

Xác định ADN mã vạch giống Keo lai TB01 và BV71

(*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) phục vụ giám định giống cây

Hà Văn Huân, Bùi Thị Mai Hương

Trường Đại học Lâm nghiệp

Identification of DNA barcode sequence of hybrid acacia TB01 and BV71

(*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*)

Ha Van Huan, Bui Thi Mai Huong

Vietnam National University of Forestry

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.3.2024.010-021>

TÓM TẮT

Giống Keo lai TB01 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) và BV71 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) là giống cây có giá trị kinh tế cao đã được công nhận giống theo quyết định 1998/QĐ/BNN-KHCN ngày 11/07/2006. Tuy nhiên, đối với những người nông dân việc xác định giống chỉ bằng hình thái là hết sức khó khăn. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là sử dụng phương pháp ADN mã vạch để xác định các giống Keo lai TB01, BV71. ADN tổng số được tách chiết từ các mẫu lá của TB01, BV71 và được sử dụng để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR. Các kết quả chỉ ra rằng các băng của sản phẩm PCR đúng với kích thước dự kiến như 485 bp, 815 bp, 423 bp và 377 bp cho *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* và *ITS2*, tương ứng. Các trình tự này sau đó được so sánh với các trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI). Kết quả đã chỉ ra rằng giống Keo lai TB01, BV71 có tỷ lệ tương đồng 100% của trình tự đoạn gen *rbcl*, tương đồng 99,75% của đoạn gen *matK*, tương đồng 99,76% của đoạn gen *trnH-psbA*, tương đồng 99,73% của đoạn gen *ITS2*. Kết quả cho thấy có thể sử dụng các chỉ thị *matK*, *trnH-psbA* và *ITS2* làm ADN mã vạch để giám định giống Keo lai TB01, BV71 ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu là cơ sở quan trọng cho việc xác định giống Keo lai TB01, BV71 đang trồng ở nước ta phục vụ các định hướng phát triển trong tương lai.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 23/02/2024

Ngày phản biện: 25/03/2024

Ngày quyết định đăng: 19/04/2024

Từ khóa:

ADN mã vạch, giám định loài,
Keo lai TB01, Keo lai BV71, PCR.

Keywords:

BV71, DNA barcoding, identify
species, PCR, TB01.

ABSTRACT

The hybrid *Acacia* TB01 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) and BV71 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) had been recognized as a high economic value species according to Decision 1998/QĐ/BNN-KHCN on July 11th in 2006. However, it is very hard for the farmers to identify this species by observation. Therefore, this study aimed to develop a method using DNA barcode fragments to identify the hybrid *Acacia* TB01 and BV71. The total genomic DNA was extracted from leaf samples of TB01 and BV71 and was used to amplify the DNA barcodes (*matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* and *ITS2*) by PCR. The results showed that the bands of PCR production have the expected size, which is 485 bp, 815 bp, 423 bp and 377 bp for *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* and *ITS2* fragments, respectively. After that, these sequences were aligned with the sequence of those genes of other *Acacia* species in NCBI. The results indicated that TB01 with *rbcl* gene fragment is 100% similar to BV71, *ITS2* gene fragment is 99.73% similar to BV71, *trnH-psbA* gene fragment is 99.76% similar to BV71, *matK* gene fragment is 99.75% similar to BV71. These results suggest it is best to use *matK*, *trnH-psbA* and *ITS2* molecular markers as a DNA barcode to identify Hybrid *Acacia* TB01 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) and BV71 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) in Vietnam. These results are an important basis for the identification of hybrid *Acacia* TB01 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) and BV712 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) in our country for future development orientations.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Keo thuộc chi Keo Acacia là loài cây thân gỗ. Hiện nay người ta biết khoảng 1300 loài cây Keo trên toàn thế giới, trong đó khoảng 950 loài có nguồn gốc ở Australia và phần còn lại phổ biến trong các khu vực khô của vùng nhiệt đới và ôn đới ẩm trong đó có Việt Nam [1, 2]. Cây Keo là loài cây gỗ có giá trị kinh tế cao như làm nguyên liệu sản xuất giấy, làm gỗ trong xây dựng, đồ gỗ nội thất, sử dụng sản xuất nước hoa... Keo lai TB01, BV71 được tạo ra từ hai loài Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) là giống Keo lai tự nhiên đã được công nhận là giống quốc gia (1998/QĐ/BNN-KHCN ngày 11/07/2006) với các đặc điểm ưu việt như chống chịu bệnh tốt, chất lượng gỗ tốt, ít cành nhánh, năng suất đạt 30-35 m³/ha/năm. Hiện nay trên thị trường có rất nhiều giống Keo lai khác nhau mà bằng phân biệt về mặt hình thái rất khó để phân loại. Do vậy, việc nghiên cứu xác định các đoạn ADN mã vạch cho giống Keo lai TB01 và BV71 phục vụ giám định giống là cần thiết và cấp bách cho việc định danh và phát triển vùng trồng cho giống lai TB01 và BV71 ở Việt Nam.

Hiện nay, để khắc phục cho việc phân loại hình thái các nhà khoa học đã sử dụng phương pháp định danh bằng ADN mã vạch [3]. Phương pháp ADN mã vạch là sử dụng một đoạn ADN chuẩn, ngắn nằm trong hệ gen của sinh vật đang nghiên cứu để phục vụ giám định loài mang lại hiệu quả cao trong thời gian ngắn góp phần không nhỏ vào sự định danh và bảo tồn các loài thực vật trên thế giới [3]. Một số đoạn gen thường được dùng trong định danh là các gen mã hóa ở lục lạp như *matK*, *rbcl*...; vùng xen của gen vùng nhân như *ITS*, *ITS2*; vùng xen của gen mã hóa ở lục lạp như *trnH-psbA*, *psbK-psbI* được sử dụng kết hợp để giám định các loài thực vật [3-8]. Một số loài Keo đã được định danh thành công bởi các mã vạch *matK*, *rbcl* [9].

