

Xác định mã vạch ADN phục vụ giám định loài Bạch quả (*Ginkgo biloba* L.)

Bùi Thị Mai Hương, Nguyễn Quỳnh Trang, Hà Văn Huân*

Trường Đại học Lâm nghiệp

The screening and identification of DNA barcode sequences for *Ginkgo biloba* L.

Bui Thi Mai Huong, Nguyen Quynh Trang, Ha Van Huan*

Vietnam National University of Forestry

*Corresponding author: huanhv@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.2.2025.023-030>

TÓM TẮT

Bạch quả là các loài cây dược liệu có giá trị kinh tế cao, làm thuốc, làm cảnh. Hiện nay, các sản phẩm dược liệu từ Bạch quả đang được bán trên thị trường tràn lan với giá thành rất cao. Do vậy, việc xác định các đoạn mã vạch ADN để định danh cho loài Bạch quả (*Ginkgo biloba*) phục vụ giám định loài là cần thiết trong các sản phẩm dược liệu đó. ADN tổng số được phân lập từ lá cây Bạch quả. Các đoạn mã vạch ADN (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*) được nhân bản từ ADN tổng số của Bạch quả bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR chỉ ra rằng các băng thu được có kích thước giống với kích thước dự kiến, sau đó sản phẩm PCR được xác định trình tự. Kết quả phân tích trình tự đã chỉ ra, đoạn *rbcl* có 679 nucleotide, đoạn *TrnH-psbA* có 275 nucleotide và đoạn *ITS2* có 239 nucleotide. Các trình tự này sau đó được xử lý trên Ngân hàng gen quốc tế (NCBI) đã tìm ra: loài Bạch quả có tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcl*, 99,64% của đoạn gen *trnH-psbA* và 99,58% của đoạn *ITS2* với loài Bạch quả trên NCBI. So sánh sự khác biệt của ba đoạn chỉ thị *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2* cho thấy: đoạn gen *ITS2* và *trnH-psbA* có sai khác. Do vậy, có thể sử dụng chỉ thị *ITS2* và *trnH-psbA* làm mã vạch ADN để giám định loài Bạch quả trong các sản phẩm dược liệu ở Việt Nam.

ABSTRACT

Ginkgo biloba is a species of high economic value with medicinal and ornamental plants. Currently, medicinal products from *Ginkgo biloba* are widely sold at very high prices. So, it is necessary to identify DNA barcode fragments of the *Ginkgo biloba* for species identification. The genomic DNA was extracted from the leaf tissue of *Ginkgo biloba*. The DNA barcodes (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*) were amplified from the total DNA of *Ginkgo biloba* by PCR technique. The PCR results indicated that all DNA bands have a size similar to the theoretical size of *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*. Results nucleotide sequencing of PCR product samples showed that the size of the isolated *rbcl* fragment is 679 bp, the *trnH-psbA* fragment is 275 bp and the *ITS2* fragment is 239 bp. These sequences were analyzed by using Blast on the NCBI we found that: *Ginkgo biloba* had a percent identity of 100% of *rbcl*, 99.64% of *TrnH-psbA* gene fragment, and 99.58% of *ITS2* gene fragment. Then, comparing the differences of the three markers *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2* showed that: *ITS2* and *TrnH-psbA* had the difference sequences. Therefore, it is best to use *ITS2* and *TrnH-psbA* molecular markers as DNA barcodes to identify *Ginkgo biloba* in medicinal products in Vietnam.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/11/2024

Ngày phản biện: 06/12/2024

Ngày quyết định đăng: 09/01/2025

Từ khóa:

Bạch quả, giám định loài, mã vạch ADN, PCR.

Keywords:

DNA barcoding, *Ginkgo biloba*, PCR, Species Identification.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch quả (tên gọi khoa học là *Ginkgo biloba* L.) là cây thân gỗ duy nhất còn tồn tại trong chi

