

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐOẠN DNA BARCODE CHO LOÀI HOÀNG ĐÀN (*Cupressus tonkinensis*) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Hà Văn Huân¹, Hoàng Minh Trang¹, Bùi Thị Mai Hương¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Hoàng đàn (*Cupressus tonkinensis*) là các loài cây được đánh giá là có giá trị kinh tế cao, gỗ tốt, gỗ có mùi hương. Hiện nay các loài này đang bị khai thác khá nhiều. Do đó, loài này đang đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng. Vì vậy, việc xác định các đoạn DNA barcode cho loài Hoàng đàn (*Cupressus tonkinensis* Silba) phục vụ giám định loài là cần thiết. ADN tổng số được phân lập từ lá cây Hoàng đàn. Các đoạn DNA barcode (*ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* and *ITS2*) được nhân bản từ ADN tổng số của cây *Cupressus tonkinensis* 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 *ITS* có 1643 nucleotide, đoạn *rbcL* có 573 nucleotide, đoạn *trnH-psbA* có 507 nucleotide và đoạn *ITS2* có 349 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 Hoàng đàn khác: đoạn gen *ITS* tương đồng 94% với loài *Cupressus funebris*, đoạn gen *rbcL* tương đồng 97% với loài *Cupressus funebris*, đoạn gen *ITS2* tương đồng 99% với loài *Cupressus funebris*, đoạn gen *TrnH-psbA* tương đồng 99% với loài *Cupressus funebris*. Sau đó, chúng tôi đăng ký trên DNABank.vn với mã số: CCT0001; CCT0002; CCT0003; CCT0004. Sử dụng chỉ thị *ITS* làm mã vạch ADN để giám định loài Hoàng đàn *Cupressus tonkinensis* ở Việt Nam.

Từ khóa: Giám định loài, Hoàng đàn, mã vạch ADN.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Hoàng đàn có tên khoa học là *Cupressus tonkinensis* Silba, phân bố hẹp ở các dải núi đá vôi cao chót vót chạy từ Hữu Lũng, Chi Lăng, Văn Quan đến Bắc Sơn (Lạng Sơn), Thạch An (Cao Bằng), Na Hang (Tuyên Quang), nhưng Hoàng đàn tập trung lớn nhất, lượng tinh dầu nhiều nhất là ở vùng núi đá vôi Hữu Lũng (Lạng Sơn). Hoàng đàn là cho gỗ thẳng, có vân gỗ đẹp, chịu mối mọt, gỗ thường sử dụng làm đồ thủ công mỹ nghệ và đồ gỗ cao cấp. Gỗ Hoàng đàn có chứa tinh dầu có mùi thơm đặc trưng, tinh dầu trong gỗ có tác dụng xua đuổi Gián, Chuột, Nhện và chống mối mọt rất hiệu quả. Mang mùi hương gỗ nồng ấm êm dịu giúp giảm căng thẳng, kích thích nhẹ nhàng, giúp sáng khoái, tạo cảm giác bình yên, thư thái, giảm mệt mỏi, giảm căng thẳng thần kinh, giúp tái tạo nâng cao cảm giác hưng phấn (Võ Văn Chi, 2004; Phạm Văn The, 2013). Và hiện nay các loài này đang bị khai thác khá nhiều, do vậy chúng đang nằm trong danh sách loài thực vật cần được bảo tồn của quốc gia. Hoàng đàn là loài đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam (1996, 2007) và Danh mục Động thực vật rừng nguy cấp quý hiếm nhóm I (nhóm IA) trong nghị định 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ nước cộng hòa xã hội chủ nghĩa

Việt Nam. Do đó, việc nghiên cứu xác định các đoạn DNA barcode cho loài Hoàng đàn (*Cupressus tonkinensis* Silba) phục vụ giám định loài là cần thiết và cấp bách cho việc định danh và bảo tồn loài.

Việc ứng dụng các gen mã vạch, xác định các đoạn DNA barcode là một phương pháp định danh, sử dụng một đoạn DNA 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 DNA barcode là một công cụ hữu hiệu hỗ trợ cho phương pháp phân loại dựa vào hình thái (Aron J.F. et al., 2008; Kress J.W. et al., 2008).

