

XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN tRNA - LEU CHO HAI LOÀI CÂY GỖ SỪA (*DALBERGIA TONKINENSIS*) VÀ CÂY GỖ TRẮC ĐỎ (*DALBERGIA COCHINCHINENSIS*) PHỤC VỤ VIỆC PHÂN LOẠI MẪU VẬT TẠI BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN VIỆT NAM

Vũ Thị Thu Hiền, Lưu Đàm Cư, Đinh Thị Phòng

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

TÓM TẮT

Cây gỗ Sừa (*Dalbergia tonkinensis*) và cây gỗ Trắc đỏ (*Dalbergia cochinchinensis*) thuộc chi *Dalbergia* là hai loài cây gỗ quý hiếm có giá trị sử dụng và kinh tế cao của Việt Nam. Hệ gen lục lạp được nghiên cứu khá nhiều do tính bảo thủ cao và tần số đột biến thấp hơn so với DNA nhân. Để làm cơ sở cho việc phân loại mẫu vật, nghiên cứu này tập trung vào việc tách dòng và xác định trình tự đoạn gen tRNA-Leu (trnL) mã hóa cho tRNA vận chuyển leucine ở lục lạp. Cặp môi *Dal2* được thiết kế để nhân đoạn gen trnL dựa trên loài *D. foliolosa* có mã số EF451106 trong Ngân hàng Genbank. Kết quả cho thấy, đã nhân được đoạn gen có kích thước là 476 bp và 423 bp cho hai loài *D. tonkinensis* và *D. cochinchinensis*, tương ứng và có mức độ tương đồng nucleotide là 99,8%. Mức độ tương đồng với 13 loài thuộc chi *Dalbergia* trên Ngân hàng GenBank dao động trong khoảng từ 94,6% đến 100%. Hai loài *D. tonkinensis* và *D. cochinchinensis* chỉ sai khác ở đoạn gen trên duy nhất 1 nucleotide tại vị trí thứ 56 (T) và khi so sánh trình tự nucleotide của hai loài này với 13 loài khác thuộc chi *Dalbergia* cho thấy có sự khác nhau ở 9 vị trí: 3 nucleotide GGA được chèn vào vị trí 255 - 257; 5 nucleotide AACTG bị mất đi ở vị trí 392 - 396 và tại vị trí 332 (G) được thay bằng (T).

Từ khóa: *D. cochinchinensis*, *D. tonkinensis*, gen tRNA - Leu, hệ gen lục lạp, trình tự nucleotide, tương đồng di truyền

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong 16 quốc gia có tính đa dạng sinh học cao trên thế giới (WWF, IUCN, 2000). Gần đây, do ảnh hưởng của thiên tai và khai thác gỗ ngày càng bừa bãi, đặc biệt là các loài cây gỗ quý. Vì vậy, diện tích rừng tự nhiên bị thu hẹp từ 43% độ che phủ (năm 1945) xuống còn 7,8% (năm 2006). Chi trắc (*Dalbergia*) gồm nhiều loài cây thân gỗ có kích thước từ nhỏ đến trung bình, thuộc cây họ đậu (Fabaceae). Đây là chi điển hình của rừng nhiệt đới, theo thống kê phân loại thực vật chi *Dalbergia* có khoảng 300 loài. Ở Việt Nam có khoảng 27 loài, phân bố rộng khắp ở các vùng rừng kín từ Nam ra Bắc. Hiện nay, chi *Dalbergia* đang bị khai thác cạn kiệt do có giá trị kinh tế và thương mại cao. Trong đó hai loài *D. tonkinensis* (cây gỗ Sừa) và *D. cochinchinensis* (cây gỗ Trắc đỏ) được ghi nhận trong Danh lục đỏ Việt Nam (Đặng Ngọc Thanh, Nguyễn Tiến Bản, 2007), và được Chính phủ Việt Nam quy định trong nhóm IA và IIA của Nghị định 32/2006/NĐ-CP là loài đặc biệt quý hiếm, có nguy cơ đe dọa tuyệt chủng.