Ginkgo, họ Ginkgoaceae. Bạch quả là cây thảo dược đa công dụng như: hợp chất flavonoid trong Bạch quả là hợp chất chống oxy hóa

mạnh mẽ, giúp cải thiện lưu thông bằng cách làm giãn mạch máu và giảm “độ dính” của tiểu cầu. Lá Bạch quả thường uống để điều trị rối loạn trí nhớ bao gồm cả bệnh Alzheimer, giảm lo âu, căng thẳng, giảm các triệu chứng tâm thần phân liệt, cải thiện các triệu chứng chóng mặt và rối loạn thăng bằng [1, 2]. Hầu hết các sản phẩm thảo dược từ cây Bạch quả được chiết xuất từ lá dưới dạng viên uống hoặc trà [1, 2]. Các sản phẩm dược liệu từ Bạch quả đang được bán trên thị trường tràn lan với giá thành rất cao. Tuy nhiên có rất nhiều sản phẩm chưa được kiểm chứng có thành phần của loài *Ginkgo biloba* L. hay không, nếu có thì nguồn gốc từ đâu vẫn là vấn đề đang cần được giải quyết. Vì vậy, việc xác định các chỉ thị ADN mã vạch cho loài Bạch quả với mục đích định danh chính xác loài Bạch quả trong các sản phẩm dược liệu thương mại trôi nổi trên thị trường và thêm nữa là để đưa vào nghiên cứu tiếp theo như nhân giống, tách chiết các hợp chất flavonoids... là hết sức cần thiết. Do đó, việc nghiên cứu xác định các đoạn mã vạch ADN cho loài Bạch quả phục vụ giám định loài là cần thiết và cấp bách cho việc định danh trong các sản phẩm dược liệu và nhân giống loài Bạch quả tại Việt Nam.

Xác định mã vạch ADN là một phương pháp định danh, sử dụng một đoạn hoặc nhiều đoạn ADN chuẩn ngắn nằm trong bộ genome 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. Phương pháp xác định các đoạn mã vạch ADN là một công cụ hữu hiệu hỗ trợ cho phương pháp phân loại dựa vào hình thái [3]. Ở động vật, đoạn mã vạch ADN được sử dụng cho phần lớn các loài là đoạn gen ở ty thể cytochrome C oxidase (*CO1*) [4]. Ở thực vật, tốc độ tiến hóa của các đoạn gen ty thể không nhanh như ở động vật do đó đoạn *CO1* 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 [5-9].

Nghiên cứu này, đã tiến hành lựa chọn ba đoạn trình tự ADN để sử dụng làm mã vạch ADN là: *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*. Trong số đó, các đoạn *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2* là các đoạn ADN nằm ở hệ gen lục lạp. 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 loài Bạch quả ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: loài Bạch quả được thu thập tại Việt Nam.

Vật liệu nghiên cứu: mẫu lá bánh tẻ của cây Bạch quả, lấy 3 mẫu lá từ 3 cây khác nhau. Sau khi thu, mẫu được bảo quản trong túi nilon có chứa hạt silica gel hút ẩm, sau đó được bảo quản ở -20°C để tách chiết ADN phục vụ nghiên cứu. Kí hiệu các mẫu Bạch quả được lấy: BQ1, BQ2, BQ3.

Trình tự các cặp mồi *rbcl* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C; mồi *TrnH-psbA* (trnP1F: CGCGCATGGTGGATTCAATCC; psbPR1: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C; mồi *ITS2* (IsP1F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT; IsP1R: TCCTCCGCTTATTGATATGC) với nhiệt độ gắn mồi 48°C. Cả 3 mồi này đều nằm ở hệ gen lục lạp.

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 Bạch quả theo hướng dẫn sử dụng Kit (Plant ADN Isolation Kit). Nhân bản đoạn gen *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2* 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 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. Sau khi tinh sạch sản phẩm PCR được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự.

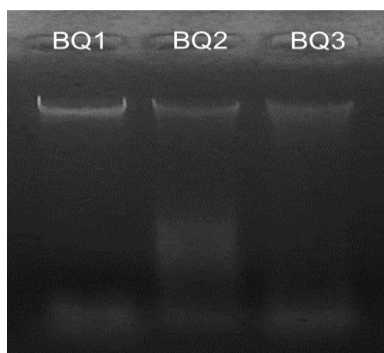
Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như Bioedit, Mega10, NCBI... Trình tự nucleotide của các đoạn gen *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ITS2* được so sánh trên Ngân hàng gen quốc tế

(NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng NCBI.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Bạch quả bằng Kit tách chiết của hãng Norgen được pha loãng để xác định nồng độ và độ tinh sạch. Sau đó, nghiên cứu tiến hành điện di để kiểm tra sự nguyên vẹn của sản phẩm (Hình 1). Kết quả điện di cho thấy các băng ADN khá sắc nét, không có sản phẩm phụ, điều này khẳng định ADN tổng số còn nguyên vẹn, ít đứt gãy. Sản phẩm tách chiết ADN tổng số đảm bảo yêu cầu kỹ thuật làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

