

Xác định DNA mã vạch giống Bạch đàn lai UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) và UP54 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) phục vụ giám định giống cây

Bùi Thị Mai Hương, Hà Văn Huân, Lê Thọ Sơn

Trường Đại học Lâm nghiệp

Identification of DNA barcode sequence of hybrid eucalyptus UP35 (*E. urophylla* x *E. pellita*) and UP54 (*E. urophylla* x *E. pellita*) to identify plant varieties

Bui Thi Mai Huong, Ha Van Huan, Le Tho Son

Vietnam National University of Forestry

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.4.2024.011-022>

TÓM TẮT

Giống Bạch đàn lai UP35 (*E. urophylla* x *E. pellita*) và UP54 (*E. urophylla* x *E. pellita*) là giống cây có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Tuy nhiên, việc xác định các giống này còn hết sức khó khăn do chúng có hình thái các giống cây rất giống nhau. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là sử dụng phương pháp phân tử DNA mã vạch để xác định các giống Bạch đàn lai UP35 và UP54. Các kết quả cho thấy các băng của sản phẩm PCR đúng với kích thước dự kiến như 643 bp, 743 bp, 626 bp, 563 bp và 214 bp tương ứng với các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2*. Kết quả so sánh với các trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) cho thấy giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 có tỷ lệ tương đồng của trình tự đoạn gen *rbcl* và *matK* và *trnH-psbA* là 100% và tỷ tương đồng là 99,06% và 98,29 % tương ứng của đoạn gen *ITS* và *ITS2*. Các kết quả này cho thấy sử dụng chỉ thị *ITS* và *ITS2* làm DNA mã vạch để giám định giống Bạch đàn lai UP35, UP54 ở Việt Nam là tốt nhất. Kết quả nghiên cứu là cơ sở quan trọng cho việc xác định giống Bạch đàn lai UP35, UP54 đang trồng ở nước ta phục vụ các định hướng phát triển trong tương lai.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 11/04/2024

Ngày phản biện: 13/05/2024

Ngày quyết định đăng: 07/06/2024

Từ khóa:

Bạch đàn lai UP35, Bạch đàn lai UP54, giám định loài, mã vạch DNA, PCR.

ABSTRACT

Hybrid *Eucalyptus* UP35 (*E. urophylla* x *E. pellita*) and UP54 (*E. urophylla* x *E. pellita*) varieties are economically valuable in Vietnam. However, identifying these varieties is challenging due to their very similar morphology. Therefore, this study aimed to use a DNA barcoding method to identify the hybrid *Eucalyptus* varieties UP35 and UP54. The results showed that the bands of PCR products had the expected size, which is 643 bp, 743 bp, 626 bp, 563 bp, and 214 bp corresponding to the *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS*, and *ITS2* gene regions, respectively. Comparison with sequences from the other *Eucalyptus* species in NCBI revealed that the UP35 and UP54 hybrids have 100% sequence similarity for the *rbcl*, *matK*, and *trnH-psbA* gene regions, and 99.06% and 98.29% similarity for the *ITS* and *ITS2* gene regions, respectively. These results suggest that using *ITS2* and *ITS* markers as a DNA barcode is the most effective method for identifying the hybrid UP35 and UP54 in Vietnam. This research provides a crucial foundation for identifying the UP35 and UP54 hybrids currently planted in the country, supporting future development directions.

Keywords:

DNA barcoding, Hybrid eucalyptus UP35, Hybrid eucalyptus UP54, identify species, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn lai UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) và UP54 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) được tạo ra từ hai loài Bạch đàn *Eucalyptus urophylla* và

Eucalyptus pellita đã được công nhận là giống quốc gia (65/QĐ-BNN-TCLN, ngày 11 tháng 01 năm 2013) và có giá trị kinh tế cao trong trồng rừng sản xuất. Hiện nay, việc phân loại Bạch đàn lai UP35 và UP54 với nhiều giống bạch đàn

khác trên thị trường bằng phương pháp hình thái là rất khó khăn. Do đó, nghiên cứu xác định các đoạn mã vạch DNA đặc trưng cho giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 là cần thiết để phục vụ giám định giống và phát triển vùng trồng cho hai giống bạch này ở Việt Nam.

Sử dụng các chỉ thị DNA mã vạch là một phương pháp phân loại phân tử, trong đó sử dụng một đoạn DNA ngắn, chuẩn nằm trong hệ gen nhân, hệ gen lục lạp, hoặc hệ gen ty thể của sinh vật để giám định loài. Phương pháp này mang lại hiệu quả cao trong thời gian ngắn, góp phần định danh và bảo tồn các loài thực vật trên thế giới [1]. Phương pháp này là một công cụ hỗ trợ hữu hiệu cho phân loại dựa vào hình thái, đưa lại kết quả chính xác cao [2]. Một số gen thường được sử dụng để phân loại gồm: gen lục lạp *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *ycf...*; vùng xen của gen vùng nhân *ITS*, *ITS2*, *ITS1...*; vùng xen của gen lục lạp *trnH-psbA*, *psbKpsbI*, *trnL-psbF...* [3-8]. Trong nghiên cứu này, năm đoạn

trình tự được lựa chọn làm mã vạch DNA là: *matK*, *rbcl*, *trnH - psbA*, *ITS* và *ITS2*. Các đoạn trình tự này đều có tính đặc trưng cao cho loài, có thể đem lại kết quả khả quan trong việc 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 Bạch đàn lai UP35 và UP54 ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất

Vật liệu nghiên cứu: 06 mẫu lá bánh tẻ được lấy từ 03 cây Bạch đàn lai UP35 và 03 cây Bạch đàn lai UP54 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 DNA phục vụ nghiên cứu. Kí hiệu các mẫu Bạch đàn lai UP35 được đánh số lần lượt là UP35.1; UP35.2; UP35.3; các mẫu Bạch đàn lai UP54 được đánh số lần lượt là UP54.1; UP54.2; UP54.3.

