

## TRÌNH TỰ CYTOCHROME B CỦA SAO LA (*PSEUDORYX NGHETINHENSIS*)

Nguyễn Minh Tâm<sup>1, 2</sup>, Nguyễn Thị Phương Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Đặng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

<sup>2</sup>Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

### TÓM TẮT

Chúng tôi đã tiến hành điều tra vị trí phân loại của loài Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) thu thập được ở A Lưới (Thừa Thiên - Huế) trên cơ sở xác định trình tự nucleotide vùng cytochrome b. DNA tổng số được tách từ mô xương và sừng của mẫu tiêu bản Sao la được lưu trữ trong Bảo tàng Động vật (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật). Vùng cytochrome b được nhân bản trên cơ sở cặp mồi đặc hiệu. Trình tự nucleotide vùng cytochrome b của Sao la đã được xác định với kích thước 333 bp và sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền cùng với 8 loài thú móng guốc khác và loài Sao la ở Vũ Quang. Dữ liệu phân tích đã chỉ ra rằng, loài Sao la ở cả 2 vùng địa lý (Hà Tĩnh và Thừa Thiên - Huế) đều có quan hệ mật thiết với nhau (bootstrap 100%). Hệ số sai khác của loài này ở 2 vùng địa lý là nhỏ 3,8%. Kết quả cũng chỉ ra 4 nhóm loài thú móng guốc có quan hệ mật thiết với nhau (bootstrap > 80%).

**Từ khóa:** A Lưới, cây phát sinh phả hệ, cytochrome b, Sao la

### MỞ ĐẦU

Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*, Bovidae) được phát hiện ở khu Bảo tồn Thiên nhiên Vũ Quang (Hà Tĩnh) vào năm 1992 (Dung *et al.*, 1993), phân bố trong vùng núi Bắc Trung Bộ thuộc khu vực biên giới Việt - Lào, bao gồm các tỉnh từ Hà Tĩnh đến Thừa Thiên - Huế. Nơi sống của Sao la rất đa dạng với độ cao và kiểu thảm thực vật khác nhau, bao gồm rừng hỗn giao với các loài cây phổ biến thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae) và rừng nhiệt đới núi cao với các loài cây lá kim chiếm ưu thế ở độ cao trên 2000 m (Dung *et al.*, 1993), có thể gặp Sao la dọc theo suối lớn trong rừng nhiệt đới núi thấp ở độ cao khoảng 200 m (Dung *et al.*, 1994). Cũng theo các tác giả này, Sao la có thể được bắt gặp ở khu vực núi cao vào mùa hè khi nguồn nước suối phong phú và ở độ cao thấp hơn vào mùa đông khi nguồn nước suối trên cao khô cạn. Cấu trúc thảm thực vật của nơi sống gồm tầng tán với các loài cây thường xanh lá rộng và tầng dưới tán với các loài thuộc họ Hòa thảo (Poaceae) và Cau dừa (Arecaceae) (Schaller, Rabinowitz, 1995).

Sao la đang bị đe dọa ở mức độ C1+2a (IUCN, 2004) liên quan đến nơi sống bị suy giảm và phân cắt. Phá rừng làm nương rẫy và hình thành các khu dân cư là hình thức phổ biến. Rừng bị chặt trụi và biến thành đất nông nghiệp hoặc thảm cỏ cây bụi. Hơn nữa, hoạt động săn bắn của người dân địa phương cũng làm suy giảm nghiêm trọng đến số

lượng cá thể của loài này. Số lượng cá thể trong quần thể bị thu nhỏ và bị phân cắt thành các đơn vị nhỏ hơn và bị cô lập. Khoảng vài trăm cá thể Sao la đang tồn tại ở khu vực biên giới Việt - Lào (Schaller, Rabinowitz, 1995).

