

SỬ DỤNG DNA MÃ VẠCH VÙNG GEN NHÂN (*ITS-rDNA*) ĐỊNH DANH LOÀI HOA TRỨNG GÀ YÊN TỬ (*Magnolia* sp.)

Vũ Đình Duy^{1,3*}, Nguyễn Thị Thịnh^{2,4*}, Vũ Thị Thu Hiền², Lưu Thị Phương², Vũ Quang Nam^{2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Lâm nghiệp

³Viện Sinh thái Nhiệt đới, Trung tâm nhiệt đới Việt – Nga

⁴Trường THPT Chương Mỹ A, Chương Mỹ, Hà Nội

TÓM TẮT

Xác định đúng loài sẽ giúp ích cho việc bảo tồn cũng như các nghiên cứu về sinh học tiến hóa và hệ thống học của loài. Mã vạch DNA là công cụ hữu ích để xác định loài bằng cách sử dụng các đoạn DNA bộ gen được chuẩn hóa. Chúng tôi sử dụng mã vạch DNA (gen *ITS-rDNA*) để khám phá tình trạng phân loại của loài Hoa trứng gà yên tử dựa trên 19 mẫu thu thập ở rừng quốc gia Yên Tử, tỉnh Quảng Ninh nhằm cung cấp một cách nhìn mới về mối quan hệ phát sinh loài của chi Ngọc Lan (*Magnolia* L.), họ Ngọc Lan (Magnoliaceae). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ thành công cho phản ứng khuếch đại PCR vùng gen *ITS-rDNA* là 100%. Tỷ lệ đọc thành công trình tự hai chiều đạt được từ sản phẩm PCR là 100% đối với đoạn gen *ITS-rDNA* dài 600 bp và đăng ký trên GenBank (Mã số: MW969605 đến MW969623). Phân tích phát sinh loài sử dụng phương pháp ML chỉ ra rằng các mẫu Hoa trứng gà yên tử (*Magnolia* sp.) có mối quan hệ gần gũi với các loài *Magnolia championii*, *M. alboericea*, *M. coco* và hình thành một nhánh chị em đối với ba loài nói trên. Chúng tôi xác nhận Hoa trứng gà yên tử (*Magnolia* sp.) ở Rừng quốc gia Yên Tử là *M. quangninhensis* và nghiên cứu này cung cấp dữ liệu di truyền đầu tiên của loài này. Khoảng cách di truyền giữa các loài trong và giữa các loài *Magnolia* 2,7% (dao động từ 0 đến 5,7%). Nghiên cứu hiện tại cung cấp thêm bằng chứng về vùng gen *ITS-rDNA* như một dấu hiệu hữu ích để xác định loài trong chi *Magnolia*.

Từ khóa: cây phát sinh phả hệ, DNA mã vạch, hoa trứng gà yên tử, *ITS-rDNA*, *Magnolia* sp..

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, Ngọc lan (*Magnolia* L.) là một chi thực vật thuộc họ Ngọc lan (Magnoliaceae) với khoảng trên 90 loài, phân bố chủ yếu ở Đông Nam Á và Châu Mỹ (Vu Quang Nam, 2017), thường là cây bụi và gỗ nhỏ, bao hoa chưa phân hóa, không có cuống nhụy, hoa và quả thường mọc ở đầu cành, có 2 noãn trong mỗi lá noãn. Ở Việt Nam, chi Ngọc lan có khoảng trên 12 loài, phân bố rộng khắp đất nước, đa số các loài được dùng làm cảnh bởi hoa thường to, thơm, lá xanh quanh năm. Trong nhiều đợt khảo sát, điều tra tại Rừng quốc gia Yên Tử, tỉnh Quảng Ninh chúng tôi phát hiện và thu mẫu được loài Hoa trứng gà yên tử (Hình 1). Loài này được các cán bộ quản lý và người dân địa phương gọi là loài Hoa trứng gà. Tuy nhiên, qua nghiên cứu chúng tôi thấy loài *Magnolia coco* hoàn toàn không lông, cây bụi, hoa trắng, thường là cây

