

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH CÁC ĐOẠN MÃ VẠCH ADN (DNA BARCODE) CHO LOÀI ÁO CỘC (*Liriodendron chinense*) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Bùi Thị Mai Hương¹, Nguyễn Văn Phong¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Áo cộc (*Liriodendron chinense*) là loài cây được đánh giá có giá trị kinh tế với cây làm cảnh, gỗ tốt. Hiện nay các loài này đang bị đe dọa và đã được liệt kê trong danh sách các loài thực vật có nguy cơ tuyệt chủng vì hiệu quả sinh sản thấp. Vì vậy, việc xác định các đoạn mã vạch ADN cho loài Áo cộc phục vụ giám định loài là cần thiết. ADN tổng số được phân lập từ lá cây Áo cộc. Các đoạn DNA barcode (*rbcL*, *matK* và *trnH-psbA*) được nhân bản từ ADN tổng số của cây 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 nucleotide. Kết quả phân tích trình tự đã chỉ ra, đoạn *rbcL* có 658 nucleotide, đoạn *matK* có 543 nucleotide và đoạn *trnH-psbA* có 382 nucleotide. Các trình tự này sau đó được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI đã tìm ra sự khác biệt với các loài Áo cộc khác: đoạn gen *matK* tương đồng 100% với loài *Liriodendron chinense*, đoạn gen *rbcL* tương đồng 99,1% với loài *Liriodendron chinense*, đoạn gen *trnH-psbA* tương đồng 92,4% với loài *Liriodendron chinenses*. Với 3 đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, nghiên cứu cho thấy rằng sử dụng đoạn gen *trnH-psbA* làm mã vạch ADN để giám định loài Áo cộc ở Việt Nam là tốt nhất.

Từ khóa: Áo cộc, cây phát sinh, giám định loài, mã vạch ADN.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Áo cộc (*L. chinense*) được phân bố ở vùng núi có độ cao 450 m đến 1800 m ở miền Nam Trung Quốc và miền Bắc Việt Nam. Là một trong số những cây có bóng mát lớn, lá cây có hình dạng như những chiếc áo phông, trong mùa thu sắc lá chuyển từ xanh sang vàng, hoa màu vàng có hình dạng giống như hoa tulip. Áo cộc là một trong mười sáu kiểu che phủ rừng, mức độ thống trị của loài này đã tạo ra sự khác biệt giữa các cộng đồng sinh thái không những thế nó còn có giá trị như một nguồn mật hoa để sản xuất mật ong, một nguồn thực phẩm tự nhiên, một loài cây cảnh cho bóng mát lớn tại các đô thị (AGM Plants - Ornamental; Xia Nianhe *et.al.*, 2012). Gỗ của loài được sử dụng trong một loạt sản phẩm thiết yếu như: nội thất, pallet, khung xây dựng (Xia Nianhe *et.al.*, 2012). Ngoài ra, chiết xuất hóa học từ gỗ hoặc lá đã được chứng minh hữu ích có tác dụng chống khối u, chống đông máu cho các loài động vật ăn cỏ và các alkaloid kháng khuẩn (Xia Nianhe *et.al.*, 2012). Áo cộc đang bị đe dọa và đã được liệt kê trong danh sách các loài thực vật có nguy cơ tuyệt chủng vì hiệu quả sinh sản thấp, tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp, điều này ảnh hưởng rất lớn tới việc nhân giống và

phổ biến nhanh chóng của loài (Phan, K.L., 2015). Do đó, việc nghiên cứu xác định các đoạn mã vạch ADN cho loài Áo cộc phục vụ giám định loài là cần thiết và cấp bách cho việc định danh và bảo tồn loài Áo cộc tại Việt Nam.

Xác định các đoạn mã vạch ADN là một phương pháp định danh, 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. 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 (Aron J.F. *et.al.*, 2008). 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*) (Anders R., 2012; Alvarez I.W.J.F., 2003). 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 (Chase M.W *et al.*, 2005; Chen S.Y.H *et al.*, 2010; Ford C.S *et al.*, 2009; Kress J.W *et al.*, 2005;

Von Crautlein M.K.H *et al.*, 2011).

Trong nghiên cứu này, tiến hành lựa chọn ba đoạn trình tự ADN để sử dụng làm mã vạch ADN là: *rbcL*, *matK* và *TrnH-psbA*. Trong số đó, các đoạn *rbcL*, *TrnH-psbA* và *matK* 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



Hình 1. Ảnh lá, hoa của cây Áo cộc

Vật liệu nghiên cứu: Mẫu lá bánh tẻ của cây Áo cộc, 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 Áo cộc được lấy: Ac.1; Ac.2; Ac.3.

