

## XÁC ĐỊNH ADN MÃ VẠCH GIỐNG BẠCH ĐÀN LAI UG24 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH GIỐNG CÂY

Bùi Thị Mai Hương<sup>1</sup>, Bùi Thị Hoàng Yến<sup>2</sup>, Hà Văn Huân<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Gấm<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>2</sup>Trường Trung học Phổ thông Đồng Hòa - Hải Phòng

### TÓM TẮT

Giống bạch đàn lai UG24 (*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*) là giống cây có giá trị kinh tế cao đã được công nhận giống theo quyết định 3893/QĐ-BNN-TCLN ngày 20/9/2016. Tuy nhiên, đối với những người nông dân việc xác định giống chỉ bằng hình thái là hết sức khó khăn. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là sử dụng phương pháp mã vạch ADN để xác định dòng Bạch đàn lai UG24. ADN tổng số được tách chiết từ các mẫu lá của UG24 và được sử dụng để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR. Các kết quả chỉ ra rằng các băng của sản phẩm PCR đúng với kích thước dự kiến như 687 bp, 449 bp, 336 bp, 564 bp, và 178 bp cho *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *ITS*, và *ITS2*, tương ứng. Các trình tự này sau đó được so sánh với các trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI). Kết quả đã chỉ ra rằng giống Bạch đàn lai UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) thuộc loài *E. urophylla* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcL* và *matK*, 98,76% của đoạn gen *ITS*, 98,31% của đoạn gen *ITS2*, 97,92% của đoạn gen *trnH-psbA*, và một cây là *E. grandis* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcL*, 99,55% của đoạn gen *matK*, 98,23% của đoạn gen *ITS*, 98,31% của đoạn gen *ITS2*, 87,43% của đoạn gen *trnH-psbA*. Kết quả cũng cho thấy sử dụng chỉ thị *trnH-psbA* làm mã vạch ADN để giám định giống Bạch đàn lai UG24 ở Việt Nam là tốt nhất.

**Từ khóa:** Bạch đàn lai UG24, giám định loài, mã vạch ADN, nhân bản gen.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn hay Khuynh diệp thuộc chi thực vật có hoa *Eucalyptus* trong họ Sim (Myrtaceae) (Boland D.J. *et al.*, 2006). Hiện trên thế giới có hơn 700 loài bạch đàn được tìm thấy ở Australia, châu Mỹ, châu Âu, châu Phi... và cả Việt Nam (Boland D.J. *et al.*, 2006; Brooker M.I.H. *et al.*, 2006). Bạch đàn là loài cây gỗ có giá trị kinh tế cao như làm gỗ trong xây dựng, làm nguyên liệu chế biến bột giấy và ván ép trong công nghiệp, tinh dầu bạch đàn điều trị đau đầu, nhức xương trong y học... (<https://caythuocdangian.com>). Bạch đàn lai UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) được tạo ra từ hai loài Bạch đàn *E. urophylla* và *E. grandis* đã được công nhận là giống quốc gia (3893/QĐ/BNN-TCLN, ngày 20 tháng 09 năm 2016) với mã số BDL.TVT.16.03, và là giống cây có giá trị kinh tế cao trong trồng rừng sản xuất. Hiện nay trên thị trường có rất nhiều giống bạch đàn và bạch đàn lai khác nhau mà bằng phân biệt về hình thái rất khó để phân loại. Do vậy, việc nghiên cứu xác định các đoạn mã vạch ADN cho giống Bạch đàn lai UG24 phục vụ giám định dòng là cần thiết và cấp bách cho việc định danh và phát triển vùng

trồng cho giống lai UG24 ở Việt Nam.

Xác định các đoạn mã vạch ADN là một phương pháp định danh, sử dụng một đoạn ADN chuẩn, gắn 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 (Mark W Chase *et al.*, 2005). 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 *et al.*, 2008). 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 *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Ford *et al.*, 2009; Kress *et al.*, 2005; Von Crautlein *et al.*, 2011). Thêm vào đó, một số loài Bạch đàn đã được định danh thành công bởi các mã vạch *ITS* và *matK*, *rbcL*, *psbA-matK*, *trnG-psbK* (Fladung *et al.*, 2015).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn năm đoạn trình tự để sử dụng làm mã vạch ADN 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

nhằm phân loại, giám định và xác định mối quan hệ di truyền, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả bảo tồn và phát triển giống Bạch đàn lai UG24 ở Việt Nam.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: cây Bạch đàn lai UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) được thu thập tại Tân Mai - Đồng Mai - Quảng Yên - Quảng Ninh.

Vật liệu nghiên cứu: 03 mẫu lá bánh tẻ được lấy từ 03 cây Bạch đàn lai UG24 khác nhau. Mẫu lá được bảo quản trong túi nylon có chứa hạt silicagel hút ẩm, sau đó được bảo quản ở -20°C để tách chiết ADN phục vụ nghiên cứu. Kí hiệu các mẫu Bạch đàn lai UG24 được lấy lần lượt là UG24.1; UG24.2; UG24.3.