trồng, trong khi loài được phát hiện tại rừng quốc gia Yên Tử có đặc điểm sinh học như hoa to, màu trắng hoặc tím hồng, cây gỗ nhỏ (5-8 m), có phân bố tự nhiên. Do vậy, xác định chính xác tên khoa học của loài/thứ Hoa trứng gà yên tử trong tự nhiên là rất quan trọng đối với việc xác định giống cây, lựa chọn cha mẹ để nhân giống, sử dụng và bảo tồn nguồn gen của chúng.

Mã vạch DNA (DNA barcoding) sử dụng đoạn DNA ngắn đã chuẩn hóa phân biệt giữa các loài (Hebert *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012a,b), chúng trở thành công cụ phục vụ có hiệu quả cho công tác giám định, phân loại, đánh giá quan hệ di truyền, phát hiện loài mới, quản lý chất lượng, nguồn gốc, xuất xứ, bản quyền của sản phẩm từ sinh vật (Chen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012a,b). Ở thực vật, một số vùng gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*...) và vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại (phylogeny), phân loại (taxonomy)

*Corresponding author: duydingvu87@gmail.com; namvq@vnuf.edu.vn; thinhmoon@gmail.com

và nhận dạng loài (identity) (Hollingsworth *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). Nhiều phân tích phát sinh loài phân tử đã được tiến hành ở *Magnolia* hoặc Magnoliaceae trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf 1b*) và gen nhân (*ITS-rDNA*) (Nie *et al.*, 2008; Ha Van Huan *et al.*, 2017; Huan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Những nghiên cứu phát sinh loài này đã nâng cao hiểu biết của chúng ta về các mối quan hệ tiến hóa trong họ.

Để công tác quản lý, bảo tồn và phát triển loài Hoa trứng gà yên tử có hiệu quả, trong nghiên cứu này chúng tôi giải trình tự

nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) của 19 mẫu Hoa trứng gà nhằm phục vụ phân loại, giám định và xác định mối quan hệ di truyền cũng như xem xét mức độ hữu dụng vùng gen DNA mã vạch này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

19 mẫu Hoa trứng gà yên tử hoang dã được dùng làm vật liệu trong nghiên cứu này (Hình 1, Bảng 1). Các mẫu lá được bảo quản trong túi nhựa dẻo có chứa silicagel ngay tại thực địa và chuyển đến phòng thí nghiệm giữ ở tủ lạnh âm 30°C đến khi sử dụng tách chiết DNA.



Hình 1. Hình ảnh Hoa và Quả của loài Hoa trứng gà yên tử (*Magnolia* sp.)
(Ảnh: Vũ Quang Nam)

Bảng 1. Bảng ký hiệu 19 mẫu Hoa trứng gà yên tử sử dụng trong nghiên cứu

Tên Việt Nam	Ký hiệu	Số hiệu tiêu bản	Nơi thu mẫu	Mã số GenBank	OD _{260nm} / OD _{280nm}	Hàm lượng (ng/μL)
Hoa trứng gà yên tử	VQN01- VQN19	VQN01 - VQN19	Rừng quốc gia Yên tử, Quảng Ninh	MW969605- MW969623	1,85	750

2.2. Phương pháp nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của 19 mẫu loài Hoa trứng gà yên tử được tách chiết bằng bộ hóa chất Plant DNA isolation Kit (Norgenbiotek, Canada). Các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2. Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR