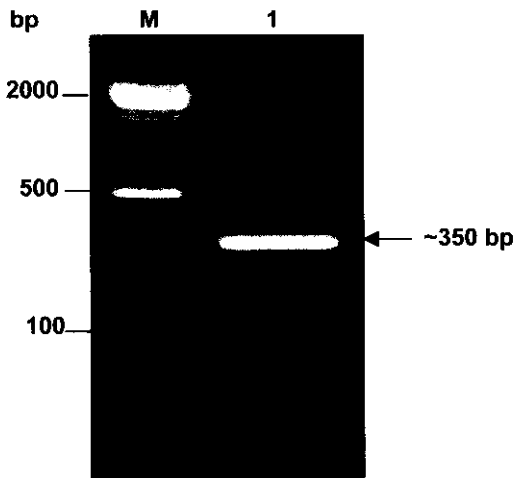
Đã có một số công trình nghiên cứu về di truyền của Sao la trên cơ sở phân tích chỉ thị phân tử DNA và hệ gen ty thể (Hassanin, Douzery, 1999) và so sánh cytogenetic của Sao la và Bò (*Bos taurus*) dùng G- and Q-banding và FISH (Ahrens *et al.*, 2005). Hassanin và Douzery (1999) đã xếp chúng trong họ phụ Bovinae và giả thiết Sao la thuộc Tông Bovini. Hernandez-Fernandez và Vrba (2005) đã xếp chúng vào Tông Pseudorygini trên cơ sở nghiên cứu cây phát sinh phả hệ của Ruminantia. Trong bài báo này, chúng tôi đề cập đến mối quan hệ di truyền trên cơ sở kết quả nghiên cứu vùng cytochrome b (cytb) của Sao la thu thập được ở A Lưới (Thừa Thiên - Huế), kết hợp với dữ liệu đã công bố loài này ở Vũ Quang (Hà Tĩnh) cùng với một số loài thú móng guốc khác (Bovidae) đã được lưu trữ trong GenBank để hiểu rõ hơn về tiến hóa phân tử của Sao la.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

DNA tổng số của Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) được tách chiết từ mẫu xương và sừng của mẫu vật trong Bảo tàng Động vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, được thu thập từ A

Lưới, Thừa Thiên - Huế. Để loại bỏ calcium trong xương và sừng, 1 g mẫu sau khi nghiền thành bột mịn trong nitrogen lỏng được chuyển vào ống eppendorf 1,5 ml và xử lý với 1 ml EDTA 0,5 M với pH 7,5 và lắc ở 4°C trong 24 h. Tiếp theo, mẫu nghiền được ly tâm 14.000 rpm trong 15 phút, rửa sạch 3 lần bằng nước cất khử trùng. DNeasy Blood & Tissue Kit (Hãng QIAGEN) được sử dụng để tách chiết DNA tổng số.

Thể tích phản ứng PCR là 50 ml, trong đó chứa các thành phần gồm 32 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml buffer, 5 ml dNTP, 3 ml mỗi cytb-F (30 pM), 3 ml mỗi cytb-R (30 pM), 1 ml DNA tổng số và 1 ml Taq-polymerase. Cặp mồi (*Cytb*-F: 5'- GGC CTG TAT TAC GGA TCA TAT -3' và *Cytb*-R: 5'- GAA TGG GAT TTT GTC TGC GTC-3') được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của vùng cytochrome b (*cytb*) của loài Bò tót (*Bos gaurus*) đã được lưu trữ trong GenBank. Nhân bản DNA được tiến hành trên máy PCR-Thermal Cycler (The Eppendorf Mastercycler) theo chu kỳ nhiệt: 3 phút ở 95°C, 30 chu kỳ (50 giây 95°C, 45 giây 55°C, 45 giây 72°C) và sau đó là 1 chu kỳ ở 72°C trong 5 phút. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% trong 40 ml dung dịch đệm 1xTAE (Hình 1). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Hãng QIAGEN).



**Hình 1.** Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, M: Thang chuẩn DNA (1 kb DNA ladder), 1: Sản phẩm PCR của Sao la.

Đọc trình tự nucleotide vùng *cytb* được xác định với kit BigDye terminator v3.1 và máy đọc trình tự

ABI 3100 Avant genetic Analyzer (Applied Biosystems) có tại Viện Công nghệ sinh học. Mỗi *cytb*-F được dùng để giải mã vùng cytochrome b. Trước khi đọc trình tự nucleotide trên máy, sản phẩm PCR được tinh sạch dùng sephadex G50 (Hãng Sigma).