Ở động vật, đoạn DNA barcode được sử dụng cho phần lớn các loài là đoạn gen ở ty thể cytochrome C oxidase (*COI*). 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 (Anders R., 2012; Alvarez I.W.J.F., 2003; Aron J.F., 2008; Chase M.W. et al., 2005; Von Crautlein M.K.H. et al., 2011).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành lựa chọn bốn đoạn trình tự ADN để sử dụng làm mã vạch ADN là: *ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ITS2*. Trong số đó, các đoạn *rbcL*, *trnH-psbA* là các đoạn ADN nằm ở hệ gen lục lạp, đoạn *ITS*, *ITS2* nằm ở hệ gen nhân (Chen S.Y.H. et al., 2010; Ford C.S. et al., 2009; Hamilton M.B., 1999). Tuy có vị trí và mức độ phân hóa khác nhau, 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 Hoàng đàn ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: loài Hoàng đàn *Cupressus tonkinensis* Silba ở Lạng Sơn.

Vật liệu nghiên cứu: mẫu lá bánh tẻ của cây Hoàng đàn, 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 Hoàng đàn được lấy theo chữ viết tắt họ và tên khoa học của loài: CCT12.1; CCT12.2; CCT12.3.

Mỗi được sử dụng để nhân các đoạn trình tự được thiết kế dựa trên các tài liệu đã được công bố.

Hóa chất: Kit tách chiết DNA tổng số (Plant DNA 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, DNA marker, Redsafe...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Hoàng đàn theo hướng dẫn của Kit (Plant DNA Isolation Kit). Xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch ADN tổng số bằng phương pháp quang phổ kế. Nhân bản đoạn gen *ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ITS2* từ các mẫu ADN tổng số bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ), mỗi phản ứng PCR được

thực hiện trong tổng thể tích 20 µl, bao gồm: H₂O deion (7 µl), 2x PCR Master mix Solution (10 µl), 10 pmol/µl mỗi xuôi (1,0 µl), 10 pmol/µl mỗi 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, 55°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Nhiệt độ gắn mỗi các phản ứng khác nhau phụ thuộc và cập mỗi sử dụng. Mỗi phản ứng PCR lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu thí nghiệm. Trình tự các cặp mỗi *ITS* (IsP2F: ACGAATTCATGTCCGGTGAAGTGTTTCG; IsP2R: TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC); mỗi *rbcL* (rP1F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAAATCAAGTCCACCTCG); mỗi *trnH-psbA* (trnPF1: CGCGCATGGTGGATTACAATCC; psbPR1: GTTATGCATGACGTAATGCTC); mỗi *ITS2* (IsP1F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT; IsP1R: TCCTCCGCTTATTGATATGC). Kết quả PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, quan sát kết quả dưới đèn cực tím (UV) và chụp ảnh bằng hệ thống Dolphin - Doc Image system của hãng Wealtec (Mỹ). Sản phẩm PCR được tinh sạch theo hướng dẫn của kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit) của Norgen, 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 xác định tại bằng máy giải trình tự, sử dụng bộ Kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như DNAClub, Biohit, Mega6... Trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN sau khi xử lý được đăng ký trong ngân hàng cơ sở dữ liệu ADN của Việt Nam (DNABank.vn). Trình tự mã vạch DNA sau xử lý được xử lý trên hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự tương đồng loài Hoàng đàn nghiên cứu so với các loài khác và trên cơ sở đó xây dựng cây phân loại.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

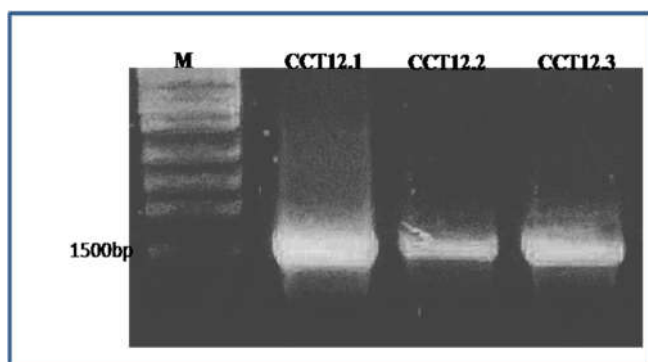
3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Hoàng đàn

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Hoàng đàn 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, chúng tôi tiến hành điện di để

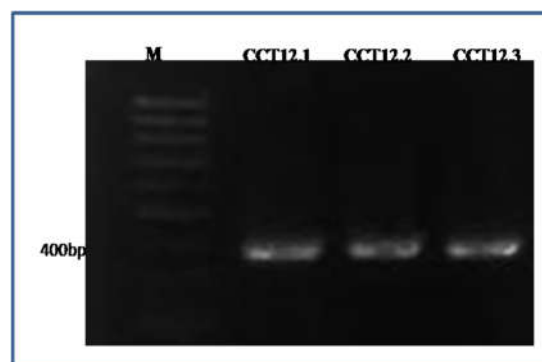
kiểm tra sự nguyên vẹn của sản phẩm. Kết quả điện di cho thấy các băng ADN khá sắc nét, không có sản phẩm phụ, điều này khẳng định ADN tổng số còn nguyên vẹn, ít đứt gãy và sạch. Sản phẩm tách chiết ADN tổng số đảm bảo yêu cầu kỹ thuật làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