Nhân bản vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) bằng kỹ thuật PCR với cặp môi thiết kế 600 nucleotide trên cơ sở trình tự *ITS-rDNA* của các loài trong chi *Magnolia* trên Genbank (Bảng 2) bằng phần mềm primer 5.0. Môi xuôi ITS-F: 5'-CTCCTACCGATTGAATGGTC-3'

và môi ngược ITS-R: 5'-GAATCCTCGTAAGTTTCTTC-3'. Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25µL với các thành phần: 7 µL H₂O deion, 12,5 µL PCR Master mix 2X (Thermo Scientific™), 1,25 µL môi xuôi (10 pmol/µL), 1,25 µL môi ngược (10 pmol/µL), 3 µL DNA (10 – 20 ng). Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 94⁰C trong 3 phút; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94⁰C trong 45 giây, 55⁰C trong 45 giây, 72⁰C trong 45 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72⁰C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4⁰C.

Bảng 2. Danh sách các loài/thứ trong chi *Magnolia* trên GenBank sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên loài/thứ	Mã số GenBank (<i>ITS-rDNA</i>)	TT	Tên loài/thứ	Mã số GenBank (<i>ITS-rDNA</i>)
1	<i>Magnolia championii</i>	MN990501	21	<i>M. obovata</i>	MN990498
2	<i>M. albosericca</i>	MN990548	22	<i>M. lotungensis</i>	MN990513
3	<i>M. bidoupensis</i>	MN990552	23	<i>M. omeiensis</i>	MN990567
4	<i>M. coco</i>	MN990540	24	<i>M. aromatica</i>	MN990504
5	<i>M. hodgsonii</i>	MN990515	25	<i>M. macrophylla</i>	MN990529
6	<i>M. delavayi</i>	MN990502	26	<i>M. odora</i>	MN990509
7	<i>M. nitida</i>	MN990568	27	<i>M. kwangtungensis</i>	MN990543
8	<i>M. wilsonii</i>	MN990549	28	<i>M. chevalieri</i>	MN990544
9	<i>M. kobus</i>	MN990563	29	<i>M. martini</i>	MN990507
10	<i>M. cathcartii</i>	MN990497	30	<i>M. ernestii</i>	MN990566
11	<i>M. stellata</i>	MN990565	31	<i>M. denudata</i>	MN990546
12	<i>M. sieboldii</i>	MN990511	32	<i>M. insignis</i>	MN990505
13	<i>M. sinica</i>	MN990512	33	<i>M. kachirachirai</i>	MN990569
14	<i>M. dawsoniana</i>	MN990550	34	<i>M. mexicana</i>	MN990530
15	<i>M. tripetala</i>	MN990535	35	<i>M. laevifolia</i>	MN990510
16	<i>M. officinalis</i>	MN990499	36	<i>M. montana</i>	MN990542
17	<i>M. amoena</i>	MN990551	37	<i>M. champaca</i>	MN990539
18	<i>M. biondii</i>	MN990524	38	<i>M. guatemalensis</i>	MN990556
19	<i>M. acuminata</i>	MN990523	39	<i>M. decidua</i>	MN990519
20	<i>M. salicifolia</i>	MN990517	40	<i>M. dodecapetala</i>	MN990526

2.2.3. Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại công ty Macrogen, Hàn Quốc. Trình tự DNA sau khi giải trình tự được hiệu chỉnh và loại bỏ các tín hiệu nhiễu với sự trợ giúp của phần mềm ChromasPro2.1.6 được so

sánh với các trình tự đã có trên Genbank (sử dụng công cụ BLAST trong NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 (Hall, 1999). Các vùng không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích.

2.2.4. Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood) sử dụng phần mềm Mega 7.0 (Kumar et al., 2016) với giá trị ủng hộ (bootstrap) 1.000 lần lặp lại. Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi được tính toán bằng Mega 7.0.