Nghiên cứu phân loại và định loại mẫu vật của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam là một nhiệm vụ cấp

bách, với phương pháp hình thái truyền thống không thể định loại được hết các loại mẫu thu thập được và có thể cho kết quả thiếu chính xác trong một số trường hợp nhất là khi mẫu không còn nguyên vẹn. Hơn nữa, từ lâu trên thế giới đã nghiên cứu và đưa phương pháp hiện đại vào việc phân loại và giám định mẫu vật. Trong đó, phương pháp phân loại học phân tử được xem là phương pháp cho hiệu quả và độ chính xác cao mà không lệ thuộc vào tình trạng của mẫu (Rout *et al.*, 2003; Favreau *et al.*, 2006; Andrianoeline *et al.*, 2006; Subhash *et al.*, 2004; Juchum *et al.*, 2007). Cho đến nay, đã có khá nhiều nghiên cứu phân tử đối với chi *Dalbergia* tập trung vào hai nội dung chính là đánh giá đa dạng di truyền loài và xác định trình tự các đoạn gen đặc trưng, trong đó đoạn gen mã hóa cho tRNA vận chuyển leucine ở lục lạp (tRNA - Leu) được đề cập nghiên cứu khá nhiều do có tính bảo thủ cao và đặc trưng cho loài (Ribeiro *et al.*, 2007). Đây là nguồn dữ liệu có giá trị để chúng ta có thể khai thác ứng dụng cho nghiên cứu chi này của Việt Nam.

Xuất phát từ các cơ sở trên, nghiên cứu này đề cập đến kết quả xác định trình tự đoạn gen trnL cho hai loài *D. tonkinensis* và *D. cochinchinensis* làm cơ sở cho nghiên cứu định loại mẫu vật phục vụ việc

trung bày, giáo dục, trao đổi nghiên cứu mẫu vật... tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam và góp phần bảo tồn nguồn gen quý của Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu lá và mẫu gỗ của hai loài *D. tonkinensis* và *D. cochinchinensis* của Việt Nam đã được xác định hình thái do Phòng Sinh học, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam cung cấp. Chúng vi khuẩn tách dòng *E. coli* DH5α và vector tách dòng pBT do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp (Phan Trọng Hoàng *et al.*, 2005). Cặp mồi *Dal2* được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen tRNA - Leu (trnL) của loài *Dalbergia foliolosa*, mã số EF451106 trong Ngân hàng GenBank có kích thước 510 bp.

Phương pháp

DNA tổng số được tách chiết theo công bố của Doyle và Doyle (1990), tinh sạch DNA bằng bộ Kit DNAeasy Mini Plant Kit (QIAGEN) (Asif MJ, Cannon CH, 2005; Ribeiro RA, Lovato MB, 2007). Cặp mồi *Dal2* được thiết kế trong phần mềm DNASTar.

Thành phần phản ứng PCR 25 µl gồm: 12,4 µl H₂O khử ion; 2,5 µl dung dịch đệm buffer 10X; 2,5 µl

MgCl₂ 25 mM; 2,5 µl dNTPs 2,5 mM; 1,25 µl mỗi xuôi (10 pmol); 1,25 µl mỗi ngược (10 pmol); 0,6 µl *Taq* polymerase (5 U/µl); 2 µl DNA. Chu trình nhiệt của phản ứng là: 94°C trong 2 phút; 35 chu kỳ (94°C trong 1 phút; 51°C trong 1 phút; 72°C trong 1 phút); 72°C trong 10 phút; giữ sản phẩm ở 4°C. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,9%.