Trình tự các cặp mồi *rbcL* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C, kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 750 bp); mồi *trnH-psbA* (trnP1F: CGCGCATGGTGGATTCACAATCC; psbP1R: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C, kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 600 bp); mồi *matK* (mP3F: TTCCATGGCCTTCTTGCATTTGTTGC; mP3R: TTCCATGGTTTTTTGAGGATCCGCTGT), kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 700 bp); mồi *ITS* (IsP2F: ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG; IsP2R: TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC), kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 600 bp); mồi *ITS2* (IsP1F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT; IsP1R: TCCTCCGCTTATTGATATGC) với nhiệt độ gắn mồi 48°C, kích thước đoạn gen dự kiến khoảng 300 bp. Các cặp mồi sử dụng cho các đoạn gen cần nhân được cung cấp từ Hà Văn Huân (Ha Van Huan, 2018).

Hóa chất: Kit tách chiết ADN tổng số (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của hãng Intron Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch

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

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Bạch đàn lai UG24 được tách bằng kit (Plant ADN Isolation Kit) của Đức. Các mẫu ADN tổng số này được dùng để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *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: H<sub>2</sub>O 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 đọc trình tự tại công ty 1st Base (Malaysia).

Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như Bioedit, ADNclub, Biohit, MegaX... Trình tự nucleotide của các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* được so sánh trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML), tính khoảng cách di truyền bằng phần mềm megaX.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

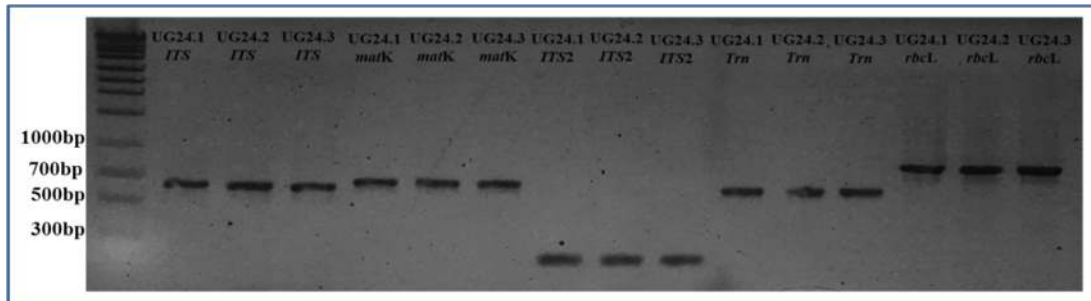
### 3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Bạch đàn lai

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Bạch đàn lai UG24 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 100 - 200 ng/µl; Tỷ số OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 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. Sản phẩm tách chiết ADN tổng số đảm bảo làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

**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 đàn lai UG24 được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả được minh họa trong hình 1.



Hình 1. Ảnh điện di các đoạn gen *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL*, *ITS2*, *ITS* của UG24

Kết quả PCR sau khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 1) 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 01 cũng cho thấy không có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR rất đặc hiệu, sau khi tinh sạch có thể sử dụng trực tiếp các sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide.

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

**3.3.1. Trình tự ADN trên gen *rbcL***

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* cho thấy cả 3 mẫu UG24.1; UG24.2; UG24.3 đều cho ra kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý các đoạn ADN bị nhiễu đoạn gen *rbcL* có kích thước 687 bp như hình 2.

```
GGTGTTAAAGATTATAAACTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCT
CAACCTGGAGTTCCTCCTGAGGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGG
CTTACCAGCCTTGATCGTTATAAAGGAAGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATATGTTATGTAGCT
TACCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTGGGTTCAAAGCCCTGCGCG
CTCTACGCTGGAGGATCTGCGAATCCCTCCTCTATACGAAAACCTTCCAAGGCCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGAGAGATA
AATTGAACAAATATGGGCGTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAACTACGGTAGAGCAGTTT
ATGAATGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTACGAAAGATGATGAGAACGTGAACCTACAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCT
TATTTTGTGCCGAAGCCATTTTAAATCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCA
```