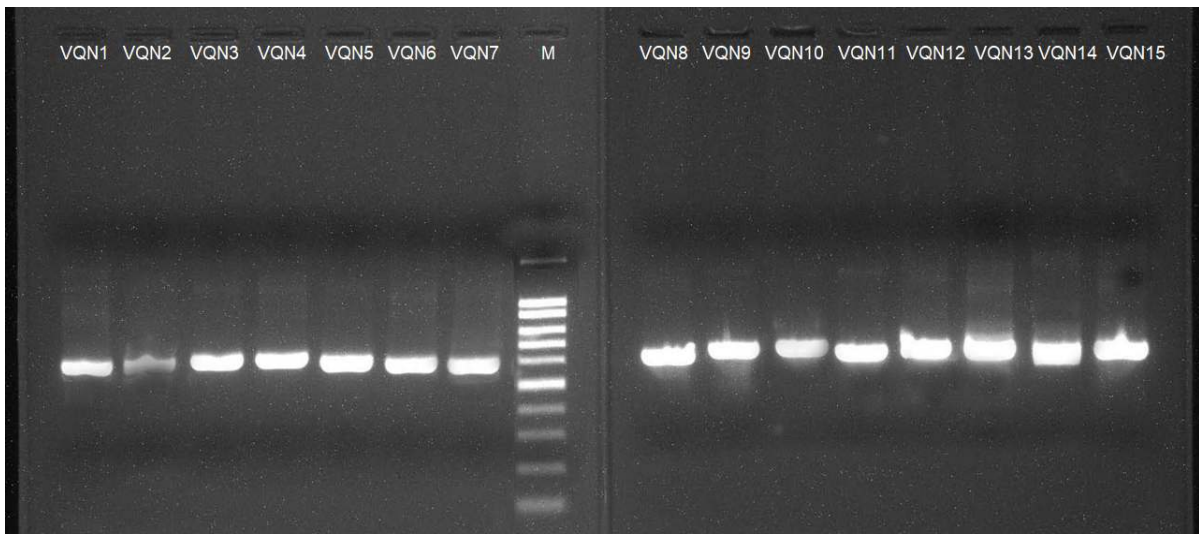
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA tổng số và phản ứng PCR

Tách chiết DNA tổng số là một bước khởi đầu rất quan trọng, nó quyết định sự thành công cho phản ứng PCR. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng bộ hóa chất Plant DNA isolation Kit (Norgenbiotek, Canada) để tách chiết DNA tổng số từ 19 mẫu lá của loài Hoa trứng gà yên tử (Bảng 1). DNA tổng số được xác định hàm lượng và độ tinh sạch của các

mẫu bằng phương pháp quang phổ trên máy NanoDrop 2000. Kết quả thu được ở bảng 1, cho thấy các mẫu DNA tổng số có hàm lượng cao (750 ng/μL) và đều có tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} nằm trong khoảng 1,8 – 2,0, điều này chứng tỏ các mẫu DNA tổng số tách chiết được đảm bảo độ tinh sạch để làm khuôn thực hiện phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu. Các mẫu DNA tổng số được pha loãng bằng H₂O deion về hàm lượng 20 ng/μL để bảo quản và thực hiện phản ứng PCR.

Cặp môi vùng gen *ITS-rDNA* đã nhân bản thành công ở nhiệt độ gán môi là 55°C cho 19 mẫu nghiên cứu. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 600 bp. Chất lượng của sản phẩm PCR được thể hiện khi điện di trên gel agarose 1,5% chỉ có một băng duy nhất, sáng đậm, đủ tiêu chuẩn để giải mã trình tự nucleotide cho các mẫu trong nghiên cứu (Hình 2).