Sản phẩm PCR tinh sạch được gắn vào vector pBT (Phan Trọng Hoàng *et al.*, 2005) và được nhân lên trong chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α. Các khuẩn lạc trắng mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin (100 mg/l), X-gal (30 mg/l) và IPTG (100 µM). Sau đó, chọn dòng khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp theo phương pháp colony-PCR với cặp mồi pUC18-F, pUC18-R để xác định khuẩn lạc có plasmid mang gen quan tâm. Tách plasmid nhờ AccuPrep® Plasmid Extraction Kit (Bioneer). Xác định trình tự đoạn gen trnL trên máy đọc trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

Xử lý số liệu: Các số liệu thu được trong nghiên cứu được xử lý bằng các chương trình phần mềm chuyên dụng như DNASTar, BioEdit và ClustalW. So sánh với các trình tự gen trnL trên Ngân hàng GenBank với nhau. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp tối đa MP (Maximum Parsimony) và phương pháp NJ (Neighbor Joining).

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi nghiên cứu.

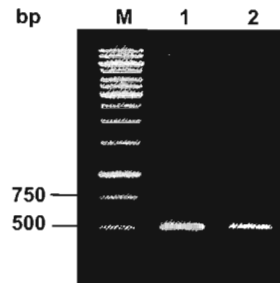
| Gen | Ký hiệu | Trình tự nucleotide | Kích thước lý thuyết (bp) |
|-------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------|
| tRNA - Leu (trnL) | <i>Dal2</i> -F | 5- GTGATAACTTTCAAATTCAGAG -3' | 510 |
| | <i>Dal2</i> -R | 5- CTCACGATTCTTAAGTCGA -3' | |

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân tích PCR và tách dòng gen tRNA - Leu

DNA sau khi tinh sạch được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR để nhân đoạn gen tRNA - Leu (trnL) với cặp mồi *Dal2*.

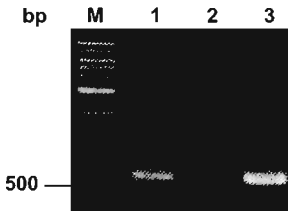
Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 0,9% (Hình 1) cho thấy, đã nhân được đoạn DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 510 bp. Kết quả này cũng phù hợp với kích thước lý thuyết của gen trnL ở các loài đã công bố trong Ngân hàng GenBank. Do vậy, sản phẩm PCR tiếp tục được dùng để tách dòng gen.



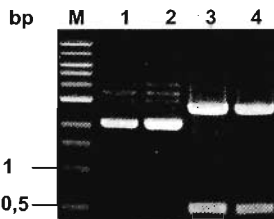
Hình 1. Sản phẩm PCR của hai loài *Dalbergia* phân tích với cặp mồi *Dal2* trên gel agarose 0,9%. M: marker phân tử 1 kb; 1: *D. Tonkinensis*; 2: *D. cochinchinensis*.

Theo lý thuyết, tất cả các khuẩn lạc trắng đều là

các khuẩn lạc có chứa đoạn gen cần chèn. Tuy vậy, trong thực tế không phải khuẩn lạc trắng nào cũng chứa đoạn gen này. Vì thế, một số khuẩn lạc trắng được chạy kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR và tách plasmid nhờ AccuPrep® Plasmid Extraction Kit (Bioneer). Cũng theo lý thuyết, nếu khuẩn lạc chứa plasmid mang gen quan tâm, thì sản phẩm PCR có kích thước lớn hơn đoạn DNA trong ứng khoảng 100 bp. Kết quả colony-PCR thu được có kích thước khoảng 610 bp (Hình 2) xấp xỉ với kích thước dự đoán. Plasmid thu được cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế *Bam*HI. Kết quả cho thấy, các phân đoạn DNA có đúng kích thước như dự đoán khoảng 510 bp (Hình 3). Từ kết quả này chúng tôi khẳng định các dòng khuẩn lạc trắng chọn được đã mang plasmid chứa đoạn gen quan tâm.