Hình 2. Trình tự DNA trên đoạn gen *rbcL*

Các trình tự này sau đó 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

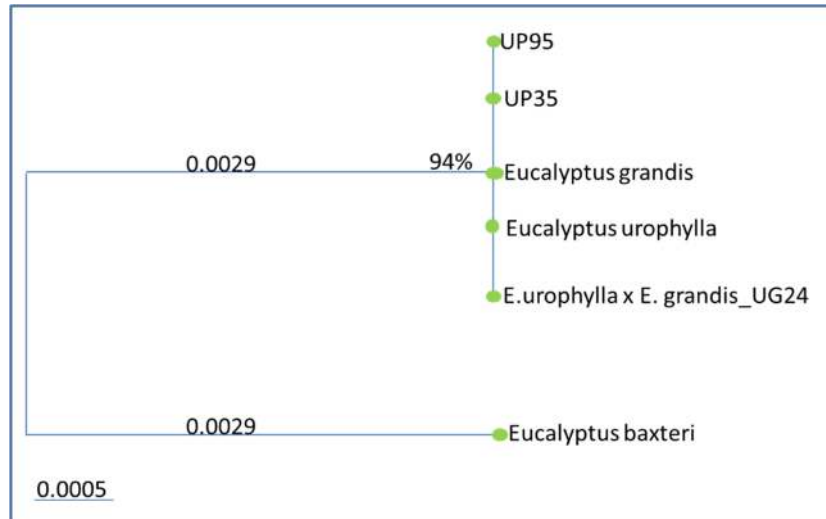
trình tự gen tương đồng dùng so sánh với giống Bạch đàn lai được trình bày ở bảng 1.

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

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Eucalyptus grandis</i>	MG925369.1	100
2	<i>Eucalyptus urophylla</i>	KJ440000.1	100
3	<i>Eucalyptus baxteri</i>	KC180773.1	99,42
4	UP35 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP35	100
5	UP95 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP95	100

Sau đó chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Bạch đàn lai chúng tôi nghiên cứu với các loài khác

ở bảng 1 và khoảng cách di truyền giữa chúng (hình 3).



Hình 3. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *rbcL* tạo bởi ML

Khoảng cách di truyền (*p-distance*) của giống Bạch đàn lai với các loài khác thu được như bảng 2.

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

	UP95	UP35	<i>E.grandis</i>	<i>E.urophylla</i>	<i>E.baxteri</i>	UG24
UP95						
UP35	0,0000					
<i>E.grandis</i>	0,0000	0,0000				
<i>E.urophylla</i>	0,0000	0,0000	0,0000			
<i>E.baxteri</i>	0,0058	0,0058	0,0058	0,0058		
_UG24	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0058	

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 với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai mà chúng tôi nghiên cứu có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài *E. urophylla*, *E. grandis*, UP35 và UP95 với khoảng cách di truyền là 0,0000 (hệ số tương

đồng 100%) và có quan hệ xa hơn với loài *E. baxteri* với khoảng cách di truyền là 0,0058 (hệ số tương đồng 99,42%).

### 3.3.2. Trình tự đoạn gen *matK*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *matK* cho thấy cả 3 mẫu đều cho ra kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *matK* có kích thước 449 bp như hình 4.

TGGCTTCAAAAAGATACGCCTCTTCTGATGAAGAAATGGAAATATTACCTTGTTAATTTATGGCAATATCATTTTTACGCCTGGTTTCA  
 ACCAGGAAGGATCGATATAAACCAATTATGCAAGTATTCTTTACTTTTTGGGCTATCGTTCAAGCGTGCCTAAATTCTTCAGTG  
 GTACGAAGTCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATAAATAATGCTATGAAGAAGTTCGAGACAATAGTTCCAATTATTCTCTGATT  
 GGATCATTGTCTAAAGCGAATTTTTGTGACACATTAGGGCATCCCATAGTAAACCGACCCGGGCTGATTTCATCAGATTCTGATATT  
 ATCGACCGTTTTTTCGATATCCAGAAAATCTTTCTCATTATCACAGCGGATCCTCAAAAAAAAAAGAGTTTATATCGAGTAAAATAT  
 ATACTTCGACTTCTTGTTGTTAAAACTTTGGCTCGTAAACACAAAAAGACTGTACGTACTTTTTTAAAAAGATTAGGTTTCGGAATTTT  
 TGGAAGAATTCCTTACGGAGGAAGAAGTTGTTCTTTCTTTGATCTTCCCAAGAAGTATTCTACTTCACGAAGGTTATATAGAGGGCG  
 GATTGGTATTGGATATTACTTCTATCAA

Hình 4. Trình tự DNA trên đoạn gen *matK*

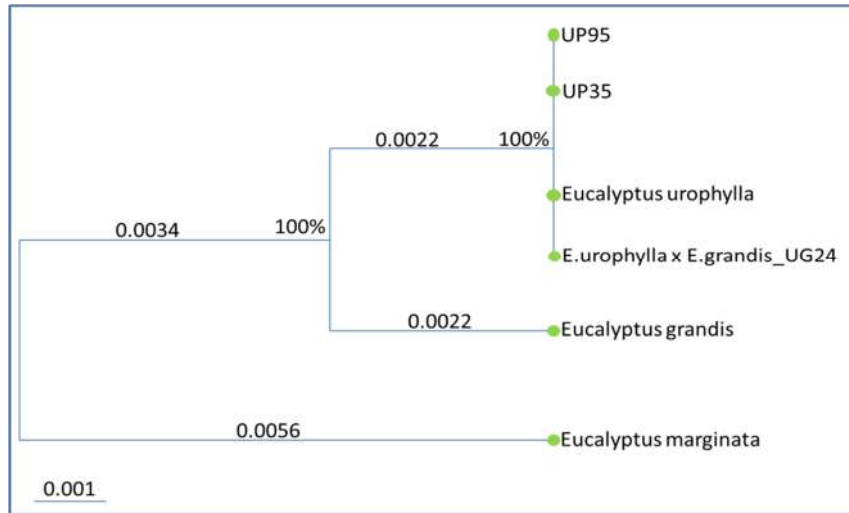
Các trình tự này sau đó được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài và các loài. Một số loài có

trình tự gen tương đồng với giống Bạch đàn lai được trình bày ở bảng 3.