Bảng 1. Danh sách các môi sử dụng để nhân các đoạn DNA mã vạch

Môi xuôi/ môi ngược	Trình tự môi (5'-3')	DNA mã vạch	Nhiệt độ gắn môi (EC)	Tài liệu tham khảo
matKF	5'-TCCATGGGTTTATATGGATCCTCCTGGTT-3'	<i>matK</i>	60.7	
matKR	5'-CCCGCCATGGATGGAAGAATTCAAAGATA-3'		60.5	
rP1F	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'	<i>rbcl</i>	57.2	Levin et al., 2023 [9]
rP1R	5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'		52.8	Kress et al., 2007 [10]
trnPF1	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'	<i>trnH-psbA</i>	61.1	Sang et al., 1997 [11]
psbPR1	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'		52.3	Tate et al., 2003 [12]
IsP2F	5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG-3'	<i>ITS</i>	62.4	www.dnabarcoding101.org
IsP2R	5'-TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'		65.2	www.dnabarcoding101.org
Is2P-F	5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'	<i>ITS2</i>	51.9	www.dnabarcoding101.org
Is2P1-R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		52.1	www.dnabarcoding101.org

Hóa chất: Kit tách chiết DNA tổng số (Plant DNA Isolation Kit, Norgen, Canada); 2x PCR Master mix (Intron Biotechnology, Hàn Quốc); Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit, Norgen, Canada); Agarose (Merck, Đức), DNA marker và Redsafe (Hàn Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

DNA tổng số từ các mẫu lá của cây Bạch đàn

lai UP35 và UP54 được tách bằng kit (Plant DNA Isolation Kit). Các mẫu DNA tổng số này được dùng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 µl, bao gồm: H₂O deion (7 µl), 2x PCR Master mix Solution (10 µl), 10 pmol/µl môi xuôi (1,0 µl),

10 pmol/μl mỗi ngược (1,0 μl) và 50 ng/μl DNA khuôn (1 μl). Chu kỳ nhiệt của 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. Nhiệt độ gắn mỗi các phản ứng phụ thuộc vào cặp mồi sử dụng. Mỗi phản ứng PCR được lặp lại 3 lần trên một mẫu thí nghiệm.

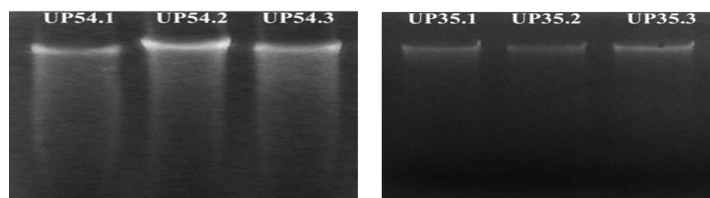
Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit (PCR Purification Kit) và đọc trình tự tại Công ty 1st Base (Malaysia). Trình tự nucleotide của các đoạn DNA được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như Bioedit, NCBI, MegaX... Các trình tự này được so sánh trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen được xây dựng bằng phương pháp

Maximum Likelihood (ML), tính khoảng cách di truyền bằng phần mềm megaX.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ lá cây Bạch đàn lai UP35 và UP54

Kết quả cho thấy DNA tổng số đã được tách chiết từ các mẫu lá cây Bạch đàn lai UP35 và UP54 (Hình 1). Kết quả xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch DNA tổng số cho thấy, dung dịch DNA tổng số có nồng độ dao động từ 200 - 300 ng/μl và tỷ số OD_{260 nm}/OD_{280 nm} trong khoảng từ 1,7 - 2,05. Các kết quả này khẳng định đã tách chiết được DNA với nồng độ cao và đảm bảo độ tinh sạch. Sản phẩm tách chiết DNA tổng số đảm bảo làm khuôn cho nhân bản các đoạn DNA quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

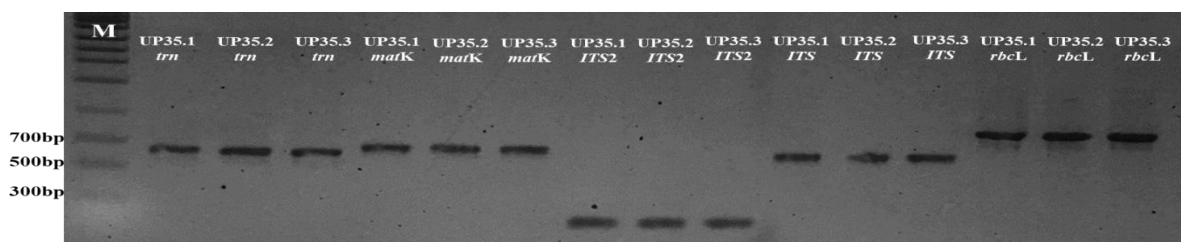


Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số của UP35 và UP54

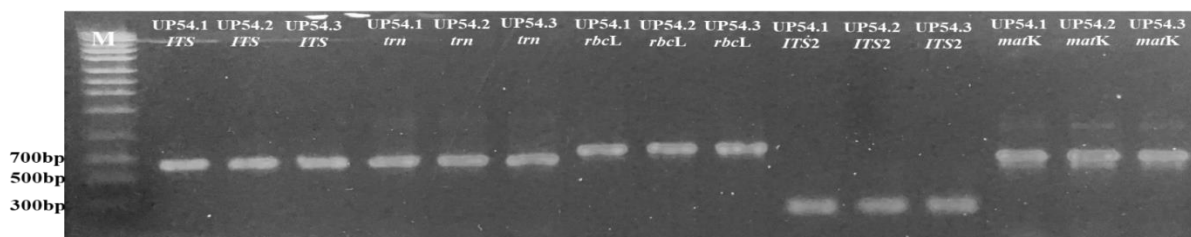
3.2. Kết quả nhân bản các đoạn DNA mã vạch bằng kỹ thuật PCR

Kết quả PCR sau khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 2, 3) cho thấy xuất hiện băng DNA có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn mã vạch DNA dự kiến

trong Bảng 1. Sản phẩm PCR ở Hình 2 và Hình 3 cho thấy không có băng DNA 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.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR của UP35 với các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2*



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR của UP54 với các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2*

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

Kết quả đọc trình tự nucleotide đoạn gen *rbcl* từ mẫu lá cây UP35 và UP54 được thể hiện tương ứng trong Hình 4 và Hình 5.