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả lựa chọn bốn đoạn trình tự để sử dụng làm ADN mã vạch

là: *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS*. Các đoạn trình tự này đều có tính đặc trưng cao cho loài, có thể đem lại kết quả khả quan nhằm phân loại, giám định và xác định mối quan hệ di truyền, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả bảo tồn và phát triển giống Keo lai TB01, BV71 ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: cây Keo lai TB01, BV71 (*A. mangium* x *A. auriculiformis*) được thu thập tại Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm Lâm nghiệp (NCTN LN) Đông Nam Bộ, Trạm NCTN LN Song Mỹ Tân An-Vĩnh Cửu- Đồng Nai.

Vật liệu nghiên cứu: 06 mẫu lá bánh tẻ được lấy từ 03 cây Keo lai TB01 và BV71 khác nhau. Mẫu lá được bảo quản trong túi nilon có chứa hạt silicagel hút ẩm, sau đó được bảo quản ở -20°C để tách chiết ADN phục vụ nghiên cứu. Kí hiệu các mẫu Keo lai TB01 được lấy lần lượt là TB01.1; TB01.2; TB01.3, các mẫu Keo lai BV71 được đánh số lần lượt là BV71.1; BV71.2; BV71.3.

Trình tự các cặp mồi *rbcl* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C, kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 750 bp); mồi *trnH-psbA* (*trnPF1*: CGCGCATGGTGGATTCAATCC; *psbPR1*: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C, kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 600 bp); mồi *matK* (mP3F: TTCCATGGCCTTCTTTGCATTTGTTGC; mP3R: TTCCATGGTTTTTGGAGGATCCGCTGT), kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 700 bp); mồi *ITS* (IsP2F: ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG; IsP2R: TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC), kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 600 bp. Các cặp mồi sử dụng cho các đoạn gen cần nhân được cung cấp từ Hà Văn Huân (2018) [10]. Hóa chất: Kit tách chiết ADN tổng số (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của hãng Intron

Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit) của Norgen, Canada; Hóa chất cho điện di trên gel Agarose: Agarose của Đức, ADN marker, Redsafe của Hàn Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

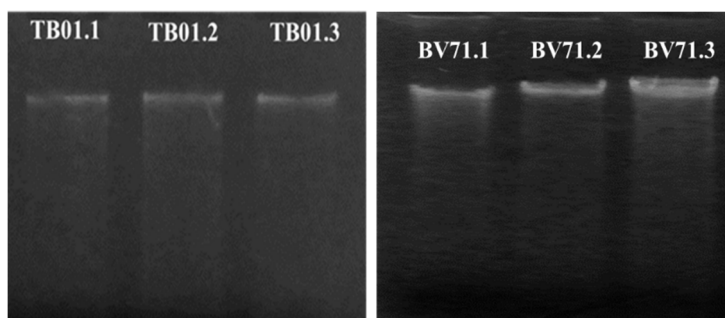
ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Keo lai TB01, BV71 được tách bằng kit (Plant ADN Isolation Kit) của Đức. Các mẫu ADN tổng số này được dùng để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 μ l, bao gồm: H₂O deion (7 μ l), 2x PCR Master mix Solution (10 μ l), 10 pmol/ μ l mỗi xuôi (1,0 μ l), 10 pmol/ μ l mỗi ngược (1,0 μ l) và 50 ng/ μ l ADN khuôn (1 μ l). Chương trình phản ứng PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C: 30 giây, 48- 52°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 5 phút; 4°C. Nhiệt độ gắn mỗi các phản ứng phụ

thuộc vào cặp mồi sử dụng. Mỗi phản ứng PCR lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu thí nghiệm. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit (PCR Purification Kit) của Canada. Trình tự nucleotide của các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* được so sánh trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML), tính khoảng cách di truyền bằng phần mềm Mega11, giá trị bootstrap 100.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Keo lai

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Keo lai TB01, BV71 được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm tách chiết ADN tổng số đảm bảo làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

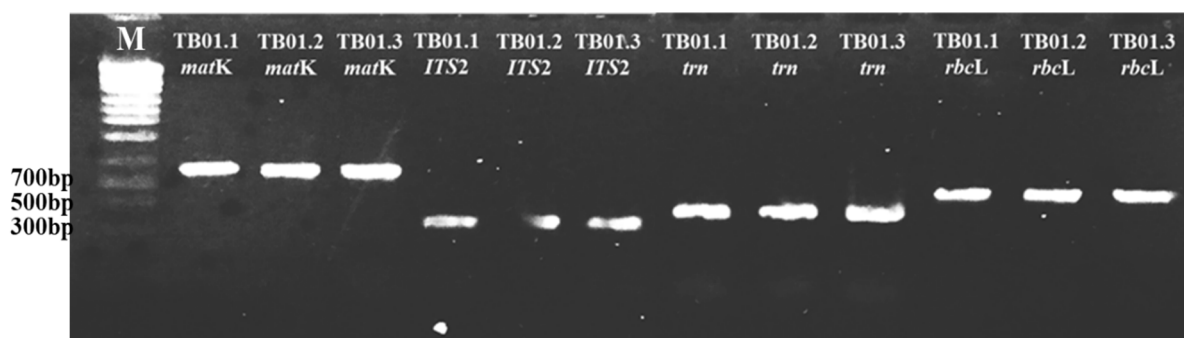


Hình 1. Ảnh điện di ADN tổng số của 3 mẫu lá Keo lai TB01.1, TB01.2, TB01.3 và 3 mẫu lá Keo lai BV71.1, BV71.2, BV71.3

3.2. Kết quả nhân bản các đoạn mã vạch ADN bằng kỹ thuật PCR

ADN tổng số của cây Keo lai được sử dụng

làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả được minh họa trong Hình 2 và Hình 3.



Hình 2. Ảnh điện di các đoạn gen *matK*, *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl* của TB01, thang marker 1 kb



Hình 3. Ảnh điện di các đoạn gen *matK*, *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcL* của BV71, thang marker 1 kb

Kết quả PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 2, Hình 3) cho thấy xuất hiện băng ADN có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn mã vạch ADN dự kiến. Sản phẩm PCR các đoạn mã vạch ADN ở Hình 2, Hình 3 cũng cho thấy không có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR rất đặc hiệu, sau khi tinh sạch có thể sử dụng trực tiếp các sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide.

