

GÓP PHẦN XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ QUAN HỆ HỌ HÀNG GIỮA SA MỘC TRỒNG *CUNNINGHAMIA LANCEOLATA* VÀ SA MỘC DẦU *CUNNINGHAMIA KONISHII* (Họ HOÀNG ĐÀN CUPRESSACEAE) Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ 18S-rDNA

Nguyễn Thị Phương Trang¹, Nguyễn Minh Tâm^{1, 2}, Phan Kế Long¹, Phan Kế Lộc³

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

²Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Sa mộc trồng *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. nhập từ Trung Quốc vào trồng và Sa mộc dầu *Cunninghamia konishii* Hayata mọc tự nhiên là 2 loài duy nhất của chi Sa mộc Cunninghamia. Có một quan điểm khác nhau về *Cunninghamia konishii* Hayata vào loài *Cunninghamia lanceolata*. Cả 2 quan điểm đều chỉ dựa thuần túy vào một số đặc điểm hình thái bên ngoài. Nhằm khắc phục tính phiến diện đó chúng tôi đã xác định trình tự nucleotide vùng 18S-rDNA của chúng và phân tích mối quan hệ di truyền của chúng với 7 loài khác chi nhưng trong cùng họ Hoàng đàn Cupressaceae theo phương pháp MP. Kết quả cho thấy, có 2 nhóm tiến hóa, trong đó 2 loài Sa mộc Cunninghamia tạo thành một nhóm riêng. Giữa chúng có mối quan hệ rất mật thiết với nhau (bootstrap 99%) với hệ số sai khác rất nhỏ (0,018). Chúng tôi nhất trí nhập *Cunninghamia konishii* Hayata vào loài *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., coi nó chỉ như một thứ, *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* (Hayata) Fujita bên cạnh thứ chuẩn *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. var. *lanceolata*.

Từ khóa: Cây phà hệ, *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., *Cunninghamia konishii* Hayata, *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* (Hayata) Fujita, trình tự 18S-rDNA

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Cunninghamia Sa mộc được Brown thành lập năm 1826, chỉ gồm một loài chuẩn *C. lanceolata* (Lamb.) Hook., một tổ hợp tên loài mới do Hooker đề xuất dựa vào tên gốc là *Pinus lanceolata* Lamb. công bố năm 1803. Cho đến 1908, *C. lanceolata* chỉ biết mọc tự nhiên ở Trung và Nam Trung Quốc. Vào năm 1908 Hayata đã công bố loài thứ hai là *C. konishii* Hayata mọc tự nhiên ở Đài Loan với một số sai khác nhỏ, chủ yếu về kích thước của lá và độ dày đặc của các dải lỗ khí ở hai mặt lá. Cho đến nay, trong khi một số nhà thực vật học vẫn coi 2 loài này là độc lập (Hiep, Vidal, 1996; Nguyễn Tiến Hiệp *et al.*, 2004; Farjon, 2005) thì ngay từ năm 1932 Fujita đã cho *C. konishii* Hayata chỉ là một thứ, var. *konishii* (Hayata) Fujita bên cạnh thứ chuẩn, var. *lanceolata* của loài *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. vì sự sai khác giữa chúng về một số đặc điểm của lá và cả nón hạt là nhỏ, chưa xứng đáng ở mức loài. Fu và đồng tác giả (1999) chấp nhận quan điểm này của Fujita. Qua đó chúng ta cũng thấy là việc thảo luận về mối quan hệ và vị trí của 2 taxon nêu trên chỉ dựa thuần túy vào một số ít

đặc điểm hình thái bên ngoài. Thấy rõ tính phiến diện của những bàn luận đó một số nhà nghiên cứu sinh học phân tử đã thử sử dụng phương pháp nghiên cứu DNA lập lục để góp phần giải quyết vấn đề còn đang bàn cãi kể trên. Lu và đồng tác giả (1999) đã xác định lại vị trí phân loại của 2 loài Sa mộc Cunninghamia kể trên dựa trên nghiên cứu RFLP của đoạn *trnD-trnT* của lập lục, và đi đến kết luận là *Cunninghamia konishii* chỉ là tên đồng nghĩa của *C. lanceolata*. Ở Việt Nam, chúng tôi đã thu được dẫn liệu về trình tự nucleotide của đoạn 18S-rDNA ở mẫu lá Sa mộc dầu thu ở xã Tây Sơn, huyện Kỳ Sơn, tỉnh Nghệ An với tên gọi *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* (Hayata) Fujita, và chúng được lưu giữ tại ngân hàng dữ liệu thông tin di truyền (GenBank) với mã số EU273292.

