

XÁC ĐỊNH ADN MÃ VẠCH CHO LOÀI ĐÀN HƯƠNG TRẮNG (*Santalum album* L.) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Nguyễn Thị Hồng Gấm¹, Vũ Thị Lan Anh¹, Kim Thị Huệ¹, Phạm Thị Kim Yên¹,
Nguyễn Đức Nam¹, Bùi Thị Mai Hương¹, Nguyễn Hồng Nhung², Đỗ Tiến Phát²

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

²Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.2023.1.024-032>

TÓM TẮT

Đàn hương trắng là cây gỗ quý có giá trị kinh tế cao, với gỗ có mùi thơm. Hiện nay, loài cây này đang bị khai thác quá mức dẫn tới nguy cơ cạn kiệt. Do vậy, việc sử dụng các đoạn ADN mã vạch để định danh loài Đàn hương trắng phục vụ công tác giám định loài, bảo tồn và phát triển là cần thiết. Trong nghiên cứu này, các phân đoạn ADN mã vạch (*matK*, *rbcL*, *ITS*) được nhân bản từ ADN tổng số của Đàn hương trắng bằng kỹ thuật PCR và sử dụng cho giải trình tự thông qua phương pháp Sanger. Kết quả phân tích trình tự cho thấy, phân đoạn *matK*, *rbcL* và *ITS* có kích thước lần lượt là 805bp, 688bp và 434bp. Kết quả phân tích trình tự với nguồn dữ liệu mở NCBI cho thấy các phân đoạn *matK* và *rbcL* thu được của mẫu cây nghiên cứu có độ tương đồng hoàn toàn (100%) với trình tự các phân đoạn này trên cây Đàn hương trắng xuất xứ Karnataka (Ấn Độ) nhập nội vào Việt Nam (*Santalum album*). Trong khi đó, phân đoạn *ITS* có độ tương đồng 99,54% so với trình tự phân đoạn này trên Đàn hương trắng Ấn Độ. Kết quả nghiên cứu là cơ sở quan trọng cho việc xác định loài Đàn hương đang trồng ở nước ta phục vụ các định hướng phát triển trong tương lai.

Từ khóa: ADN mã vạch, chỉ thị, Đàn hương trắng, định danh, *Santalum album*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đàn hương trắng là cây thân gỗ, cao 10 - 15 m, ở Ấn Độ lên tới 20 m. Thân hình trụ, với chu vi có thể đạt hơn 1,5 m khi trưởng thành. Cây non vỏ nhẵn và có màu từ nâu đến nâu sẫm, xám đen. Ở Việt Nam, loài cây này được nhập nội và trồng tại một số vùng núi Nghệ An, Hà Tĩnh, Thanh Hóa [1]. Đàn hương trắng có giá trị sử dụng và kinh tế cao hơn so với các giống Đàn hương khác. Gần như tất cả các bộ phận của cây đều được sử dụng như thân, lá, rễ, hạt. Gỗ có màu vàng nhạt, mùi thơm được dùng để sản xuất ra các mặt hàng có giá trị cao như đồ gỗ mỹ nghệ, đồ gia dụng cao cấp, trang trí nội thất, dùng chiết tinh dầu, sản xuất nước hoa. Rễ cây Đàn hương còn chứa 60 - 70% lượng tinh dầu, dùng chế xuất tinh dầu hoặc nghiền lấy bột sử dụng trong ngành mỹ phẩm phục vụ làm đẹp và chăm sóc da. Lá cây dùng sản xuất trà sạch chất lượng cao, hạt được dùng chiết tinh dầu, sản xuất rượu. Tuy nhiên, do cây có giá trị và tinh

dầu có hàm lượng santalol alpha cao nên đã bị khai thác quá mức, dẫn đến tình trạng cạn kiệt ở chính các nước cây phân bố tự nhiên [13]. Do đó, việc nhập nội và phát triển loài Đàn hương trắng ở Việt Nam cần thiết và cấp bách.

ADN mã vạch là một phương pháp hiệu quả dùng trong định danh, giám định loài của nhiều đối tượng thực vật khác nhau bao gồm các cây lâm nghiệp. Đây là phương pháp hữu hiệu hỗ trợ cho phương pháp phân loại dựa vào hình thái [4]. Ở động vật, đoạn mã vạch ADN được sử dụng cho phần lớn các loài là đoạn gen ở ty thể cytochrome C oxidase (*COI*) [2, 3]. Ở thực vật, tốc độ tiến hóa của các đoạn gen ty thể không nhanh như ở động vật do đó đoạn *COI* không được sử dụng. Thay vào đó, một số gen lục lạp như *matK*, *rbcL*...; gen vùng nhân như *ITS*, *ITS2*; vùng xen *trnH-psbA*, *psbK-psbI* được sử dụng kết hợp để giám định các loài thực vật [5, 6, 8, 10, 12].