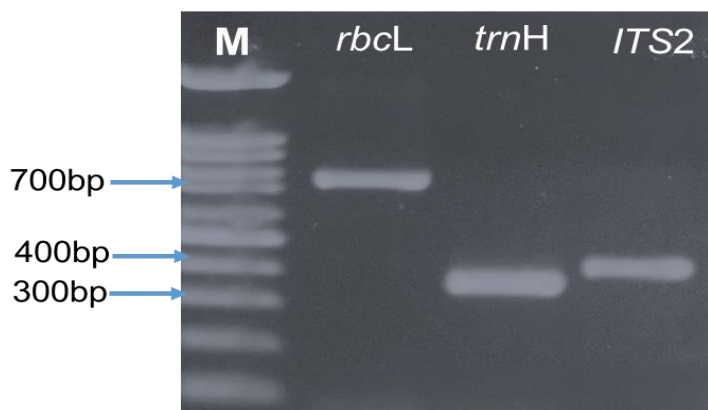


Hình 1. Ảnh điện di ADN tổng số của 3 mẫu Bạch quả
BQ1: Bạch quả 1, BQ2: Bạch quả 2, BQ3: Bạch quả 3

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 Bạch quả được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 2. Kết quả PCR các đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS2* của mẫu Bạch quả
(M là thang marker 1 kb)

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 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 của đoạn gen *rbcl*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *rbcl* được nhân bản có kích thước 679 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcl* của mẫu Bạch quả như sau:

GATTACAGATTGACTTATTATACTCCTGAATATCA
AACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTA
ACTCCTCAACCTGGAGTGCCACCTGAGGAAGCGGGA
GCTGCAGTAGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGA

CCACTGTTTGGACCGATGGACTTACCAGTCTTGATCG
TTACAAGGGAAGATGCTATGACATCGAGCCCGTTCCT
GGGGAGGAAAATCAATTTATTGCCTATGTAGCTTACC
CTTTGGATCTTTTCGAGGAAGGTCTGTTACTAACCT
GTTCACTTCCATTGTAGGGAATGTATTTGGATTCAAA
GCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTC
CTCCTGCTTATTCCAAAACCTTCCAGGGTCCACCTCAT
GGTATCCAAGTTGAAAGGGATAAATTGAATAAATAT
GGCCGTCCCCTATTGGGATGTACTATCAAGCCAAAAT
TGGGTTTATCTGCCAAAATTATGGTAGAGCAGTTTA
CGAATGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTTACTAAAGAT
GATGAGAACGTAAATTCCCAACCATTTCATGCGCTGGA
GAGATCGTTTCTTGTGTTTGTGAGAAGCAATTATAA
AGCTCAGACCGAGACGGGTGAAATTAAGGGACATTA
CTTGAATGCTACTGCAG