Hình 2. Kết quả colony-PCR phân tích với cặp mồi pUC18-F và pUC18-R. M: Marker phân tử; 1: Khuẩn lạc trắng chứa vector tái tổ hợp của mẫu *D. tonkinensis*; 3: Khuẩn lạc trắng chứa vector tái tổ hợp của mẫu *D. cochinchinensis*; 2: Khuẩn lạc xanh không chứa vector tái tổ hợp.



Hình 3. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp mang gen *trnL*. M: marker; 1 và 2: Plasmid tái tổ hợp chưa xử lý với enzyme; 3: Plasmid chứa gen *trnL* của mẫu *D. Tonkinensis*; 4: Plasmid chứa gen *trnL* của mẫu *D. cochinchinensis* cắt bằng enzyme hạn chế *Bam*HI.

Kết quả xác định trình tự nucleotide gen *trnL*

Trình tự các nucleotide của hai loài *D. tonkinensis* và *D. cochinchinensis* được ký hiệu là *D.*

tonkinensis VN và *D. cochinchinensis* VN sau khi phân tích với cặp mồi *Dal2* và thu được trình tự nucleotide có độ dài là 476 bp và 423 bp (tương ứng) thuộc gen *trnL*. So sánh trình tự gen *trnL* của hai loài phân lập được với các trình tự gen *trnL* của 13 loài thuộc chi *Dalbergia* trên ngân hàng GenBank có độ tương đồng tương đối cao (từ 94,6 % giữa *D. tonkinensis* VN và *D. foliolosa*; *D. cochinchinensis* VN và *D. foliolosa* đến 100% giữa *D. decipularis* và *D. frutescens*). Sự khác nhau giữa các vị trí nucleotide được thể hiện khi so sánh giữa hai loài *D. tonkinensis* VN và *D. cochinchinensis* VN thì chỉ sai khác duy nhất 1 nucleotide thứ 56 (T) và khi so sánh hai loài nghiên cứu với 13 loài khác thuộc chi *Dalbergia* trên thế giới thì tại vị trí nucleotide thứ 332 (G) được thay (T). Trong khi đó, tại vị trí nucleotide thứ 255, 256 và 257 cả hai loài của Việt Nam đã xuất hiện chèn thêm ba nucleotide là GGA (tương ứng) và tại vị trí nucleotide thứ 392, 393, 394, 395 và 396 thì hai loài đã mất đoạn 5 nucleotide AACTG (tương ứng). Tại các nucleotide còn lại không thấy có sự thay đổi rõ rệt. Các vùng sai khác giữa các nucleotide khi so sánh hai loài nghiên cứu với 13 loài thuộc chi *Dalbergia* trên Ngân hàng Genbank được thể hiện trong hình 4.

Mức độ tương đồng giữa các nucleotide thuộc gen *trnL* của hai loài nghiên cứu với 13 loài trong Ngân hàng Genbank

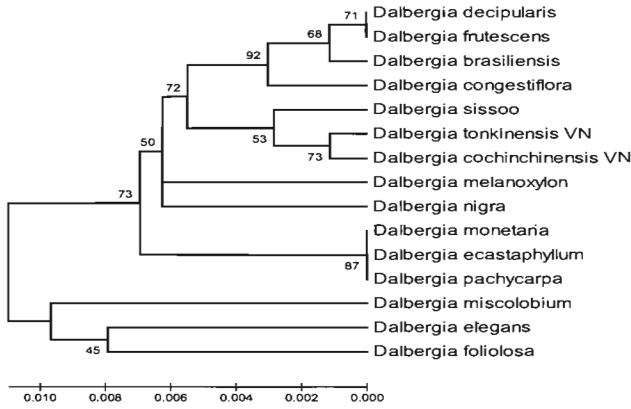
Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp tối đa MP (Maximum Parsimony) và phương pháp NJ (Neighbor Joining) khi so sánh trình tự gen *trnL* của hai loài *D. tonkinensis* VN và *D. cochinchinensis* VN với 13 loài khác nhau thuộc chi *Dalbergia* đã công bố trong Ngân hàng GenBank được trình bày ở hình 5.