Trong nghiên cứu này, 3 phân đoạn ADN mã vạch bao gồm *matK*, *rbcL* và *ITS* đã được lựa chọn để định danh loài cho mẫu Đàn hương trắng. Kết quả phân tích trình tự ghi nhận, các phân đoạn này có độ tương đồng cao (99,54%-100%) với các trình tự tương ứng của loài Đàn hương trắng Ấn Độ. Kết quả nghiên cứu khẳng định tiềm năng ứng dụng ADN mã vạch trong việc định danh loài Đàn hương phục vụ công tác bảo tồn và phát triển loại cây lâm nghiệp có giá trị này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu lá cây Đàn hương trắng trồng tại Hà Nội được Viện nghiên cứu cây Đàn Hương và thực vật quý hiếm cung cấp.

Trình tự các cặp mồi *rbcL* (rP1F: ATGTCACCACAAACAGAAAC; rP1R: TCGCATGTACCTGCAGTAGC) với nhiệt độ gắn mồi 56°C; mồi *matK* (mP3F: CGATCTATTCATTCAATATTTTC; mP3R: TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT) với nhiệt độ gắn mồi 52°C; mồi *ITS* (IsP2F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT; IsP2R: GACGCTTCTCCAGACTACAAT) với nhiệt độ gắn mồi 56°C [9]. Các cặp mồi sử dụng cho các đoạn gen cần nhân được cung cấp bởi Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam).

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, ADN marker, Redsafe...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Đàn hương trắng theo hướng dẫn

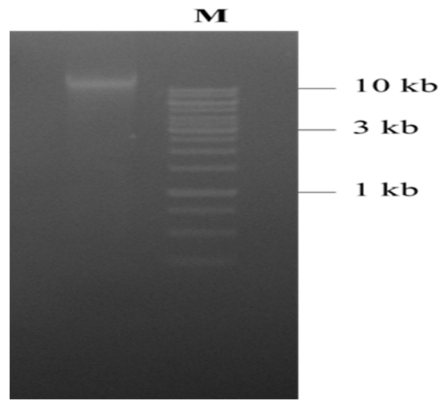
sử dụng Kit (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen. Nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcL* và *ITS* từ các mẫu ADN tổng số bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700, mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 µl, bao gồm: H₂O deion (7 µl), 2x PCR Master mix Solution (10 µl), 10 pmol/µl mồi xuôi (1,0 µl), 10 pmol/µl mồi ngược (1,0 µl) và 50 ng/µl ADN khuôn (1 µl). 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 mồi 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. Sau khi tinh sạch sản phẩm PCR được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự.

Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như Bioedit để lấy được trình tự ADN, sau đó được phân tích với nguồn dữ liệu mở NCBI để tìm ra các loài tương đồng. Tiếp theo, chương trình Mega11 được sử dụng để xây dựng cây phân loại tương đồng.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Đàn hương trắng

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Đàn hương trắng bằng Kit tách chiết của hãng Norgen được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch. Kết quả cho thấy, nồng độ ADN tổng số thu được dao động từ 100-200ng/µl. Ngoài ra, tỷ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} trong khoảng từ 1,7 - 2,05. Kết quả điện di cho thấy các băng ADN khá sắc nét, không có sản phẩm phụ. Điều này khẳng định ADN tổng số tách chiết từ lá cây đàn hương ít bị đứt gãy và đảm bảo độ tinh sạch cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1).

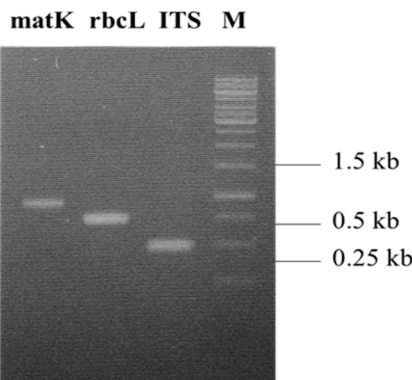


Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm ADN tổng số của Đàn hương chạy điện di trên gel agarose 0,8%; M: ladder 1 kb

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

ADN tổng số tách chiết từ các mẫu lá của

cây Đàn hương trắng được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcL* và *ITS* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR các đoạn gen *matK*, *rbcL* và *ITS* của Đàn hương trắng

Kết quả PCR sau khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 2) 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 cũng cho thấy không có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR có độ đặc hiệu cao. Sau khi tinh sạch, các sản phẩm này được sử dụng 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 đoạn gen *ITS*