Trình tự các cặp mồi *rbcL* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C ; mồi *TrnH-psbA* (tmPF1: CGCGCATGGTGGATTCAATCC; psbPR1: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C ; mồi *matK* (mP3F: TTCCATGGCCTTCTTTGCATTTGTTGC; mP3R: TTCCATGGTTTTTTGAGGATCCGCTGT) với nhiệt độ gắn mồi 48°C . Cả 3 trình tự mồi *rbcL*, *TrnH-psbA*, *matK* được xây dựng dựa trên các đoạn gen thuộc 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

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 Áo cộc ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: Loài Áo cộc thu thập tại núi Luột Trường Đại học Lâm nghiệp - Xuân Mai - Chương Mỹ - Hà Nội (hình 1).

Agarose: Agarose, ADN marker, Redsafe...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Áo cộc theo hướng dẫn sử dụng Kit (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen. Nhân bản các đoạn gen *rbcL*, *matK*, và *TrnH-psbA* 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 $20\ \mu\text{l}$, bao gồm: H_2O deion ($7\ \mu\text{l}$), 2x PCR Master mix Solution ($10\ \mu\text{l}$), $10\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ mồi xuôi ($1,0\ \mu\text{l}$), $10\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ mồi ngược ($1,0\ \mu\text{l}$) và $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$ ADN khuôn ($1\ \mu\text{l}$). Chương trình phản ứng PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C : 30 giây, $48 - 52^{\circ}\text{C}$: 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, ADNclub, Biohit, Mega10... Trình tự nucleotide của các đoạn

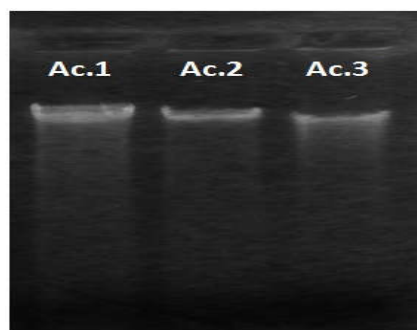
gen *rbcL*, *matK* và *TrnH-psbA* được so sánh trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng sử dụng các công cụ trên NCBI.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Áo cộc bằng Kit tách chiết của hãng Norgen được pha loãng để xác định nồng độ và độ tinh sạch. Kết quả xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch ADN tổng số cho thấy,

dung dịch ADN tổng số có nồng độ dao động từ 3 - 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Tỷ số $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ trong khoảng từ 1,7 - 2,05, kết quả này khẳng định đã tách chiết được ADN với nồng độ cao và đảm bảo độ tinh sạch. Sau đó, tiến hành điện di để kiểm tra sự nguyên vẹn của sản phẩm. 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 và sạch. 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.

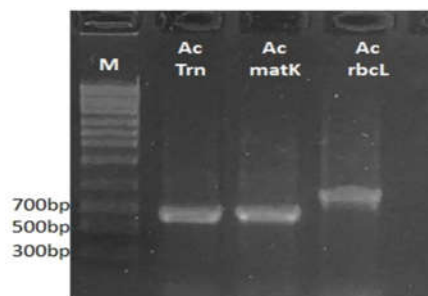


Hình 2. Ảnh điện di ADN tổng số của 3 mẫu Áo cộc (Ac.1: Áo cộc 1; Ac.2: Áo cộc 2; Ac.3: Áo cộc 3)

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



Hình 3. Kết quả PCR các đoạn gen *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL* của Áo cộc

Kết quả PCR sau khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (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 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 đoạn gen *matK*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *matK* được nhân bản có kích thước 543 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *matK* của mẫu Áo cộc như hình 4.

GAAAGAACTTGTTCTTCCTCTGTAAGGAATTCCTCCAAGAATTCTGAACCTAATCGTTT
 CAAAAAGCGCGTACCGTACTTTTATGTTTACGAGCCAAAGTTCTAGCACACGAAAGT
 CGAAGTATATACTTTATTCGATACAAAGTCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAATG
 AGAAAGATTTCTGTATATCTGCCCAAATCGATTTATAATATCAGAATCTGACGAATCG
 GCCCGGACCGACTTACTAATGGGATGCCCTGATACGTTACAAAATTTTCGCTTTAACCA
 CTGATCCAATCAGAGAAATAATTGGGACTAGGGTCTCGAATTTATTAATAGAAGTATC
 TATTAGAAATGAATTCTCTAGCATTTGAATCCTTACCACCGAAGTGTTTAGTCGTACA
 CTTGAAAGATAGCCCAGAAAATAGAAGGAATGATTGTATAATTGGTTTATATGGATCC
 TGTCCGGTCGAGACCACAAGTAAAAATGACATTGCCAAAATTTGACAAGGTGAGATT
 TCCATTTCTTCATCAGAAGA