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

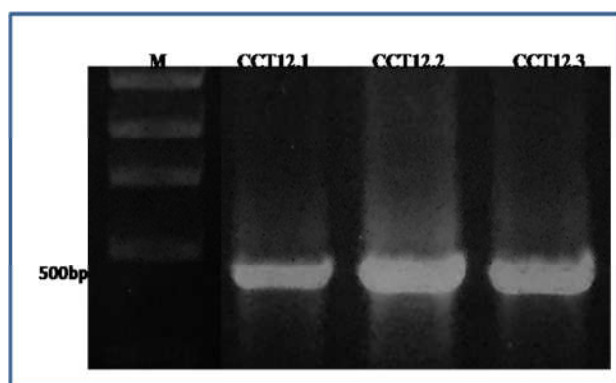
ADN tổng số tách chiết từ các mẫu lá của cây Hoàng đàn được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.



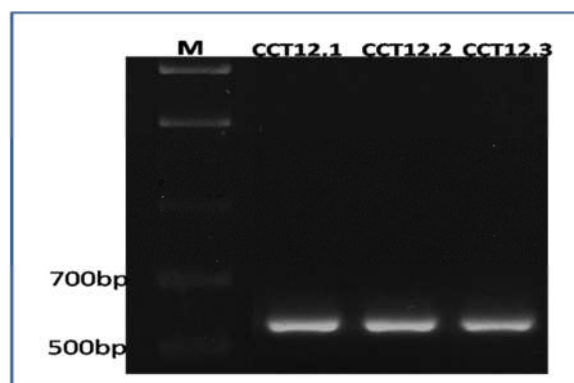
Hình A: Đoạn gen *ITS*



Hình B: Đoạn gen *ITS2*



Hình C: Đoạn gen *rbcL*



Hình D: Đoạn gen *trnH-psbA*

Hình 1. Kết quả PCR nhân gen các đoạn mã vạch ADN

(*CCT12.1*: Hoàng đàn mẫu 1; *CCT12.2*: Hoàng đàn mẫu 2; *CCT12.3*: Hoàng đàn mẫu 3)

Phản ứng PCR được lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu thí nghiệm. 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 1 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

Kết quả xác định trình tự nucleotide của các sản phẩm PCR, sau khi phân tích cho thấy trình tự nucleotide của mỗi đoạn ADN ở cả 3 lần lặp không có sự khác biệt về trình tự nucleotide của mỗi đoạn ở các lần lặp lại và

các mẫu trong cùng một loài. Trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch *ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ITS2* đã được đăng ký trong ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam

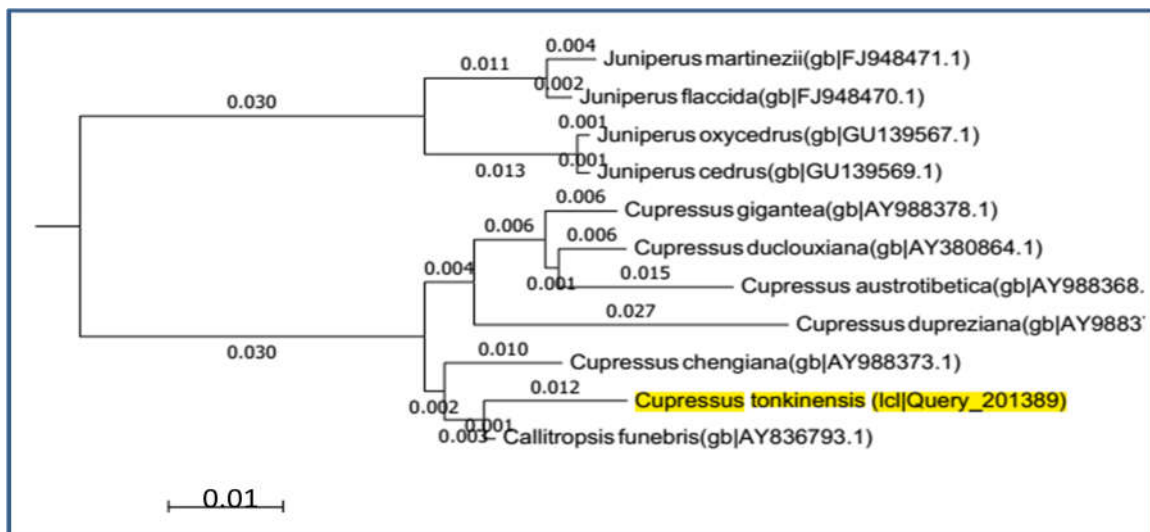
(DNABank.vn), với các mã số (Barcode ID) tương ứng là: *rbcL*: CCT0001; *trnH-psbA*: CCT0002; *ITS2*: CCT0003; *ITS*: CCT0004.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của đoạn gen *ITS*, gồm 1643 bp
(Barcode ID: CCT0004)