Trình tự đoạn gen *ITS* của mẫu Đàn hương trắng sau khi phân tích trình tự gen đã thu được đoạn trình tự có kích thước là 434bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *ITS* của mẫu Đàn hương như Hình 3.

```
AGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGTTAAGGGCACGCCTGCCTGGGTGTCACGCACCGTGC  
TGCTCCCTAACCCCTTTTAATGGGCGGGGACCTTTGGGAACGAATGCTGGCTTCCCGTGCAAACAATGGCG  
CGGTTAGCTGAAATACTATAGTCCTTGGCGACGCGTCTCATGACGAGTTGTGGATAACAACGTCTTCTTCGG  
GTCGCCACACGACAAACTATAAAGATTCGTGGGACTTTGTTTACATGATGAAAATAGAGGTCCCTTTGCGAC  
CCCAGGTCAGGTGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATT  
CCCTTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGAAGAGCCCAGCTTGAGAATCGGGTGGCAAAGCCATCCGAATTGTAG  
TCTG
```

Hình 3. Trình tự nucleotide của đoạn *ITS*

Trình tự này sau đó được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI bằng công cụ nucleotide

blast để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài và các loài được thể hiện như Hình 4.

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Santalum album isolate SAAL_PA_1of3 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2...	Santalum album	793	793	100%	0.0	99.54%	491	KY700470.1
Santalum album 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; a...	Santalum album	765	765	97%	0.0	99.29%	446	MH547594.1
Ziziphus mauritiana isolate 3011 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	Ziziphus mauritiana	739	739	93%	0.0	99.51%	406	JX856618.1
Santalum album isolate SAAL_R.D_2of3 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Santalum album	713	713	90%	0.0	99.49%	393	KY700471.1
Santalum album partial 26S rRNA gene, specimen voucher VB1	Santalum album	619	619	78%	8e-173	99.42%	348	LT577939.1
Santalum album partial 26S rRNA gene, specimen voucher SB2	Santalum album	619	619	78%	8e-173	99.42%	353	LT577938.1
Santalum album partial 26S rRNA gene, specimen voucher SB1	Santalum album	619	619	78%	8e-173	99.42%	357	LT577937.1
Santalum album partial 26S rRNA gene, specimen voucher AB2	Santalum album	619	619	78%	8e-173	99.42%	345	LT577936.1
Santalum album partial 26S rRNA gene, specimen voucher AB1	Santalum album	619	619	78%	8e-173	99.42%	347	LT577935.1
Santalum album voucher CMPR8773 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Santalum album	606	606	76%	6e-169	99.40%	790	KY563220.1
Santalum album partial 26S rRNA gene, specimen voucher VB2	Santalum album	595	595	74%	1e-165	100.00%	322	LT577940.1
Santalum album UASWS0418 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribo...	Santalum album	595	595	75%	1e-165	99.39%	737	HM235968.1
Santalum album isolate 20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete se...	Santalum album	588	588	75%	2e-163	99.09%	759	JX856495.1
Santalum album isolate SBB-0062F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Santalum album	580	580	73%	4e-161	99.38%	783	MG748844.1
Santalum album genes for 5.8S rRNA, ITS 2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: CHULA-025	Santalum album	580	580	73%	4e-161	99.38%	343	LC435402.1
Santalum album voucher PS1377MT04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, ...	Santalum album	580	580	73%	4e-161	99.38%	785	FJ980416.1
Santalum album voucher PS1377MT01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, ...	Santalum album	580	580	73%	4e-161	99.38%	786	FJ980415.1
Santalum album small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom...	Santalum album	555	555	70%	2e-153	99.35%	743	MH547587.1
Santalum haleakalae voucher HNPV08San 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Santalum haleak...	555	555	76%	2e-153	96.99%	791	GU011990.1
Santalum macrogregorii internal transcribed spacer 1, partial sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene and internal l...	Santalum macrogr...	549	549	76%	1e-151	96.43%	863	HM116974.1