Hình 4. Trình tự ADN đoạn gen *matK*

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 và các loài có trình tự tương đồng với đoạn gen *matK* ở loài Áo cộc bằng cách sử

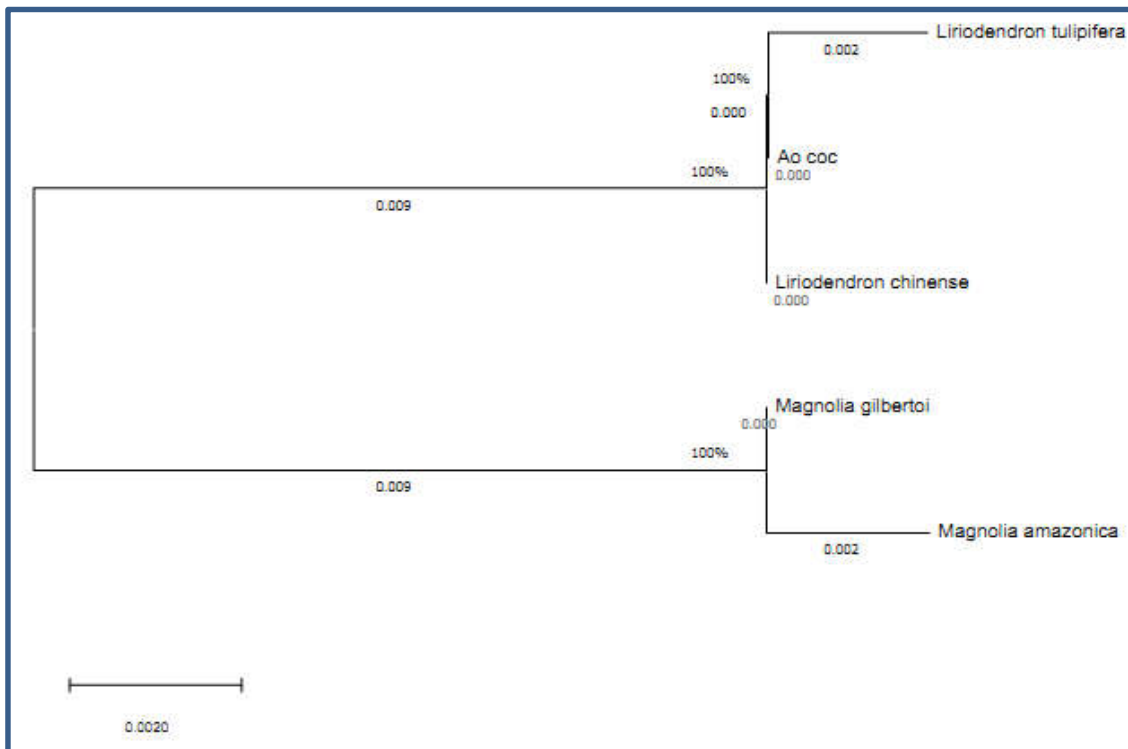
dụng công cụ BLASTn. Một số loài có trình tự gen tương đồng với loài Áo cộc được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Một số loài có trình tự đoạn gen *matK* tương đồng với loài Áo cộc trên ngân hàng gen NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Liriodendron chinense</i>	KU170535.1	100,00
2	<i>Liriodendron tulipifera</i>	DQ899947.1	99,26
3	<i>Magnolia gilbertoi</i>	MN990627.1	98,34
4	<i>Magnolia amazonica</i>	MN990631.1	98,16

Sau đó chúng tôi sử dụng phần mềm Mega X để xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của loài Áo cộc chúng tôi nghiên

cứu với các loài khác ở bảng 1 và khoảng cách di truyền giữa chúng.