Hình 3. Sản phẩm PCR của một số mẫu Hoa trứng gà yên tử phân tích với cặp môi *ITS-rDNA* điện di trên gel agarose 1,5% (M: Marker phân tử 100bp; VQN1-15: ký hiệu mẫu)

3.2. Trình tự nucleotide gen *ITS-rDNA* của 19 mẫu Hoa trứng gà yên tử

Sản phẩm PCR 19 mẫu của loài Hoa trứng gà yên tử sau khi được giải trình tự hai chiều (xuôi và ngược) của vùng gen *ITS-rDNA* được hiệu chỉnh, ghép nối với sự trợ giúp của phần mềm chromaspro 2.1.6 để loại bỏ các vùng tín hiệu nhiễu và các đỉnh màu không rõ ràng. Tổng số 19 trình tự nucleotide sau hiệu chỉnh đã thu được đoạn trình tự có kích thước là 578 nucleotide và chúng đã được đăng ký trên ngân

hàng gen thế giới (Bảng 1). Kết quả so sánh mức độ tương đồng di truyền chỉ ra tất cả 19 mẫu Hoa trứng gà yên tử (*VQN01-VQN19*) có mức độ tương đồng nucleotide 100% trong vùng gen này nên chúng tôi đã sử dụng kết quả của 1 mẫu để tiến hành các phân tích tiếp theo. Trình tự thu được từ các mẫu này được kiểm tra tính tương đồng (similarity) với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự các mẫu tương đồng cao với các loài trong chi

Ngọc Lan. Cụ thể, mẫu Hoa trứng gà yên tử (VQN) tương đồng di truyền cao 99,13% với loài *Magnolia championii* (MN990501), 98,61% với *M. albosericca* (MN990548) và 99,12% với *M. coco* (MN990540). Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (99%) cũng không thể suy ngược lại tên loài bởi kết quả BLAST chỉ hiển thị trình tự tương đồng nhất mà trên GenBank hiện có. Do kết quả của BLAST cho ra những điểm nghi vấn chưa chuẩn xác, vì vậy chúng tôi sử dụng phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại để xác định tên khoa học cho các mẫu trong nghiên cứu.

3.3. Khoảng cách di truyền (P) giữa các loài trong chi Ngọc Lan

Trình tự mẫu Hoa trứng gà yên tử (VQN) được so sánh về khoảng cách di truyền với 40 loài trong cùng chi Ngọc Lan lấy trên GenBank (Bảng 2). Chúng tôi đã xác định được 138 vị trí biến đổi (Variable), 82 vị trí nào mang thông tin (Parsimony informative). Khoảng cách di truyền giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo phương pháp *p-distance* đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài trong chi Ngọc Lan. Kết quả cho thấy, trong chi Ngọc Lan khoảng cách di truyền giữa các loài khá lớn, trung bình 2,7% (0 - 5,7%).