Hai tài liệu về phân loại Thông chính thức ở Việt Nam nói riêng và Đông Dương nói chung (Hiep, Vidal, 1996; Nguyễn Tiến Hiệp *et al.*, 2004) vẫn chỉ dựa trên một số sai khác về hình thái bên ngoài để coi chi Cunninghamia gồm có 2 loài độc lập: Sa mộc trồng *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. và Sa mộc dầu *Cunninghamia konishii* Hayata. Ở Việt Nam loài thứ nhất được đưa từ Trung

Quốc vào trồng từ vài chục năm nay, lúc đầu làm cây cảnh ở một số khu nghỉ mát trên núi như Sa Pa, Tam Đảo, sau đó là cây trồng rừng ở một số vùng núi phía cực bắc như Quản Bạ, cũng như một số vùng thấp hơn như Lạng Sơn. Cây tạo nên nón hạt đều đặn nhưng rất ít khi gặp tái sinh tự nhiên và mọc hoang dại hóa. Còn loài thứ hai, Sa mộc đầu gần đây mới được phát hiện mọc hoang dại ở Nghệ An (Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp, 1999; Farjon, 2005) và một số vùng lân cận khác, mới được thử trồng rất hạn chế. Nhằm tiếp tục góp phần làm sáng tỏ mối quan hệ giữa 2 loài thuộc chi *Cunninghamia* Sa mộc này bằng phương pháp sinh học phân tử, chúng tôi xác định trình tự nucleotide của đoạn DNA nằm trong vùng 18S-rDNA của mẫu Sa mộc trồng *Cunninghamia lanceolata* trồng và so sánh với kết quả tương tự ở Sa mộc đầu *Cunninghamia konishii* mọc tự nhiên ở Kỳ Sơn cũng như 7 loài khác chi nhưng cùng họ Hoàng đàn, xây dựng cây phả hệ để làm sáng tỏ mối quan hệ họ hàng của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu vật nghiên cứu

Lá Sa mộc trồng *Cunninghamia lanceolata* thu từ cây trồng ở thị trấn Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phú (SMTQ-01). Mẫu được bảo quản trong bình chứa nitrogen lỏng trước khi đưa về lưu giữ trong tủ lạnh sâu -80°C tại phòng thí nghiệm cho tới khi tiến hành tách chiết DNA tổng số.

Tách chiết DNA tổng số

Khoảng 200 mg mẫu lá non của loài nghiên cứu được tách DNA tổng số theo phương pháp của Leroy và Leon (2000) hiệu chỉnh phù hợp với điều kiện Việt Nam. Mẫu lá sau khi nghiền mịn trong nitrogen lỏng được bổ sung 640 μl dịch chiết gồm 100 mM Tris-HCl, pH 8; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl, 0,2% β -mercaptoethanol và 10% CTAB, ủ ở 60°C trong 50 phút. Bổ sung tiếp 500 μl phenol: chloroform : isoamylalcohol (25:24:1), trộn đều và ly tâm tốc độ 12000 rpm/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. DNA được rửa bằng isopropanol ở -70°C trong 20 phút, rửa bằng ethanol 70% và làm khô trong máy Speed-Vac, sau đó được hoà tan trong 50 μl dung dịch TE và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Nhân bản gen 18S-rDNA bằng kỹ thuật PCR