So sánh sự khác nhau về vị trí các nucleotide giữa các cặp loài dùng ClustalW (Thomas *et al.*, 1994) và GeneDoc2.5 (Nicholas, Nicholas, 1997). Phần mềm MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) được sử dụng để phân tích dữ liệu. Trình tự nucleotide vùng cytochrome b của 10 loài thú móng guốc, bao gồm DQ379301, AY157735, AF026885, DQ459331, EF197952, AY689189, AY702618, DQ459334 và AF091635 (GenBank: www.cbhi.nlm.nih.gov) được sử dụng trong bài báo này.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chiều dài của vùng *cytb* 333 bp đã được xác định cho loài Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) ở A Lưới, Thừa Thiên - Huế. Vị trí nucleotide khác nhau của 9 loài thú móng guốc (Artiodactyla) của vùng cytochrome b được trình bày ở hình 1.

Trên cơ sở dữ liệu của 9 loài thú móng guốc (Artiodactyla), thành phần GC dao động từ 41,3% (*Pseudoryx nghetinhensis* ở Vũ Quang) đến 45,6% (*Capricornis sumatraensis*), trung bình 42,5%. Thành phần GC của Saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) thu thập ở A Lưới (Thừa Thiên - Huế) là 42,3%, cao hơn 1,0% với loài này ở Vũ Quang (Hà Tĩnh). Thành phần các base cho mỗi loài thú móng guốc được trình bày ở bảng 1. Thành phần base của loài Sao la ở Vũ Quang là A = 26,6; C = 27,5; A = 32,1 và G = 13,8%, trong khi đó loài này ở A Lưới tương ứng là 26,7; 27,3; 30,9 và 15,0%. Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, 327 vị trí có giá trị được sử dụng cho phân tích. Trong số 108 vị trí V (Variable), giá trị Pi (Parsimony informative) chiếm 64 vị trí. Số cặp nucleotide tương đồng trung bình 286. Số cặp tương đồng cao nhất là 105 xuất hiện ở vị trí codon thứ 2 và thấp nhất là 82 ở vị trí codon thứ 3. Hệ số trung bình của các cặp Si (transition) và Sv (transversion) là 2,7. Hệ số này đối với vị trí codon thứ nhất, thứ hai và thứ ba là 4,5; 2,5 và 2,3, tương ứng. Tần số cao xuất hiện ở vị trí codon thứ nhất cho cặp A - A và G - G là 0,31 và 0,13, tương ứng. Tần số này là 0,35 và 0,29 cho T - T và C - C, tương ứng ở vị trí codon thứ hai và 0,36 và 0,24 cho A - A và C - C, tương ứng ở vị trí codon thứ ba.