Kết quả trên cây phát sinh chủng loại cho thấy, hai loài nghiên cứu ở Việt Nam tạo thành một nhóm có mức độ tương đồng di truyền là 99,8% và có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài *D. sissoo* (Hồng sắc Ấn Độ) với mức độ tương đồng giữa *D. tonkinensis* VN và *D. sissoo* là 97,2%, giữa *D. cochinchinensis* VN và *D. sissoo* là 97,4%. Kết quả này cho phép nhận định hai loài của Việt Nam có chung nguồn gốc với 13 loài thuộc chi *Dalbergia* trên thế giới.

Tỷ lệ phần trăm tương đồng của từng cặp so sánh bằng chương trình MEGALIGN thống kê dưới dạng ma trận tam giác (Bảng.2) cho thấy đoạn gen này tương đối bảo thủ. Mức độ tương đồng giữa các loài từ 94,6 % đến 100%.

| | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------|-------------|----------------------|--------------------|
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| D.foliolosa | GTTTTATGAA | AGCAAAGAAA | AGTTAAGAAA | GCGAGAATAA | AAAAAGGATA |
| D.brasiliensis |C..... | | | | |
| D.congestiflora |C..... | | | | |
| D.sissoo |C..... | | | | |
| D.frutescens |C..... | | | | |
| D.decipularis |C..... | | | | |
| D.nigra |C..... | |A..... | | |
| D.elegans |C..... | | | | |
| D.ecastaphyllum |C..... | | | | |
| D.melanoxylon |C..... | | | | |
| D.monetaria |C..... | | | | |
| D.pachycarpa |C..... | | | | |
| D.miscolobium |C..... | | |C..... | |
| D.tonkinensis VN | T | | | | |
| D.cochinchinensis VN |C..... | | | | |
| ***** | | | | | |
| | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| D.foliolosa | AAGA---CTC | CAAATTTCTA | TTTGTAATC | GTTATATCAC | AATTGAAAGA |
| D.brasiliensis | .G.---..... | |G..... | | |
| D.congestiflora | .G.---..... | |G..... | | |
| D.sissoo | .G.---..... | |G..... | | |
| D.frutescens | .G.---..... | |G..... | | |
| D.decipularis | .G.---..... | |G..... | | |
| D.nigra |G..... | |G..... | | |
| D.elegans |A..... | |G..... | | |
| D.ecastaphyllum |G..... | |G..... | | |
| D.melanoxylon |G..... | |G..... |C..... | |
| D.monetaria |G..... | |G..... | | |
| D.pachycarpa |G..... | |G..... | | |
| D.miscolobium |G..... | |G..... | | |
| D.tonkinensis VN | .G. GGA | |G..... | | |
| D.cochinchinensis VN | .G. GGA | |G..... | | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| D.foliolosa | TGTGAATCAA | ATCAATTCCA | AGTTGAAGAA | AGAATTTAAT | ATTCACATGAT |
| D.brasiliensis | | |A..... |G..... | |
| D.congestiflora | | |A..... |G..... | |
| D.sissoo | | | | | |
| D.frutescens | | |A..... |G..... | |
| D.decipularis | | |A..... |G..... | |
| D.nigra | | | | | |
| D.elegans | | | |G..... | |
| D.ecastaphyllum | | | | | |
| D.melanoxylon | | | |G..... | |
| D.monetaria | | | | | |
| D.pachycarpa | | |N..... | | |
| D.miscolobium | | | |G..... | |
| D.tonkinensis VN | | | | T | |
| D.cochinchinensis VN | | | | T | |
| | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| D.foliolosa | CAATCATTC | ACTCCATCAT | AGTCTGATAT | ATCTTTTGAA | GA ACTGATTA |
| D.brasiliensis | | |G..... | | |
| D.congestiflora | | |G..... | | |
| D.sissoo | | |G..... | | |
| D.frutescens | | |G..... | | |
| D.decipularis | | |G..... | | |
| D.nigra | | |G..... | | |
| D.elegans | | |G..... | | |
| D.ecastaphyllum | | |G..... | | |
| D.melanoxylon | | |G..... | | |
| D.monetaria | | |G..... | | |
| D.pachycarpa | | |G..... | | |
| D.miscolobium | | |G..... | | |
| D.tonkinensis VN | | |G..... | | |
| D.cochinchinensis VN | | |G..... | | |
| ***** | | | | | |