Một đoạn gen 18S-rDNA có chiều dài khoảng

600 bp được nhân bản bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 18S-F (TCA AAG ATT AAG CCA TGC ATG TCT) và 18S-R (TAC GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC). Phản ứng PCR được chạy trong tổng thể tích 50 μl gồm 32 μl H_2O , 5 μl đệm 10X PCR, 5 μl dNTP, 3 μl mồi F (30 pM), 3 μl mồi R (30 pM), 1 μl DNA tổng số, 1 μl enzyme *Taq* polymerase. Chương trình chạy PCR được tiến hành theo chu kỳ nhiệt: 4 phút ở 95°C , 30 chu kỳ (50 giây 95°C , 1 phút 55°C , 1 phút 72°C) và sau đó lưu giữ ở 1 chu kỳ ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 1) thì được tinh sạch bằng QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN).

Xác định trình tự gen 18S-rDNA

Trình tự gen 18S-rDNA được xác định theo phương pháp tổng hợp của Sanger và đồng tác giả (1977) với bộ kit xác định trình tự Bigdye terminator v3.1 và máy đọc trình tự ABI 3100 Avant genetic Analyser (Applied Biosystems).

Phân tích dữ liệu

So sánh kết quả giải mã vùng gen 18S-rDNA của loài Sa mộc đầu *Cunninghamia konishii* mọc tự nhiên ở Việt Nam và loài Sa mộc trồng *Cunninghamia lanceolata* nhập từ Trung Quốc vào trồng với 7 loài thuộc các chi khác (Bảng 1) trong họ Hoàng đàn từ dữ liệu trên GenBank bằng phần mềm ClustalX (Thomas *et al.*, 1997), GeneDoc (Nicholas, Nicholas, 1997). Xây dựng cây phả hệ bằng phương pháp Maximum parsimony (MP) và phân tích kết quả bằng phần mềm MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) và PAUP 4.0 (Swofford, 1993).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

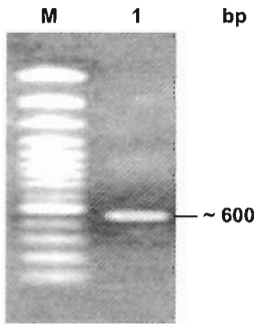
Một đoạn DNA của gen 18S-rDNA của loài Sa mộc trồng có chiều dài khoảng 600 bp được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu 18F và 18R theo phương pháp PCR. Sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% được trình bày ở hình 1. Kết quả cho thấy, chỉ xuất hiện đúng 1 băng DNA có kích thước khoảng 600 bp đúng theo dự kiến. Đoạn DNA này được chọn để tinh sạch và xác định trình tự trên máy đọc trình tự ABI. Chiều dài nucleotide của vùng 18S-rDNA là 703 bp cho loài Sa mộc trồng *C. lanceolata* đã được xác định (Hình 2). Trên cơ sở dữ liệu của 9 loài Hoàng đàn thuộc họ Cupressaceae, thành phần GC dao động từ 49,7% đối với *Metasequoia glyptostroboides* đến

50,4% đối với *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* trung bình 50,0%. Thành phần GC của *Sa* mọc trồng *Cunninghamia lanceolata* và *Sa* mọc dầu *Cunninghamia konishii* đều là 49,8%. Thành phần của mỗi loài Hoàng đàn được trình bày ở bảng 2. Thành phần base của loài *Sa* mọc trồng là A = 24,6%; C = 20,8%; T = 25,6% và G = 29,0%, trong khi ở loài *Sa* mọc dầu các thành phần base tương ứng là 24,6%; 21,1%; 25,6%; và 28,7%. Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, 703 vị trí có giá trị được sử dụng cho phân tích. Trong số 44 vị trí V (Variable), giá trị Pi (Parsimony informative) chiếm 15 vị trí. Số cặp nucleotide tương đồng trung bình 688, cao nhất là 231 xuất hiện ở vị trí codon