Hình 5. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *matK* được tạo bởi phần mềm MegaX

Bằng phần mềm Mega X, nghiên cứu nhận thấy với các loài khác như ở bảng 2. được khoảng cách di truyền của loài Áo cộc

Bảng 2. Bảng so sánh khoảng cách di truyền của loài Áo cộc với các loài khác trên ngân hàng gen quốc tế NCBI dựa trên đoạn trình tự *matK*

Tên loài	<i>Magnolia gilbertoi</i>	<i>Magnolia amazonica</i>	<i>Liriodendron tulipifera</i>	<i>Liriodendron chinense</i>	Ao coc
<i>Magnolia gilbertoi</i>					
<i>Magnolia amazonica</i>	0,0018				
<i>Liriodendron tulipifera</i>	0,0189	0,0209			
<i>Liriodendron chinense</i>	0,0170	0,0189	0,0018		
Ao coc	0,0170	0,0189	0,0018	0,0000	

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 loài Áo cộc với các loài khác ta thấy: loài Áo cộc trong nghiên cứu này có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài *Liriodendron chinense* Trung Quốc với khoảng cách di truyền là 0.00 (hệ số tương đồng 100%) và có quan hệ xa nhất với loài *Magnolia amazonica* với khoảng cách di

truyền là 0,0189 (hệ số tương đồng 98,16%) với giá trị bootstrap 100% nói lên độ tin cậy sự gần gũi của các thành viên trong nhóm là rất cao.

3.3.2. Trình tự ADN đoạn gen *rbcL*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *rbcL* được nhân bản có kích thước 676 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcL* của mẫu Áo cộc như hình 6.

GGTGTTTAAGATTATAAACTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAACCAAAGATACTG
 ATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACTCGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAGG
 GGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGA
 CTTACCAGCCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAACCCGTTGCTGGGG
 AGACCGATCAATATATTGTTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCT
 GTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTACGAGC
 TCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTCCTGCTTATATCAAACTTTCCAAGGCCCG
 CCCCATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTTCGTCCTTATTGG
 GATGTACTATTAACCAAATTGGGGTTATCCGCCAAGAACTACGGTAGGGCGGTTTA
 TGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGATTTTACCAAGGATGATGAGAACGTGAACTCCCAA
 CCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCACTTTATAAAGCGC
 AGGCCGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGA

Hình 6. Trình tự ADN đoạn gen *rbcL*

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 và các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *rbcL* ở loài Áo cộc bằng cách sử

dụng công cụ BLASTn. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Áo cộc được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Một số loài có trình tự gen *rbcL* tương đồng với loài Áo cộc trên ngân hàng gen NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Liriodendron chinense</i>	KU170538.1	99,11
2	<i>Liriodendron tulipifera</i>	MK477550.1	99,11
3	<i>Degeneria vitiensis</i>	L12643.1	97,04
4	<i>Magnolia decida</i>	MN990591.1	96,90

Nghiên cứu sử dụng phần mềm Mega X để xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 7) tìm ra mối quan hệ của loài Áo cộc với các loài

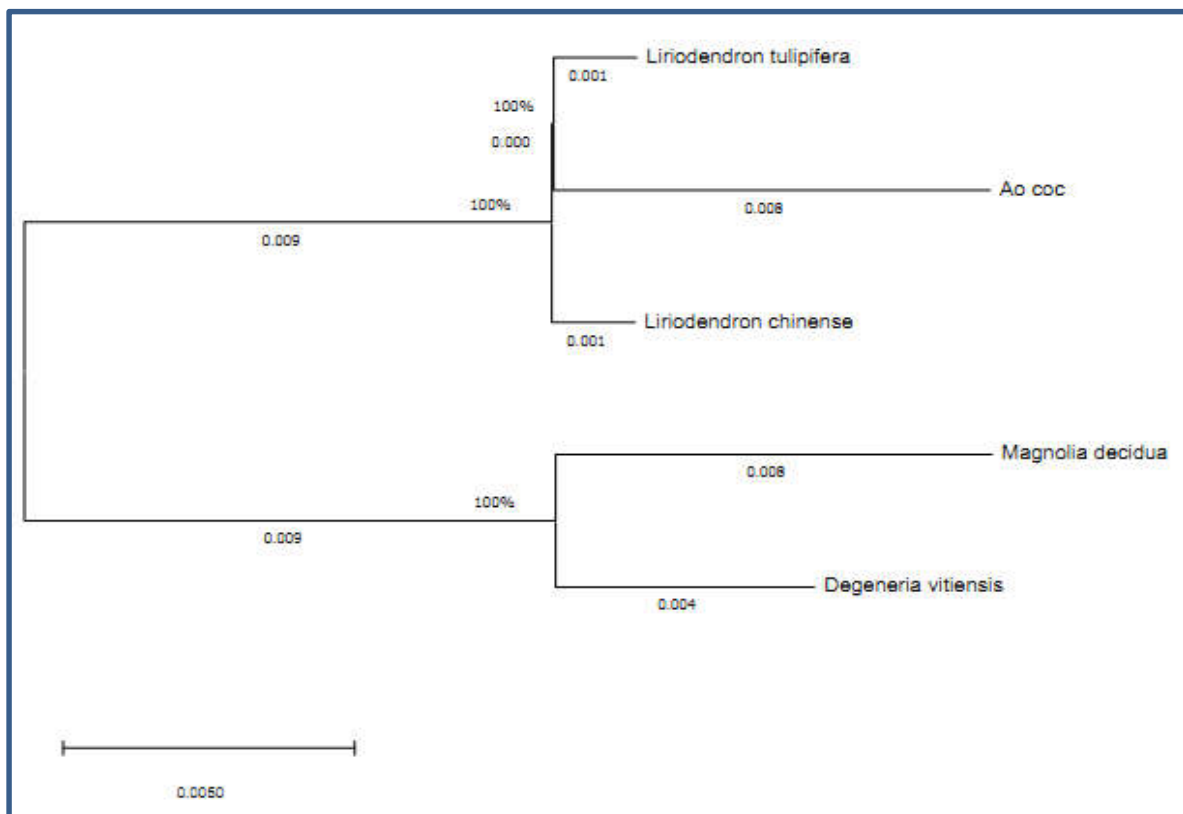
khác ở bảng 3 và khoảng cách di truyền giữa chúng như bảng 4.