Hình 4. So sánh trình tự gen trnL của hai loài nghiên cứu với 13 loài thuộc chi *Dalbergia* đã công bố trong Ngân hàng GenBank (Các trình tự được sử dụng để so sánh có mã hiệu trong Ngân hàng GenBank như sau: *D. brasiliensis* (EF451115); *D. congestiflora* (AF208924); *D. decipularis* (EF451116); *D. ecastaphyllum* (EF451111); *D. elegans* (EF451105); *D. foliolosa* (EF451106); *D. frutescens* (EF451117); *D. melanoxylon* (AF208921); *D. miscolobium* (EF451109); *D. monetaria* (EF451112); *D. nigra* (EF451114); *D. pachycarpa* (AF208919); *D. sissoo* (EF451118)).



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của hai loài *D. tonkinensis* VN và *D. cochinchinensis* VN phân tích cặp mỗi *Dal2* với 13 loài thuộc chi *Dalbergia* đã công bố trong Ngân hàng GenBank.

Bảng 2. Mức độ tương đồng nucleotide phân tích với cặp mỗi *Dal2* của loài *D. tonkinensis* VN và *D. cochinchinensis* VN với trình tự của 13 loài thuộc chi *Dalbergia* đã công bố trong Ngân hàng GenBank.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
|----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------|
| 1 | ■ | 99.8 | 99.4 | 97.4 | 98.1 | 95.7 | 100 | 97.6 | 97.4 | 97.0 | 97.6 | 96.8 | 98.5 | 97.0 | 97.2 | <i>D. decipularis</i> |
| 2 | 0.2 | ■ | 99.6 | 97.6 | 98.3 | 95.9 | 99.8 | 97.8 | 97.6 | 97.2 | 97.8 | 97.0 | 98.7 | 97.2 | 97.4 | <i>D. brasiliensis</i> |
| 3 | 0.7 | 0.4 | ■ | 97.6 | 98.3 | 95.9 | 99.4 | 97.8 | 97.6 | 97.2 | 97.8 | 97.0 | 98.7 | 97.2 | 97.4 | <i>D. congestiflora</i> |
| 4 | 1.8 | 1.6 | 1.6 | ■ | 97.6 | 97.8 | 97.4 | 98.1 | 97.4 | 99.6 | 99.4 | 99.4 | 97.6 | 96.1 | 96.3 | <i>D. ecastaphyllum</i> |
| 5 | 2 | 1.8 | 1.8 | 1.6 | ■ | 97.2 | 98.1 | 97.8 | 98.5 | 97.2 | 97.8 | 97.0 | 97.8 | 96.6 | 96.6 | <i>D. elegans</i> |
| 6 | 3.1 | 2.9 | 2.9 | 1.8 | 1.6 | ■ | 95.7 | 96.3 | 96.6 | 98.3 | 97.6 | 98.1 | 95.9 | 94.6 | 94.6 | <i>D. foliolosa</i> |
| 7 | 0 | 0.2 | 0.7 | 1.8 | 2 | 3.1 | ■ | 97.6 | 97.4 | 97.0 | 97.6 | 96.8 | 96.5 | 97.0 | 97.2 | <i>D. frutescens</i> |
| 8 | 1.8 | 1.6 | 1.6 | 1.3 | 1.6 | 2.7 | 1.8 | ■ | 97.2 | 97.6 | 98.3 | 97.4 | 97.6 | 95.9 | 96.1 | <i>D. melanoxyton</i> |
| 9 | 2.7 | 2.5 | 2.5 | 1.8 | 1.6 | 2.2 | 2.7 | 2.2 | ■ | 97.0 | 97.2 | 96.8 | 97.2 | 95.7 | 95.9 | <i>D. miscolobium</i> |
| 10 | 1.8 | 1.6 | 1.6 | 0 | 1.6 | 1.8 | 1.8 | 1.3 | 1.8 | ■ | 98.9 | 99.8 | 97.2 | 95.7 | 95.9 | <i>D. monetaria</i> |
| 11 | 1.6 | 1.3 | 1.3 | 0.7 | 1.3 | 2 | 1.6 | 1.1 | 2 | 0.7 | ■ | 98.7 | 97.8 | 96.3 | 96.6 | <i>D. nigra</i> |
| 12 | 1.8 | 1.6 | 1.6 | 0 | 1.6 | 1.8 | 1.8 | 1.3 | 1.8 | 0 | 0.7 | ■ | 97.0 | 95.5 | 95.7 | <i>D. pachycarpa</i> |
| 13 | 1.1 | 0.9 | 0.9 | 1.1 | 1.8 | 2.5 | 1.1 | 1.3 | 2.5 | 1.1 | 0.9 | 1.1 | ■ | 97.2 | 97.4 | <i>D. sissoo</i> |
| 14 | 1.3 | 1.1 | 1.1 | 1.3 | 1.8 | 2.5 | 1.3 | 1.8 | 2.7 | 1.3 | 1.1 | 1.3 | 0.7 | ■ | 99.8 | <i>D. tonkinensis</i> VN |
| 15 | 1.1 | 0.9 | 0.9 | 1.1 | 1.8 | 2.5 | 1.1 | 1.6 | 2.5 | 1.1 | 0.9 | 1.1 | 0.4 | 0.2 | ■ | <i>D. cochinchinensis</i> VN |