Hình 4. Kết quả minh họa trình tự blast của đoạn ITS trên NCBI

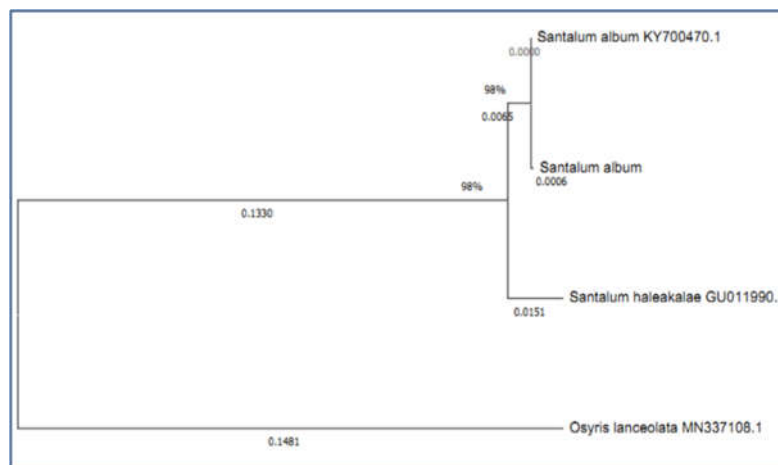
Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với Đàn hương trắng được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Một số loài có trình tự đoạn ITS tương đồng với Đàn hương trắng trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng di truyền (%)
1	<i>Santalum album</i>	KY700470.1	99,54
2	<i>Santalum haleakalae</i>	GU011990.1	96,99
3	<i>Osyris lanceolata</i>	MN337108.1	82,03

Sau đó, xây dựng cây quan hệ di truyền của các loài ở Bảng 1 bằng phương pháp Maximum

Likelihood của phần mềm Mega 11 được thể hiện ở Hình 5.



Hình 5. Cây quan hệ di truyền giữa gen ITS của cây Đàn hương với một số loài trên ngân hàng gen quốc tế

Từ cây phân loại dựa trên trình tự đoạn *ITS* kết hợp với hệ số tương đồng cho thấy: Đàn hương trắng nghiên cứu có sự tương đồng cao nhất với loài Đàn hương trên NCBI *Santalum album* (KY563220.1) với hệ số tương đồng là 99,40%, quan hệ xa nhất với loài *Osyris lalanceolata* (MN337108.1) với hệ số tương đồng

là 82,03%.

3.3.2. Trình tự đoạn gen *rbcL*

Trình tự gen *rbcL* của mẫu Đàn hương sau khi phân tích trình tự gen đã thu được đoạn trình tự có kích thước là 688bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcL* như Hình 6.

CTGGGGTTAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGATTATGTAACCAAAGATACTGATATCTTGCGCA GCATTCCGAGTAACCTCAACCTGGAGTTCGGCCTGAGGAAGCAGGGGCCGCGGTAGCTGCTGAATCTTCT ACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCAC ATCGAGCCCCGTTGCTGGAGAAGAACTCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAA GGTTCTGTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGCAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTAAGG CTGGAGGATCTGCGAATCCCTCCTGCTTATTCTAAAACTTTTCAAGGCCACCTCATGGCATCCAAGTTGAG AGAGATAAAATTGAACAAGTATGGACGTCCGTTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCCGCT AAGAACTATGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTTCGCGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTA AACTCCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAGGCACAGGCC GAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCA

Hình 6. Trình tự nucleotide của đoạn *rbcL*

Trình tự này sau đó được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI bằng công cụ nucleotide

blast để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài và các loài được thể hiện như Hình 7.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Santalum album voucher CMPR8773 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)...	Santalum album	1266	1266	100%	0.0	99.85%	719	KY556634.1
Santalum album chloroplast complete genome	Santalum album	1266	1266	100%	0.0	99.85%	144034	MK638825.1
Santalum album ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (rbcL) gene chloroplast gene encoding chloroplast pr...	Santalum album	1266	1266	100%	0.0	99.85%	1419	L26077.1
Santalum album chloroplast complete genome	Santalum album	1260	1260	100%	0.0	99.71%	144101	MK675809.1
Santalum album chloroplast complete genome	Santalum album	1260	1260	100%	0.0	99.71%	144101	MN106256.1
Santalum boninense KYO:Nishimura & Takayama 18031601 chloroplast DNA complete genome	Santalum bonin...	1260	1260	100%	0.0	99.71%	144263	LC522526.1
Santalum paniculatum voucher J.P. Der s.n. ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit...	Santalum panicu...	1260	1260	100%	0.0	99.71%	1428	MH390690.1
Santalum album voucher Z. D. Chen HN253 (PE) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large su...	Santalum album	1260	1260	100%	0.0	99.71%	827	MG999448.1
Santalum album chloroplast complete genome	Santalum album	1260	1260	100%	0.0	99.71%	144101	NC_048953.1
Santalum macrogorii isolate 4499 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) ge...	Santalum macgr...	1254	1254	100%	0.0	99.56%	1408	EF584607.1
Santalum album ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase (rbcL) gene partial cds: chloroplast	Santalum album	1253	1253	98%	0.0	100.00%	678	KC503287.1
Santalum album voucher PS1377MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbc...	Santalum album	1249	1249	98%	0.0	99.85%	703	GQ436681.1
Santalum album voucher PS1377MT04 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbc...	Santalum album	1243	1243	98%	0.0	99.71%	703	GQ436682.1
Osyris wightiana chloroplast complete genome	Osyris wightiana	1197	1197	99%	0.0	98.11%	147544	MK675807.1
Osyris alba voucher Navarro CN4665 (PE) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (r...	Osyris alba	1197	1197	99%	0.0	98.11%	827	MG999443.1
Osyris alba chloroplast complete genome	Osyris alba	1197	1197	99%	0.0	98.11%	147253	KT070882.1
Osyris wightiana chloroplast complete genome	Osyris wightiana	1197	1197	99%	0.0	98.11%	147544	NC_048952.1
Myoschilos oblongum voucher D. Nickrent 4504 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large sub...	Myoschilos oblo...	1194	1194	100%	0.0	97.97%	1428	MH390688.1
Myoschilos oblongum isolate 4504 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) ge...	Myoschilos oblo...	1194	1194	100%	0.0	97.97%	1401	EF584599.1
Osyris lanceolata ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene partial cds: ch...	Osyris lanceolata	1192	1192	99%	0.0	97.97%	1398	EF464525.1
Osyris quadripartita isolate 4062 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene...	Osyris quadripar...	1188	1188	98%	0.0	98.23%	1377	EF584604.1
Osyris lanceolata ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) gene partial cds: chloroplast ge...	Osyris lanceolata	1188	1188	99%	0.0	97.82%	1398	L11196.2