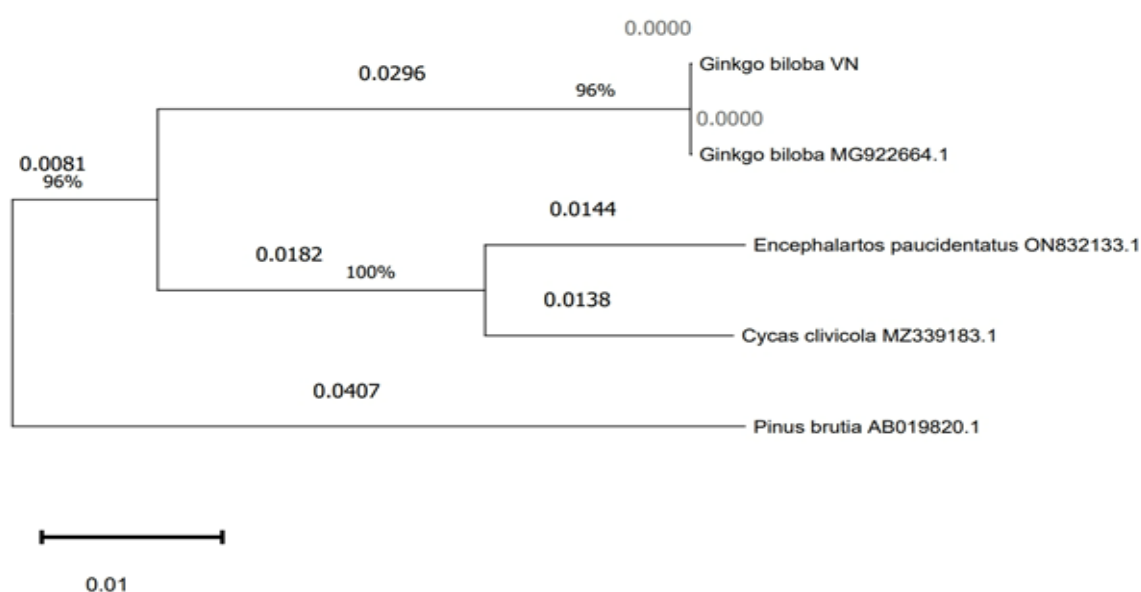
Trình tự này sau đó được xử lý trên NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *rbcl* ở loài Bạch quả bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Bạch quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Một số loài có trình tự đoạn gen *rbcl* tương đồng với loài Bạch quả trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Ginkgo biloba</i>	MG922664.1	100
2	<i>Cycas clivicola</i>	MZ339183.1	94,18
3	<i>Encephalartos paucidentatus</i>	ON832133.1	93,89
4	<i>Pinus brutia</i>	AB019820.1	92,19

Sau đó đã sử dụng các loài trong Bảng 1 để xây dựng cây phát sinh chủng loại với loài Bạch

quả được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *rbcl* tạo bởi Maximum Likelihood Tree

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *rbcL* kết hợp với hệ số tương đồng của loài Bạch quả với các loài Bạch quả khác trên NCBI ta thấy: loài Bạch quả nghiên cứu có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài Bạch quả trên NCBI với mã số MG922664.1 và có quan hệ xa hơn với loài *Cycas clivicola* và *Encephalartos paucidentatus* với hệ số tương đồng 94,18% và 93,89%, có quan hệ xa nhất với loài *Pinus brutia* với hệ số tương đồng 92,19%.

3.3.2. Trình tự ADN của đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *trnH-psbA* được nhân bản có kích thước 275 bp. Kết quả giải trình tự đoạn

gen *trnH-psbA* của mẫu Bạch quả như sau:

TGGCTACGTCCGCCCTATTATTATTCACATTTGTTG
AACAGAATACAAGTAGAACTTGAATTAACAGTACC
AATGTGGATAGAGCAACACTGGCAGATAAAGTAAAC
AATACGATATTGGTGGGTAGGATAAAAAAAAAAAAA
AAAAAACAGATAAATACCAAACCTTTTCATTTGATTG
AAAGGCTTGGTATTATCTTATCGGTAATTTAAACACG
CTAACTAGCAATATGTCAGAATATTATCCAGCTATAG
AAAGAGCTTCAACAGCGGCTA

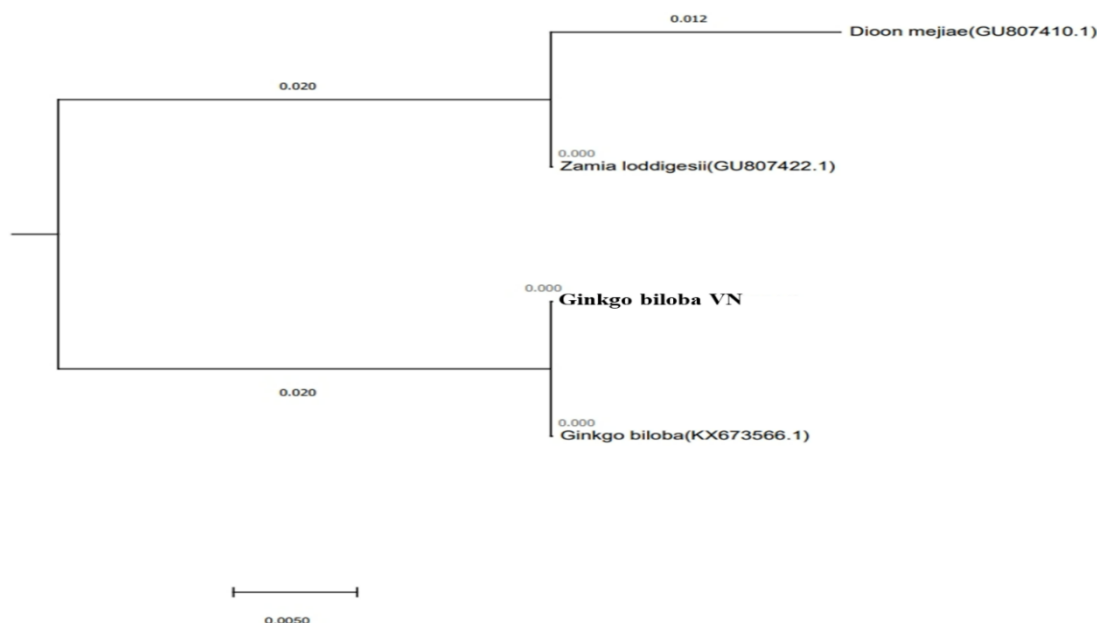
Trình tự này sau đó được xử lý trên NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *trnH-psbA* ở loài Bạch quả bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Bạch quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Một số loài có trình tự đoạn gen *trnH-psbA* tương đồng với loài Bạch quả trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Ginkgo biloba</i>	KX673566.1	99,64
2	<i>Zamia loddigesii</i>	GU807422.1	97,22
3	<i>Dioon mejiae</i>	GU807410.1	95,00