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

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Eucalyptus grandis</i>	MG925369.1	99,55
2	<i>Eucalyptus urophylla</i>	KJ510901.1	100
3	<i>Eucalyptus marginata</i>	KC180781.1	98,89
4	UP35 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP35	100
5	UP95 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP95	100

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại các loài khác ở bảng 3 và khoảng cách di truyền giữa chúng (hình 5). tìm ra mối quan hệ của giống Bạch đàn lai với



**Hình 5. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *matK* tạo bởi ML**

Khoảng cách di truyền (*p-distance*) của giống Bạch đàn lai với các loài khác như bảng 4.

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

	UP95	UP35	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. marginata</i>	UG24
UP95						
UP35	0,0000					
<i>E. grandis</i>	0,0045	0,0045				
<i>E. urophylla</i>	0,0000	0,0000	0,0045			
<i>E. marginata</i>	0,0112	0,0112	0,0112	0,0112		
UG24	0,0000	0,0000	0,0045	0,0000	0,0112	

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 với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai mà chúng tôi nghiên cứu có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài *E. urophylla*, UP35 và UP95 với khoảng cách di truyền là 0,0000 và có quan hệ xa hơn với loài

*E. marginata* với khoảng cách di truyền là 0,0112 (hệ số tương đồng 98,89%).

### 3.3.3. Trình tự DNA trên gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA* cho thấy cả 3 mẫu đều cho ra kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *trnH-psbA* có kích thước 383 bp như hình 6.

ATATTTTTTTTTCTTTTTAAATCCATTTAAAAATTAAGAAATATTCCATTTTAAATGAAATCAAAAAAGAAATTCATAATGGA  
 AAATATTTTCATTGATTGTTAATTTTAAACATTTTCTATACTTAATTATGAGTAAACATTTTCTATCTTAATTATGAGATAGAAGAAG  
 CAGAAAATTATAACCTTTCCATTTTATTGAAAAAAAAGTAGAAGATAATAATCTCACAAAGCCTTACAAAAGGGTTGAAAAGAA  
 TGTATATAAATTCATATCTAAGGAAAAAGTAGATAAGCAATCATAAAGCAATCCCTAAGACTAGAATACTTTTCTTATGTTGAA  
 GTAAAGAAAACTTATGTAAAGAAAAGAGCACTAAAATAAGGAACAATAACCAATTTCTTTTCTATCAAGAGTGTGGTTATTGCT  
 CCTTCCAATCAAAAACCTCGGCTAGACTTATACTAAGACCAAAGTCTTATCCATTTGTAGATGGAACCTTCGACAGCAGCTAGGTCTA  
 GAGGGAAGTTATGAGCATTACGTTTCATGCATAAC

**Hình 6. Trình tự DNA trên đoạn gen *TrnH-psbA***

Các 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. Một số loài có

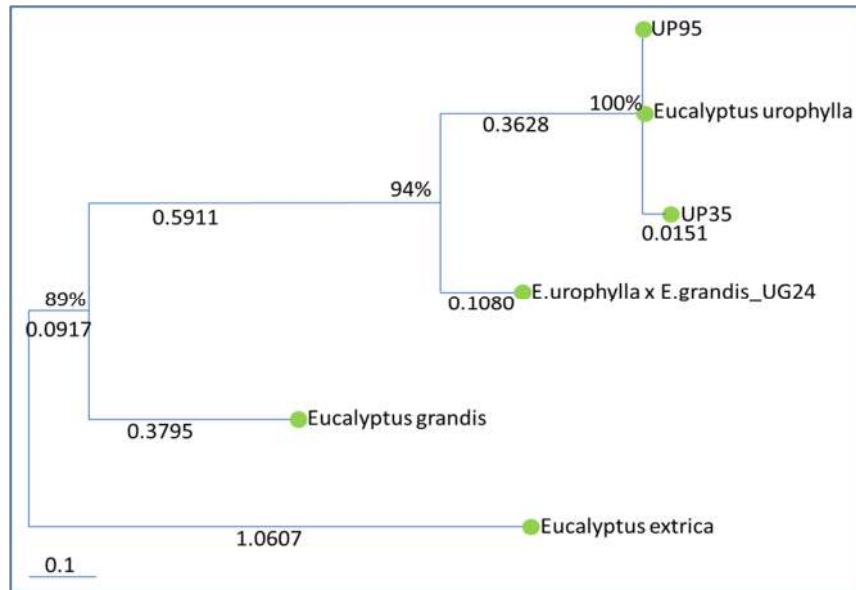
trình tự gen tương đồng với giống Bạch đàn lai được trình bày ở bảng 5.