Hình 7. Kết quả minh họa trình tự blast của đoạn *rbcL* trên ngân hàng NCBI

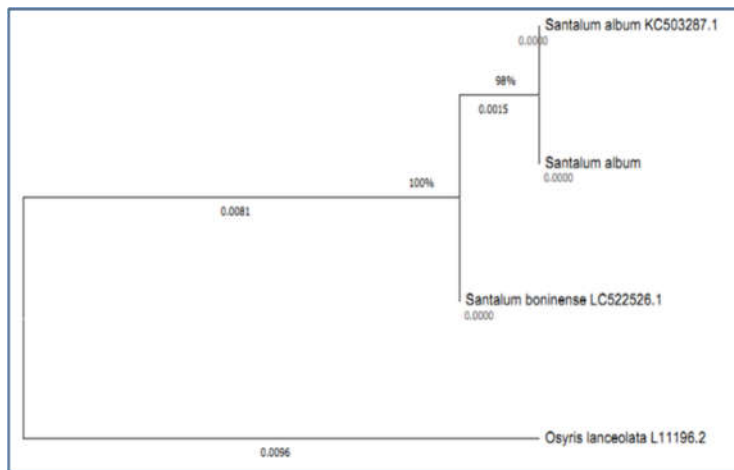
Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với Đàn hương trắng được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Một số loài có trình tự đoạn *rbcL* tương đồng với Đàn hương trắng trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng di truyền (%)
1	<i>Santalum album</i>	KC503287.1	100%
2	<i>Santalum boninense</i>	LC522526.1	99,71%
3	<i>Osyris lanceolata</i>	L11196.2	97,82%

Sau đó, xây dựng cây quan hệ di truyền của các loài bằng phương pháp Maximum

Likelihood của phần mềm Mega 11 được thể hiện ở Hình 8.



Hình 8. Cây quan hệ di truyền giữa gen *rbcL* của cây Đàn hương với một số loài trên ngân hàng gen quốc tế

Từ cây phân loại dựa trên trình tự đoạn *rbcL* kết hợp với hệ số tương đồng cho thấy: Đàn hương trắng nghiên cứu có sự tương đồng cao nhất với loài Đàn hương trên NCBI *Santalum album* (KC503287.1) với hệ số tương đồng là 100%, quan hệ xa nhất với loài *Osyris lanceolata* (L11196.2)

với hệ số tương đồng là 97,82%.