thứ hai và thấp nhất là 228 ở vị trí codon thứ ba. Hệ số trung bình của các cặp si (transition) và Sv (transversion) là 1,2. Hệ số này đối với vị trí codon thứ nhất, thứ hai và thứ ba tương ứng là 1,5; 0,6 và 1,4. Tần số cao nhất xuất hiện ở vị trí codon thứ nhất cho cặp C – C là 0,368 và thấp nhất ở cặp T – T là 0,302. Tần số này là 0,380 và 0,299 cho cặp tương ứng T – T và C – C ở vị trí codon thứ hai, tương tự là 0,339 và 0,318 cho cặp tương ứng A – A và T – T ở vị trí codon thứ ba. Các cặp TT, CC, AA và GG chiếm ưu thế ở tất cả 2 vị trí codon, dao động từ 0,184 cho cặp CC thuộc vị trí codon thứ hai đến 0,299 cho cặp GG cũng xuất hiện ở vị trí codon thứ hai.

Bảng 1. Danh sách các loài được dùng để so sánh với 2 loài *Sa* mọc trồng *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. và *Sa* mọc dầu *Cunninghamia konishii* Hayata có ở Việt Nam.

STT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Viết tắt	Mã số trên GenBank
1	<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Bách tán dài loan	<i>T. cryptomerioides</i>	EF673739
2	<i>Calocedrus decurrens</i>	Bách xanh	<i>Ca. decurrens</i>	D85293
3	<i>Cupressus macrocarpa</i>	Hoàng đàn	<i>Cu. macrocarpa</i>	AF051797
4	<i>Chamaecyparis obtusa</i> var. <i>formosana</i>	Cối bạch	<i>Ch. ob. var. formosana</i>	EF673741
5	<i>Cryptomeria japonica</i>	Liễu sam	<i>Cr. japonica</i>	EF673735
6	<i>Sequoia sempervirens</i>	Củ tùng	<i>Se. sempervirens</i>	AY686598
7	<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	Thùy sam	<i>Me. glyptostroboides</i>	L00970



Hình 1. Sản phẩm PCR trên gel agarose 1%. M: DNA 1 kb plus Marker. 1: Mẫu SMTQ-01

Sự khác nhau giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo mô hình Kimura 2 thông số (Kimura, 1980) cũng đã được xác định. Kết quả phân tích đã chỉ ra rằng 2 mẫu *Sa* mọc dầu *C. konishii* và *Sa* mọc trồng *C. lanceolata* có tỷ lệ sai khác là thấp nhất (0,018),

trong khi giữa loài *Sa* mọc dầu *C. konishii* với 7 loài khác chỉ nhưng cùng họ Hoàng đàn có tỷ lệ sai khác lớn hơn, trung bình 0,028 (từ 0,025 với loài *Ch. obtusa* var. *formosana* đến 0,035 với loài *M. glyptostroboides*). Loài *Sa* mọc trồng *C. lanceolata* có tỷ lệ sai khác với 7 loài khác chỉ nhưng cùng họ Hoàng đàn trung bình 0,028 (từ 0,023 với loài *Cryptomeria japonica* đến 0,034 với loài *M. glyptostroboides*). Việc phân tích mối quan hệ di truyền trên cơ sở trình tự nucleotide của vùng 18S-rDNA của 9 loài trong họ Hoàng đàn theo phương pháp MP đã chỉ ra mối quan hệ giữa chúng (Hình 3). Hai nhóm tiến hóa của họ Hoàng đàn đã được xác định. Nhóm thứ nhất gồm 2 loài *Sa* mọc, *Sa* mọc trồng *Cunninghamia lanceolata* và *Sa* mọc dầu *Cunninghamia konishii*. Chúng có quan hệ rất gần gũi với nhau với bootstrap 99% và hệ số sai khác nhỏ ở một số nucleotide, 0,018 (Hình 2). Kết quả nghiên cứu sinh học phân tử này thống nhất với các kết quả nghiên cứu của Lu và đồng tác giả, và bổ sung cho quan điểm trước đây chỉ dựa thuần túy

vào một số đặc điểm hình thái bên ngoài là gộp hai loài này thành một. Và theo nguyên tắc ưu tiên thì *Cunninghamia konishii* chỉ là một thứ của loài *Cunninghamia lanceolata*, var. *konishii* (Hayata) Fujita bên cạnh thứ chuẩn *C. lanceolata* (Lamb.)