3.3.1. Trình tự đoạn gen *rbcl*

ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAACTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTG ATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCTGGAGTTCCTCTGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTG GACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTATAAAGGAAGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAG ACCTTTTTGAAGAAGTCTGTACTAATATGTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATCCCTC CTTCCTATACGAAAACCTTCCAAGGCCCGCTCATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAATATGGGCGTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAA TTGGGGTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTTACGAAAGATGATGAGAACGTGAACCTACAACCATTTATGC GTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTGTGCCGAAGCCATTTTAAATCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCAGGTACATGCGA

Hình 4. Trình tự DNA trên đoạn gen *rbcl* của giống Bạch đàn lai UP35

ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAACTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTG ATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCTCAACCTGGAGTTCCTCTGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTG GACCGATGGGCTTACCAGCCTTGATCGTTATAAAGGAAGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCTTACCCTTTAG ACCTTTTTGAAGAAGTCTGTACTAATATGTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTACGTCTGGAGGATCTGCGAATCCCTC CTTCCTATACGAAAACCTTCCAAGGCCCGCTCATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAATATGGGCGTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAA TTGGGGTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTTACGAAAGATGATGAGAACGTGAACCTACAACCATTTATGC GTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTGTGCCGAAGCCATTTTAAATCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCAGGTACATGCGA

Hình 5. Trình tự DNA trên đoạn gen *rbcl* của giống Bạch đàn lai UP54

Các trình tự này được so sánh với các trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) bằng phần mềm BLAST để tìm ra sự khác biệt ở cấp

độ loài. Một số loài có trình tự gen tương đồng với giống Bạch đàn lai UP35 được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Một số loài có trình tự đoạn *rbcl* tương đồng với giống UP35 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>E. urophylla</i>	KJ440000.1	100
2	<i>E. pellita</i>	KF496742.1	100
3	<i>E. grandis</i>	AB537496.1	100
4	UP54_ <i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	UP54	100
5	<i>Syzygium aromaticum</i>	NC_047249.1	99,07

Từ dữ liệu của các trình tự thu được khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 với các loài khác được xác

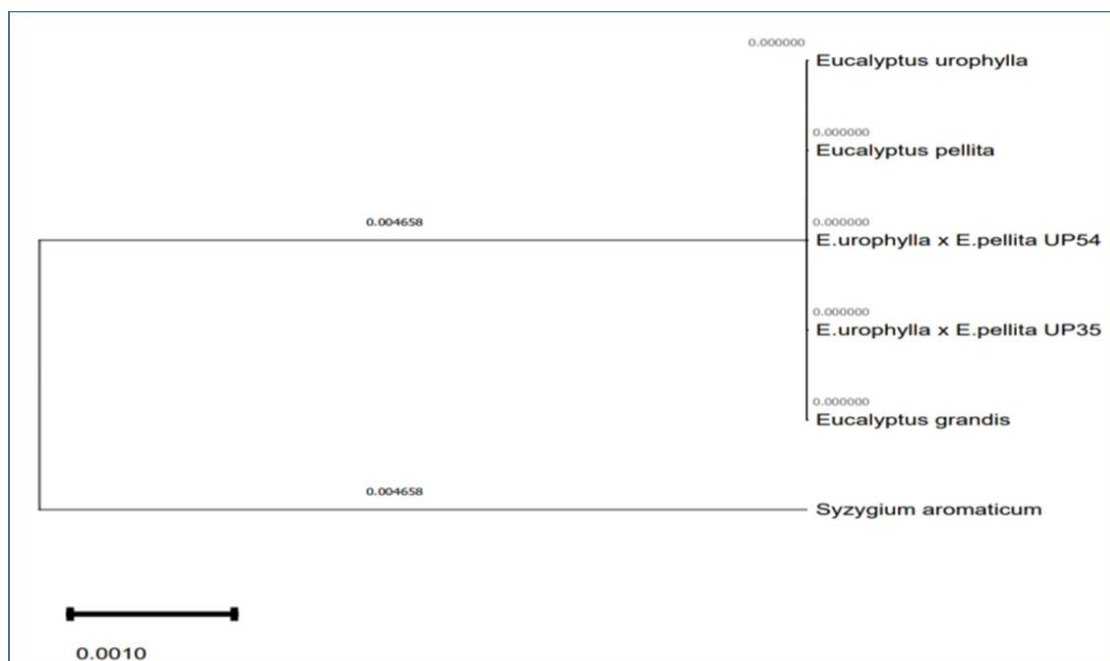
định bằng phương pháp Kimura 2-parameter trong Mega X và trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai UP35 với các loài khác của đoạn *rbcl*

	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP54	<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP35
<i>Syzygium aromaticum</i>						
<i>E. urophylla</i>	0,0093					
<i>E. pellita</i>	0,0093	0,0000				
<i>E. grandis</i>	0,0093	0,0000	0,0000			
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP54	0,0093	0,0000	0,0000	0,0000		
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP35	0,0093	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	

Trên cơ sở của khoảng cách di truyền, cây phát sinh chủng loại được xây dựng để xác định

mối quan hệ của giống UP35 và UP54 với các loài khác (Hình 6).



Hình 6. Cây quan hệ di truyền dựa trên đoạn gen *rbcL* của giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với một số loài trên Ngân hàng gen Quốc tế

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 Bạch đàn lai UP35 và UP54 với các loài khác ta thấy: 100% với đoạn gen của giống Bạch đàn lai UP54 và UP35 giống với các loài *E. urophylla*, *E. pellita*, *E. grandis* với hệ số tương đồng 100% (khoảng cách di truyền là 0,0000) và có quan hệ xa hơn với loài *Syzygium aromaticum* với hệ số tương

đồng 99,07% (khoảng cách di truyền là 0,0093). Như vậy, với đoạn gen *rbcL* chưa xác định được sự khác nhau giữa hai dòng UP54 và UP35.