Sau đó đã sử dụng các loài trong Bảng 2 để xây dựng cây phát sinh chủng loại với loài Bạch

quả được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *trnH-psbA* tạo bởi Maximum Likelihood Tree

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *trnH-psbA* kết hợp với hệ số tương

đồng của loài Bạch quả với các loài Bạch quả khác trên NCBI, cho thấy: loài Bạch quả nghiên

cứu có trình tự gen giống 99,64% với đoạn gen của loài Bạch quả trên NCBI với mã số KX673566.1 và có quan hệ xa hơn với loài *Zamia loddigesii* với hệ số tương đồng 97,22%, có quan hệ xa nhất với loài *Dioon mejiae* với hệ số tương đồng 95%.

3.3.3. Trình tự ADN của đoạn gen ITS2

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *ITS2* được nhân bản có kích thước 239 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *ITS2* của mẫu Bạch quả như sau:

CGAGTCTTTGAACGCAGTTGCGCCCGAGGCCTCG

GCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCGCACAACCTA
TCGCCCCCGCCCTCCGGGTGCGGGGCGCGGAGTT
GGCCGTCCGTGCCCCAGCGGCGCGGTGCGCTGAAA
ACCACGCGGTGTCGTCTCTCTGCGCCGGCGAACGG
TGTCCGGGCCGCGGATGCGCGGTGATCGGCGCCG
GCGCGGAGCATCGGGCGAGCGTCTC

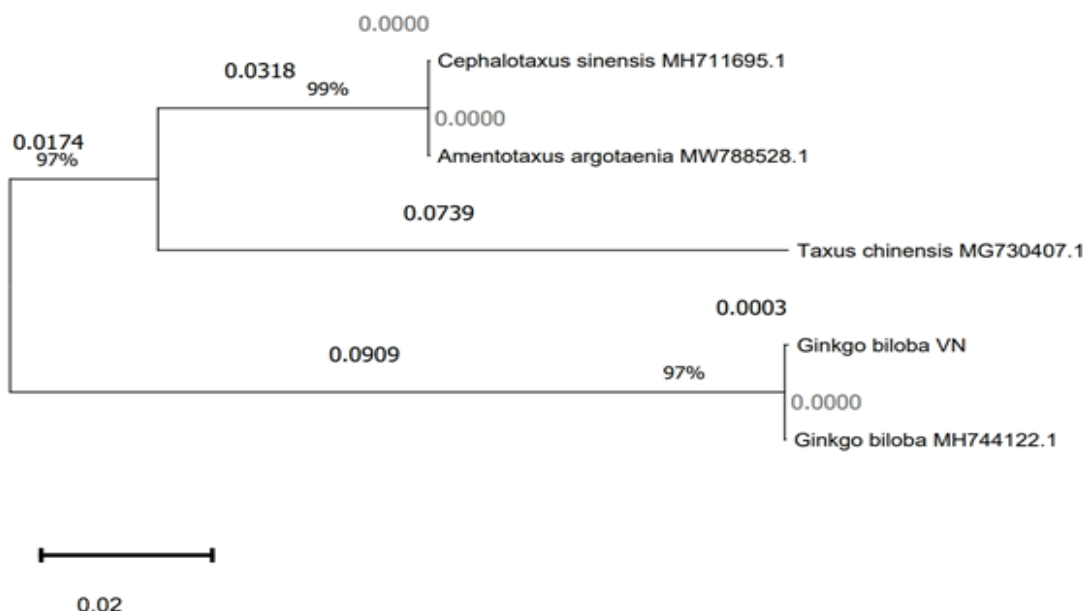
Trình tự này sau đó được xử lý trên NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *ITS2* ở loài Bạch quả bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Bạch quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Một số loài có trình tự đoạn gen *ITS2* tương đồng với loài Bạch quả trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Ginkgo biloba</i>	MH744122.1	99,58
2	<i>Taxus chinensis</i>	MG730407.1	84,56
3	<i>Cephalotaxus sinensis</i>	MH711695.1	84,93
4	<i>Amentotaxus argotaenia</i>	MW788528.1	84,93