Hook. var. *lanceolata*. Nhóm thứ hai gồm các loài còn lại của họ Hoàng đàn với các chi Sequoia, Metasequoia, Taiwania, Cryptomeria, Chamaecyparis, Calocedrus và Cupressus, trong đó 2 chi Sequoia và Metasequoia có quan hệ gần nhau với bootstrap 91%.

< 18S-rDNA		
Cunninghamia konishii	:-.....	: 53
Cunninghamia lanceolata	:-.....	: 53
T. cryptomerioides	:-.....	: 54
Cr. japonica	:-.....	: 54
Ca. decurrens	:A.....	: 54
Se. sempervirens	:-.....	: 54
Cu. macrocarpa	:-.....	: 54
Ch. ob. var. formosana	:-.....	: 54
Me. glyptostroboides	:A.....-.....	: 53
ATAGCgTATATTTAaGTTGTGTCAGTTAAAAAGcTCGTAGTTGGACCTTGGGtC		
Cunninghamia konishii	:C.....	: 107
Cunninghamia lanceolata	:C.....	: 107
T. cryptomerioides	:C.....	: 108
Cr. japonica	:T.....	: 108
Ca. decurrens	:T.....T.....	: 108
Se. sempervirens	:C.....	: 108
Cu. macrocarpa	:T.....	: 108
Ch. ob. var. formosana	:-.....	: 108
Me. glyptostroboides	:-.....	: 107
GTCACGGTCCGCTCCGCTaCT GGTGTGCACTGGCCCTCACGTCCCTTCTGCCG		
Cunninghamia konishii	:A.....	: 161
Cunninghamia lanceolata	:A.....	: 161
T. cryptomerioides	: ..A.....C.....	: 162
Cr. japonica	:-.....	: 162
Ca. decurrens	:-.....	: 162
Se. sempervirens	:C.....T.....	: 162
Cu. macrocarpa	:G.....A.....	: 162
Ch. ob. var. formosana	:G.....	: 162
Me. glyptostroboides	:AC.....T.....T.....	: 161
GCgGcgtGTTCTGCTGCCTTAatTGGCTGGGTC cGGTTCCGGCGCcGTTACTTT		
Cunninghamia konishii	:-.....	: 215
Cunninghamia lanceolata	:-.....	: 215
T. cryptomerioides	:-.....	: 216
Cr. japonica	:-.....	: 216
Ca. decurrens	:-.....	: 216
Se. sempervirens	:-.....	: 216
Cu. macrocarpa	:-.....	: 216
Ch. ob. var. formosana	:-.....	: 216
Me. glyptostroboides	:-.....	: 215
GAAAAAATTAGAGTCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAA		
Cunninghamia konishii	:-.....	: 269
Cunninghamia lanceolata	:-.....	: 269
T. cryptomerioides	:-.....	: 270
Cr. japonica	:-.....	: 270
Ca. decurrens	:-.....	: 270
Se. sempervirens	:T.....	: 270
Cu. macrocarpa	:A.....C.....	: 270
Ch. ob. var. formosana	:-.....	: 270
Me. glyptostroboides	:TC.....	: 269
TAACGcgATAGGAGTCTGGTCTGTtCCGTTGGCCTtCGGGACCGGAGTAATGA		