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

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Eucalyptus grandis</i>	HM347959.1	87,43
2	<i>Eucalyptus urophylla</i>	EF507887.1	97,92
3	<i>Eucalyptus extrica</i>	FJ654343.1	84,59
4	UP35 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP35	96,74
5	UP95 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP95	97,92

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Bạch đàn lai với

các loài khác ở bảng 5 và khoảng cách di truyền giữa chúng (hình 7).



**Hình 7. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *trnH-psbA* tạo bởi ML**

Khoảng cách di truyền (*p-distance*) của giống Bạch đàn lai với các loài khác như bảng 6.

**Bảng 6. Khoảng cách di truyền của giống UG24 với các loài khác của đoạn *trnH-psbA***

	UP95	UP35	<i>E.grandis</i>	<i>E.extrica</i>	<i>E.urophylla</i>	UG24
UP95						
UP35	0,0151					
<i>E.grandis</i>	1,2406	1,2770				
<i>E.extrica</i>	1,6827	1,7277	1,6015			
<i>E.urophylla</i>	0,0000	0,0151	1,2406	1,6827		
UG24	0,4665	0,4781	1,0368	2,0949	0,4665	

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *trnH-psbA* kết hợp với khoảng cách di truyền và hệ số tương đồng của giống Bạch đàn lai với các loài khác ta thấy: giống Bạch đàn lai UG24 có trình tự gen giống 97,92% với đoạn gen của loài *E. urophylla* và UP95 với khoảng cách di truyền là 0,4665, giống 87,43% với đoạn gen của loài *E. grandis* với khoảng

cách di truyền là 1,0368 và có quan hệ xa hơn với loài *E. extrica* với khoảng cách di truyền là 2,0949 (hệ số tương đồng 84,59%). Ngoài ra, với chỉ thị này phân biệt được hai dòng UP95 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) và UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) có khoảng cách di truyền là 0,0151 và hệ số tương đồng 98,81%.

**3.3.4. Trình tự DNA trên đoạn ITS**

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn gen *ITS* cho thấy cả 3 mẫu đều cho ra kết quả

trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *ITS* có kích thước 564 bp như hình 8.

```

CCCGACGTCCCTCTCGACGCGGAGGATCGGGGCTCGGGCACCTCAGGGCGCTCGGCCTTTGTCCTCGGCGGGCGCAACGAACCCCGG
CGCGGAATGCGCCAAGGAACTTTAACAAGAGTGCGATGCTCCCGCCGCCATACACGGTGCGCGCGGGGATGCCATGCAATCTC
ATATTACTATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAACTGCGATACTTGGTGTGAATT
GCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAACCTTTGGTTCGAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTCACACAT
GGCGTTGCCCAATCCCTCCGCCCTCTGAACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGGTACGATGGCTCCCGCGACGACCACGTCCC
GGTTGGCCAAAATCGAGCGTCCGAGCGATCAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCGCGTGGC
GCTCATCGACGCTCCGCGAATCTGCTCCTTACCAACGCGACCCCA
    
```

**Hình 8. Trình tự DNA trên đoạn gen *ITS***

Các 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. Một số loài có

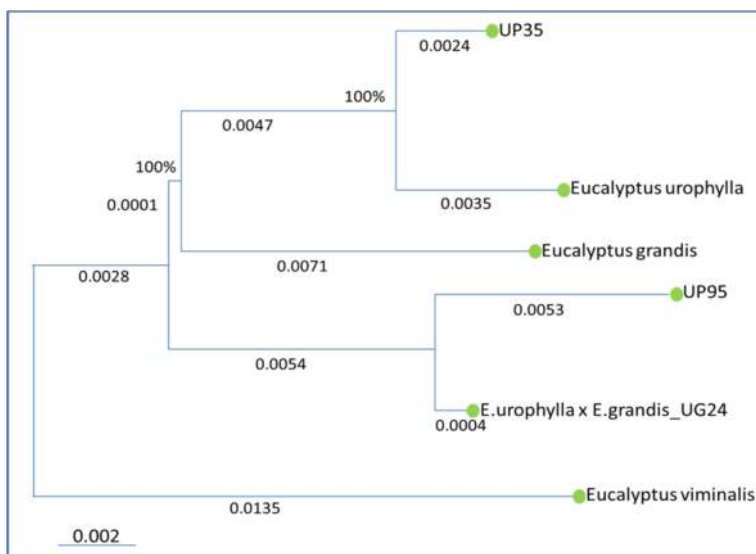
trình tự gen tương đồng với giống Bạch đàn lai được trình bày ở bảng 7.