Sau đó đã sử dụng các loài trong Bảng 3 để xây dựng cây phát sinh chủng loại với loài Bạch

quả được thể hiện ở Hình 5.



Hình 5. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *ITS2* tạo bởi Maximum Likelihood Tree

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *ITS2* kết hợp với hệ số tương đồng của loài Bạch quả với các loài Bạch quả khác trên NCBI ta thấy: loài Bạch quả nghiên cứu có trình tự gen giống 99,58% với đoạn gen của loài

Bạch quả trên NCBI với mã số MH744122.1 và có quan hệ xa hơn với loài *Cephalotaxus sinensis* và *Amentotaxus argotaenia* với hệ số tương đồng 84,93%, có quan hệ xa nhất với loài *Taxus chinensis* với hệ số tương đồng 84,56%.

Như vậy, dựa vào cây phân loại của cả 3 đoạn gen *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcL* đều cho thấy loài Bạch quả nghiên cứu tương đồng cao nhất với loài Bạch quả trên Ngân hàng gen quốc tế với các tỷ lệ tương đồng như 100% của đoạn gen *rbcL*, 99,64% của đoạn gen *trnH-psbA*, 99,58% của đoạn *ITS2*.

4. THẢO LUẬN

Dựa vào kết quả so sánh trình tự các đoạn

gen *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcL* của loài Bạch quả với trình tự gen của loài Bạch quả (*Ginkgo biloba*) công bố trên Ngân hàng gen quốc tế, ta lập được bảng so sánh khả năng phân biệt của các đoạn trình tự *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcL* như Bảng 4. Kết quả cho thấy, cả 3 chỉ thị *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcL* đều có khả năng phân biệt cho loài Bạch quả với tỷ lệ sai khác là 0,42%, 0,36% và 0% tương ứng.

Bảng 4. Bảng so sánh khả năng phân biệt của Các đoạn trình tự *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcL*

Tên đoạn gen	<i>ITS2</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>
Số điểm sai khác	1	1	0
Kích thước trình tự	239	275	704
Tỷ lệ sai khác	0,42%	0,36%	0%

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *trnH-psbA*: vị trí 132 đã được đánh dấu in đậm.

Query	1	TGGCTACGTCCGCCCTATTATTATTCACATTTGTTGAACAGAATACAAGTAGAACTTGAA	60
Sbjct	86	TGGCTACGTCCGCCCTATTATTATTCACATTTGTTGAACAGAATACAAGTAGAACTTGAA	145
Query	61	TTAAACAGTACCAATGTGGATAGAGCAACACTGGCAGATAAAGTAAACAATACGATATTG	120
Sbjct	146	TTAAACAGTACCAATGTGGATAGAGCAACACTGGCAGATAAAGTAAACAATACGATATTG	205
Query	121	GTGGGTAGGATaaaaaaaaaaaaaaaaaaCAGATAAATACCAAACCTTTCATTTGATT	180
Sbjct	206	GTGGGTAGGAT-AAAAAAAAAAAAAAAAAACAGATAAATACCAAACCTTTCATTTGATT	264
Query	181	GAAAGGCTTGGTATTATCTTATCGGTAATTTAAACACGCTAACTAGCAATATGTCAGAAT	240
Sbjct	265	GAAAGGCTTGGTATTATCTTATCGGTAATTTAAACACGCTAACTAGCAATATGTCAGAAT	324
Query	241	ATTATCCAGCTATAGAAAGAGCTTCAACAGCGGCTA	276
Sbjct	325	ATTATCCAGCTATAGAAAGAGCTTCAACAGCGGCTA	360