KẾT LUẬN

Đã xác định được trình tự nucleotide thuộc gen tRNA - Leu (trnL) cho hai loài *D. tonkinensis* VN và *D. cochinchinensis* VN có độ dài là 476 bp và 423 bp (tương ứng) và có mức độ tương đồng di truyền là 99,8%. Mức độ tương đồng di truyền hai loài *Dalbergia* của Việt Nam với 13 loài *Dalbergia* khác trên thế giới dao động từ 94,6 % (giữa *D. tonkinensis* VN và *D. foliolosa*; *D. cochinchinensis* VN và *D. foliolosa*) đến 100% (giữa *D. decipularis* và *D. frutescens*).

Hai loài *D. tonkinensis* VN và *D. cochinchinensis* VN chỉ sai khác duy nhất 1 nucleotide tại vị trí thứ 56 (T) và khi so sánh trình tự nucleotide của hai loài này với 13 loài khác thuộc chi *Dalbergia* cho thấy có sự khác nhau ở 9 vị trí: 3 nucleotide GGA được chèn vào vị trí 255, 256, 257; 5 nucleotide AACTG bị mất đi ở vị trí 392, 393, 394, 395, 396 và tại vị trí 332 (G) được thay bằng (T). Hai trình tự này đã được đăng ký trên Ngân hàng Genbank và có mã hiệu là FN 185726 (*D. tonkinensis* VN) và FN 356228 (*D. cochinchinensis* VN).