3.3. Kết quả xác định và phân tích trình tự nucleotide của đoạn mã vạch ADN

3.3.1. Trình tự ADN trên gen *rbcL*

Trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* cho thấy cả 3 mẫu TB01.1; TB01.2; TB01.3 đều cho ra kết quả trình tự giống nhau và cả 3 mẫu BV71.1; BV71.2; BV71.3 đều cho ra kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý các đoạn ADN bị nhiễu đoạn gen *rbcL* có kích thước 485 bp như Hình 4, Hình 5.

AAGATTATAAATTGACTTATTATACTCTGACTATGAAACCAAAGATAGTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAAC
CTGGAGTTCGGCCTGAAGAAGCAGGTGCCGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGATGGGC
TTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGTCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGC
TTATCCCTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCGATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCG
CGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCTCCTTATTCTAAAACCTTCCAAGGTCCGCTCACGGCATCCAAGTTGAGAGAG
ATAAATTGAACAAGTACGGCCGTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAATTTGGGG

Hình 4. Trình tự ADN trên đoạn gen *rbcL* của giống Keo lai TB01

AAGATTATAAATTGACTTATTATACTCTGACTATGAAACCAAAGATAGTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAAC
CTGGAGTTCGGCCTGAAGAAGCAGGTGCCGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACCGATGGGC
TTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGTCCGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGC
TTATCCCTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCGATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCG
CGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCTCCTTATTCTAAAACCTTCCAAGGTCCGCTCACGGCATCCAAGTTGAGAGAG
ATAAATTGAACAAGTACGGCCGTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAATTTGGGG

Hình 5. Trình tự ADN trên đoạn gen *rbcL* của giống Keo lai BV71

Trình tự này được so sánh với các trình tự trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài. Một số loài có trình tự

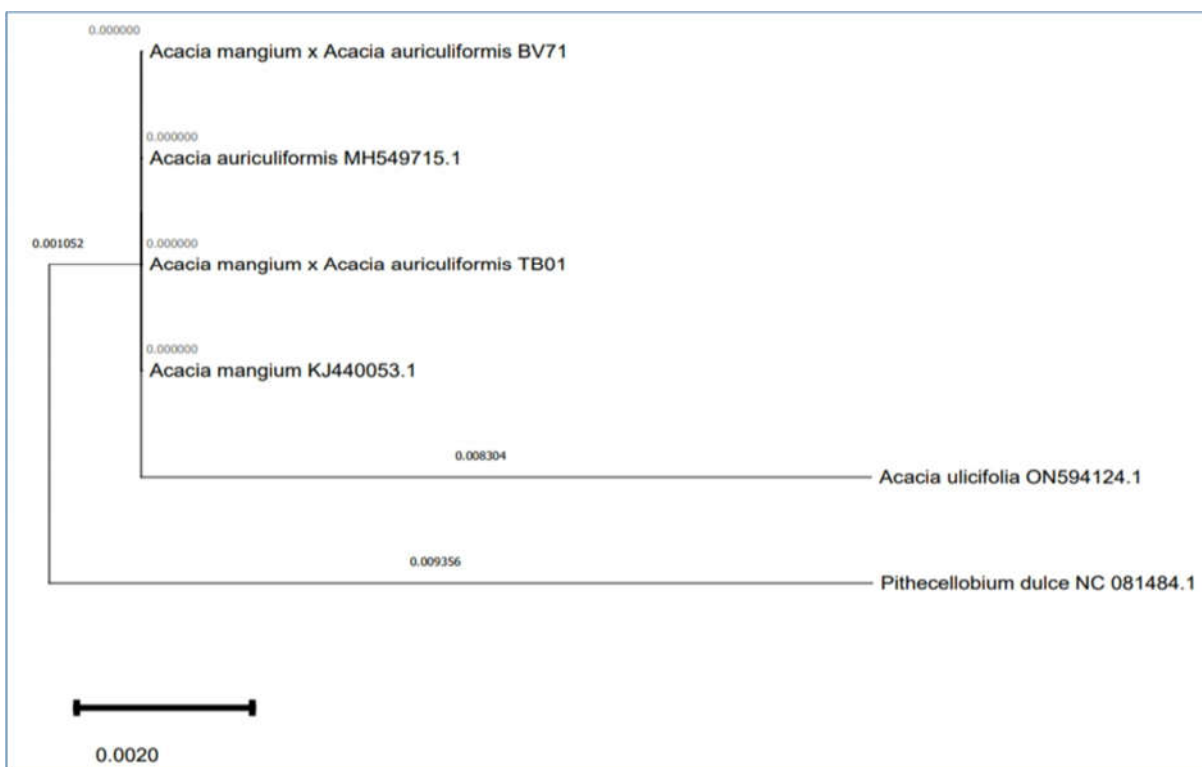
gen tương đồng với giống Keo lai TB01 được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Một số loài có trình tự đoạn *rbcL* tương đồng với giống Keo lai TB01 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Acacia auriculiformis</i>	MH549715.1	100
2	<i>Acacia mangium</i>	KJ440053.1	100
3	<i>Acacia mangium x Acacia auriculiformis_BV71</i>	BV71	100
4	<i>Acacia ulicifolia</i>	ON594124.1	99,18
5	<i>Pithecellobium dulce</i>	NC_081484.1	98,97

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Keo lai, nghiên cứu

với các loài khác ở Bảng 1 và khoảng cách di truyền giữa chúng (Hình 6).



Hình 6. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *rbcL* tạo bởi ML

Khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Keo lai TB01 với các loài khác thu được như Bảng 2.

