truyền lớn nhất được tìm thấy ở cặp loài Trắc/Sưa đỏ là 0.0159 và số vị trí sai khác của cặp loài này là 8 nucleotide đồng nghĩa chúng tương đồng về mặt di truyền thấp.

III. KẾT LUẬN

Chỉ số tương đồng của vùng gen *rpoC* từ 2 mẫu nghiên cứu với trình tự tương đồng từ hai loài *Dalbergia cochinchinensis* và *Dalbergia tonkinensis* tham khảo là 99%. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy vùng gen *rpoC* có khả năng dùng trong phân loại các loài của chi Sưa (*Dalbergia*).

Đoạn gen *rpoC* dài 600 bp của hai loài *Dalbergia cochinchinensis* và *Dalbergia tonkinensis* của Việt Nam đã được đăng ký tại Genbank với mã số lần lượt là KY287755 và KY287750.

Lời cảm ơn: Công trình này được tài trợ một phần bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia - NAFOSTED (mã số 104.01-2015.49).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chính phủ**, 2006. Nghị định số 32/2006/NĐ-CP: Nghị định về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm.
2. **CBOL Plant working group**, 2009. A DNA barcode for land plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 12794-12797.
3. **Kress W. J., Erickson D. L.**, 2007. A two locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS One, 2(6): e508.
4. **Nguyễn Đức Thành**, 2014. Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. Tạp chí Sinh học, 36(3): 265-294

5. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731-2739.

**MOLECULAR CHARACTERISTICS AND CLASSIFICATION ABILITY OF
RPOC REGION FOR *DALBERGIA COCHINCHINENSIS* PIERRE AND
DALBERGIA TONKINENSIS PRAIN SPECIES IN VIET NAM**

**Nguyen Thi Hong Mai, Nguyen Manh Cuong, Ngu Truong Nhan,
Nguyen Phuong Dai Nguyen, Nguyen Thi Phuong Trang**

SUMMARY

Dalbergia cochinchinensis Pierre and *Dalbergia tonkinensis* Prain belong to the genus *Dalbergia* of the family Fabaceae. They are rare species with high valuable economic. Using DNA markers is one of the methods used to identify species accurately, reliably and has been used a lot in the classification of plants and animals. Chloroplast *rpoC* gene is one of seven DNA regions that is suggested for DNA barcoding research. In this study, the *rpoC* gene with 600bp in length of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre and *Dalbergia tonkinensis* Prain were sequenced and submitted to Genbank with the accession numbers KY287755 and KY287750, respectively. Our results added the genetics information into the genetic database of rare wood timbers in Vietnam, and also confirmed that *rpoC* is DNA marker and suitable for classification of the genus *Dalbergia*.