Bảng 3. Bảng so sánh khoảng cách di truyền của loài Áo cộc với các loài khác trên ngân hàng gen quốc tế NCBI dựa trên đoạn trình tự *rbcL*

Tên loài	<i>Magnolia decidua</i>	<i>Liriodendron tulipifera</i>	<i>Liriodendron chinense</i>	<i>Degeneria vitiensis</i>	Ao coc
<i>Magnolia decidua</i>					
<i>Liriodendron tulipifera</i>	0,02713				
<i>Liriodendron chinense</i>	0,02713	0,00297			
<i>Degeneria vitiensis</i>	0,01195	0,02409	0,02409		
Ao coc	0,03331	0,00894	0,00894	0,03025	

Bằng phần mềm Mega X nghiên cứu nhận được khoảng cách di truyền của loài Áo cộc

với các loài khác như hình 7.



Hình 7. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *rbcL* được tạo bởi phần mềm MegaX

Từ cây phát sinh chủng loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *rbcL* kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng của loài Áo cộc với các loài khác ta thấy: loài *Áo cộc* có quan hệ gen gần nhất với các loài *Liriodendron chinense*, *Liriodendron tulipifera* với khoảng cách di truyền là 0.0084 (hệ số tương đồng 99.11%) và xa nhất với loài *Magnolia decidua*

với khoảng cách di truyền là 0.03331 (hệ số tương đồng 96,90%) với giá trị bootstrap rất cao 100% nói lên độ tin cậy sự gần gũi của các thành viên trong nhóm là rất cao.

3.3.3. Trình tự DNA đoạn gen *TrnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *TrnH-psbA* được nhân bản có kích thước 382 bp (kích thước nhỏ hơn so

với kích thước trên bản gel của PCR vì sau khi đọc trình tự nghiên cứu tiến hành xử lý cắt bỏ một số đoạn trình tự bị nhiễu ở đầu đoạn các

chiều xuôi và chiều ngược của trình tự để thu được trình tự chuẩn). Kết quả giải trình tự đoạn gen *TrnH-psbA* của mẫu Áo cộc như hình 8.

TATTTAAAGGATTCAATTTTCCCCCTTCATGATTTTTTTATTGGGTTTTTTTTCTTTTTG
 GGATACAGATTTTGAACATAAAATGCCAATACTGTAAATTGTAAAAGTTCAAAAAAA
 AATTCCTTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAACAATTTTGAGGAACGTACAGAAATTA
 CAGTACAGATCGGCACAGAACAAAAAAAAAAAAAAAAATAGGATGTTTCGATCATGACCCACCC
 AACATAATATTTTCTTAATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAATGAAAAGGGCAAAAATGTTTATG
 TGAGTAAAACCCTACGGAATCAAACAATCAATACCCAACCTTCTTCATAAAAACAAAA
 ATTGGGGTATTGATCTGATCCTTCACCGACTCATAT

Hình 8. Trình tự ADN đoạn gen *TrnH-psbA*

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 và các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *TrnH-psbA* ở loài Áo cộc bằng

cách sử dụng công cụ BLASTn. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Áo cộc được trình bày ở bảng 5.