Bảng 2. Khoảng cách di truyền của giống Keo lai TB01 với các loài khác của đoạn *rbcL*

	<i>Pithecellobium dulce</i>	<i>A. ulicifolia</i>	<i>A. mangium</i>	TB01	BV71	<i>A. auriculiformis</i>
<i>Pithecellobium dulce</i>						
<i>A. ulicifolia</i>	0,0189					
<i>A. mangium</i>	0,0104	0,0083				
TB01	0,0104	0,0083	0,0000			
BV71	0,0104	0,0083	0,0000	0,0000		
<i>A.auriculiformis</i>	0,0104	0,0083	0,0000	0,0000	0,0000	

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *rbcL* kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng của giống Keo lai TB01, BV71 với các loài khác ta thấy: giống Keo lai TB01 có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài BV71, *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium* với khoảng cách di truyền là 0,0000 (hệ số tương đồng 100%) và có quan hệ

xa hơn với loài *Acacia ulicifolia* với khoảng cách di truyền là 0,0083 (hệ số tương đồng 99,18%), có quan hệ xa nhất với loài *Pithecellobium dulce* với khoảng cách di truyền là 0,0104 (hệ số tương đồng 98,97%). Do vậy, đoạn gen *rbcL* chưa xác định sự khác nhau giữa TB01 và BV71.

3.3.2. Trình tự đoạn gen *matK*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn

gen *matK* cho thấy cả 3 mẫu TB01 cho ra kết quả trình tự giống nhau và cả 3 mẫu BV71 cho

ra kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *matK* có kích thước 936 bp như Hình 7.

TAATTTACGATCAATTCATTCAATATTTCTTTTTTTGAGGAAAAATTTCCATATTTAAATTATGTGTCAG
 ATGTACAAATACCCTACCCTATACATCTGGAAATCTTGATTCAAACCTTCGATACTGGGTGAAAGATGCCT
 CCTCCTTTCATTTATTAAGGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGAATAGTCTTATTACTCCAAAAAAG
 GATTTCTACTTTTTCAAAAAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCTATATAATTTTTATGTATGTGAATACGAA
 TCCATCTTTCTTTTTCTCCGTAACAAATCTTCTTATTTACGATTAACATCTTCTGGAGTCTTTTTGAACGAAT
 CTATTTCTATGCAAAAATAGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGGATTTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTC
 AAGGACCCTTTCATTATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCTAGTTTCAAAGAATACGCCCTTTTTG
 ATGAAAAAATGGAAATACTATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTTTTTTGTTTGGTCTCAACCAGGAAAG
 ATCCATATAAACCAATTATCCGAGCATTCAATTTACTTTTTGGGCTATTTTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTT
 CAGTGGTACGGAGTCAAATGTTGGAAAAGTCAATTTATAATGGAAAATCTTATGAAAAAGCTTGATACAAT
 AATTCCAATTATTCCTCTAATTAGATCATTGGCTAAAGCAAATTTTTGTAATGTATTAGGACATCCCATTAGT
 AAGCCGGTCTGGGCCGATTCATCCGATTTTGATATTATTGAGCGATTTTTGCAGATATGCAGAGATCTCTCT
 CATTATTACAACGGATCCTCAAAAAAAGAGTTTGTATCGAATCAAATATACTTCGGCTTTCTTGT

Hình 7. Trình tự ADN trên đoạn gen *matK* của giống Keo lai TB01

CGATACTGGGTGAAAGATGCCTCCTCTTTCATTTATTAAGGCTCTTTCTTTATGAGTATTGTAATTGGA
 ATAGTCTTATTACTCCAAAAAAGGATTTCTACTTTTTCAAAAAGTAATCCAAGATTTTTCTGTTCTATA
 TAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCTATCTTTCTTTTTCTCCGTAACAAATCTTCTTATTACGATTAACAT
 CTTCTGGAGTCTTTTTGAACGAATCTATTTCTATGCAAAAATAGAACATTTTGTAGAAGTCTTTGATAAGG
 ATTTCCGTCCACCCTATGGTTCTTCAAGGACCCTTTCATTATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTCT
 AGTTTCAAAGAATACGCCCTTTTTGATGAAAAAATGGAAATACTATCTTATCCATTTATGGCAATGTCATTT
 TTTTGTGGTCTCAACCAGGAAAGATCCATATAAACCAATTATCCGAGCATTCAATTTACTTTTTGGGCTAT
 TTTCAAATGTGCGGCTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGTTGGAAAAGTCAATTTATAATGGAAA
 TCTTATGAAAAAGCTTGATACAATAATTCCAATTATTCCTCTAATTAGATCATTGGCTAAAGCAAATTTTTGT
 AATGTATTAGGACATCCCATTAGTAAGCCGGTCTGGGCCGATTCATCCGATTTTGATATTATTGAGCGATTT
 TTGCAGATATGCAGAGATCTCTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAAAAAGAGTTTGTATCGAATCAA
 ATATACTTCGGCTTTCTTGT