3.3.2. Trình tự đoạn gen *matK*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *matK* cho thấy cả 3 mẫu UP35.1; UP35.2; UP35.3 có kích thước 643 bp và 3 mẫu UP54.1; UP54.2; UP54.3 có kích thước 643 bp được thể hiện như Hình 7 và Hình 8.

```
TGGCTTCAAAGATACGCCTCTTCTGATGAAGAAATGGAAATATTACCTTGTTAATTTATGGCAATATCATTITTTACGCCTGGTTTCAACCAGGAAGGATCGAT
ATAAACCAATTATGCAAGTATTCTTTACTTTTTGGGCTATCGTTCAAGCGTGCGACTAAATTCCTCAGTGGTACGAAGTCAAATGCTAGAAAATTCATTCTAATA
AATAATGCTATGAAGAAGTTCGAGACAATAGTTCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGTCTAAAGCGAATTTTTGTGACACATTAGGGCATCCCATAGTAAACC
GACCCGGGCTGATTATCAGATTCTGATATTATCGACCGTTTTTTGCGTATATCCAGAAATCTTTCTCATTATCACAGCGGATCCTCAAAAAAAAAAGAGTTTATATCG
AGTAAATATATACTTCGACTTTCTTGTTTAAACTTTGGCTCGTAAACACAAAAAGACTGTACGTACTTTTTTAAAAAGATTAGGTTCCGGAATTTTTGGAAGAATT
CCTTACGGAGGAAGAAGTTGTTCTTTCTTTGATCTTCCCAAGAACTTATTCTACTTCACGAAGTTATATAGAGGGCGGATTTGGTATTTGGATATTACTTCTATCAA
```

Hình 7. Trình tự DNA trên đoạn gen *matK* của giống Bạch đàn lai UP35

```
TGGCTTCAAAGATACGCCTCTTCTGATGAAGAAATGGAAATATTACCTTGTTAATTTATGGCAATATCATTITTTACGCCTGGTTTCAACCAGGAAGGATCGAT
ATAAACCAATTATGCAAGTATTCTTTACTTTTTGGGCTATCGTTCAAGCGTGCGACTAAATTCCTCAGTGGTACGAAGTCAAATGCTAGAAAATTCATTCTAATA
AATAATGCTATGAAGAAGTTCGAGACAATAGTTCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGTCTAAAGCGAATTTTTGTGACACATTAGGGCATCCCATAGTAAACC
GACCCGGGCTGATTATCAGATTCTGATATTATCGACCGTTTTTTGCGTATATCCAGAAATCTTTCTCATTATCACAGCGGATCCTCAAAAAAAAAAGAGTTTATATCG
AGTAAATATATACTTCGACTTTCTTGTTTAAACTTTGGCTCGTAAACACAAAAAGACTGTACGTACTTTTTTAAAAAGATTAGGTTCCGGAATTTTTGGAAGAATT
CCTTACGGAGGAAGAAGTTGTTCTTTCTTTGATCTTCCCAAGAACTTATTCTACTTCACGAAGTTATATAGAGGGCGGATTTGGTATTTGGATATTACTTCTATCAA
```

Hình 8. Trình tự DNA trên đoạn gen *matK* của giống Bạch đàn lai UP54

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 giống Bạch đàn lai UP35 được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Một số loài có trình tự đoạn *matK* tương đồng với giống UP35 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>E. urophylla</i>	KJ510901.1	100
2	<i>E. pellita</i>	KT633046.1	99,45
3	<i>E. grandis</i>	MG925369.1	99,45
4	UP54_ <i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	UP54	100
5	<i>Syzygium aromaticum</i>	KM065365.1	98,07

Từ dữ liệu của các trình tự thu được khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 với các loài khác được xác

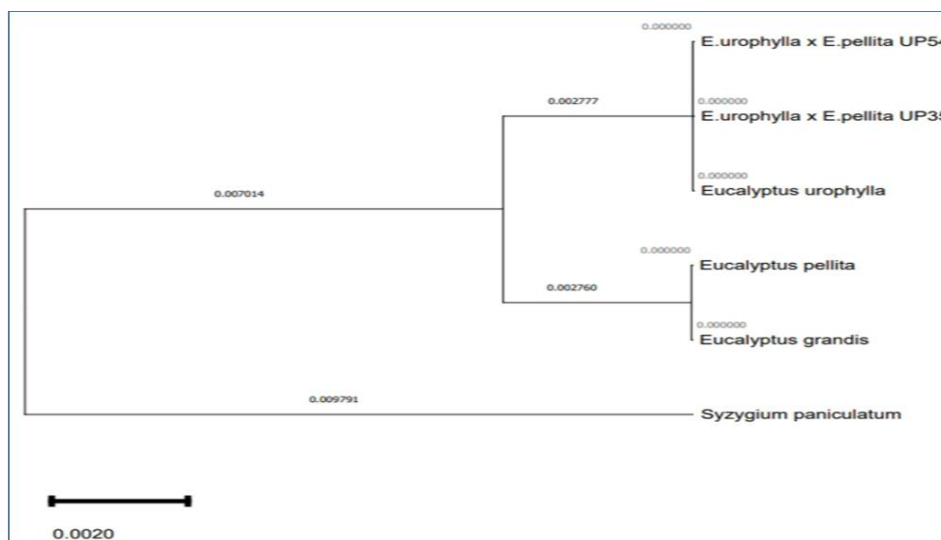
định bằng phương pháp Kimura 2-parameter trong Mega X và trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai UP35 với các loài khác của đoạn *matK*

	<i>Syzygium paniculatum</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP54	<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP35
<i>Syzygium paniculatum</i>						
<i>E. urophylla</i>	0,0196					
<i>E. pellita</i>	0,0196	0,0055				
<i>E. grandis</i>	0,0196	0,0055	0,0000			
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP54	0,0196	0,0000	0,0055	0,0055		
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP35	0,0196	0,0000	0,0055	0,0055	0,0000	

Trên cơ sở của khoảng cách di truyền, cây phát sinh chủng loại được xây dựng để xác định

mối quan hệ của giống UP35 và UP54 với các loài khác (Hình 9).



Hình 9. Cây quan hệ di truyền dựa trên đoạn gen *matK* của giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với một số loài trên Ngân hàng gen Quốc tế

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 Bạch đàn

lai UP35 và UP54 với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai UP35 có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của UP54, *E. urophylla* với khoảng

cách di truyền là 0,0000 và có quan hệ xa hơn với loài *E. grandis*, *E. pellita* với khoảng cách di truyền là 0,0055 (hệ số tương đồng 99,45%). Tuy nhiên, giống Bạch đàn lai UP35 có quan hệ xa nhất với loài *Syzygium aromaticum* với khoảng cách di truyền là 0,0196 (hệ số tương đồng 98,07%). Như vậy, với đoạn gen *matK* chưa xác định được sự khác nhau giữa hai dòng

UP54 và UP35.