Bảng 4. Bảng so sánh khoảng cách di truyền của loài Áo cộc với các loài khác trên ngân hàng gen quốc tế NCBI dựa trên đoạn trình tự *TrnH-psbA*

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Liriodendron chinenes</i>	KU170538.1	91,88
2	<i>Liriodendron tulipifera</i>	MK477550.1	89,30
3	<i>Ocotea puberula</i>	GQ982304.1	66,00

Bằng phần mềm Mega X, nghiên cứu xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 9) tìm ra mối quan hệ của loài Áo cộc với các loài khác

ở bảng 5 và khoảng cách di truyền giữa chúng như bảng 6.

Bảng 5. Bảng so sánh khoảng cách di truyền của loài Áo cộc với các loài khác trên ngân hàng gen quốc tế NCBI của đoạn trình tự *TrnH-psbA*

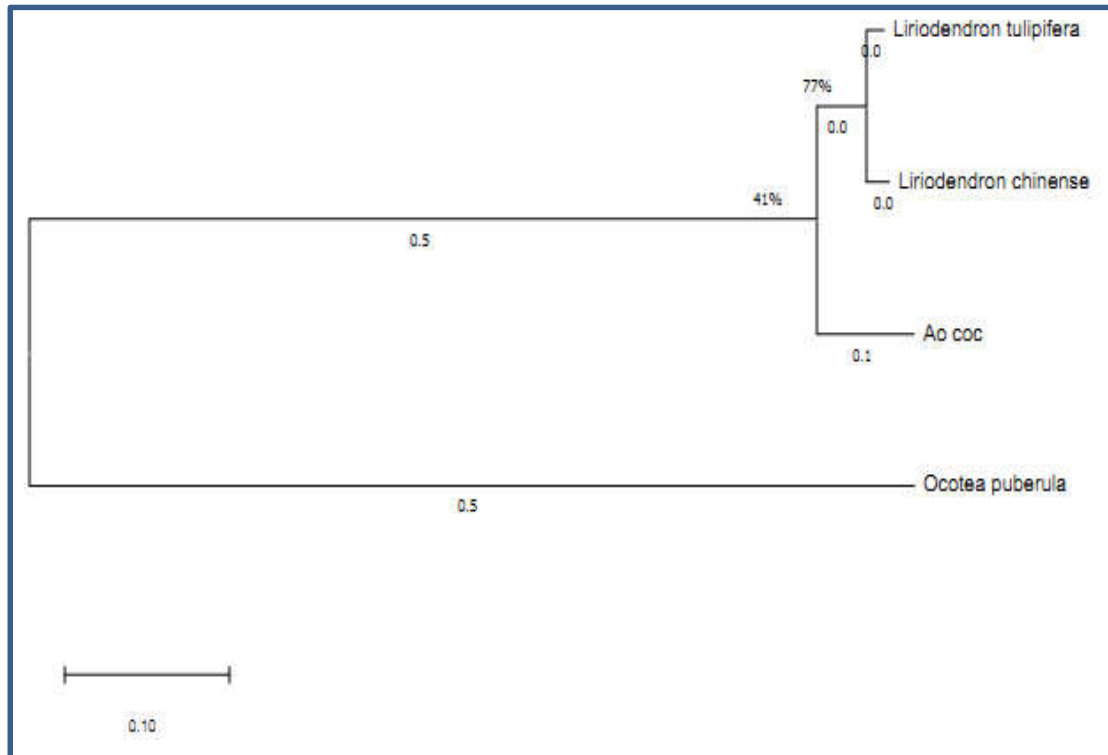
Tên loài	<i>Ocotea puberula</i>	<i>Liriodendron tulipifera</i>	<i>Liriodendron chinense</i>	Ao coc
<i>Ocotea puberula</i>				
<i>Liriodendron tulipifera</i>	1,0396			
<i>Liriodendron chinense</i>	1,0718	0,0242		
Ao coc	1,0727	0,1133	0,0876	

Bằng phần mềm Mega X chúng tôi nhận được khoảng cách di truyền của loài Áo cộc với các loài khác như hình 9.

với giá trị bootstrap 77% và xa nhất với loài *Ocotea puberula* với khoảng cách di truyền là 1,0727 (hệ số tương đồng 66%).

Từ cây phát sinh chủng loại kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *TrnH-psbA* ta thấy: loài *Áo cộc* có quan hệ gen gần nhất với loài *Liriodendron chinense* với khoảng cách di truyền là 0,0876 (hệ số tương đồng 91,88%)

Như vậy, dựa vào cây phân loại của cả 3 đoạn gen *rbcL*, *matK* và *trnH-psbA* đều cho thấy loài *Áo cộc* thuộc loài *Liriodendron chinense* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *matK*, 99,1% của đoạn gen *rbcL*, 92,4% của đoạn gen *trnH-psbA*.