Hình 8. Trình tự ADN trên đoạn gen *matK* của giống Keo lai BV71

Trình tự trên được xử lý trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ

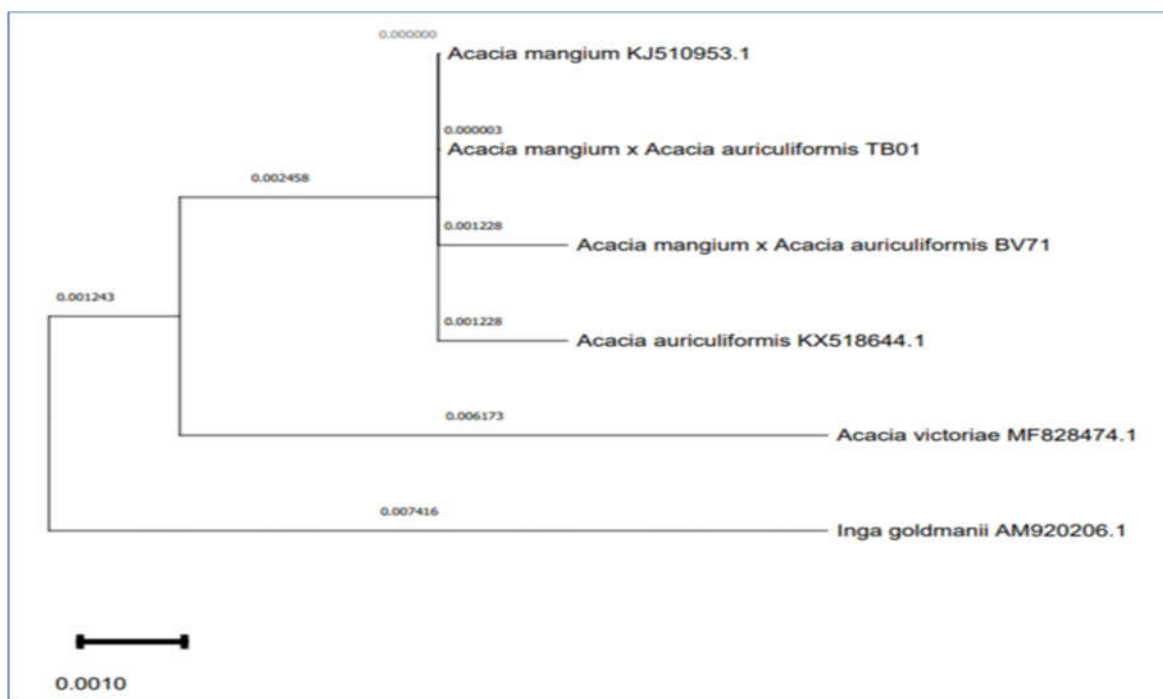
loài. Một số loài có trình tự gen tương đồng với giống Keo lai TB01 được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Một số loài có trình tự đoạn *matK* tương đồng với giống Keo lai TB01 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Acacia auriculiformis</i>	KX518644.1	99,88
2	<i>Acacia mangium</i>	KJ510953.1	99,88
3	<i>Acacia mangium x Acacia auriculiformis_BV71</i>	BV71	99,75
4	<i>Acacia victoriae</i>	MF828474.1	99,02
5	<i>Inga goldmanii</i>	AM920206.1	98,77

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Keo lai TB01 với các

loài khác ở Bảng 3 và khoảng cách di truyền giữa chúng (Hình 9).



Hình 9. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *matK* tạo bởi ML

Khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Keo lai TB01 với các loài khác như Bảng 4.

Bảng 4. Khoảng cách di truyền của giống Keo lai TB01 với các loài khác của đoạn *matK*

	<i>Inga goldmanii</i>	<i>A. victoriae</i>	<i>A. mangium</i>	TB01	BV71	<i>A. auriculiformis</i>
<i>Inga goldmanii</i>						
<i>A. victoriae</i>	0,0049					
<i>A. mangium</i>	0,0036	0,0028				
TB01	0,0036	0,0028	0,0000			
BV71	0,0041	0,0032	0,0004	0,0004		
<i>A. auriculiformis</i>	0,0041	0,0032	0,0004	0,0004	0,0008	

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *matK* kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng của giống Keo lai TB01, BV71 với các loài khác ta thấy: giống Keo lai TB01 có trình tự gen giống 99,88% với đoạn gen của loài *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, giống 99,75% với đoạn gen của loài BV71 và có quan hệ xa hơn với loài *Acacia victoriae* với hệ số tương đồng 99,02, có quan hệ xa nhất với loài *Inga goldmanii* với hệ số

tương đồng 98,77%. Với chỉ thị *matK*, có sự khác nhau giữa hai giống TB01 và BV71.

3.3.3. Trình tự ADN trên đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA* cho thấy cả 3 mẫu TB01 cho ra kết quả trình tự giống nhau và 3 mẫu BV71 cho kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *trnH-psbA* có kích thước 383 bp như Hình 10, Hình 11.

CCCTATACTATCTAAAAATTACAGAGATTTCCATTTGTATTCTTTCTTTTTTTTTTTCATTATTTTGAAGTTTT
TACTCGTCTTCTAAGATACAATAGACTAGAATTAACATTCATTTCTTTTTTTTTTTTTTTCATTTCAAAAAGA
TAAAGAAAGATTGCTGAGAAAAACGTATAAAATAAATTAGTAAAAAAGAAACAAAAGTATGAACTCCA
ATATTTTTCTTAAACAACGGTAAAGAATGTTGAAGTAAATACAAAATTGATGTATGAACTACTAAAAAG
TAAAGGTAAAAAGTAAAGGAGCAATATTAACCCTCTTGATAGAACAATAAATTAATTATTGCTCCTTTACG
TTCAAAAACCTCGTATACATTAAGACCAAGATTTTATCCGTTTATAGCTGGAGCCTCAACCGCAG

Hình 10. Trình tự ADN trên đoạn gen *TrnH-psbA* của giống Keo lai TB01

CCCTATACTATCTAAAAATTACAGAGATTTCATTTGTATTCTTTCTTTTTTTTTTTCATTATTTTGAAGTTTT
 TACTCGTCTTCTAAGATAACAATAGACTAGAATTAACATTCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTCATTTCAAAG
 ATAAAGAAAGATTGCTGAGAAAAACGTATAAAATAAATTAGTAAAAAGAAACAAAAAGTATGAAACTCC
 AATATTTTTCTTAAACAACGGTAAAGAATGTTGAAGTAAATACAAAATTGATGTATGAAACTACTAAAA
 GTAAAGGTAAAAAGTAAAGGAGCAATATTAACCTCTTGATAGAACAATAAATTAATTATTGCTCCTTTAC
 GTTCAAAAACCTCGTATACATTAAGACCAAGATTTTATCCGTTTATAGCTGGAGCCTCAACCGCAG