|                                                              |                                                       |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| < Cytochrome b                                               |                                                       |
| ACATGAACACATCGGAGTAATTCTACCTAAGTCACAGTAATAGCCACAGCATTGCATAG  |                                                       |
| <i>Bos javanicus</i>                                         | : .....-....T.....-T..TA-.T.....T.....-.....: 55      |
| <i>Bos sauveli</i>                                           | : .....-....T.....-T..TA-.T.....T.....-.....: 55      |
| <i>Bos gaurus</i>                                            | : .....-..T.....C..-T..GC-.....-.....: 55             |
| <i>Bubalus amee</i>                                          | : .....-.....C..-A....-..G.....-T....: 55             |
| <i>Axis porcinus</i>                                         | : .....-....T.....C..-.....-...G..T.....-..G...: 55   |
| <i>Cervus eldi</i>                                           | : .....-....T.....-.....-T.....T....A.....-..G...: 55 |
| <i>Moschus berezovski</i>                                    | : .....-.....C..C..-T...-.....-.....: 55              |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>                              | : .....-.....-....C-.....ACG.....-.....: 55           |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> VU:                           | .....-.....-.....-T..C.....T.....-T....: 55           |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> A :                           | .....TCGT..AG...G.....T.GC....G..T.....T...T.: 59     |
| GATATGTCCTACCATGACCGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACC  |                                                       |
| <i>Bos javanicus</i>                                         | : .....G.....--.....T....G.....T.....:112             |
| <i>Bos sauveli</i>                                           | : .....A.....--.....G....T....G.....T.....:112        |
| <i>Bos gaurus</i>                                            | : ...C.....--.....:112                                |
| <i>Bubalus amee</i>                                          | : ...C..A..G.....--.....G.....:112                    |
| <i>Axis porcinus</i>                                         | : .....--.....G.....T..T.....:112                     |
| <i>Cervus eldi</i>                                           | : .G.....T.....--.....G.....:112                      |
| <i>Moschus berezovski</i>                                    | : .....T...--.....T.....T..T...T.:112                 |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>                              | : .C.....--.....G..T....T..T.....:112                 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> VU:                           | ...C..A.....G--.....T.....:112                        |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> A :                           | ...C..A....G..G..A.....T.....:118                     |
| TCCTATCAGCAATCCCATACATCGGCACAAATGTAGTCGAATGAATCTGAGGCGGATTC  |                                                       |
| <i>Bos javanicus</i>                                         | : .....T.....T.....:171                               |
| <i>Bos sauveli</i>                                           | : .....T.....T.....T.....:171                         |
| <i>Bos gaurus</i>                                            | : ..T.....T.....:171                                  |
| <i>Bubalus amee</i>                                          | : .T..C.....T..T...G...G..T..G....T....G.....:171     |
| <i>Axis porcinus</i>                                         | : ...C.....T.....G..C..T:171                          |
| <i>Cervus eldi</i>                                           | : ...C.....T.....G..C..T:171                          |
| <i>Moschus berezovski</i>                                    | : .T..C.....T..T...T..T..T...G..T.....A..C...:171     |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>                              | : ...C.....T.....C.....A.....:171                     |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> VU:                           | .....T..T.....C.....T.....C...:171                    |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> A :                           | .....T..T.....C.....T.....C...:177                    |
| TCAGTAGACAAAGCAACCCCTCACCCGATTCTTCGCCTTCCACTTTATCCTCCCATTTAT |                                                       |
| <i>Bos javanicus</i>                                         | : .....T.....T.....T.....T....C...:230                |
| <i>Bos sauveli</i>                                           | : .....T.....T.....T.....T....C...:230                |

|                                    |   |                               |      |
|------------------------------------|---|-------------------------------|------|
| <i>Bos gaurus</i>                  | : | .....T.....T.....T.....T..... | :230 |
| <i>Bubalus amee</i>                | : | .....A..T....C.....C....      | :230 |
| <i>Axis porcinus</i>               | : | .....T.A.....T.....T.....     | :230 |
| <i>Cervus eldi</i>                 | : | .....T.....G.....T.....T..... | :230 |
| <i>Moschus berezovski</i>          | : | .....A.....T.....C.....       | :230 |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>    | : | ..C.....C.....T.....T..C..... | :230 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> VU: | : | .....T.....T.....T.....       | :230 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> A:  | : | .....T.....T.....T.....       | :236 |

CATCACAGCACTTGCTATAGTCCACCTACTATTCCGCCACGAAACAGGATCCAACAACC

|                                    |   |                                        |      |
|------------------------------------|---|----------------------------------------|------|
| <i>Bos javanicus</i>               | : | .....A...C.....T.....C.....T..         | :289 |
| <i>Bos sauveli</i>                 | : | ....G....A...C.....T.....C.....T..     | :289 |
| <i>Bos gaurus</i>                  | : | ....T...A...C.....T.....C.....T..      | :289 |
| <i>Bubalus amee</i>                | : | T...G.....A.....T...T.....             | :289 |
| <i>Axis porcinus</i>               | : | T..TG.....CA.....A.....T.....T....     | :289 |
| <i>Cervus eldi</i>                 | : | ....G.....A...T...T...T....G.....T.... | :289 |
| <i>Moschus berezovski</i>          | : | ....G.....C....G..T.....C..T.....      | :289 |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>    | : | ....T...T..C..C....A.....T.....        | :289 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> VU: | : | ....T.....A.....T.....T....            | :289 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> A:  | : | ....T.....A.....T.....T....            | :295 |