Hình 9. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *TrnH-psbA* được tạo bởi phần mềm MegaX

Dựa vào kết quả so sánh trình tự các đoạn gen *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* của *Áo cộc* với trình tự gen của loài *Liriodendron chinense* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI với

mã số KU170535.1, ta lập được bảng so sánh khả năng phân biệt của đoạn trình tự *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* như bảng 7.

Bảng 6. Bảng so sánh khả năng phân biệt của các đoạn trình tự *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*

Tên đoạn gen	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
Số điểm sai khác	0	6	29
Kích thước trình tự	543	658	382
Tỷ lệ sai khác	0%	0,9%	7,6%

Kết quả phân tích cho thấy khi so sánh trình tự *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* của loài *Áo cộc* với trình tự gen của loài *Liriodendron chinense* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI với mã số KU170535.1 : trình tự đoạn gen *matK* có 0 điểm sai khác, trình tự đoạn gen *rbcL* có 6 điểm sai khác và trình tự đoạn gen *trnH-psbA* có 29 điểm sai khác. Tỷ lệ sai khác của trình tự *trnH-psbA* là cao nhất (7,6%) do đó khả năng phân biệt loài của gen *trnH-psbA* cũng là tốt nhất và tỷ lệ sai khác của trình tự *matK* là thấp nhất (0%) đồng nghĩa với khả năng phân biệt loài kém nhất trong 3 gen. Như vậy, đoạn *trnH-psbA* có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *matK* và *rbcL* khi so sánh loài *Áo cộc* với loài *Liriodendron chinense*. Mặc dù vậy,

cách tốt nhất là sử dụng đồng thời cả 3 đoạn trình tự *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* để có thể xác định chính xác nhất loài cần định danh.

3.4. Thảo luận

Với chỉ thị *matK* chúng tôi thu được kết quả loài *Áo cộc* chúng tôi nghiên cứu giống 100% với loài *Áo cộc* ở Trung Quốc được công bố trên ngân hàng gen NCBI và có sự sai khác nhỏ với loài *Liriodendron tulipifera*. Tuy nhiên lại sai khác nhiều so với loài *Magnolia pacifica*. Điều này phù hợp với phân loại hình thái được thực hiện bởi Yongda Zhong và cộng sự (2018) về loài *Liriodendron tulipifera*, ta thấy rằng 2 loài trên đều có đặc điểm hình thái lá và hoa giống nhau, tuy nhiên loài *L. chinense* có kích thước lá lớn hơn, nét cắt ở

thùy giữa lá sâu hơn so với loài Áo cộc và hoa của loài Áo cộc có màu cam trong khi đó loài *L.chinense* có màu xanh lục hoặc vàng nhạt.

Với chỉ thị phân tử *rbcL* và *trnH-psbA* chúng tôi nhận được loài Áo cộc có quan hệ gần nhất với các loài *Liriodendron chinense*, với khoảng cách di truyền lần lượt là 0,00894 và 0,0876. Như vậy với các chỉ thị này cho thấy loài Áo cộc nghiên cứu lấy tại Việt Nam có sự sai khác với loài Áo cộc nhận được trên ngân hàng gen quốc tế NCBI.

Dựa vào kết quả so sánh đặc điểm hình thái cùng với so sánh khả năng phân biệt của các đoạn trình tự *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* của loài Áo cộc, ta thấy được rằng: Để định danh cho loài Áo cộc chúng tôi sử dụng đoạn gen *matK* với tỷ lệ tương đồng 100% với *L. chinense*. Để phân biệt loài nghiên cứu sử dụng đoạn gen *trnH-psbA* với tỷ lệ sai tương đồng 92,4% với *L. chinense*.

4. KẾT LUẬN

Các vùng gen *rbcL*, *matK*, và *trnH-psbA* được giải trình tự nucleotide với các kích thước như sau: đoạn *rbcL* có kích thước là 658 bp, đoạn *matK* có 543 bp và đoạn *TrnH-psbA* có 382 bp. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN (*rbcL*, *matK*, và *TrnH-psbA*) của loài Áo cộc với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của các loài khác trên NCBI đã chỉ ra: loài Áo cộc thuộc loài *L.chinense* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *matK*, 99,1% của đoạn gen *rbcL*, và 92,4% của đoạn gen *trnH-psbA* với các giá trị bootstrap rất cao 100%. Như vậy, kết quả so sánh của cả 3 đoạn (*rbcL*, *matK* và *TrnH-psbA*) với loài *L. chinense* chúng tôi tìm ra được: Để định danh cho loài Áo cộc chúng tôi sử dụng đoạn gen *matK*, để phân biệt loài chúng tôi sử dụng đoạn gen *trnH-psbA* bởi đoạn *TrnH-psbA* có khả năng phân biệt loài cao hơn so với đoạn *rbcL* và *matK*. Tuy nhiên, chính xác nhất nên sử dụng cả 3 chỉ thị để định danh loài Áo cộc ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anders R., (2012). ADN 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.