CCTATCAAGCTCGCACGGCGATTGATGTCGGCAACGCTCACGAGAAGTTCATTGAACCTTATCATTTAGA
GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTACCGTAGGTGAACCTGCGGTAGGATCATTGTCGGTTCGAGACCCT
GAATCGTGTAGGGGATGGAGCTGGCCTCCTCCCCGCCCAAAATCTCGGCGACGTGCGGACACTTGGC
CCTGCAGCGATGTGCTGGACGGCAAGCTACGGGTCCAGCGCCGTCAAGGTGGAGGGTCACATCGAATG
CCGTGATCGAAAGCGTGGATTCCCCGCGGGGCGAAGAGACTCGGATGCAAATCTGGATTACGATCGGTG
CCTTCGAACGACGTCTGCGTTCGGAGCGAGGGGTCCCTGCTCGGTTGTAGTTCAGAGGGGGTCCGGGCC
CGTCCCCGTTGAGATTTTCATGGCCCGGTGCGGTGCGCGGGCGCTGTGCCAGGGATCCGTCGTTTCGACGG
CGGCAAGTCGGGACTGCCGCAACCCCCGTTGCCTTGCCAGGTGTGTTAACTCGTCGCTCGGAGCGTTC
TGTGTCTAGGATGGGTGCACTCGCAAGATTTGCGGGGACAGGGGCCCCGTCGATGACACGGCTCTCCCA
TGCGTCGACTCACACCTTTCGAGAGGTGATGGGGCGGGGACACACCAGAGCGTTCCTCGTCGCACCCATT
GGGTGCTCGGGGTTTCGGGATGTGTCAACACCCAACACACGGGGTGCATCGCGCACCTTAGAAAATCCAA
AGAATGAAACCGCGAATCCAGCGCCCTTGC GCGGCTCGGGTTCGCCCAGAAAGACAAAACCTTAACCA
AAATTCACGGACTTTCGGGCAACGGAATATTCTCGGCCTCTCGCCACGAATGAAAGAATGTTAACCG
AAAATGCCGAATACTTTAAGTGGTCAAATTGGCAGAAATCCCCGGGGAAATCCATCCAAGTCTTTTGA
AACGCCAAGTTTGGCGCCCCCGAAGGCCCTCCGGCCAAAGGGGCCACCGTTCCTGGCTTTGGGGGCGT
CCCCAACTAACAAAAAATTGCCCCCTTCCCCCAAGCCGAAGGGAAACGGGAAAAAATGGGGCCCTTT
CCCCGGTGGTCTCTCCAAATTTGGGCCCCCGGTTTCTGTGCTTGTAAATATGTAAGCTCACCTAAATG
GTTCTCTTTCCCTAGATCCTTCGTTCTCCCTGTAACATAAACGCGGTGGTGGGGCCCTCGCCCCTTAAA
AGAATGGTTCCCGTTGGTCCGGTGTGTTGGATTTGTGTTGCCCCCCCTTGTGAAACGCTTAAAGACCA
AGGAGTGTATACCCGCTGCCGCGTCATAAGAGAAAAAACTTTTTTTGTAAATCTTACCTCCGCAGAG
TGGGGCTCTCGCTCAACTCGTGGGGGTTGCCACTCTTGTTCCTACTCGTCCTCTATAGGTTATGAAGGTGT
GGGAGTGACTTTCAGCCGGTTCCTACTTCATAGAGTTCTACCAATGTATGATTATCGCTCGCGTGTATAT
GCGCACTCTCCTCAAAAATTTTATTTAACGTGAGTTGTTGTAGGATATATAGTATATCACCTCGTGTG
TGTGTTAGATTTTACTATTGTAGAGCACGTGGGTTATGTGGCGCG

Các trình tự này sau đó được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *ITS* ở loài Hoàng đàn bằng cách sử

dụng công cụ BLAST. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Hoàng đàn được dùng để xây dựng cây phát sinh chủng loại được thể hiện ở hình 2.