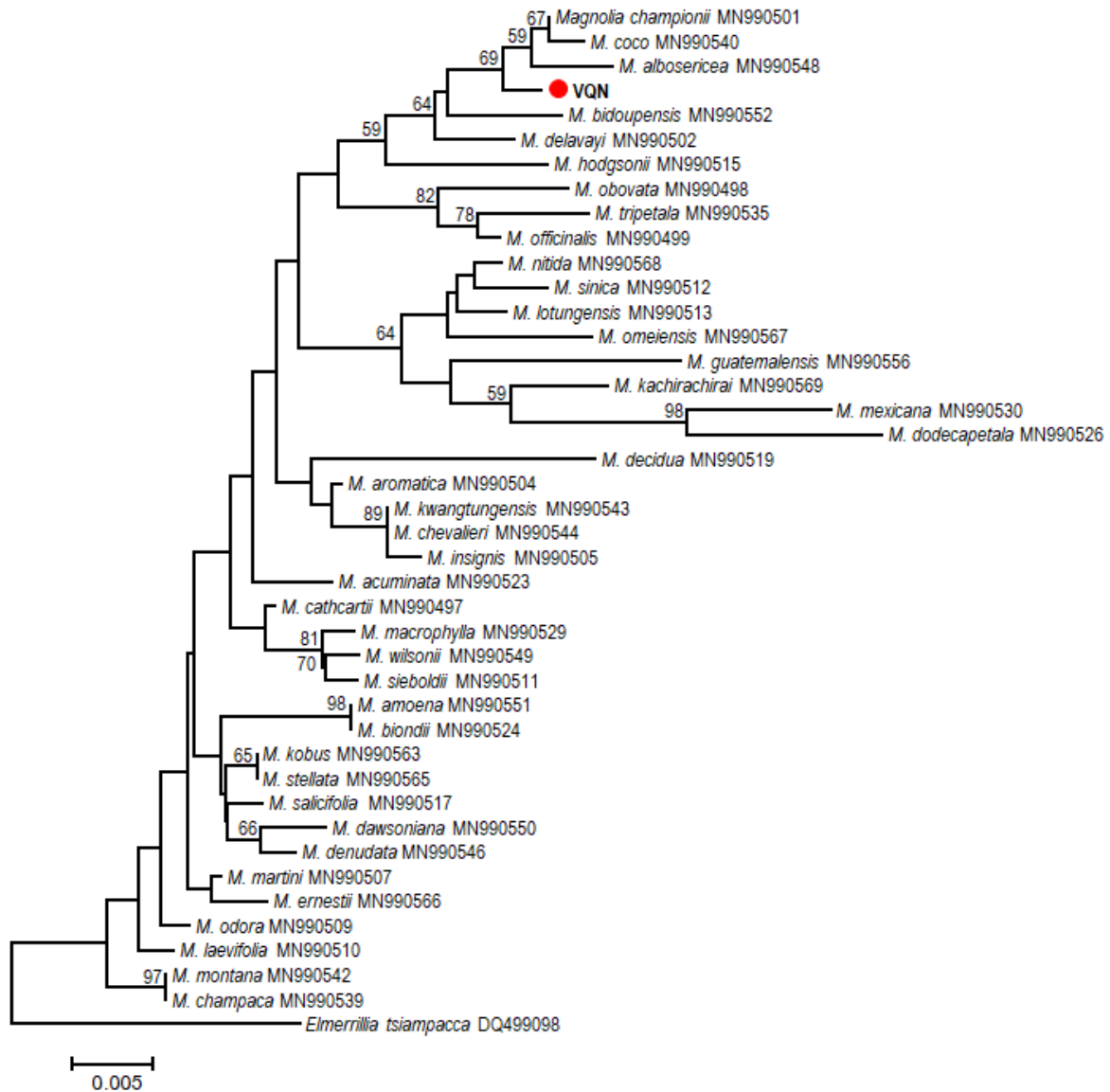
3.4. Vị trí phân loại của mẫu Hoa trứng gà yên tử

Để có thêm các bằng chứng khoa học chúng tôi xác định vị trí phân loại của 19 mẫu nghiên cứu. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của một số loài thuộc chi *Magnolia* đã được xây dựng theo phương pháp ML (Hình 3). Các mẫu trong nghiên cứu này và các loài *Magnolia championii* (MN990501), *M. albosericca* (MN990548) và *M. coco* (MN990540) tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap (69%). Tuy nhiên, mẫu nghiên cứu được tách biệt so với ba loài