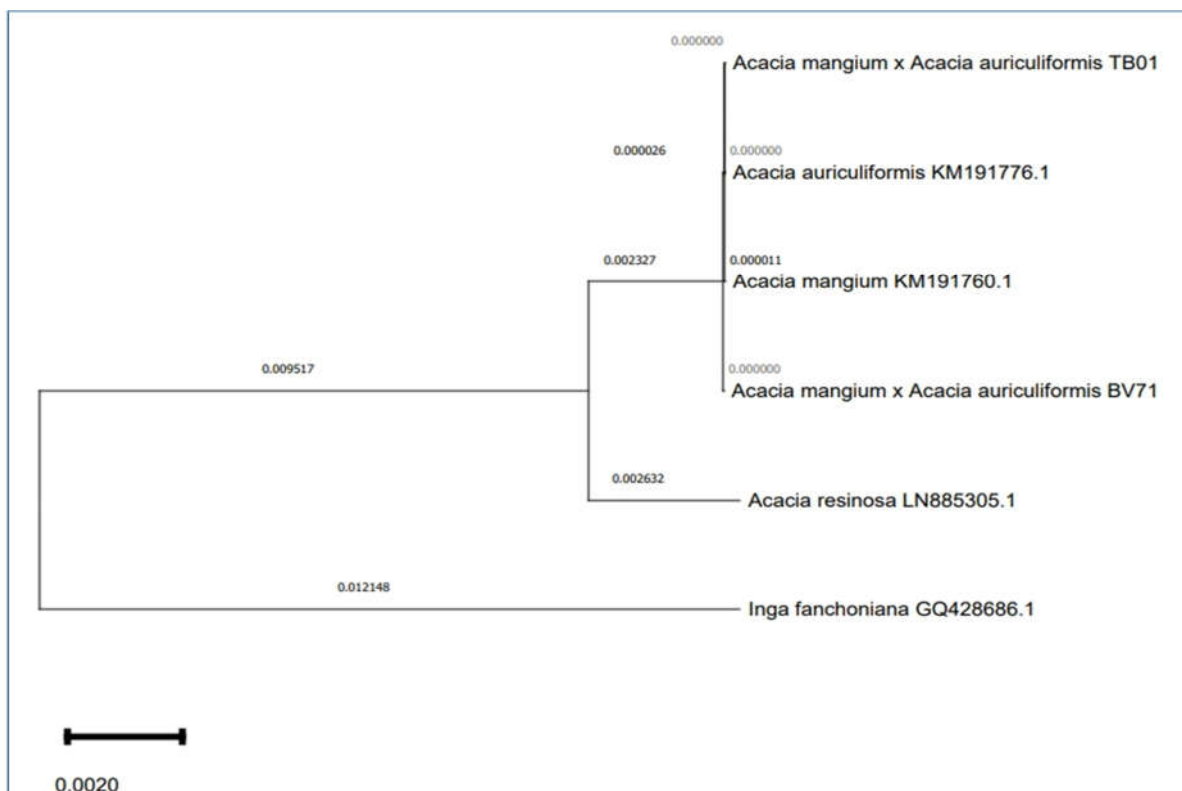
Hình 11. Trình tự ADN trên đoạn gen *TrnH-psbA* của giống Keo lai BV71

Trình tự này được xử lý trên Ngân hàng gen loài. Một số loài có trình tự gen tương đồng với quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ giống Keo lai TB01 được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Một số loài có trình tự đoạn *trnH-psbA* tương đồng với loài Keo lai TB01 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Acacia auriculiformis</i>	KM191776.1	100
2	<i>Acacia mangium</i>	KM191760.1	99,76
3	<i>Acacia mangium x Acacia auriculiformis_BV71</i>	BV71	99,76
4	<i>Acacia resinosa</i>	LN885305.1	96,98
5	<i>Inga fanchoniana</i>	GQ428686.1	93,06

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Keo lai với các loài khác ở Bảng 5 và khoảng cách di truyền giữa chúng (Hình 12).



Hình 12. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *trnH-psbA* tạo bởi ML

Khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Keo lai TB01 với các loài khác như Bảng 6.

Bảng 6. Khoảng cách di truyền của giống TB01 với các loài khác của đoạn *trnH-psbA*

	<i>Inga fanchoniana</i>	<i>A. resinosa</i>	<i>A. mangium</i>	TB01	BV71	<i>A. auriculiformis</i>
<i>Inga fanchoniana</i>						
<i>A. resinosa</i>	0,0167					
<i>A. mangium</i>	0,0152	0,0032				
TB01	0,0152	0,0032	0,0000			
BV71	0,0152	0,0032	0,0000	0,0000		
<i>A. auriculiformis</i>	0,0152	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000	

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *trnH-psbA* kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng của giống Keo lai TB01, BV71 với các loài khác ta thấy: giống Keo lai TB01 có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài *Acacia auriculiformis*, giống 99,76% với BV71, *Acacia mangium* và có quan hệ xa hơn với loài *Acacia resinosa* với hệ số tương đồng 96,98%, có quan hệ xa nhất với loài

Inga fanchoniana với hệ số tương đồng 93,06%. Với chỉ thị *trnH-psbA*, có sự khác nhau giữa hai giống TB01 và BV71.

3.3.5. Trình tự ADN trên đoạn *ITS2*

Kết quả trình tự nucleotide *ITS2* cho thấy cả 3 mẫu TB01 đều cho ra trình tự giống nhau và 3 mẫu BV71 cho ra trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *ITS2* có kích thước 178 bp như Hình 13, Hình 14.

ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGA
 AGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCACCGTCGCCAGCGCCCAACTCCCCGGGCG
 CGGCGGATGATGGCCTCCCGGAGCCTCGCCTCCCGGCTGGCCGAAAAGGGGGCCCAACGTGGCGACCG
 CCACGATCCACGGTGGTTGAGTGAACACTCGCTCGAGGCCAAGACGTGCGCGCGTCGTCCCACCGGTCTT
 GGGCCGTCGGCAGGGCGTGTTACCGCCGCTGCCGCTCGTACGCGACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACC
 CGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Hình 13. Trình tự ADN trên đoạn gen *ITS2* của giống Keo lai TB01

ATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGA
 AGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCACCGTCGCCAGCGCCCAACTCCCCGGGCG
 CGGCGGATGATGGCCTCCCGGAGCCTCGCCTCCCGGCTGGCCGAAAAGGGGGCCCAACGTGGCGACCG
 CCACGATCCATGGTGGTTGAGTGAACACTCGCTCGAGGCCAAGACGTGCGCGCGTCGTCCCACCGGTCTT
 GGGCCGTCGGCAGGGCGTGTTACCGCCGCTGCCGCTCGTACGCGACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACC
 CGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Hình 14. Trình tự ADN trên đoạn gen *ITS2* của giống Keo lai BV71