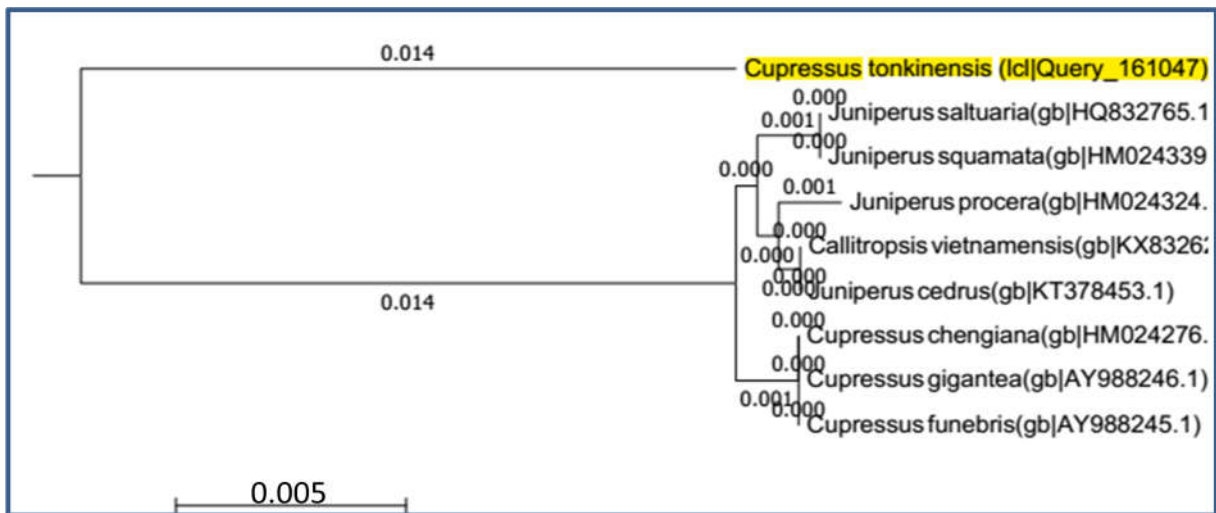
Hình 2. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *ITS* tạo bởi NCBI

**Bảng 2. Trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL*, gồm 573bp
(Barcode ID:CCT0001)**

GCCTCATGCTGCATGCTCGTTACTAAGATTACAGATTGACTTATTATACTCCGGACTAT
CAGACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTCACTCCTCAACCTGGAGTGC
CCCCGAAGAAGCGGGGGCCGCGGTAGCTGCCGAATCTTCCACTGGTACATGGACCA
CTGTTTGGACCGATGGTCTTACCAGTCTTGATCGCTACAAGGGGCGATGCTACGATAT
TGAACCCGTTCTTGAGAAGAACTCAATTTATTGCCTATGTAGCTTACCCTTTAGAC
CTTTTGAAGAAGTTCTGTGACTAACCTGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGG
ATTCAAAGCCTTGCGGGCTCTACGTCTGGAAGATTTACGAATTCCTCCTGCTTATTCAA
AACTTTTCAAGGACCACCTCATGGTATTCAAGTTGAAAGAGATAAATTAACAAAT
ATGGTCGTCCTTTGTTGGGATGTACTATCAAACCTAAATTGGGTCTATCTGCCAAGAA
TTATGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTCCGTGGTGGACTTGGATTTTACA

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

tương đồng theo đoạn *rbcL* dùng so sánh với loài Hoàng đàn được dùng để xây dựng cây phát sinh chủng loại được thể hiện ở hình 3.