Magnolia championii (MN990501), *M. albosericca* (MN990548) và *M. coco* (MN990540). Kết quả này cho phép nhận định các mẫu trong nghiên cứu có khả năng là một loài mới hay phụ loài mới cho khoa học. Theo nghiên cứu mới nhất của Vu et al. (2020) sử dụng phương pháp hình thái đã mô tả loài Hoa trứng gà yên tử là một loài mới với tên khoa học (*Magnolia quangninhensis* QN Vu & NH Xia) trong họ Magnoliaceae ở Rừng quốc gia Yên Tử, tỉnh Quảng Ninh với một số đặc điểm nổi bật như tất cả các bộ phận của cây đều có màu sáng, các lá hình elip lớn có màu trắng kem đến hồng tím và nhị hoa (6–) 9–11 đôi. Kết quả của chúng tôi cũng đồng quan điểm với tác giả trên, trong vùng gen nhân cũng đã thể hiện được sự khác biệt di truyền giữa 19 mẫu Hoa trứng gà yên tử với các loài trong chi Ngọc Lan.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) của 19 mẫu Hoa trứng gà yên tử được giải trình tự nucleotide có kích thước 578 nucleotide. Các trình tự này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI) với mã số (MW969605-MW969623) góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA cung cấp cho các nghiên cứu tiến hóa và hệ thống sinh học của loài. Trong đó, 138 vị trí nucleotide biến đổi, 82 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin khi so sánh trình tự nucleotide vùng gen nhân giữa các loài trong chi Ngọc Lan. Trong chi Ngọc Lan khoảng cách di truyền giữa các loài khá lớn, trung bình 2,7% (0- 5,7%) trong vùng gen *ITS-rDNA*. Hơn nữa, kết quả phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* chỉ ra các loài trong chi Ngọc Lan có cùng nguồn gốc tiến hóa và các mẫu trong nghiên cứu được tách biệt 1 nhánh riêng rẽ, xác định được chính xác tên loài dựa trên kết quả giải mã vùng gen *ITS-rDNA* và đặc điểm hình thái với tên khoa học là *Magnolia quangninhensis*. Vùng gen này là vùng gen DNA barcode (DNA mã vạch) hữu dụng để nhận dạng, định loại loài cho các loài trong chi Ngọc Lan.



Hình 3. Mối quan hệ họ hàng của mẫu nghiên cứu với các loài trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* bằng phương pháp ML
(Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. Loài *Elmerrillia tsiampacca* (DQ499098) được xem như loài ngoài nhóm (outgroup))

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu này được tài trợ bởi nguồn kinh phí của Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam thuộc đề tài sau tiến sĩ mã số GUST.STS.ĐT2019-ST01 và đề tài mã số 106.03-2017.16. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất và phòng thí nghiệm cho sự thành công của nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen S., Yao 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 barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5: e8613.

2. Gao T., Yao H., Song J., Liu C., Zhu Y., Ma X., Pang X., Xu H., Chen S., 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 116-121.

3. Ha Van Huan, Luu Thi Thao Nguyen, Nguyen Minh Quang, 2018. To create DNA Barcode data of *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S. Kumar for identification species and reseaching genetic diversity. *Journal of Forestry Science and Technology*, 2: 1-9.

4. Hall T.A., 1999. BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41: 95-98.

5. Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 101: 14812-14817.