**Bảng 7. Một số loài có trình tự đoạn *ITS* tương đồng với giống Bạch đàn lai trên NCBI**

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Eucalyptus urophylla</i>	HM596068.1	98,76
2	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF058475.1	98,23
3	<i>Eucalyptus viminalis</i>	KM064970.1	97,16
4	UP35 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP35	98,93
5	UP95 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP95	99,47

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Bạch đàn lai với

các loài khác ở bảng 7 và khoảng cách di truyền giữa chúng (hình 9).



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

Khoảng cách di truyền (*p-distance*) của giống Bạch đàn lai với các loài khác thể hiện ở bảng 8.

**Bảng 8. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai với các loài khác của đoạn *ITS***

	UP95	UP35	<i>E.viminalis</i>	<i>E.urophylla</i>	UG24	<i>E.grandis</i>
UP95						
UP35	0,0126					
<i>E.viminalis</i>	0,0275	0,0237				
<i>E.urophylla</i>	0,0108	0,0036	0,0200			
UG24	0,0054	0,0108	0,0219	0,0090		
<i>E.grandis</i>	0,0181	0,0144	0,0238	0,0090	0,0126	

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *ITS* 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 mà chúng tôi nghiên cứu có trình tự gen giống 99,47% với đoạn gen của loài UP95 với khoảng cách di truyền là 0,0054 và có quan hệ xa hơn với loài *E. viminalis* với khoảng cách di truyền là 0,0219 (hệ số tương đồng 97,16%). Với chỉ thị này đã phân biệt được hai dòng

AATCCCCTCCGCCCTCTGAACGGGGCGAGCGGGACTCGGGCGCGTACGATGGCCTCCCGCGACGACCACGTCCCGGT  
TGGCCCAAATCGAGCGTCCGAGCGATCAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATTAGACCCCAATGATCAATGTCGCG  
CGTGCCGCTCATCGCACGCTCCGC

Hình 10. Trình tự DNA trên đoạn gen *ITS2*

Các 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. Một số loài có

UP95 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) và UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) có khoảng cách di truyền là 0,0126.

3.3.5. Trình tự DNA trên đoạn *ITS2*

Kết quả xác định trình tự nucleotide *ITS2* cho thấy cả 3 mẫu đều cho ra kết quả trình tự giống nhau. Sau khi xử lý đoạn gen *ITS* có kích thước 178 bp như hình 10.

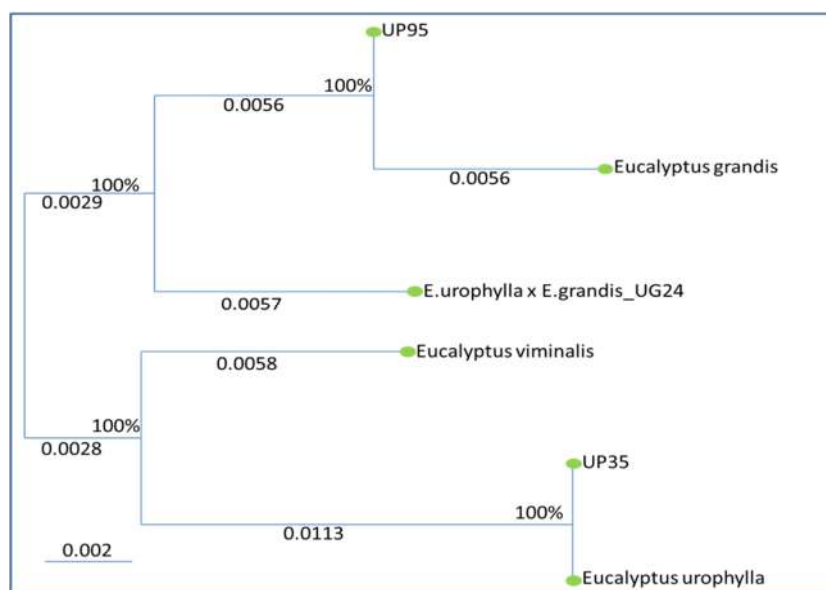
trình tự gen tương đồng với giống Bạch đàn lai được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai với các loài khác của đoạn *ITS2*

TT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Eucalyptus urophylla</i>	AF390492.1	98,31
2	<i>Eucalyptus grandis</i>	HM596050.1	98,31
3	<i>Eucalyptus viminalis</i>	KM064970.1	97,19
4	UP35 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP35	98,31
5	UP95 ( <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus pellita</i> )	UP95	98,88

Sau đó xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của giống Bạch đàn lai với

các loài khác ở bảng 9 và khoảng cách di truyền giữa chúng.



Hình 11. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *ITS2* tạo bởi ML

Khoảng cách di truyền (*p-distance*) của giống Bạch đàn lai với các loài khác như trong bảng 10.