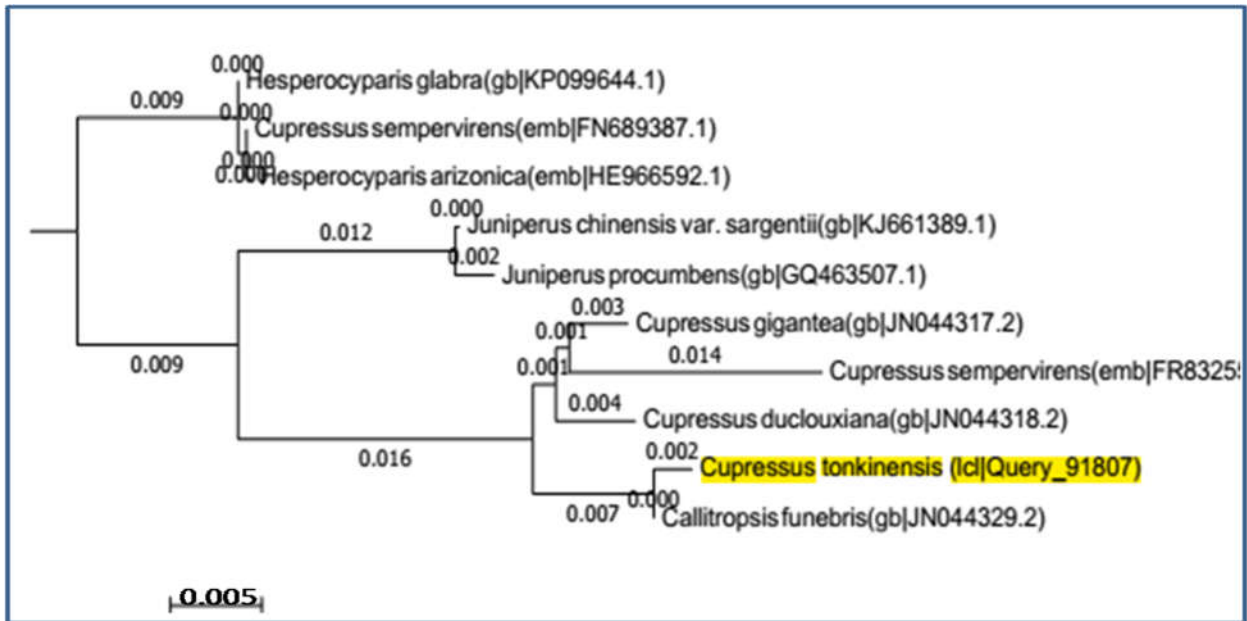
Hình 3. Cây phân loại dựa trình tự trên đoạn vào *rbcL* tạo bởi NCBI

**Bảng 3. Trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA*, gồm 507 nucleotide
(Barcode ID:CCT0002)**

CGCCCAACTAATTGACAGTCTCTGTCTACGGTCATTCCATTTCAAGAATGGATGGTTCT
AAGCCCCGAAAACCAACTAATAATGAAACTATTCTATTATTTAGAATAGTTATTAATT
TGTTGCACTTGCAATGCAACTCTCACACAAGTTAGTGACATTGACATTTTTTTTTTTTA
ATAGTTTTGTTTTGGGTATTAATAAAAAAAGATCTGAGCCAATACTCGCTACAAATTAAT
AATTGATATTATGTATCCATGGCTAAATGGTAAAAGCACCCAATCATAATTGGGAAG
TCGCGGGTTCAATTCGGCTGGATGCACAGTTATAGTTATTGGGCTCTGTTTCGCTCGC
AATAACTATAAAATTAGACGGAAAAAGCAGTACCAAATTGGCACTGCTTTCTTTTTAG
GATTGAAATACTAACAATCCACCTGAATAATTAGCCGTTTATAGAATTACC

Các trình tự thu được này sau đó được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài. Một số loài có trình tự gen tương đồng theo đoạn *trnH-psbA* dùng so

sánh với loài Hoàng đàn được dùng để xây dựng cây phát sinh chủng loại được thể hiện ở hình 4.



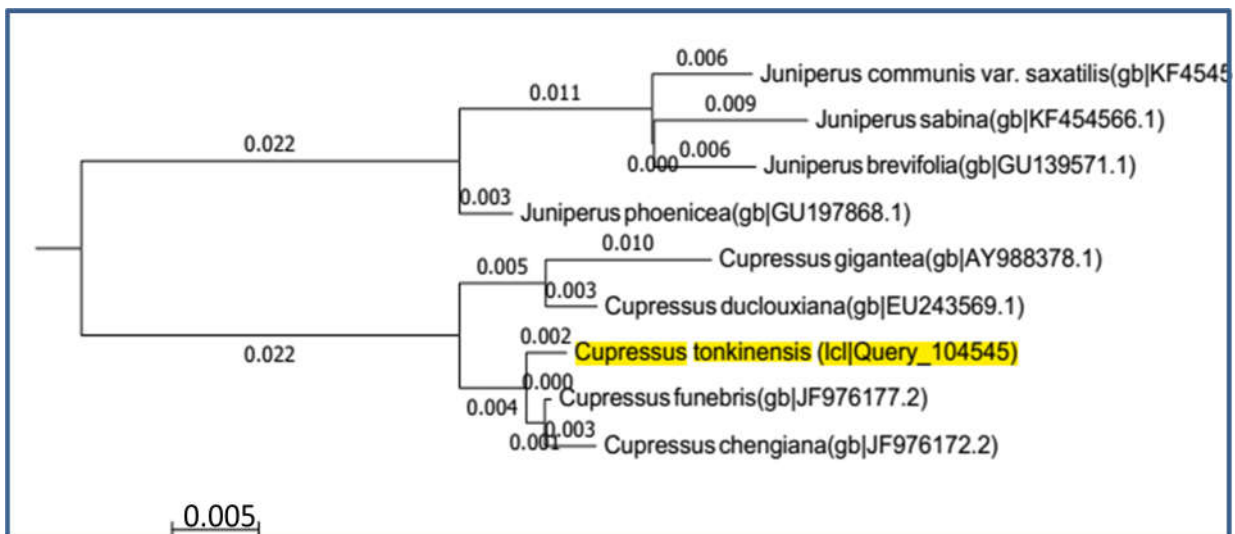
Hình 4. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *TrnH-psbA* tạo bởi NCBI