#### Cytochrome b>

CAACAGGAGTCTCATCAGACGCAGACAAAATCCCATTCC

|                                    |   |                             |       |
|------------------------------------|---|-----------------------------|-------|
| <i>Bos javanicus</i>               | : | .....G...C.....             | : 327 |
| <i>Bos sauveli</i>                 | : | .....G...C.....T.....       | : 327 |
| <i>Bos gaurus</i>                  | : | .....C.....T.....           | : 327 |
| <i>Bubalus amee</i>                | : | .....A.....                 | : 327 |
| <i>Axis porcinus</i>               | : | .....C.....T.....T.....C... | : 327 |
| <i>Cervus eldi</i>                 | : | .....C.....T.....T..C...    | : 327 |
| <i>Moschus berezovski</i>          | : | .....AT.....AT.....         | : 327 |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>    | : | ..C.....C.....A.....        | : 327 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> VU: | : | .....                       | : 327 |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> A:  | : | .....                       | : 333 |

**Hình 1.** Vị trí nucleotide khác nhau vùng cytochrome b của 9 loài thú móng guốc.

Sự khác nhau giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo mô hình Kimura 2- thông số đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài thú móng guốc (Bảng 2). Dữ liệu nghiên cứu đã chỉ ra rằng 2 loài bò Java (*Bos javanicus*) và bò xám (*B. sauveli*) có tỉ lệ sai khác thấp nhất 1,6%, tiếp đó là cặp bò Java và bò tót

(*B. gaurus*) là 7,2%. Giá trị sai khác lớn nhất được tìm thấy ở cặp loài Hươu xạ (*Moschus berezovskii*) và Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) ở A Lưới (18,7%). Hệ số sai khác giữa loài Sao la ở Vũ Quang (Hà Tĩnh) và A Lưới (Thừa Thiên - Huế) là 3,8%. Sự sai khác của loài Sao la ở 2 địa điểm thu mẫu khác

xa nhau về địa lý (khoảng 150 km) có thể liên quan đến môi trường sống của chúng.

Phân tích mối quan hệ di truyền trên cơ sở dữ liệu cytochrome b của 9 loài thú móng guốc theo phương pháp NJ (Neighbor Joining) đã chỉ ra mối quan hệ giữa các loài thú móng guốc (Hình 2). 4 nhóm loài thú móng guốc có quan hệ di truyền mật thiết với nhau, với bootstrap > 80%, bao gồm nhóm thứ nhất với các loài thuộc giống Bos (*B. javanicus*, *B. sauveli* và *B. gaurus*) với bootstrap 97%, nhóm 2 gồm 2 loài *Bos javanicus* và *B. sauveli* (bootstrap

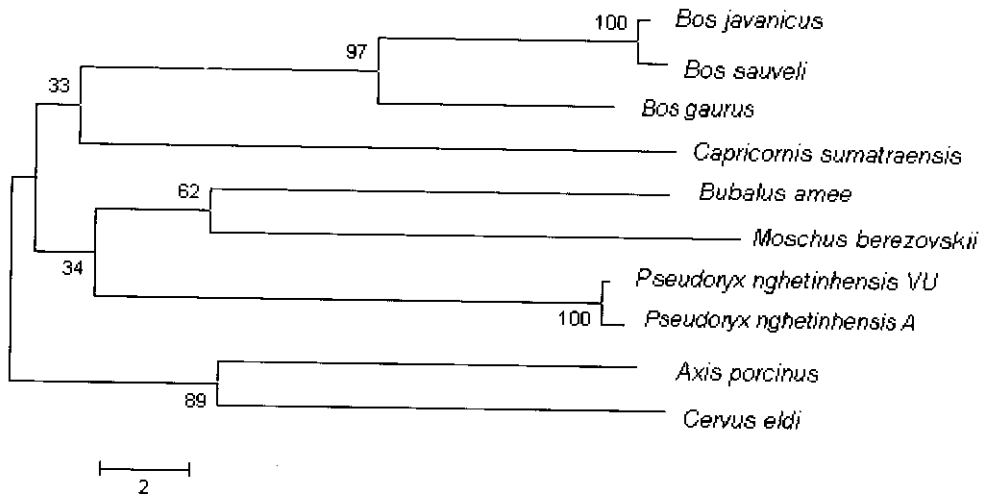
100%), nhóm thứ 3 gồm loài Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) ở 2 huyện Vũ Quang (Hà Tĩnh) và A Lưới (Thừa Thiên - Huế) với bootstrap 100%, và nhóm cuối cùng gồm 2 loài thuộc họ Hươu nai (Cervidae): *Axis porcinus* và *Cervus eldi* (89%). Một số nhóm khác có quan hệ di truyền yếu hơn với bootstrap từ 33 đến 62%. Nhóm gồm 3 loài thuộc giống Bos và loài *Capricornis sumatraensis* (Sơn dương) với bootstrap 33%, nhóm *Bubalus amee*/*Moschus berezovski* (62%) và nhóm *Pseudoryx nghetinhensis*/*Bubalus amee*/*Moschus berezovski* (34%).