**Bảng 10. Khoảng cách di truyền của giống Bạch đàn lai với các loài khác của đoạn ITS2**

	UP95	UP35	<i>E.viminalis</i>	<i>E.grandis</i>	UG24	<i>E.urophylla</i>
UP95						
UP35	0,0229					
<i>E.viminalis</i>	0,0173	0,0174				
<i>E.grandis</i>	0,0056	0,0287	0,0232			
UG24	0,0114	0,0171	0,0174	0,0171		
<i>E.urophylla</i>	0,0229	0,0000	0,0174	0,0287	0,0171	

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 mà chúng tôi nghiên cứu có trình tự gen giống 98,88% với đoạn gen của loài UP95 với khoảng cách di truyền là 0,0114 và có quan hệ xa hơn với loài *E. viminalis* với khoảng cách di truyền là 0,0174 (hệ số tương đồng 97,19%). Chỉ thị này cũng phân biệt được hai dòng UP95 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus*

*pellita*) và UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) với khoảng cách di truyền là 0,0229.

#### 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 UG24 với trình tự gen của loài *E. urophylla* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI ta lập được bảng so sánh đoạn trình tự như bảng 11.

**Bảng 11. So sánh trình tự của các đoạn gen giữa Bạch đàn lai UG24 và *E. urophylla***

Tên đoạn gen	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS2</i>
Số điểm sai khác	0	0	7	7	3
Kích thước trình tự	687	449	336	564	178
Tỷ lệ sai khác (%)	0	0	3,08	2,24	2,69

Kết quả cho thấy: trình tự đoạn gen *rbcL*, *matK* có tỷ lệ sai khác là 0%, trình tự đoạn gen *ITS* có tỷ lệ sai khác là 2,24%, trình tự đoạn gen *ITS2* có tỷ lệ sai khác là 2,69% và trình tự đoạn gen *trnH-psbA* có tỷ lệ sai khác cao nhất là 3,08%. Như vậy, tỉ lệ sai khác của trình tự đoạn gen *trnH-psbA* là cao nhất (3,08%) do đó khả năng phân biệt loài của đoạn gen *trnH-psbA* cũng là tốt nhất. Hơn nữa, kết quả cũng cho thấy tỉ lệ sai khác của trình tự đoạn gen *rbcL*, *matK* là thấp nhất (0%) đồng nghĩa với khả năng định danh loài tốt nhất khi so sánh giống Bạch đàn lai (*E. urophylla* x *E. grandis*) với loài *E. urophylla*.

Kết hợp giữa phân tích cho từng chỉ thị ở trên với kết quả so sánh của cả 5 chỉ thị với loài *E. urophylla* ở bảng 11 cho thấy: Tỷ lệ sai khác, khoảng cách di truyền của trình tự đoạn gen *rbcL* là thấp nhất (0%) và hệ số tương đồng cao nhất là 100%. Vì vậy, đoạn gen *rbcL*

có khả năng sử dụng để định danh loài tốt nhất cho giống Bạch đàn lai UG24. Tỷ lệ sai khác, khoảng cách di truyền của đoạn gen *trnH-psbA* là cao nhất (3,08%) và hệ số tương đồng thấp nhất là 97,92%. Thêm vào đó, với đoạn gen *trnH-psbA* đã phân biệt được hai dòng UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) và UP95 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) có khoảng cách di truyền là 0,0151 và hệ số tương đồng 98,81%. Vì vậy, đoạn gen *trnH-psbA* có khả năng sử dụng để phân biệt dòng tốt nhất nhất cho giống Bạch đàn lai UG24. Mặc dù vậy, cách tốt nhất là sử dụng đồng thời cả 5 đoạn trình tự gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* 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 (Steane D.A. et al., 1999). 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 (Fladung M. et al., 2015). Như vậy, đối với các loài Bạch đàn thì các chỉ thị ADN mã vạch của các đoạn gen nhân *ITS* và các đoạn chỉ thị ở lục lạp như *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* là hoàn toàn tin cậy và có độ phân loại cao.