3.3.3. Trình tự đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA* cho thấy cả 3 mẫu UP35.1; UP35.2; UP35.3 có kích thước 626 bp và 3 mẫu UP54.1; UP54.2; UP54.3 có kích thước 626 bp được thể hiện như Hình 10 và Hình 11.

CGCGCATGGTGGATTACAATCCACTGCCTTGATCCACTGGCTACATCCGCCCCACTACTACTAATATTCTTTTTCTTTTTAAATGGATTAAGAAAAA
AAAGAATATCCATTTTTAATGAAATAAAAAAGAAATTCATAATGGAAAATATTCATTCGATTGTAATTTTTAACATTTTTCTATACTAATTATGAGTAACATT
TTTCTATCTTAATTATGAGATAGAAGAAGCAGAAAATTATAACCTTTCTATTTATTTGATAAAAAAACTAGAAGATAATAATCTCACAAAGCCTTACAAAGGGTT
GAAAAGAATGTATATAAATTCATATCTAAGGAAAAAAGTATGATAAGCAATCATAAGCAATCCCTAAGACTAGAATACTTTTTCTTATGTTGAAGTAAAGAAAAAC
TTATGTAAGAAAAAGAGCACTAAATAAAGGAACAATAACCAATTTCTTTTTCTATCAAGAGTGTGGTTATTGCTCCTTTCCAATCAAAAACCTCGGCTAGACTTATAC
TAAGACCAAAGTCTTATCCATTTGTAGATGGAACCTCGACAGCAGCTAGGTCTAGAGGGAAGTTATGAGCATTACGTTTCATGCATAAC

Hình 10. Trình tự DNA trên đoạn gen *trnH-psbA* của giống Bạch đàn lai UP35

CGCGCATGGTGGATTACAATCCACTGCCTTGATCCACTGGCTACATCCGCCCCACTACTACTAATATTCTTTTTCTTTTTAAATGGATTAAGAAAAA
AAAGAATATCCATTTTTAATGAAATAAAAAAGAAATTCATAATGGAAAATATTCATTCGATTGTAATTTTTAACATTTTTCTATACTAATTATGAGTAACATT
TTTCTATCTTAATTATGAGATAGAAGAAGCAGAAAATTATAACCTTTCTATTTATTTGATAAAAAAACTAGAAGATAATAATCTCACAAAGCCTTACAAAGGGTT
GAAAAGAATGTATATAAATTCATATCTAAGGAAAAAAGTATGATAAGCAATCATAAGCAATCCCTAAGACTAGAATACTTTTTCTTATGTTGAAGTAAAGAAAAAC
TTATGTAAGAAAAAGAGCACTAAATAAAGGAACAATAACCAATTTCTTTTTCTATCAAGAGTGTGGTTATTGCTCCTTTCCAATCAAAAACCTCGGCTAGACTTATAC
TAAGACCAAAGTCTTATCCATTTGTAGATGGAACCTCGACAGCAGCTAGGTCTAGAGGGAAGTTATGAGCATTACGTTTCATGCATAAC

Hình 11. Trình tự DNA trên đoạn gen *trnH-psbA* của giống Bạch đàn lai UP54

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 Bạch đàn lai UP35 được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Một số loài có trình tự đoạn *trnH-psbA* tương đồng với giống UP35 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>E. urophylla</i>	EF507887.1	100
2	<i>E. grandis</i>	EF507887.1	88,51
3	UP54_ <i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	UP54	100
4	<i>Syzygium aromaticum</i>	MH070008.1	85,05

Từ dữ liệu của các trình tự thu được khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 với các loài khác được xác

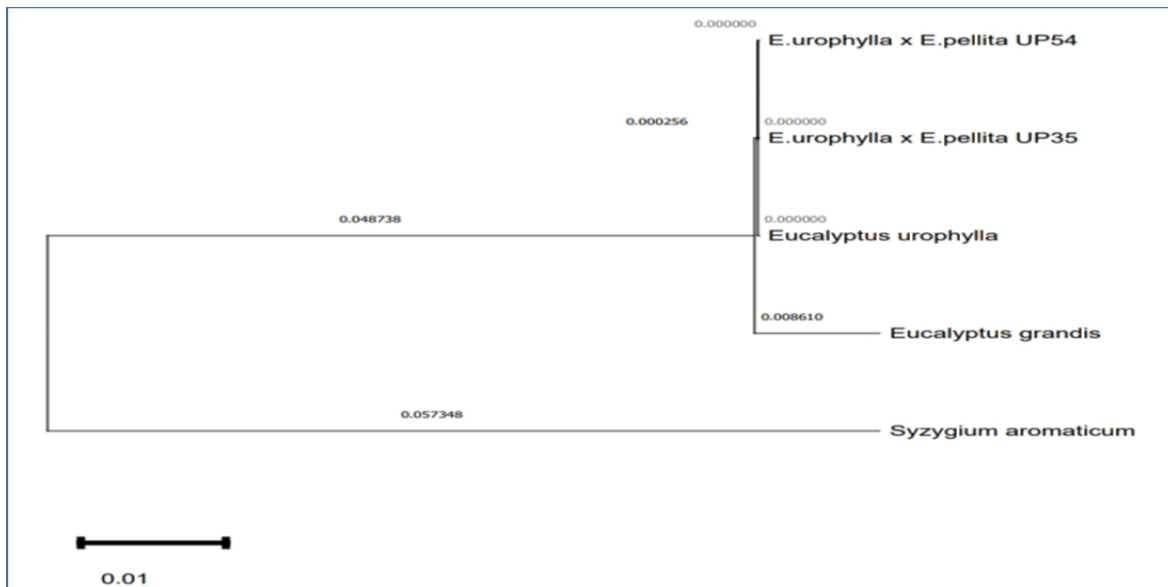
định bằng phương pháp Kimura 2-parameter trong Mega X và trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Khoảng cách di truyền của giống UP35 với các loài khác của đoạn *trnH-psbA*

	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP54	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP35
<i>Syzygium aromaticum</i>					
<i>E. urophylla</i>	0,1105				
<i>E. grandis</i>	0,0966	0,0087			
<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP54	0,1105	0,0000	0,0087		
<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP35	0,1105	0,0000	0,0087	0,0000	

Trên cơ sở của khoảng cách di truyền, cây phát sinh chủng loại được xây dựng để xác

định mối quan hệ của giống UP35 và UP54 với các loài khác (Hình 12).