Vị trí các nucleotide sai khác của đoạn gen *ITS2*: vị trí 11 đã được đánh dấu in đậm

Query	1	CGAGTCTTTGAACGC-AGTTGCGCCCGAGGCCTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGT	59
Sbjct	2697	CGAGTCTTTGAACGC A AGTTGCGCCCGAGGCCTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGT	2756
Query	60	CGCACAACTATCGCCCCCGCCCTCCGGGTGCGGGGGCGCGGAGTTGGCCGTCCGTGCC	119
Sbjct	2757	CGCACAACTATCGCCCCCGCCCTCCGGGTGCGGGGGCGCGGAGTTGGCCGTCCGTGCC	2816
Query	120	CCCAGCGGCGCGGTTCGGCTGAAAACACGCGGTTCGTCTCTCTGCGCCGGCGAACGGT	179
Sbjct	2817	CCCAGCGGCGCGGTTCGGCTGAAAACACGCGGTTCGTCTCTCTGCGCCGGCGAACGGT	2876
Query	180	GTCCGGGCGCGCGATGCGCGGTTCGATCGGCGCCGGCGCGGAGCATCGGGCGAGCGTCTC	239
Sbjct	2877	GTCCGGGCGCGCGATGCGCGGTTCGATCGGCGCCGGCGCGGAGCATCGGGCGAGCGTCTC	2936

Như vậy, với các chỉ thị DNA barcode của các đoạn gen *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl* cho loài Bạch quả chúng ta có thể sử dụng định danh cho loài này khi được liệu đã qua sơ chế hay bị phân mảnh, không còn nguyên vẹn vẫn được nhận biết thông qua các trình tự DNA barcode của 3 đoạn gen trên. Để có cơ sở dữ liệu này nhóm tác giả đã thu thập bộ dữ liệu về hình thái đặc trưng của loài cũng như khu phân bố đặc trưng cho loài. Cơ sở dữ liệu này là kết quả nghiên cứu cơ bản về điều tra, thu thập, nhận dạng và định danh loài. Qua đó tiếp tục xây dựng cơ sở dữ liệu đồng bộ về hình thái và DNA barcode của loài làm thuốc để bị nhầm lẫn để phục vụ công tác giám định tính đúng của dược liệu.

5. KẾT LUẬN

Đã tách chiết được 3 mẫu ADN tổng số của Bạch quả. Nhân gen thành công các đoạn gen *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl* từ ADN tổng số của loài Bạch quả bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xác định trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN cho thấy đoạn *rbcl* có kích thước là 679 bp, đoạn *TrnH-psbA* có 275 bp và đoạn *ITS2* có 239 bp. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN (*ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl*) của loài Bạch quả với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của các loài Bạch quả trên NCBI đã chỉ ra: loài Bạch quả nghiên cứu có các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcl*, 99,64% của đoạn gen *trnH-psbA*, 99,58% của đoạn *ITS2* với loài Bạch quả trên Ngân hàng gen quốc tế. Như vậy, kết quả so sánh của cả 3 đoạn (*ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl*) với loài *Ginkgo biloba* nhóm tác giả tìm ra được đoạn *ITS2* và *trnH-psbA* làm mã vạch có khả năng phân biệt loài Bạch quả nghiên cứu. Tuy nhiên, để chính xác

nhất nên sử dụng cả 3 chỉ thị để định danh loài Bạch quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Teris A. van Beeka & Paola Montoro (2009). Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts and phytopharmaceuticals. Journal of Chromatography A. 1216: 2002–2032.
- [2]. Chun Shi, Jun Liu, Fengming Wu & David T. Yew (2010). Ginkgo biloba Extract in Alzheimer's disease: From Action Mechanisms to Medical Practice. Int. J. Mol. Sci. 11: 107-123.
- [3]. W. J. Kress (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. Journal of Systematics and Evolution. 55: 291–307.
- [4]. John Waugh (2007). Multiple multilocus ADN barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. BioEssays 29(2): 188-97.
- [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]. 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.
- [7]. 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.
- [8]. 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.
- [9]. 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.