6. Hollingsworth P.M., Forrest L.L., Spouge J.L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., Bank M., Chase M.W., Cowan R.S., Erickson D.L., Fazekas A.J., Graham S.W., James K.E., Kim K.J., Kress W.J., Schneider H., AlphenStahl J., Barrett S.C.H., Berg C., Bogarin D., Burgess K.S., Cameron K.M., Carine M.C., Chacón J., Clark A., Clarkson J.J., Conrad F., Devey D.S., Ford C.S., Hedderson T.A.J., Hollingsworth M.L., Husband B.C., Kelly L.J., Kesanakurti P.R., Kim J.S., Kim Y.D., Lahaye R., Lee H.L., Long D.G., Madriñán S., Maurin O., Meusnier I., Newmaster S.G., Park C.W., Percy D.M., Petersen G., Richardson J.E., Salazar G.A., Savolainen V., Seberg O., Wilkinson M.J., Yi D.K., Little D.P., 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS*, 106(31): 12794–12797.
7. Huan H.V., Trang H.M., Toan N.V., 2018. Identification of DNA barcode sequence and genetic relationship among some species of *Magnolia* Family. *Asian J Plant Sci*, 17: 56–64.
8. Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.
9. Li D.Z., Gao L.M., Li H.T., Wang H., Ge X.J., Liu J.Q., Chen Z.D., Zhou S.L., Chen S.L., Yang J.B., Fu C.X., Zeng C.X., Yan H.F., Zhu Y.J., Sun Y.S., Chen S.Y., Zhao L., Wang K., Yang T., Duan G.W., 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that the internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS*, 108: 19641–19646.
10. Liu G.N., Liu B.B., Wen J., Wang Y.B., 2020. The complete chloroplast genome sequence of *Magnolia mexicana* DC. (Magnoliaceae) from Central America. *Mitochondrial DNA Part B*, 5: 798–799.
11. Liu J., Provan J., Gao L.M., Li D.Z., 2012a. Sampling strategy and potential utility of indels for DNA barcoding of closely related plant species: A case study in *Taxus*. *Int J Mol Sci*, 13: 8740–8751.
12. Liu Z., Zeng X., Yang D., Ren G., Chu G., Yuan Z., Luo K., Xiao P., Chen S., 2012b. Identification of medicinal vines by ITS2 using complementary discrimination methods. *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 242–249.
13. Nie Z.L., Wen J., Azuma H., Qiu Y.L., Sun H., Meng Y., Sun W.B., Zimmer E.A., 2008. Phylogenetic and biogeographic complexity of Magnoliaceae in the Northern Hemisphere inferred from three nuclear data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 1027–1040.
14. Vu Q.N., Xia N.H., Nguyen T.T., Khuat T.H.N., 2020. *Magnolia quangninhensis* (Magnoliaceae), a new species from northern Vietnam. *Phytotaxa*, 464 (2): 188–192.
15. Vu Quang Nam. 2017. *Michelia* Plants of Viet Nam Lambert Academic Publishing, Germany, pp. 80
16. Wang Y.B., Liu B.B., Nie Z.L., Chen H.F., Chen F.J., Figlar R.B., Wen J., 2020. Major clades and a revised classification of *Magnolia* and Magnoliaceae based on whole plastid genome sequences via genome skimming. *Journal of Systematics and Evolution*, 58(5): 673–695

USING *ITS-rDNA*-BARCODING FOR IDENTIFICATION OF *Magnolia* sp. SPECIES IN VIETNAM (Magnoliaceae)

Vu Dinh Duy^{1,3*}, Nguyen Thi Thinh^{2,4*}, Vu Thi Hien², Luu Thi Phuong², Vu Quang Nam^{2*}

¹Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Vietnam National University of Forestry

³Institute of Tropical Ecology, Vietnam - Russia Tropical Centre

⁴Chuong My A High School, Chuong My, Hanoi

SUMMARY

Identifying a species will help its conservation as well as the studies on evolutionary biology and systematics of this species. DNA barcoding is a useful tool for species identification using standardized genomic DNA fragments. We used DNA barcodes (*ITS-rDNA* gene) to explore the taxonomic status of *Magnolia* sp. (Magnoliaceae) based on 19 samples collected from Yen Tu National Park, Quang Ninh province, and to provide new insight on the genetic relationships of the genus *Magnolia*. In this study, the PCR success rate for *ITS-rDNA* region was 100%. The success rate of bidirectional sequencing of PCR product was 100% for 600 bp long *ITS-rDNA* region fragment. Phylogenetic analyses using Maximum likelihood (ML) indicated that all samples of *Magnolia* sp. had a close relationship with *M. championii*, *M. albosericea* and *M. coco*, and formed a sister lineage with respect to a clade joining the three these species. We identified the *Magnolia* sp. from Yen Tu National Park as *M. quangninhensis*. Our results provide the first genetic data for this species. Interspecific genetic distances among *Magnolia* species was 2.7% (ranging from 0 to 5.7%). Our study confirmed the monophyly of the genus *Magnolia*. The current study provides further evidence for *ITS-rDNA* region as a useful marker for species identification in the genus *Magnolia*.

Keywords: DNA Barcodes, *ITS-rDNA* gene, *Magnolia* sp., Phylogenly.

Ngày nhận bài : 06/4/2021

Ngày phản biện : 05/5/2020

Ngày quyết định đăng : 14/5/2021