Hình 12. Cây quan hệ di truyền dựa trên đoạn gen *trnH-psbA* của giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với một số loài trên Ngân hàng gen Quốc tế

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *trnH-psbA* kết hợp với hệ số tương đồng của giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai UP35 có trình tự gen tương đồng 100% với giống UP54, với loài *E. urophylla* (khoảng cách di truyền 0,0000), tương đồng 88,51% với đoạn gen của loài *E. grandis* và có quan hệ xa nhất với loài *Syzygium aromaticum* với hệ số tương đồng 85,05% (khoảng cách di truyền 0,1105).

Như vậy, với đoạn gen *trnH-psbA* chưa xác định được sự khác nhau giữa hai dòng UP54 và UP35.

3.3.4. Trình tự đoạn gen ITS

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen ITS cho thấy cả 3 mẫu UP35.1; UP35.2; UP35.3 có kích thước 534 bp và 3 mẫu UP54.1; UP54.2; UP54.3 có kích thước 563 bp được thể hiện như Hình 13 và Hình 14.

```
CCGACGTCCTCTCGACGCCGAGGATCGGGGCTCGGGCACCTCCGGGCGCTCGGCCCTTTGTCCTCGGCGGCACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAG
GAACCTTAACAAGAGTGCGATGCTCCCGCCGCCCATACACGGTGCGCGCGGGGATGCCATGCAATCTCATATTACTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTC
GGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCTAGCGAAGTGCATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAACCTTTG
GTCGAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTACACATGGCGTTGCCCTAATCCCTCCGTCCTCTAAACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCTCCCGCG
ACGACCACGTCGCGGTTGGCCAAAATCGAGCGTCGGAGCGATCAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTGCCGCTCATC
CGCGCTCCGCGAATCTGCTCTTACCAACGCGACCCCA
```

Hình 13. Trình tự DNA trên đoạn gen ITS của giống Bạch đàn lai UP35

```
TCAGCCCGACGTCCTCTCGACCGGAGGATCGGGGCTCGGGCACCTCAGGGCGCTCGGCCCTTTGTCCTCGGCGGCACGAACCCCGCGCGGAATGCG
CCAAGGAACCTTAACAAGAGTGCGATGCTCCCGCCGCCCATACACGGTGCGCGCGGGGATGCCATGCAATCTCATATTAGTCATAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCTAGCGAAGTGCATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAAC
CTTTGGTCGAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTACACATGGCGTTGCCCTAATCCCTCCGCCCTCTGAACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCTCC
CGCGACGACCAGTCCCGGTTGGCCAAAATCGAGCGTCGGAGCGATCAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTGCCGCTCATC
TCATCGCACGCTCCGCGAATCTGCTCTTACCAACGCGACCCCA
```

Hình 14. Trình tự DNA trên đoạn gen ITS của giống Bạch đàn lai UP54

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 Bạch đàn lai UP35 được trình bày ở Bảng 8.

Bảng 8. Một số loài có trình tự đoạn ITS tương đồng với giống UP35 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>E. urophylla</i>	HM596068.1	99,44
2	<i>E. pellita</i>	KT631261.1	98,88
3	<i>E. grandis</i>	AF058475.1	98,13
4	UP54_ <i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	UP54	99,06
5	<i>Syzygium aromaticum</i>	KM064993.1	90,11

Từ dữ liệu của các trình tự thu được khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 với các loài khác được xác

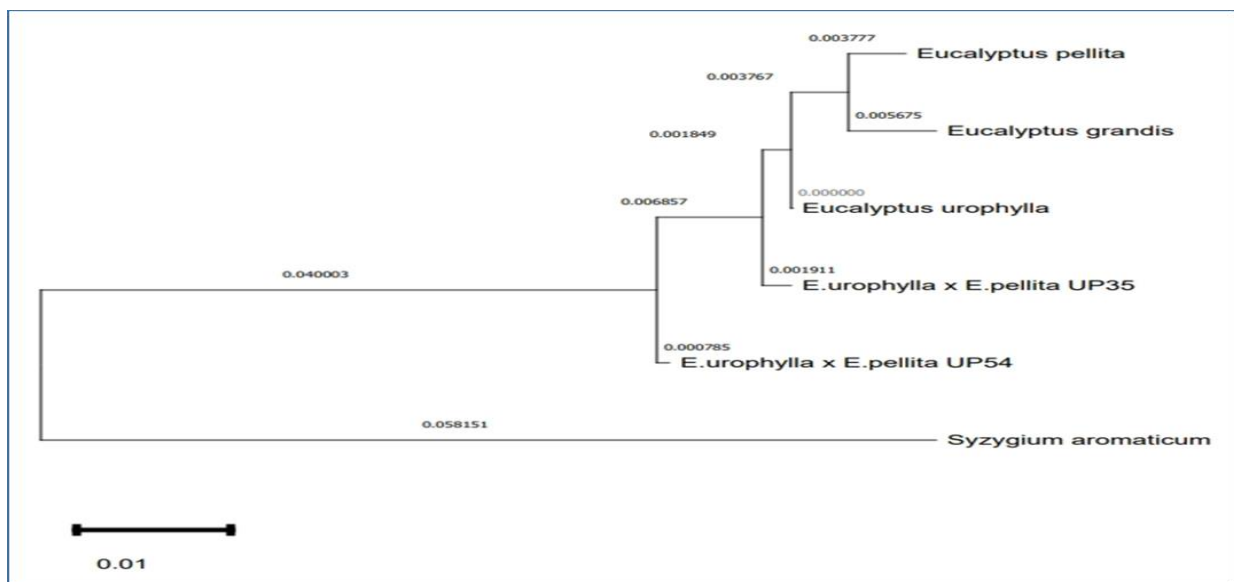
định bằng phương pháp Kimura 2-parameter trong Mega X và trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai UP35 với các loài khác của đoạn ITS

	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP54	<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP35
<i>Syzygium aromaticum</i>						
<i>E. urophylla</i>	0,1006					
<i>E. pellita</i>	0,1094	0,0076				
<i>E. grandis</i>	0,1080	0,0076	0,0095			
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP54	0,0983	0,0075	0,0171	0,0134		
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i> _UP35	0,1024	0,0038	0,0114	0,0133	0,0095	

Trên cơ sở của khoảng cách di truyền, cây phát sinh chủng loại được xây dựng để xác định

mối quan hệ của giống UP35 và UP54 với các loài khác (Hình 15).