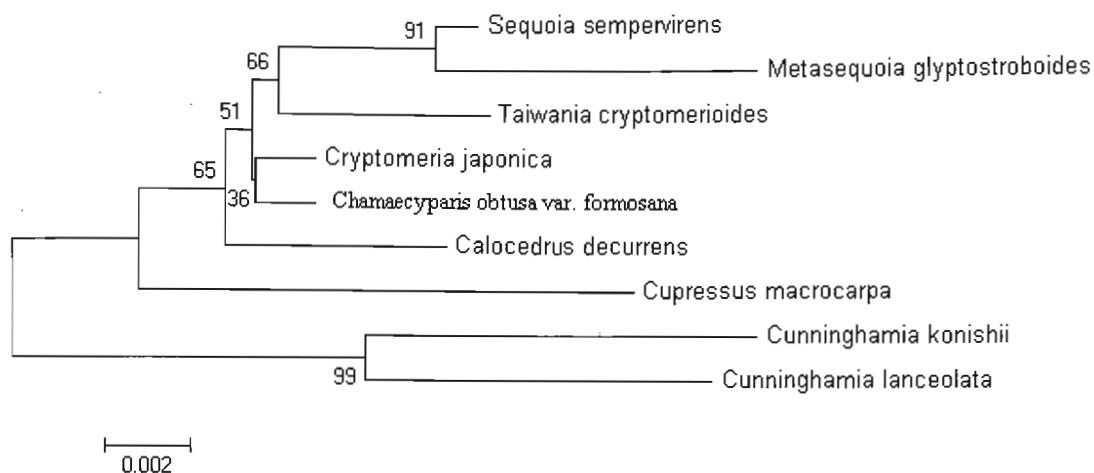
Cunninghamia konishii	:		:	323
Cunninghamia lanceolata	:		:	323
T. cryptomerioides	:		:	324
Cr. japonica	:		:	324
Ca. decurrens	:		:	324
Se. sempervirens	:		:	324
Cu. macrocarpa	:	 A	:	324
Ch. ob. var. formosana	:		:	324
Me. glyptostroboides	:		:	323
TTAATAGGGACTGTCGGgGGCATTCTGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTG				
Cunninghamia konishii	:	 G	:	377
Cunninghamia lanceolata	:	 G	:	377
T. cryptomerioides	:		:	378
Cr. japonica	:		:	378
Ca. decurrens	:		:	378
Se. sempervirens	:		:	378
Cu. macrocarpa	:		:	378
Ch. ob. var. formosana	:		:	378
Me. glyptostroboides	:	-	:	376
gATTTATGGAAGAcGAACCACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTCATTAA				
Cunninghamia konishii	:		:	431
Cunninghamia lanceolata	:		:	431
T. cryptomerioides	:		:	432
Cr. japonica	:		:	432
Ca. decurrens	:		:	432
Se. sempervirens	:		:	432
Cu. macrocarpa	:		:	432
Ch. ob. var. formosana	:		:	432
Me. glyptostroboides	:	 NN.C	:	430
TCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAgaCgATCAGATACcGTCCTAGTCTCAAC				
Cunninghamia konishii	:	 -	:	484
T. cryptomerioides	:	 -	:	485
Cr. japonica	:	 -	:	485
Ca. decurrens	:	 -	:	485
Se. sempervirens	:	 -	:	485
Cu. macrocarpa	:	 -	:	486
Ch. ob. var. formosana	:	 -	:	485
Me. glyptostroboides	:	 -	:	482
Cunninghamia lanceolata	:	 -	:	484
CATAAAcGATGCCGACCAGGG ATCGGCGGATGTTGctCTAAGGAActCCGCCAG				
Cunninghamia konishii	:	 C	:	538
Cunninghamia lanceolata	:	 G	:	538
T. cryptomerioides	:	 -	:	538
Cr. japonica	:	 -	:	538
Ca. decurrens	:	 A	:	538
Se. sempervirens	:	 -	:	538
Cu. macrocarpa	:	 -	:	539
Ch. ob. var. formosana	:	 -	:	538
Me. glyptostroboides	:	 -	:	535
CACCTTcTGaGAAATCAGAGtGTTTgG gttccGG GGgaGtATGGTCGCAAgG				
Cunninghamia konishii	:	 -	:	591
Cunninghamia lanceolata	:	 -	:	591
T. cryptomerioides	:	 -	:	591
Cr. japonica	:	 -	:	591
Ca. decurrens	:	 -	:	591
Se. sempervirens	:	 -	:	591