3.3.3. Trình tự đoạn gen *matK*

Trình tự gen *matK* của mẫu Đàn hương sau khi phân tích trình tự gen đã thu được đoạn trình tự có kích thước là 805bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcL* của mẫu Đàn hương như Hình 9.

```

GTTTAATTATGTGTCAAATATACTAATAGCCTATCCTGCCCATCTGGAAATCTTGATTCAAATTCCTTCGT
TACTGGGTGAAAGATGCTTCCTCTTTGCATTTTTTACGATTCTTTTTCCACGAGACTCATAATTGGAATAGT
TTTATTTCTCCAAATAAATCTATTTCTACCCTTTCAAAAATAAATCAAAGATTGCTCCTGTTCTTATATAAT
TCTCATGTCCGTGAATACGAATCCATTTTCATTTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCATTACGATCAAGATCT
TTTGGAAACCCTTCTTGAGCGAATATATTTACATGAAAAATAGAACATATCGTGGATATGTTTACTAAGGAT
TTTCAGGCCATTCCATGGTTGTTAAAGGATCCTTTTCATTCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAAGTAATTCTG
GCTTCAAAGGGACGCCTCTTCTGATGAATAAATGGAAATATTATCTTTCCAATTTCTGGCAATGTCGTTTT
TATGTGTGGTCTCAACCAGGAAGGATCCATATAAACCAATTATCCAACCATTCCTTAGACTTTCTAGGCTAT
CTTTCAAGTGTACAAATAAATCCTTCCGTGGTGCCTAGTCAAATGCTAAAAAATTCATTTATAATAGATAAT
GGTATTAAGAAGTTTGATACCACAGTTCCAATTATTTCTTTTGATTGGATCATTTCGCTAAAGCAAAATTTTGT
AACGTCTTAGGACATCCCATTAGTAAGTCGGTCTGGGCTGATTTAGCGGATTCTGAGATTATTGACCGATTT
TGGCGTATATGCAGAAATCTTTCTCATTATCACAGCGGATCCTCAAAAAAAGAGTTTCTATCGAATAAAG
TATATACTTCG
    
```

Hình 9. Trình tự nucleotide của đoạn *matK*

Trình tự đoạn gen *matK* được BLAST trên ngân hàng gen NCBI để xác định các trình tự tương đồng được thể hiện như Hình 10.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Santalum album chloroplast_complete genome	Santalum album	1605	1605	99%	0.0	99.89%	144101	MK675809.1
Santalum album chloroplast_complete genome	Santalum album	1605	1605	99%	0.0	99.89%	144101	MN106256.1
Santalum album chloroplast_complete genome	Santalum album	1605	1605	99%	0.0	99.89%	144034	MK638825.1
Santalum album chloroplast_complete genome	Santalum album	1605	1605	99%	0.0	99.89%	144101	NC_048953.1
Santalum boninense KYO.Nishimura & Takayama 18031801 chloroplast DNA_complete genome	Santalum boninense	1600	1600	99%	0.0	99.77%	144263	LC522526.1
Santalum album voucher CMPR8773 maturase K (matK) gene_partial cds_chloroplast	Santalum album	1589	1589	98%	0.0	99.88%	872	KY556633.1
Santalum paniculatum voucher J.P. Der s.n. maturase K (matK) gene_complete cds_chloroplast	Santalum paniculatum	1578	1578	99%	0.0	99.31%	1521	MH390648.1
Santalum album maturase K (matK) gene_partial cds	Santalum album	1574	1574	97%	0.0	99.88%	861	AY042650.1
Santalum album voucher Su 028 maturase K (matK) gene_partial cds_chloroplast	Santalum album	1500	1500	93%	0.0	99.88%	1123	KP263262.1
Santalum album maturase K (matK) gene_partial cds_chloroplast	Santalum album	1496	1496	93%	0.0	99.88%	837	MH547601.1
Santalum album voucher Z. D. Chen HN253 (PE) maturase K (matK) gene_partial cds_chloroplast	Santalum album	1493	1493	92%	0.0	99.88%	1073	MG999421.1
Santalum album voucher PS1377MT03 maturase K (matK) gene_partial cds_chloroplast	Santalum album	1476	1476	91%	0.0	100.00%	799	GQ434250.1
Santalum macgregorii isolate 4499 maturase K (matK) gene_partial cds_chloroplast	Santalum macgregorii	1456	1456	93%	0.0	98.90%	1100	EF584631.1
Santalum boninense TF <JPN>: oOGA0298 chloroplast matK gene for maturase K_partial cds	Santalum boninense	1448	1448	90%	0.0	99.87%	787	LC680293.1
Myoschilos oblongum voucher D. Nickrent 4504 maturase K (matK) gene_complete cds_chloroplast	Myoschilos oblongum	1434	1434	99%	0.0	96.33%	1521	MH390646.1
Osyris alba chloroplast_complete genome	Osyris alba	1400	1400	99%	0.0	95.65%	147253	KT070882.1
Osyris wightiana chloroplast_complete genome	Osyris wightiana	1395	1395	99%	0.0	95.53%	147544	MK675807.1
Santalum album chloroplast matK gene for maturase K_partial cds_isolate: CHULA-025	Santalum album	1395	1395	86%	0.0	100.00%	755	LC435403.1
Osyris wightiana chloroplast_complete genome	Osyris wightiana	1395	1395	99%	0.0	95.53%	147544	NC_048952.1
Osyris alba chloroplast matK pseudogene_specimen voucher A. Worberg 015 (BONN)	Osyris alba	1386	1386	99%	0.0	95.30%	2743	AM396499.2
Nestronia umbellula voucher J.P. Der 114 maturase K (matK) gene_complete cds_chloroplast	Nestronia umbellula	1367	1367	99%	0.0	94.96%	1512	MH390647.1