Trình tự này sau đó được xử lý trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài. Một số loài có trình tự gen tương

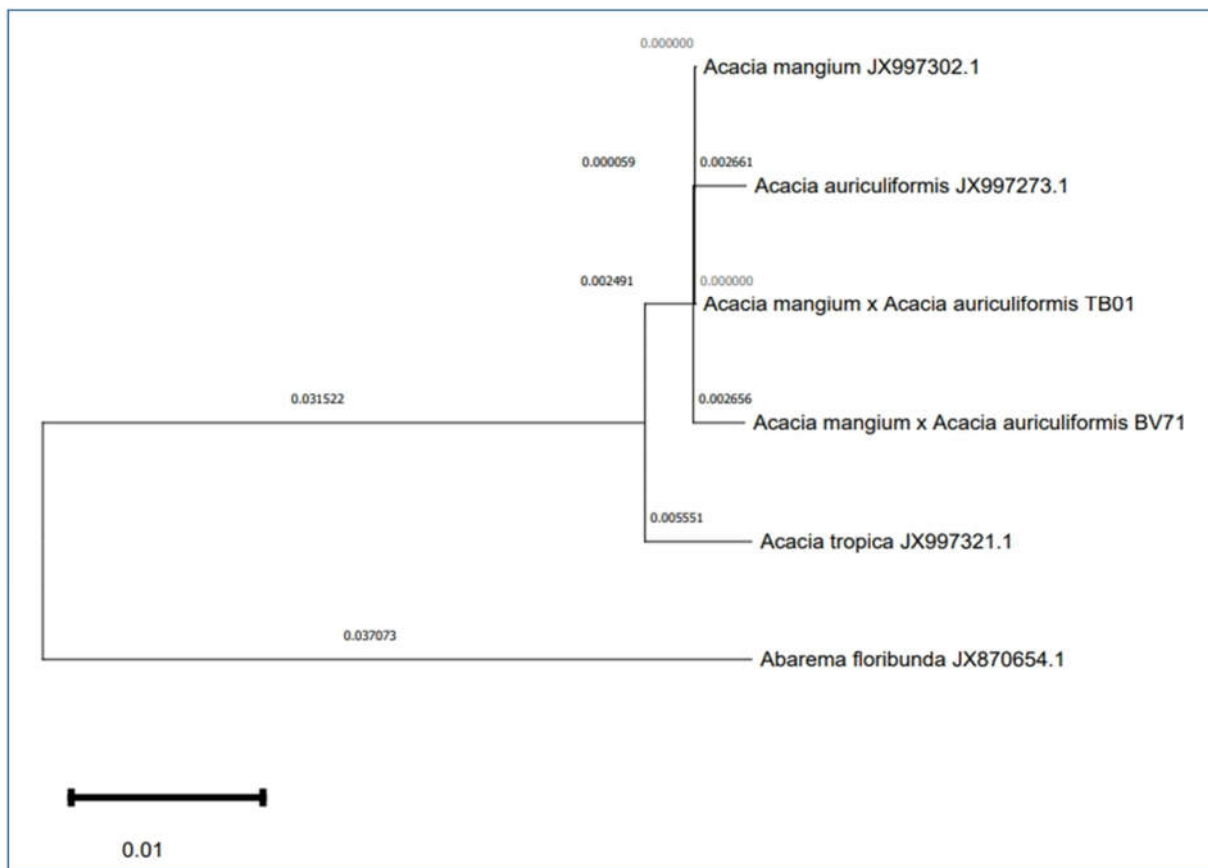
đồng với giống Keo lai TB01 được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Một số loài có trình tự đoạn *trnH-psbA* tương đồng với loài Keo lai TB01 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Acacia auriculiformis</i>	JX997273.1	99,73
2	<i>Acacia mangium</i>	JX997302.1	100
3	<i>Acacia mangium x Acacia auriculiformis_BV71</i>	BV71	99,73
4	<i>Acacia tropica</i>	JX997321.1	98,93
5	<i>Abarema floribunda</i>	JX870654.1	91,36

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Keo lai TB01 với các

loài khác ở Bảng 7 và khoảng cách di truyền giữa chúng (Hình 15).



Hình 15. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn ITS2 tạo bởi ML

Khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Keo lai với các loài khác như trong Bảng 8.

Bảng 8. Khoảng cách di truyền của giống Keo lai TB01 với các loài khác của đoạn ITS2

	<i>A. tropica</i>	<i>A.mangium</i>	TB01	BV71	<i>A.auriculiformis</i>	<i>Abarema floribunda</i>
<i>A. tropica</i>						
<i>A. mangium</i>	0,0082					
TB01	0,0082	0,0000				
BV71	0,0109	0,0027	0,0027			
<i>A. auriculiformis</i>	0,0109	0,0027	0,0027	0,0053		
<i>Abarema floribunda</i>	0,0838	0,0788	0,0788	0,0823	0,0823	

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen ITS2 kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng của giống Keo lai với các loài khác ta thấy: giống Keo lai TB01 có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài *Acacia mangium*, giống 99,73% với loài BV71, *Acacia auriculiformis* và có quan hệ xa hơn với loài *Acacia tropica* với hệ số tương đồng 98,93,

có quan hệ xa nhất với loài *Abarema floribunda* với hệ số tương đồng 91,36%. Với chỉ thị ITS2, có sự khác nhau giữa hai giống TB01 và BV71.

4. THẢO LUẬN

Dựa vào kết quả so sánh trình tự 4 đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* và ITS2 của giống Keo lai TB01 với trình tự gen của giống BV71 ta lập được bảng so sánh đoạn trình tự như Bảng 9.