Hình 15. Cây quan hệ di truyền dựa trên đoạn gen ITS của giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với một số loài trên Ngân hàng gen Quốc tế

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen ITS kết hợp với hệ số tương đồng của

giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai UP35 có trình tự gen

tương đồng 99,06% với giống UP54, tương đồng 99,44% với loài *E. urophylla*, tương đồng 99,88% với loài *E. pellita*, tương đồng 98,13% với đoạn gen của loài *E. grandis* và có quan hệ xa nhất với loài *Syzygium aromaticum* với hệ số tương đồng 90,11%. Do đó, đoạn gen *ITS* đã phân biệt được hai dòng UP54 và UP35 với tỷ

lệ sai khác là 0,94%.

3.3.5. Trình tự đoạn gen *ITS2*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *matK* cho thấy cả 3 mẫu UP35.1; UP35.2; UP35.3 có kích thước 175 bp và 3 mẫu UP54.1; UP54.2; UP54.3 có kích thước 214 bp được thể hiện như Hình 16 và Hình 17.

CACATGGCGTTGCCCTAATCCCCTCCGCTCTAAACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCCTCCCGCGACGACCACGTCCCGGTTGGCCCAA
AATCGAGCGTCGGAGCGATCAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTCCGCTCATCGCGCGCTCCGCGAATCTGCTCCTT
ACCAAC

Hình 16. Trình tự DNA trên đoạn gen *ITS2* của giống Bạch đàn lai UP35

CACATGGCGTTGCCCTAATCCCCTCCGCTCTGAACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCCTCCCGCGACGACCACGTCCCGGTTGGCCCAA
AATCGAGCGTCGGAGCGATCAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTCCGCTCATCGCACGCTCCGCGAATCTGCTCCTT
ACCAAC

Hình 17. Trình tự DNA trên đoạn gen *ITS2* của giống Bạch đàn lai UP54

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 Bạch đàn lai UP35 được trình bày ở Bảng 10.

Bảng 10. Một số loài có trình tự đoạn *ITS2* tương đồng với giống UP35 trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>E. urophylla</i>	AF390492.1	100
2	<i>E. pellita</i>	KT631261.1	98,29
3	<i>E. grandis</i>	HM596050.1	97,71
4	UP54_ <i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	UP54	98,29
5	<i>Syzygium aromaticum</i>	AY187204.2	89,58

Từ dữ liệu của các trình tự thu được khoảng cách di truyền (p-distance) của giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 với các loài khác được xác

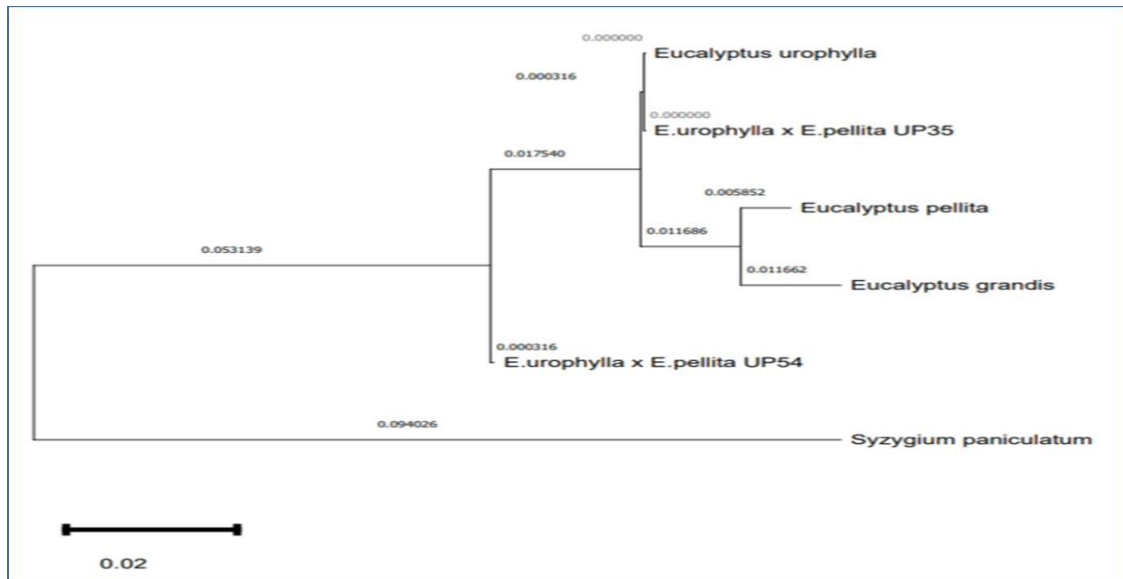
định bằng phương pháp Kimura 2-parameter trong Mega X và trình bày trong Bảng 11.

Bảng 11. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai UP35 với các loài khác của đoạn *ITS2*

	<i>Syzygium paniculatum</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP54	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP35
<i>Syzygium paniculatum</i>						
<i>E. urophylla</i>	0,1723					
<i>E. pellita</i>	0,1723	0,0175				
<i>E. grandis</i>	0,1667	0,0234	0,0175			
<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP54	0,1485	0,0175	0,0357	0,0235		
<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i> _UP35	0,1723	0,0000	0,0175	0,0234	0,0175	

Trên cơ sở của khoảng cách di truyền, cây phát sinh chủng loại được xây dựng để xác định

mối quan hệ của giống UP35 và UP54 với các loài khác (Hình 18).



Hình 18. Cây quan hệ di truyền dựa trên đoạn gen *ITS2* của giống Bạch đàn lai UP35, UP54 với một số loài trên Ngân hàng gen Quốc tế

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 Bạch đàn lai với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai UP35 có trình tự gen tương đồng 100% với đoạn gen của loài *E. urophylla*, tương đồng 98,29% với giống UP54 và loài *E. pellita*, tương đồng 97,71% với loài *E. grandis*, tương đồng 89,58% với loài *Syzygium aromaticum* (khoảng cách di truyền là 0,1723). Do đó, đoạn gen *ITS2* đã phân biệt được hai dòng UP54 và UP35 với

tỷ lệ sai khác là 1,71%.