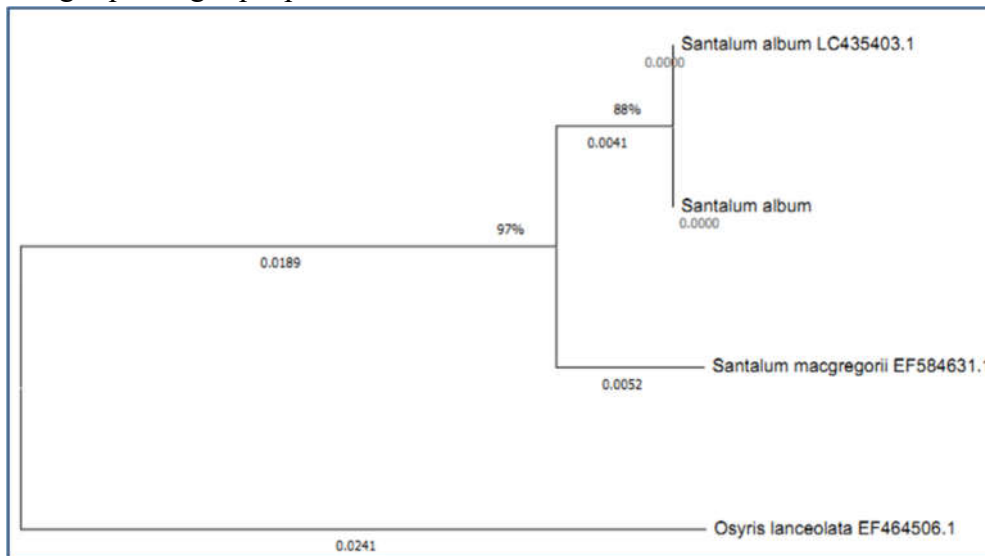
Hình 10. Kết quả minh họa trình tự blast của đoạn *matK* trên ngân hàng NCBI

Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với Đàn hương trắng được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Một số loài có trình tự đoạn *matK* tương đồng với Đàn hương trắng trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng di truyền (%)
1	<i>Santalum album</i>	LC435403.1	100
2	<i>Santalum macgregorii</i>	EF584631.1	98,90
3	<i>Osyris lanceolata</i>	EF464506.1	95,45

Sau đó, xây dựng cây quan hệ di truyền của các loài bằng phương pháp Maximum Likelihood của phần mềm Mega 11 được thể hiện ở Hình 11.



Hình 11. Cây quan hệ di truyền giữa gen *matK* của cây Đàn hương với một số loài trên ngân hàng gen quốc tế

Từ cây phân loại dựa trên trình tự đoạn *matK* kết hợp với hệ số tương đồng cho thấy: Đàn hương trắng nghiên cứu có sự tương đồng cao nhất với loài Đàn hương trên NCBI *Santalum album* (LC435403.1) với hệ số tương đồng là 100%, quan hệ xa nhất với loài *Osyris lalanceolata* (EF464506.1) với hệ số tương đồng là 95,45%.

4. THẢO LUẬN

Dựa vào kết quả so sánh trình tự 3 đoạn gen *matK*, *rbcL* và *ITS* của Đàn hương trắng với trình tự gen của loài Đàn hương trắng *Santalum album* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI cho thấy đoạn *ITS* có khả năng sử dụng để phân biệt loài tốt nhất. Mặc dù vậy, cách tốt nhất là sử dụng đồng thời cả 3 đoạn trình tự gen *matK*, *rbcL* và *ITS* để có thể xác định chính xác nhất loài cần định danh. Trước đây năm 1999 chỉ thị đoạn gen *ITS* đã được sử dụng để phân loại cho 35 loài Bạch đàn khác nhau [11]. Flagdung vào năm 2015 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 [7]. Như vậy, đối với các loài Đàn hương trắng thì các chỉ thị ADN mã vạch của các đoạn gen nhân *ITS* và các đoạn chỉ thị ở lục lạp như *rbcL*, *matK* là hoàn toàn tin cậy và có độ phân loại cao.