Bảng 9. So sánh trình tự của các đoạn gen giữa Keo lai TB01 và BV71

Tên đoạn gen	<i>rbcl</i>	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ITS2</i>
Số điểm sai khác	0	2	1	1
Kích thước trình tự	485	815	423	377
Tỷ lệ sai khác (%)	0	0,25	0,24	0,26

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *matK*: vị trí 171 và 767 đã được đánh dấu in đậm

```

Query 121 CCAAGATTTTCTGTTCTATATAATTTTATGTATGTGAATACGAATCCATCTTTCTT 180
          |||
Sbjct 121 CCAAGATTTTCTGTTCTATATAATTTTATGTATGTGAATACGAATCTATCTTTCTT 180
Query 721 TTTTGCAGATATGCAGAGATCTCTCTCATTATTACAACGGATCCTC-aaaaaaaaGAGT 779
          |||
Sbjct 721 TTTTGCAGATATGCAGAGATCTCTCTCATTATTACAACGGATCCTCAAAAAAAAAAGAGT 780
    
```

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *trnH-psbA*: vị trí 123 đã được đánh dấu in đậm

```

Query 121 TC-ttttttttttttttCATTTCAAaagataaagaaagattgctgagaaaaacgtataaaa 179
          ||
Sbjct 121 TCTTTTTTTTTTTTTTTCATTTCAAAGATAAAGAAAGATTGCTGAGAAAAACGTATAAAA 180
    
```

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *ITS2*: vị trí 217 đã được đánh dấu in đậm

```

Query 181 GAAAAGGGGGCCCAACGTGGCGACCGCCACGATCCACGGTGGTTGAGTGAACACTCGCTC 240
          |||
Sbjct 181 GAAAAGGGGGCCCAACGTGGCGACCGCCACGATCCATGGTGGTTGAGTGAACACTCGCTC 240
    
```

Kết quả cho thấy: trình tự đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA* có tỷ lệ sai khác là 0%, trình tự đoạn gen *ITS2* có tỷ lệ sai khác là 0,26%, trình tự đoạn gen *trnH-psbA* có tỷ lệ sai khác là 0,24%, trình tự đoạn gen *matK* có tỷ lệ sai khác là 0,25%. Như vậy, với cả 3 đoạn chỉ thị *ITS2*, *trnH-psbA* và *matK* đều có khả năng phân biệt hai giống TB01 và BV71.

Năm 2020, Muhammad Ismail đã sử dụng thành công hai đoạn gen *rbcl* và *matK* để phân biệt 5 loài *Acacia* (*A. albida*, *A. ampliceps*, *A. catechu*, *A. coriacea* and *A. tortilis*) [4].

Như vậy, đối với các loài Keo thì các chỉ thị ADN mã vạch của các vùng xen của gen nhân như *ITS2* và các đoạn chỉ thị ở lục lạp như *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* là hoàn toàn tin cậy và có độ phân loại cao.

5. KẾT LUẬN

Đã nhân gen thành công các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR. Trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch đã được xác định: đoạn *matK* có kích thước là 815 bp, *rbcl* là 485 bp, *trnH-psbA* là 423 bp và đoạn

ITS2 là 377 bp. Các trình tự này sau đó được xử lý trên Ngân hàng gen quốc tế (NCBI) đã chỉ ra rằng Giống Keo lai TB01 (*Acacia mangium* x *Acacia auriculiformis*) và BV71 có các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcl*; 99,75% của đoạn gen *matK*; 99,76% của đoạn gen *trnH-psbA*, 99,73% của đoạn gen *ITS2*. Kết quả cho thấy có thể sử dụng cả 3 đoạn *matK*, *trnH-psbA* và *ITS2* để giám định giống Keo lai TB01 và BV71 ở Việt Nam. Mặc dù vậy, cách tốt nhất là sử dụng đồng thời cả 4 đoạn trình tự gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* để có thể xác định chính xác nhất loài cần định danh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. B.R. Maslin & L. Pedley (1988). Patterns of distribution of *Acacia* in Australia. *Australian Journal of Botany* 36: 385–395.

[2]. B. Kyalangalilwa, J.S. Boatwright, B.H. Daru, O. Maurin & M Bank (2013). Phylogenetic position and revised classification of *Acacia* s.l. (Fabaceae: Mimosoideae) in Africa, including new combinations in *Vachellia* and *Senegalia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172(4): 500–523.

[3]. W. J. Kress (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of*

Systematics and Evolution. 55: 291–307.

[4]. V. V. Thakur, S. Tiwari, N. Tripathi & G. Tiwari (2019). Molecular identification of medicinal plants with amplicon length polymorphism using universal DNA barcodes of the atpF–atpH, trnL and trnH–psbA regions. *Biotech.* 9: 1-10.

[5]. S. Zhu, Q. Li, S. Chen, Y. Wang, L. Zhou, C. Zeng & J. Dong (2018). Phylogenetic analysis of *Uncaria* species based on internal transcribed spacer (ITS) region and ITS2 secondary structure. *Pharm Biol.* 56(1): 548-558.

[6]. M. Latvis, S. M. E. Mortimer, D. F. Morales Briones, S. Torpey, S. U. Convers, S. J. Jacobs, S. Mathew & D. C. Tank (2017). Primers for *Castilleja* and their utility across *Orobanchaceae*: I. Chloroplast primers. *Appl Plant Sci.* 5: 1-7.

[7]. S. Zhu, Q. Liu, S. Qiu, J. Dai & X. Gao (2022). DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent

advances. *Chinese Medicine.* 17: 112.

[8]. D. L. Erickson N. Zhang, P. Ramachandran, A. , R. E. Timme R. Ottesen, V. A. Funk, Y. Luo & S. M. Handy (2017). An analysis of *Echinacea* chloroplast genomes: Implications for future botanical identification. *Scientific Reports.* 2: 216.

[9]. Muhammad Ismail, Aftab Ahmad, Muhammad Nadeem, Muhammad Asif Javed, Sultan Habibullah Khan, Iqra Khawash, Aftab Alam Sthanadar, Sameer H. Qari, Suliman M. Alghanem, Khalid Ali Khan, Muhammad Fiaz Khan & Samina Qamer (2020). Development of DNA barcodes for selected *Acacia* species by using *rbcl* and *matK* DNA markers. *Journal of Biological Sciences.* 27(12): 3735-3742.

[10]. H. V. Huan, H. M. Trang & N. V. Toan (2018). Identification of DNA Barcode Sequence and Genetic Relationship among Some Species of *Magnolia* Family. *Asian Journal of Plant Sciences.* 17(1): 56-64.