Bảng 4. Trình tự nucleotide của đoạn *ITS2*, gồm 349 nucleotide
(Barcode ID: CCT0003)

AGACGGGGATCTCAGTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAGGCCTCGGCCAAGGGCACGT
CTGCTTGGGCGTTCGCACTACAAAATTGCCCTCCCCAGCGAGGAGCGGAGATGGCCGT
CCGTGTCCCAAGTGGCGCGGTTCGGCTGAAATGAGCACGAGGTCCGTCGATCCGTCG
CGACGAGCGGTGGCTCCAAAAGGCCGGCGTTGGTTTGCCTGATCGAACGATTCTC
GCGAGGAACTTTATTCTGGGTCCAGCGGCCCGCCGAGTGCGGGCATGCCGCATCTCT
ACCGCGTCCCAAGTCAGGCGTGAATACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGAA

Các trình tự này sau đó cũng được xử lý trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài. Một số loài có trình tự gen tương đồng theo đoạn *trnH-psbA* dùng so

sánh với loài Hoàng đàn được dùng để xây dựng cây phát sinh chủng loại được thể hiện ở hình 5.



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

Từ cây phát sinh chủng loại của 4 đoạn gen *ITS*, *rbcL*, *ITS2* và *trnH-psbA* cho thấy loài Hoàng đàn (*Cupressus tonkinensis*) có sự tương đồng cao nhất với cùng một loài *Cupressus funebris*. Vì vậy *Cupressus tonkinensis* có quan hệ họ hàng gần nhất với loài *Cupressus funebris*. Do đó, chúng tôi lựa chọn loài *Cupressus funebris* làm tham chiếu

so sánh để tìm ra khả năng phân biệt tốt nhất của 4 đoạn gen mà chúng tôi lựa chọn.

Dựa vào kết quả so sánh trình tự các đoạn *ITS*, *rbcL*, *ITS2* và *trnH-psbA* của *Cupressus tonkinensis* với trình tự gen của loài *Cupressus funebris*, chúng tôi lập được bảng so sánh khả năng phân biệt của đoạn trình tự *ITS*, *rbcL*, *ITS2*, và *trnH-psbA* như ở bảng 5.

Bảng 5. Bảng so sánh khả năng phân biệt của các đoạn trình tự ITS, rbcL, ITS2 và trnH-psbA

Tên đoạn gen	<i>ITS</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS2</i>	<i>trnH-psbA</i>
Số điểm sai khác	54	17	5	9
Kích thước trình tự	865	548	296	466
Tỷ lệ sai khác	6,2%	3,1%	1,6%	1,9%

Từ kết quả phân tích trên cho thấy khi so sánh đoạn trình tự *ITS* của loài *Cupressus tonkinensis* với loài *Cupressus funebris* có 54 điểm sai khác, nhiều hơn 3 đoạn gen còn lại. Tỷ lệ sai khác của đoạn trình tự này cũng cao hơn 3 đoạn còn lại với tỷ lệ 6,2%. Như vậy, đoạn *ITS* có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *rbcL*, *ITS2* và *trnH-psbA* khi so sánh loài *Cupressus tonkinensis* với loài *Cupressus funebris*.