Bảng 1. Thành phần base (%) trong các vùng cytb của 9 loài thú móng guốc

| Loài                                | T    | C    | A    | G    | Kích thước (bp) |
|-------------------------------------|------|------|------|------|-----------------|
| <i>Axis porcinus</i> (Hươu vàng)    | 26,9 | 27,8 | 30,3 | 15,0 | 327             |
| <i>Cervus eldi</i> (Nai cà tong)    | 27,5 | 26,6 | 30,0 | 15,9 | 327             |
| <i>Moschus berezovskii</i>          | 27,3 | 27,6 | 30,3 | 14,4 | 327             |
| <i>Capricornis sumatraensis</i>     | 23,9 | 31,8 | 30,6 | 13,8 | 327             |
| <i>Bos javanicus</i> (Bò Java)      | 26,9 | 26,9 | 31,5 | 15,0 | 327             |
| <i>B. sauveli</i> (Bò xám)          | 27,5 | 26,3 | 31,2 | 15,0 | 327             |
| <i>B. gaurus</i> (Bò tốt)           | 25,7 | 28,4 | 31,8 | 14,1 | 327             |
| <i>Bubalus amee</i>                 | 24,8 | 27,8 | 31,5 | 15,9 | 327             |
| <i>Pseudoryx nghetinhensis</i> (VU) | 26,6 | 27,5 | 32,1 | 13,8 | 327             |
| <i>P. nghetinhensis</i> (A)         | 26,7 | 27,3 | 30,9 | 15,0 | 333             |
| Trung bình                          | 26,4 | 27,8 | 31,0 | 14,7 | 327,6           |

Bảng 2. Hệ số khác nhau giữa các cặp loài thú móng guốc trên dữ liệu nucleotide.

|                                    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. <i>Bos javanicus</i>            |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2. <i>B. sauveli</i>               | 0,016 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3. <i>B. gaurus</i>                | 0,072 | 0,079 |       |       |       |       |       |       |       |
| 4. <i>Bubalus amee</i>             | 0,144 | 0,140 | 0,133 |       |       |       |       |       |       |
| 5. <i>Axis porcinus</i>            | 0,154 | 0,162 | 0,151 | 0,152 |       |       |       |       |       |
| 6. <i>Cervus eldi</i>              | 0,139 | 0,146 | 0,155 | 0,172 | 0,086 |       |       |       |       |
| 7. <i>Moschus berezovskii</i>      | 0,186 | 0,178 | 0,167 | 0,124 | 0,140 | 0,168 |       |       |       |
| 8. <i>Capricornis sumatraensis</i> | 0,138 | 0,154 | 0,132 | 0,147 | 0,128 | 0,144 | 0,135 |       |       |
| 9. <i>P. nghetinhensis</i> (VU)    | 0,118 | 0,129 | 0,122 | 0,122 | 0,144 | 0,132 | 0,143 | 0,139 |       |
| 10. <i>P. nghetinhensis</i> (A)    | 0,156 | 0,168 | 0,160 | 0,168 | 0,183 | 0,171 | 0,187 | 0,186 | 0,038 |



Hình 2. Mối quan hệ di truyền của 9 loài thú móng guốc theo phương pháp NJ.