Cu. macrocarpa	:	T.....	G	: 593
Ch. ob. var. formosana	:	-		: 591
Me. glyptostroboides	:	-		: 588
CTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAcCACCAGGAGTGG AGCCTGCGGc				
Cunninghamia konishii	:	A.....		: 645
Cunninghamia lanceolata	:			: 645
T. cryptomerioides	:	G.....		: 645
Cr. japonica	:			: 645
Ca. decurrens	:			: 645
Se. sempervirens	:			: 645
Cu. macrocarpa	:			: 647
Ch. ob. var. formosana	:			: 645
Me. glyptostroboides	:			: 642
TTAATTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAAGgATTGA				
Cunninghamia konishii	:	G.....		: 699
Cunninghamia lanceolata	:	G..G.....		: 699
T. cryptomerioides	:			: 699
Cr. japonica	:			: 699
Ca. decurrens	:			: 699
Se. sempervirens	:			: 699
Cu. macrocarpa	:	A.....		: 701
Ch. ob. var. formosana	:			: 699
Me. glyptostroboides	:			: 696
CAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTCAtGGccGTTCTTAG				
18S-rDNA>				
Cunninghamia konishii	:		: 703	
Cunninghamia lanceolata	:		: 703	
T. cryptomerioides	:		: 703	
Cr. japonica	:		: 703	
Ca. decurrens	:		: 703	
Se. sempervirens	:		: 703	
Cu. macrocarpa	:		: 705	
Ch. ob. var. formosana	:		: 703	
Me. glyptostroboides	:		: 700	
TTGG				

Hình 2. Vị trí nucleotide khác nhau vùng 18S-rDNA của 9 loài Hoàng đàn.

Bảng 2. Phần trăm base (%) trong đoạn DNA thuộc gen 18S-rDNA của 9 loài thuộc họ Hoàng đàn.

Tên loài	T	C	A	G	Kích thước (bp)
Cunninghamia konishii	25,6	21,1	24,6	28,7	703
Cunninghamia lanceolata	25,6	20,8	24,6	29,0	703
T. cryptomerioides	25,6	21,5	23,9	29,0	703
Cr. japonica	26,2	21,1	23,8	29,0	703
Ca. decurrens	26,2	20,9	23,9	29,0	703
Se. sempervirens	26,0	21,2	23,8	29,0	703
Cu. macrocarpa	26,0	21,0	24,1	24,1	705
Ch. ob. var. formosana	26,0	21,2	23,6	29,2	703
Me. glyptostroboides	26,3	21,2	24,0	28,5	695
Trung bình	25,9	21,1	24,0	28,9	702,3



KẾT LUẬN

Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền trên cơ sở trình tự nucleotide vùng 18S-rDNA của loài Sa mộc trồng *Cunninghamia lanceolata* nhập từ Trung Quốc vào trồng ở Tam Đảo và của loài Sa mộc dầu *Cunninghamia konishii* mọc tự nhiên ở Nghệ An với 7 loài thuộc các chi khác trong cùng họ Hoàng đàn Cupressaceae theo phương pháp MP đó cho thấy: 1. Hai nhóm tiến hóa của họ đã được xác định, trong đó 2 loài Sa mộc *Cunninghamia* tạo thành một nhóm riêng; 2. Giữa 2 loài Sa mộc *Cunninghamia* có mối quan hệ rất mật thiết với nhau (bootstrap 99%) với hệ số sai khác rất nhỏ (0,018). Kết quả nghiên cứu sinh học phân tử này góp phần củng cố quan điểm của nhiều nhà phân loại trước đây chỉ dựa thuần túy vào một số đặc điểm hình thái bên ngoài là nhập *Cunninghamia konishii* Hayata vào loài *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., coi như một thứ, *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* (Hayata) Fujita bên cạnh thứ chuẩn *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. var. *lanceolata*.

Lời cảm ơn: Bài báo này là một phần kết quả của đề tài 6.077.06 thuộc Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên, Việt Nam và đề tài 67-RF2 thuộc Quỹ Nghiên cứu hợp tác Việt Nam - Thụy Điển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Farjon A (2005) A Monograph of Cupressaceae and

Sciadopitys: 84-90. Royal Botanic Gardens, Kew.