4. THẢO LUẬN

Dựa vào kết quả so sánh trình tự 5 đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* của Bạch đàn lai UP35 và UP54 ở bảng 11 cho thấy: Các chỉ thị *matK*, *rbcl* và *trnH-psbA* không có sự khác nhau giữa hai giống UP35 và UP54. Tuy nhiên, hai chỉ thị *ITS2*, *ITS* đã chỉ ra có sự khác biệt nhỏ giữa hai giống UP35 và UP54 với tỷ lệ 1,71% và 0,75%, tương ứng.

Bảng 12. So sánh trình tự của các đoạn gen giữa Bạch đàn lai UP35 và UP54

Tên đoạn gen	<i>matK</i>	<i>rbcl</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS2</i>
Số điểm sai khác	0	0	0	4	3
Kích thước trình tự	643	743	626	534	175
Tỷ lệ sai khác (%)	0	0	0	0,75	1,71

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *ITS*: vị trí 15; 149; 340 và 497 đã được đánh dấu in đậm

Query	1	GGCTCGGGCACCTC C GGGCGCTCGGCCTTTGTCCTCGGCGGCACAACGAACCCCGGC	60
Sbjct	1	GGCTCGGGCACCTC A GGGCGCTCGGCCTTTGTCCTCGGCGGCACAACGAACCCCGGC	60
Query	121	GCGCGGGATGCCATGCAATCTCATATTA C TCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG	180
Sbjct	121	GCGCGGGATGCCATGCAATCTCATATTA G TCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG	180
Query	301	CCTGGGTGTACACATGGCGTTGCCCTAATCCCCTCCG T CCTCTAAACGGGGCGAGCGG	360
Sbjct	301	CCTGGGTGTACACATGGCGTTGCCCTAATCCCCTCCG C CCTCTGAACGGGGCGAGCGG	360
Query	481	CGCGTGCCGCTCATCGC G CGCTCCGCGAATCTGCTCCTTACCAACCGGACCCCA	534
Sbjct	481	CGCGTGCCGCTCATCGC A CGCTCCGCGAATCTGCTCCTTACCAACCGGACCCCA	534

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *ITS2*: vị trí 9; 15 và 167 đã được đánh dấu in đậm

Query	1	CCCCTCCG T CCTCT A AACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCCTCCC G CGAC	60
Sbjct	1	CCCCTCCG C CCTCT G AACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCCTCCC G CGAC	60
Query	121	GGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTGCCGCTCATCGC G CGCTCCGC	175
Sbjct	121	GGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTGCCGCTCATCGC A CGCTCCGC	175

Trên thế giới các đoạn chỉ thị *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* đã được sử dụng phổ biến để phân loại các loài Bạch đàn. Năm 1999 đoạn gen *ITS* đã được sử dụng để phân loại cho 35 loài Bạch đàn khác nhau [13]. Fladung cũng đã sử dụng đoạn gen nhân *ITS* và 6 đoạn gen ở lục lạp (*rbcl*, *matK*, *matK-trnK*, *trnG-psbK*, *psbK-psbI*, *psbA-matK*) phân loại thành công 6 loài Bạch đàn (*Eucalyptus*) sinh trưởng ở Mexico [14]. Như vậy, đối với các loài Bạch đàn khác nhau trên thế giới thì các chỉ thị DNA mã vạch của các đoạn gen nhân *ITS* và các đoạn chỉ thị ở lục lạp như *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* đã được sử dụng làm định danh là hoàn toàn tin cậy.

5. KẾT LUẬN

Đã nhân gen thành công các đoạn gen *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR. Trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch đã được xác định: Đoạn *matK* có kích thước là 643 bp, *rbcl* là 743 bp, *trnH-psbA* là 626 bp, *ITS* là 563 bp, và đoạn *ITS2* là 214 bp. Kết quả cũng cho thấy sử dụng chỉ thị *ITS2* và *ITS* làm mã vạch DNA để giám định giống Bạch đàn lai UP35 và UP54 ở Việt Nam là tốt hơn *matK*, *rbcl* và *trnH-psbA*. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng trong việc định danh và phát triển giống cây Bạch đàn lai UP35 và UP54 ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. W. J. Kress (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*. 55: 291–307.

[2]. A. Rydberg (2010). DNA barcoding as a tool for the identification of unknown plant material: A case study on medicinal roots traded in the medina of Marrakech. M.SC thesis, Uppsala University CBOL ABS Brochure.

[3]. 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.

[4]. M. Latvis, S. M. E. Mortimer, D. F. Morales-

Briones, S. Torpey, S. U. Convers, S. J. Jacobs, S. Mathews & D. C. Tank (2017). Primers for *Castilleja* and their utility across *Orobanchaceae*: I. Chloroplast primers. *Appl Plant Sci*. 5: 1-7.

[5]. 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.

[6]. N. Zhang, D. L. Erickson, P. Ramachandran, A. R. Ottesen, R. E. Timme, V. A. Funk, Y. Luo & S. M. Handy (2017). An analysis of *Echinacea* chloroplast genomes: Implications for future botanical identification. *Scientific Reports*. 7(1):216.

[7]. 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.

[8]. 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(1):112.

[9]. R.A. Levin, W.L. Wagner, P.C. Hoch, M. Nepokroeff, J.C. Pires, E.A. Zimmer & K.J. Sytsma (2003). Family-level relationships of *onagraceae* based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* data. *Am. J. Bot*. 90: 107-115.

[10]. W.J. Kress & D.L. Erickson (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding *TrnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*. 2.10.1371/journal.pone.0000508.

[11]. T. Sang, D. Crawford & T. Stuessy (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). *Am. J. Bot*. 84. 1120-1136.

[12]. J.A. Tate & B.B. Simpson (2003). Paraphyly of *Tarasa* (*Malvaceae*) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot*. 28: 723-737.

[13]. D. A. Steane, G. E. McKinnon, R. E. Vaillancourt & B. M. Potts. ITS Sequence Data Resolve Higher Level Relationships Among the *Eucalypts*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12(2): 215-223.

[14]. M. Fladung, H. Schroeder, C. Wehenkel & B. Kersten (2015). Differentiation of six *Eucalyptus* trees grown in Mexico by *ITS* and six chloroplast barcoding markers. *Silvae Genetica*. 64: 121-130.