5. KẾT LUẬN

Đã khuếch đại và giải trình tự nucleotide của ba phân đoạn mã vạch *ITS* (434 bp), *rbcL* (688 bp) và *matK* (805 bp) từ mẫu cây Đàn hương trắng. Kết quả phân tích trình tự của các ADN mã vạch này cho thấy độ tương đồng cao với loài Đàn hương trắng xuất xứ Karnataka, Ấn Độ (*Santalum album*). Cụ thể, phân đoạn mã vạch *rbcL* và *matK* của mẫu phân tích có độ tương đồng 100% các trình tự này của loài *Santalum album*, trong khi trình tự *ITS* có mức tương đồng đạt 99,54%. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng trong việc định danh và phát triển cây Đàn hương trắng ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Bộ Nông nghiệp & PTNT (2019). Quyết định số 1305/QĐ-BNN-TCLN ngày 22/4/2019 về công nhận

giống cây trồng cây lâm nghiệp mới với giống Đàn hương có xuất xứ Karnataka, Ấn Độ.

[2]. Anders R. (2012). 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]. IJFW Alvarez & Jonathan F Wendel (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular phylogenetics and evolution. 29(3): 417-434.

[4]. Aron J Fazekas, Kevin S Burgess, Prasad R Kesanakurti, Sean W Graham, Steven G Newmaster, Brian C Husband, Diana M Percy, Mehrdad Hajibabaei & Spencer CH Barrett (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. PloS one. 3(7): e2802.

[5]. Mark W Chase, Nicolas Salamin, Mike Wilkinson, James M Dunwell, Rao Prasad Kesanakurthi, Nadia Haidar & Vincent Savolainen (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 360(1462): 1889-1895.

[6]. Shilin Chen, Hui Yao, Jianping Han, Chang Liu, Jingyuan Song, Linchun Shi, Yingjie Zhu, Xinye Ma, Ting Gao & Xiaohui Pang (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS one. 5(1): e8613.

[7]. Matthias 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(1-6): 121-130.

[8]. Caroline S Ford, Karen L Ayres, Nicola Toomey, Nadia Haider, Jonathan Van Alphen Stahl, Laura J Kelly, Niklas Wikström, Peter M Hollingsworth, R Joel Duff & Sarah B Hoot (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. Botanical Journal of the Linnean Society. 159(1): 1-11.

[9]. Morgan R Gostel, Jose D Zúñiga, W John Kress, Vicki A Funk & Caroline Puente-Lelievre (2020). Microfluidic Enrichment Barcoding (MEBarcoding): A new method for high throughput plant DNA barcoding. Scientific reports. 10(1): 1-13.

[10]. W John Kress, Kenneth J Wurdack, Elizabeth A Zimmer, Lee A Weigt & Daniel H Janzen (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102(23): 8369-8374.

[11]. Dorothy A Steane, Gay E McKinnon, René E Vaillancourt & Brad M Potts (1999). ITS sequence data resolve higher level relationships among the eucalypts. Molecular Phylogenetics and Evolution. 12(2): 215-223.

[12]. Maria von Cräutlein, Helena Korpelainen, Maria Pietiläinen & Jouko Rikkinen (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. Biodiversity and conservation. 20(2): 373-389.

[13]. Vu Van Thoai & Ashutosh Srivastava (2020). Sandalwood Cultivation and Utilisation. ed. Walnut Publication.

IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCE OF *Santalum album* TO IDENTIFY PLANT SPECIES

Nguyen Thi Hong Gam¹, Vu Thi Lan Anh¹, Kim Thi Hue¹, Pham Thi Kim Yen¹,
Nguyen Duc Nam¹, Bui Thi Mai Huong¹, Nguyen Hong Nhung², Do Tien Phat²

¹Vietnam National University of Forestry

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

Santalum album L is a species of high economic value with fragrant wood. Nowadays, these species are being exploited quite a lot. Therefore, it is necessary to identify DNA barcode fragments of the *Santalum album* for species identification and conservation. The genomic DNA was extracted from the leaf tissue of the *Santalum album*. The DNA barcodes (*matK*, *rbcL* and *ITS*) were amplified from the total DNA of *Santalum album* by PCR technique. The PCR results indicated that all DNA bands have a size similar to the theoretical size of *matK*, *rbcL* and *ITS* fragments. Nucleotide sequencing results of PCR products showed that the size of the isolated *rbcL* fragment is 688bp, *matK* fragment is 805bp and *ITS* fragment is 434bp. After that, these sequences were compared with other *Santalum* species in NCBI. The results indicated that *Santalum album* L from Karnataka, India imported into Viet Nam belongs to *Santalum album* with *matK* and *rbcL* gene fragments are 100%, *ITS* gene fragment is 99.54%. The research results are important for determining the *Santalum album* in our country for future development orientations.

Keywords: DNA barcoding, identify species, indicator, phylogenetic tree, *Santalum album*.

Ngày nhận bài : 14/10/2022

Ngày phản biện : 17/11/2022

Ngày quyết định đăng : 09/12/2022