Fu LG, Yu YF, RB Mill (1999) Taxodiaceae. In Wu ZY & PH Raven (eds.). *Flora of China* 4. Science Press (Beijing) & Missouri Botanical Garden Press (St. Louis): 54-61.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.

Lu SY, Chiang TY, Hong KH, Hu TW (1999) Re-examination of the Taxonomic Status of *Cunninghamia konishii* and *C. lanceolata* Based on the RFLPs of a Chloroplast *trnD-trnT* Spacer. *Taiwan J Forest Sci* 14(1): 13-19.

Hiep NT, Vidal JE (1996) Taxodiaceae. In *Fl. Camb., Laos et Vietn*, vol. 28. Muséum National d'Histoire Naturelle. Laboratoire de Phanérogamie, Paris: 51-64.

Nguyễn Tiến Hiệp, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tô Đức Lưu, Thomas PI, Farjon A, Averyanov L, Regalado JJr (2004) *Thông Việt Nam: Nghiên cứu hiện trạng và bảo tồn 2004*: 55-56. Fauna & Flora International, Chương trình Việt Nam, Hà Nội.

Nicholas KB, HBJ Nicholas (1997) *GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments*.

Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp (1999) *Cunninghamia konishii* Hayata có mọc hoang dại ở Việt Nam hay không và tên khoa học của cây Sa mộc dầu là gì? Tuyển tập công trình hội thảo Đa dạng sinh học Bắc Trường Sơn (lần thứ hai): 61-64. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467.

Swofford DL (1993) PAUP*: *Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1*. Champaign, IL: Illinois Natural History Survey.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 10: 1093.

Thomas JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLASTALW-improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific

gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22: 4673-4680.

Thompson JD, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin, DG Higgins (1997) The Clustal_X Windows interface: flexible stragies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 25: 4876-4882.

Leroy XJ, Leon K (2000) A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-Microsatellite primers. *Plant Mole Biol Rep* 18: 283a-283g.

CONTRIBUTION TO THE SYSTEMATIC RELATIONSHIP BETWEEN *CUNNINGHAMIA LANCEOLATA* AND *CUNNINGHAMIA KONISHII* (CUPRESSACEAE) IN VIETNAM BASED ON THE 18S-rDNA SEQUENCE DATA

Nguyen Thi Phuong Trang¹, Nguyen Minh Tam^{1,2,*}, Phan Ke Long¹, Phan Ke Loc³

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

²Vietnam National Museum of Nature, VAST

³University of Natural Sciences, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

The systematic relationship between *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. and *Cunninghamia konishii* Hayata in Vietnam was investigated by using the 18S-rDNA sequence data. DNA was extracted from young leaves of introduced and cultivated *Cunninghamia lanceolata* and of native *Cunninghamia konishii*. The nucleotide sequence of 18S-rDNA was determined with 703 bp and used to analysis of phylogeny of *Cunninghamia lanceolata* by MP method, together with another species of the same genus, *Cunninghamia konishii* Hayata, and 7 species of another genera of the same family Cupressaceae, namely *Taiwania cryptomerioides*, *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Cryptomeria japonica*, *Calocedrus decurrens*, *Cupressus macrocarpa*, *Sequoia sempervirens*, and *Metasequoia glyptostroboides*. The cladiogram has indicated that *Cunninghamia lanceolata* and *Cunninghamia konishii* were found a cluster with bootstrap 99% and the very low level of the sequence divergence in 18S-rDNA, 0.018. We suggest an identity hypothesis between these two species, and recognize *Cunninghamia konishii* Hayata as a variety of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., var. *konishii* (Hayata) Fujita, beside the typical var., var. *lanceolata*.

Keywords: *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook., *Cunninghamia konishii* Hayata, systematic relationship, 18S rDNA

* Author for correspondence: Tel: 84-4-39941215; E-mail: ngtam@hn.vnn.vn