## KẾT LUẬN

Dữ liệu về trình tự nucleotide vùng cytochrome b của Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) được thu thập ở A Lưới (Thừa Thiên - Huế) cùng với 8 loài thú móng guốc, *Bos javanicus*, *B. sauveli*, *B. gaurus*, *Capricornis sumatraensis* và *Bubalus amee* (Bovidae), *Axis porcinus* và *Cervus eldi* (Cervidae), *Moschus berezovskii* (Mischidae), và loài Sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) ở Vũ Quang đã được phân tích theo phương pháp NJ đã chỉ ra rằng loài Sao la ở cả 2 vùng địa lý (Hà Tĩnh và Thừa Thiên - Huế) đều có quan hệ mật thiết với nhau (bootstrap 100%). Hệ số sai khác của loài này ở 2 vùng địa lý là rất nhỏ 3,8%. Kết quả cũng chỉ ra 4 nhóm loài thú móng guốc có quan hệ mật thiết với nhau (bootstrap > 80%). 3 loài thú móng guốc thuộc giống Bos (*B. javanicus*, *B. sauveli* và *B. gaurus*) có quan hệ mật thiết với nhau (bootstrap 97%) và hình thành một nhánh tiến hóa trong họ Trâu bò (Bovidae). Nhánh tiến hóa thứ 2 gồm 2 loài (*Axis porcinus* và *Cervus eldi*) thuộc họ Hươu nai (Cervidae).

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học đã giúp chúng tôi trong phân giải trình tự nucleotide.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahrens E, Graphodatskaya, Nguyen BX, Stranzinger G (2005) Cytogenetic comparison of saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) and cattle (*Bos taurus*) using G- and Q-banding and FISH. *Cytogenet Genome Res* 111: 147-151.
- Vu Van Dung, Pham Mong Giao, Chinh NC, Do Tuoc, MacKinnon J (1993) A new species of living bovid from Vietnam. *Nature* 363: 443-445.
- Vu Van Dung, Pham Mong Giao, Nguyen Ngoc Chinh, Do Tuoc, MacKinnon J (1994) Discovery and conservation of the Vu Quang ox in Vietnam. *Oryx* 28(1): 16-21.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) (2004) *2004 IUCN Red List of Threatened Species*.
- Hassanin A, Douzery EJP (1999) Evolutionary affinities of the enigmatic saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) in the context of the molecular phylogeny of Bovidae. *Proc R Soc Lond B* 266(1422): 893-900.
- Hernandez-Fernandez M, Vrba ES (2005) A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. *Biol Rev* 80: 269-302.
- Nicholas KB, Nicholas HBJ (1997) *GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence*

alignments.

Schaller G, Rabinowitz A (1995) The saola or spindlehorn bovid *Pseudoryx nghetinhensis* in Laos. *Oryx* 29: 107-114.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA)

software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: 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.

## NUCLEOTIDE SEQUENCE OF CYTOCHROME B OF SAOLA (*PSEUDORYX NGHETINHENSIS*)

Nguyen Minh Tam<sup>1,2,\*</sup>, Nguyen Thi Phuong Trang<sup>1</sup>, Nguyen Xuan Dang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Biological Resources*

<sup>2</sup>*Vietnam National Museum of Nature*

### SUMMARY

We investigated the systematic position of Saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) in A Luoi (Thua Thien Hue) using the cytochrome b region. DNA was extracted from tissue of born and horn. The nucleotide sequence of cytochrome b was determined with 333 bp and used to analysis of phylogeny of Saola using neighbor joining method, together with 8 mammal species including *Bos javanicus*, *B. sauveli*, *B. gaurus*, *Capricornis sumatraensis* and *Bubalus amee* (Bovidae), *Axis porcinus* and *Cervus eldi* (Cervidae), *Moschus berezovski* (Mischidae), and Saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) in Vu Quang (Ha Tinh). The analysis indicated that Saola in Vu Quang and A Luoi formed a cluster with bootstrap 100%. The results also indicated that very low level of the sequence divergence was found in cytochrome b between Saola in Vu Quang and A Luoi (3.8%). The bootstrap supports monophyletic clade of Bos group including *B. javanicus*, *B. sauveli* and *B. gaurus* in Bovidae.

**Keywords:** A Luoi, cytochrome b, phylogeny, *Pseudoryx nghetinhensis*

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-22109211; E-mail: [ngtam@hn.vnn.vn](mailto:ngtam@hn.vnn.vn)