THẢO LUẬN

Từ kết quả so sánh của 4 chỉ thị cho thấy đoạn *ITS* là đoạn cho khả năng phân biệt tốt nhất với 54 điểm sai khác, và tỷ lệ sai khác 6,2%. Kết hợp tỷ lệ tương đồng và cây phân loại dựa vào đoạn *ITS* được xây dựng bởi ngân hàng quốc tế NCBI cho thấy (hình 2): Trong cùng chi Hoàng đàn: loài *Cupressus tonkinensis* có tỷ lệ tương đồng cao nhất với *Cupressus funebris* là 94%, với *Cupressus chengiana* và *Cupressus gigantea* là 92%, với *Cupressus dupreziana* là 90%. Hơn nữa, tỷ lệ tương đồng này càng giảm so với các loài thuộc chi khác như: loài *Cupressus tonkinensis* có tỷ lệ tương đồng thấp nhất với các loài thuộc chi Bách xù *Juniperus martinii*, *Juniperus flaccid*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus cedrus* là 87%. Do vậy, đoạn *ITS* là đoạn phù hợp để sử dụng là DNA barcode cho loài Hoàng đàn mà chúng tôi nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Đã tách chiết được 3 mẫu ADN tổng số của Hoàng đàn (*Cupressus tonkinensis* Silba). Nhân gen thành công các đoạn gen *ITS*, *rbcL*, *ITS2* và *trnH-psbA* từ ADN tổng số của loài Hoàng đàn bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xác định trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN cho thấy đoạn gen *ITS* có kích thước là 1643bp, đoạn *rbcL* có 573bp, đoạn *trnH-psbA* có 507 bp và đoạn *ITS2* có 349 bp. Trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch *ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ITS2* đã được đăng ký trong ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam với các mã số (Barcode ID) tương ứng là: *rbcL*: CCT0001; *trnH-psbA*: CCT0002; *ITS2*: CCT0003; *ITS*: CCT0004. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN (*rbcL*, *ITS*, *trnH-psbA* và *ITS2*) của loài Hoàng đàn với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của các loài Hoàng đàn khác trên ngân hàng gen quốc tế NCBI đã chỉ ra: đoạn gen *ITS* tương đồng 94% với loài *Cupressus funebris*, đoạn gen *rbcL* tương đồng 97% với loài *Cupressus funebris*, đoạn gen *ITS2* tương đồng 99% với loài *Cupressus funebris*, đoạn gen *TrnH-psbA* tương đồng 99% với loài *Cupressus funebris*. Sau đó, so sánh trình tự các đoạn *ITS*, *rbcL*, *ITS2* và *trnH-psbA* của loài Hoàng đàn nghiên cứu (*Cupressus tonkinensis*) với loài *Cupressus funebris* tìm ra được chỉ thị *ITS* làm mã vạch có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *rbcL*, *ITS2* và *trnH-psbA*.

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, 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. 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.

5. 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 barcodes for identifying medicinal plant species. *Plos one* 5: e8613.

6. 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.

7. Hamilton M.B. (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 513-525.

8. Kress J.W, Erickson D.L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(8):2761-2762

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. Pham Van The, Phan Ke Loc, Nguyen Tien Hiep and John Silba. (2013). The Status of Wild and Cultivated Population of *Cupressus tonkinensis* Silba in Vietnam. *Bull. CCP* 2 (1): 10-16.

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. Võ Văn Chi (2004). Từ điển thực vật thông dụng, tập 2. NXB Khoa học và Kỹ thuật.

STUDY ON IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCE OF *Cupressus tonkinensis* TO IDENTIFY PLANT SPECIES

Ha Van Huan¹, Hoang Minh Trang¹, Bui Thi Mai Huong¹
¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Cupressus tonkinensis is a species of high economic value with good wood and fragrant wood. Nowadays, these species are being exploited quite a lot. Therefore, these species are still facing extinction. So, it is necessary to identify DNA barcode fragments of the *Cupressus tonkinensis* for species identification. The genomic DNA was extracted from leaf tissue of *Cupressus tonkinensis*. The DNA barcodes (*ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* and *ITS2*) were amplified from total DNA of *Cupressus tonkinensis* by PCR technique. The PCR products indicated that all the bands have the size similar to the theoretical size of *ITS*, *rbcL*, *trnH-psbA* and *ITS2*. Results nucleotide sequencing of PCR product samples showed that the size of the isolated *ITS* gene fragment is 1643 bp, *rbcL* fragment is 573 bp, *trnH-psbA* fragment is 507 bp and *ITS2* fragment is 349 bp. And then, these sequences were compared with *Cupressus funebris* in NCBI we found that: *ITS* gene fragment is similar to 99%, *rbcL* gene fragment is similar to 100%, *ITS2* gene fragment is similar to 98%, *TrnH-psbA* gene fragment is similar to 99%. The nucleotide sequences of *ITS*, *rbcL*, *ITS2*, *TrnH-psbA* have been registered on the DNABank.vn with Barcode ID CCT0001; CCT0002; CCT0003 and CCT0004. Recommendation for using *ITS* molecular marker as DNA barcode to identify *Cupressus tonkinensis* in Viet Nam.

Keywords: *Cupressus tonkinensis*, DNA barcoding, identify species.

Ngày nhận bài : 15/02/2020
Ngày phản biện : 16/3/2020
Ngày quyết định đăng : 23/3/2020