2. Alvarez I.W.J.F. (2003). Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.

3. Aron J.F, Kevin S.B, Prasad R.K, Kevin S. Burgess, Prasad R. Kesanakurti, Sean W. Graham, Steven G. Newmaster, Brian C. Husband, Diana M. Percy, Mehrdad Hajibabaei, Spencer C. H. Barrett. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*. 3(7): e2802.

4. "AGM Plants - Ornamental" (PDF). Royal Horticultural Society. July 2017. p. 60. Retrieved 25 March 2018.

5. Xia Nianhe; Liu Yuhu; Liu Yuhu; Hans P. Nooteboom. "Liriodendron chinense". *Flora of China*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA. Retrieved 25 May 2012.

6. Chase M.W, Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J.M., Kesanakurthi R.P., Haider N., Savolainen V. (2005). Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360:1889-1895.

7. Chen S.Y.H, Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao X., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Leon C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *Plos one* 5: e8613.

8. Ford C.S, Ayres K.L, Toomey N., Haider N., Stahl J.V.A., Kelly L.J., Wikström N., Hollingsworth P.M., Duff R.J., Hoot S.B., Cowan R.S., Chase M.W., Wilkinson M.J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on ADN plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 159 (1): 1-11.

9. Kress J.W, Wurdack K.J, Zimmer E.A, Weigt L.A, Janzen D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 102 (23): 8369 - 74.

10. Phan, K.L. (2015). "Liriodendron chinense". *IUCN Red List of Threatened Species*. 2015: e.T31284A2803363. doi:10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T31284A2803363.en.

11. Von Cräutlein M, Pietiläinen M., Korpelainen H., Rikkinen J. (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and conservation* 20: 373-389.

12. Yongda Zhong, Aihong Yang, Shujuan Liu, Lipan Liu, Yanqiang Li, Zhaoxiang Wu and Faxin Yu. (2018). "RAD-Seq Data Point to a Distinct Split in Liriodendron (Magnoliaceae) and Obvious East-West Genetic Divergence in *L. chinense*". *Forests*.10,13.doi:3390.

**STUDY ON IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCE OF
Liriodendron chinense TO IDENTIFY PLANT SPECIES**

Bui Thi Mai Huong¹, Nguyen Van Phong¹

¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Liriodendron chinense is a species of high economic value with ornamental plant and good wood. Nowadays, these species are being threatened and listed of species are still facing extinction because reproductive efficiency is low. Therefore, it is necessary to identify DNA barcode fragments of *Liriodendron chinense* for species identification. The genomic DNA was extracted from leaf tissue of *Liriodendron chinense*. The DNA barcodes (*rbcL*, *matK* and *TrnH-psbA*) were amplified from total DNA of *Liriodendron chinense* by PCR technique. The PCR results indicated that all DNA bands have a size similar to the theoretical size of *rbcL*, *matK* and *TrnH-psbA* fragments. Nucleotide sequencing results of PCR products showed that the size of the isolated *rbcL* fragment is 658 nucleotide, *matK* fragment is 543 nucleotide and *trnH-psbA* fragment is 382 nucleotide. After that, these sequences were compared with *Liriodendron chinense* species in NCBI and the results indicated that: *matK* gene fragment is similar to 100% with *Liriodendron chinense* species, *rbcL* gene fragment is similar to 99.1% with *Liriodendron chinense* species, *TrnH-psbA* gene fragment is similar to 92.4% with *Liriodendron chinense* species. Finally, in three of gene fragment: *matK*, *rbcL*, *TrnH-psbA* we found that It is best for using *TrnH-psbA* molecular marker as DNA barcode to identify *Liriodendron chinense* in Vietnam.

Keywords: DNA barcoding, identify species, *Liriodendron chinense*, phylogenetic tree.

Ngày nhận bài : 15/9/2020
Ngày phản biện : 16/11/2020
Ngày quyết định đăng : 25/11/2020