Dựa vào kết quả nhận được trên đây, cặp mồi *Dal2-F* và *Dal2-R* sẽ được sử dụng để nhân đoạn DNA có kích thước 510 bp thuộc gen tRNA - Leu phục vụ việc phân loại và nhận dạng mẫu vật thuộc chi *Dalbergia* tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam và các đơn vị nghiên cứu khác.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài "Nghiên cứu ứng dụng một số phương pháp phân loại học hiện đại phục vụ yêu cầu định loại mẫu vật của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam và góp phần nâng cao trình độ phân loại học ở Việt Nam" cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ sử dụng một số trang thiết bị của Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andrianoelina O, Rakotondraoelina H, Ramamonjisoa L, Maley J, Danthu P, Bouvet JM (2006) Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biod Cons* 15: 1109-1128.
- Asif MJ, Cannon CH (2005) DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Mol Biol Rep* 23: 185-192.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Đặng Ngọc Thanh, Nguyễn Tiến Bản (2007) *Danh lục đỏ Việt Nam - Vietnam Red List*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ: 412.
- Favreau B, Andrianoelina O, Nunez P, Vaillant A, Ramamonjisoa L, Danthu P, Bouvet JM (2007) Characterization of microsatellite in the rosewood (*Dalbergia monticola* Bosser & R Rabev.). *Mol Ecol* 7(5): 774-776.
- Juchum FS, Leal JB, Santos LM, Almeida MP, Ahnert D, Corrêa RX (2007) Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Alemão ex Benth.) using RAPD makers. *Genet Mol Res* 6(3): 534-553.
- Phan Trọng Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2005) Sử dụng enzyme *XcmI* để thiết kế vector pBT phục vụ tách dòng và đọc trình tự gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(4): 459-463.
- Ribeiro RA, Lavin M, Lemos Filho JP, Mendonca Filho CV, Santos FRD, Lovato MB (2007) The Genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: relationships inferred from combined sequence data. *Syst Bot* 32: 762-771.
- Ribeiro RA, Lovato MB (2007) Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet Mol Res* 6(1): 173-187.
- Rout GR, Bhattacharya D, Nanda RM, Nayak S, Das P (2003) Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. *Biod Cons* 12: 197-206.
- Subhash CH, Manojkumar HN (2004) Genetic relationship among some species of *Dalbergia* using PCR based DNA makers. *Cytologia* 69(2): 125-130.
- WWF, IUCN (2000) Report on proposed biodiversity action plan for western highland.

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF LEU - tRNA GENE OF TWO SPECIES *DALBERGIA TONKINENSIS* AND *DALBERGIA COCHINCHINENSIS* FOR SPECIMEN IDENTIFICATION IN THE VIETNAM NATIONAL MUSEUM OF NATURE

Vũ Thị Thu Hiền, Lưu Đàm Cu, Đinh Thị Phong*

Vietnam National Museum of Nature

SUMMARY

In Vietnam, *Dalbergia tonkinensis* and *Dalbergia cochinchinensis* belonging genus *Dalbergia* are rare woody plants with high economic and utilization values. Recently, genome of chloroplast has been extensively studied due to its high conservation and lower frequency of mutations than nuclear DNA. In order to provide a data source at molecular level for identifying specimens, this research was focused on isolating and analysing the sequences of Leu - tRNA (*trnL*) gene in chloroplast genome, encoding tRNA for leucine transport. Primer

* Author for correspondence: Tel: 84-4-39941215; E-mail: dingthiphong@hotmail.com

pairs *Dal2* were designed based on *trnL* gene sequence of *D. foliolosa* with accession number EF451106. The amplification fragments with the size of 473 and 423 bp were obtained for *D. tonkinensis* and *D. cochinchinensis*, respectively. Sequence analysis of amplified fragments showed that the similarity level between the two was 99.8% and there was difference at only one nucleotide position 56 (T). The comparison with 13 other species in *Dalbergia* genus revealed that the similarity level in nucleotide sequence of *trnL* gene was ranging from 94.6 % to 100% and there were differences at 9 positions: a trinucleotide GGA was inserted at 255 to 257 positions; a pentanucleotide AACTG was deleted from 392 to 396 positions and at position 332, G was replaced by T.

Keywords: Chloroplast genome, *D. cochinchinensis*, *D. tonkinensis*, genetic homology, nucleotide sequence, *tRNA* gene - *Leu*