## 5. KẾT LUẬN

Đã nhân gen thành công các đoạn gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *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 449 bp, *rbcL* là 687 bp, *trnH-psbA* là 336 bp, *ITS* là 564 bp, và đoạn *ITS2* là 178 bp. Các trình tự này sau đó được xử lý trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI) đã chỉ ra rằng Giống bạch đàn lai UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) có một cây thuộc loài *E. urophylla* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcL* và *matK*, 98,76% của đoạn gen *ITS*, 98,31% của đoạn gen *ITS2*, 97,92% của đoạn gen *trnH-psbA*, và một cây là *E. grandis* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcL*, 99,55% của đoạn gen *matK*, 98,23% của đoạn gen *ITS*, 98,31% của đoạn gen *ITS2*, 87,43% của đoạn gen *trnH-psbA*. Bằng công cụ BLAST trên NCBI đã so sánh trình tự các đoạn *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* của giống Bạch đàn lai UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) với loài *E. urophylla* tìm ra được tỉ lệ sai khác của trình tự đoạn gen *trnH-psbA* là cao nhất với 3,08% và tỉ lệ sai khác của trình tự đoạn gen *rbcL* là thấp nhất (0%). Đoạn gen *trnH-psbA* phân biệt được hai dòng UP35 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) và UP95 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus pellita*) có khoảng cách di truyền là 0,0151 và hệ số tương đồng 98,81%. Vì vậy, Sử dụng chỉ thị *trnH-psbA* là tốt nhất làm mã vạch ADN để giám định giống bạch đàn lai UG24 ở Việt Nam. Mặc dù vậy, cách tốt nhất là sử dụng đồng thời cả 5 đoạn trình tự gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* và *ITS2* để có thể xác định chính xác nhất loài cần định danh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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.
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., Sean W. G., Steven G. N., Brian C. H., Diana M. P., Mehrdad H., Spencer C.H.B. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS one* . 3(7): e2802.
4. Boland D. J.; Brooker, M. I. H., McDonald, M. W., Chippendale, G. M., Hall, N., Hyland, B. P. M., Kleinig, D. A. (2006). Forest Trees of Australia. Collingwood, Victoria: CSIRO Publishing. 5th edition. ISBN 0-643-06969-0.
5. Brooker M. I. H.; Kleinig, D. A. (2006). Field Guide to Eucalyptus. Melbourne: Bloomings. Third edition. ISBN 1-876473-52-5 vol. 1. South-eastern Australia.
6. Chen S.Y.H, Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C. (2010). Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcodes for identifying medicinal plant species. *Plos one* 5: e8613.
7. Ford C.S, Ayres K. L, Toomey N., Haider N., Stahl J. V. A., Kelly L. J., Wikstrom 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 DNA plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 159 (1): 1-11.
8. Ha Van Huan, Hoang Minh Trang and Nguyen Van 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. ISSN 1682-3974 DOI: 10.3923/ajps.2018.
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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (23): 8369 - 74.
10. Mark W Chase, Nicolas Salamin, Mike Wilkinson, James M Dunwell, Rao Prasad Kesanakurthi, Nadia Haider, Vincent Savolainen. (2005). Land plants and ADN barcodes: Short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1889-1895.
11. Maria V. C., Helena K., Maria P., Jouko R. (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and conservation* 20: 373-389.
12. Steane, D. A., G. E. Mckinnon, R. E. Vaillancourt and M. M. Potts (1999). ITS sequence data resolve higher level relationships among the eucalypts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 215-223.
13. <http://iftib.vn/signseed/view/vi/92>  
3893-QĐ-BNN-TCLN 2016\_IFTIB\_65691

**IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCE  
OF HYBRID *EUCALYPTUS* UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*)  
TO IDENTIFY PLANT SPECIES**

**Bui Thi Mai Huong<sup>1</sup>, Bui Thi Hoang Yen<sup>2</sup>, Ha Van Huan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hong Gam<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Vietnam National University of Forestry*

<sup>2</sup>*High school Dong Hoa, Hai Phong*

**SUMMARY**

Hybrid *Eucalyptus* UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) has been recognized as a high economic value species according to Decision 3893/QĐ-BNN-TCLN dated 20/9/2016. However, it is very hard for the farmer in identifying this species by observation. Therefore, this study aimed to develop a new method using DNA barcode fragments to identify the hybrid *Eucalyptus* UG24. The total genomic DNA was extracted from leaf samples of UG24 and was used to amplify the DNA barcodes (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS* and *ITS2*) by PCR technique. The results showed that the bands of PCR products have the expected size, which is 687 bp, 449 bp, 336 bp, 564 bp and 178 bp for *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *ITS*, and *ITS2* fragment, respectively. After that, these sequences were aligned with the sequence of those genes of *E. urophylla* and *E. grandis* species in NCBI: The results indicated that UG24 belongs to *E. urophylla* with *matK* and *rbcL* gene fragments are 100% similar to *E. urophylla*, *ITS* gene fragment is 98.76% similar to *E. urophylla*, *ITS2* gene fragment is 98.31% similar to *E. urophylla*, *trnH-psbA* gene fragment is 97.92% similar to *E. urophylla*. UG24 also belongs to *E. grandis* with *rbcL* gene fragment is 100% similar to *E. grandis*, *matK* gene fragment is 99.55% similar to *E. grandis*, *ITS* gene fragment is 98.23% similar to *E. grandis*, *ITS2* gene fragment is 98.31% similar to *E. grandis*, *trnH-psbA* gene fragment is 87.43% similar to *E. grandis*. These results suggest it is best for using *trnH-psbA* molecular marker as a DNA barcode to identify Hybrid *Eucalyptus* UG24 (*E. urophylla* x *E. grandis*) in Vietnam.

**Keywords:** DNA barcoding, identify species, PCR, UG24.

Ngày nhận bài : 09/4/2021

Ngày phản biện : 12/5/2021

Ngày quyết định đăng : 25/5/2021