

XÁC ĐỊNH MÃ VẠCH ADN PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI PHI ĐIỆP TÍM HÒA BÌNH (*Dendrobium* sp.)

Bùi Thị Mai Hương¹, Nguyễn Văn Việt¹, Hà Văn Huân¹

TÓM TẮT

Lan Phi điệp tím là các loài cây có giá trị kinh tế cao, làm cảnh, làm thuốc. Phi điệp tím Hòa Bình đặc trưng riêng so với các loại phi điệp có nơi phân bố khác về hình dạng, màu sắc hoa. Do vậy, việc xác định các đoạn mã vạch ADN để định danh cho loài Phi điệp tím Hòa Bình (*Dendrobium* sp.) phục vụ giám định loài là cần thiết. ADN tổng số được phân lập từ lá cây Phi điệp tím. Các đoạn mã vạch ADN (*rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf*) được nhân bản từ ADN tổng số của Phi điệp tím bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR chỉ ra rằng các băng thu được có kích thước giống với kích thước dự kiến, sau đó sản phẩm PCR được xác định trình tự. Kết quả phân tích trình tự đã chỉ ra, đoạn *rbcL* có 740 nucleotide, đoạn *TrnH-psbA* có 844 nucleotide và đoạn *ycf* có 821 nucleotide. Các trình tự này sau đó được xử lý trên Ngân hàng Gen quốc tế (NCBI) đã tìm ra: loài Phi điệp tím Hòa Bình thuộc loài *Dendrobium anosmum* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và 96,16% của đoạn *ycf*. So sánh sự khác biệt của Phi điệp tím Hòa Bình với các loài Lan (*Dendrobium tosaense*) khác cho thấy: đoạn gen *rbcL* tương đồng 100% với loài *Dendrobium tosaense*, đoạn gen *TrnH-psbA* tương đồng 98,52% với loài *Dendrobium tosaense*, đoạn gen *ycf* tương đồng 92,61% với loài *Dendrobium tosaense*. Sử dụng chỉ thị *ycf* là tốt nhất làm mã vạch ADN để giám định loài Phi điệp tím ở Việt Nam.

Từ khóa: Mã vạch ADN, giám định loài, Phi điệp tím.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phi điệp tím (tên gọi khác là Giả Hạc) là giống lan quý của rừng nhiệt đới được nhiều người chơi lan ưa chuộng không chỉ bởi khuôn bông đẹp, cây sai hoa mà còn đẹp cả về màu sắc lẫn hình dáng. Cánh hoa tao nhã, trên cánh có phủ lông mịn và có ánh kim, trên lưỡi thường có hai mắt tím đậm, nhất là bộ phận môi hoa có cấu trúc phức tạp và độc đáo. Phi điệp tím Hòa Bình (*Dendrobium* sp.) có hương thơm đặc biệt, dễ chịu, thoang thoảng mà hầu như không có loại hương liệu nhân tạo nào sánh được. Phi điệp tím Hòa Bình đặc trưng riêng so với các loại phi điệp có nơi phân bố khác về hình dạng màu sắc hoa. Hoa Phi điệp tím ở Hòa Bình có màu đậm hơn và có hương thơm đặc biệt hơn hoa Phi điệp ở khu vực phân bố khác. Ngoài giá trị làm cảnh phi điệp có thể làm thuốc để điều trị nhiều bệnh về da, suy nhược thần kinh và tăng cường sức đề kháng cho cơ thể. Vì vậy, Phi điệp tím Hòa Bình mang lại hiệu quả kinh tế cao. Do đó, việc nghiên cứu xác định các đoạn Mã vạch ADN cho loài Phi điệp tím Hòa Bình phục vụ giám định loài là cần thiết và cấp bách cho việc định danh và bảo tồn loài lan bản địa quý của Việt Nam.

Xác định các đoạn mã vạch ADN là một phương pháp định danh, sử dụng một đoạn ADN chuẩn ngắn nằm trong bộ genome của sinh vật đang nghiên cứu để phục vụ giám định loài, mang lại hiệu quả cao trong thời gian ngắn, góp phần không nhỏ vào sự định danh và bảo tồn các loài thực vật trên thế giới. Phương pháp xác định các đoạn mã vạch ADN là một công cụ hữu hiệu hỗ trợ cho phương pháp phân loại dựa vào hình thái [3]. Ở động vật, đoạn mã vạch ADN được sử dụng cho phần lớn các loài là đoạn gen ở ty thể cytochrome C oxidase (*COI*) [1, 2]. 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 [4, 5, 6, 7, 8].

Nghiên cứu này đã tiến hành lựa chọn ba đoạn trình tự ADN để sử dụng làm mã vạch ADN là: *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf*. Trong số đó, các đoạn *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf* là các đoạn ADN nằm ở hệ gen lục lạp. Các đoạn trình tự này đều có tính đặc trưng cao cho loài, có thể đem lại kết quả khả quan nhằm phân loại, giám định và xác định mối quan hệ di truyền, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả bảo tồn và phát triển loài Phi điệp tím ở Việt Nam.

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp
Email: thohuongminh21@gmail.com

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: loài Phi điệp tím thu thập tại gia đình ông Bùi Huy Toàn - xã Tứ Nê, huyện Tân Lạc, tỉnh Hòa Bình.



Hình 1. Ảnh Phi điệp tím Hòa Bình

Vật liệu nghiên cứu: mẫu lá bánh tẻ của cây Phi điệp tím, lấy 3 mẫu lá từ 3 cây khác nhau. Sau khi thu, mẫu được bảo quản trong túi ni lông 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 Phi điệp tím được lấy: Pd1; Pd2; Pd3.

Trình tự các cặp mồi *rbcl* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C; mồi *TrnH-psbA* (trnPF1: CGCGCATGGTGGATTACAATCC; psbPR1: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C; mồi *ycf* (ycf1bF: TCTCGACGAAATCAGATTGTTGTGAAT; ycf1bR: ATACATGTCAAAGTGATGGAAAA) với nhiệt độ gắn mồi 48°C. Cả 3 mồi này đều nằm ở hệ gen lục lạp.

Hóa chất: Kit tách chiết ADN tổng số (Plant ADN Isolation Kit) của Hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của Hãng Intron Biotechnology, Hàn Quốc; kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit) của Norgen, Canada; hóa chất cho điện di trên gel Agarose: Agarose, ADN marker, Redsafe,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

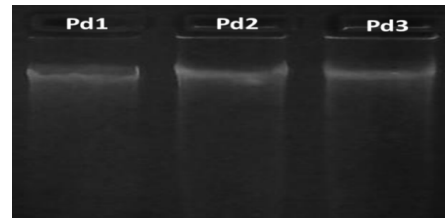
Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Phi điệp tím theo hướng dẫn sử dụng Kit (Plant ADN Isolation Kit) của Hãng Norgen. Nhân bản đoạn gen *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ycf* từ các mẫu

ADN tổng số bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700, mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 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, 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 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*, *TrnH-psbA* và *ycf* được so sánh trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng NCBI.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Phi điệp tím



Hình 2. Ảnh điện di ADN tổng số của 3 mẫu Phi điệp tím

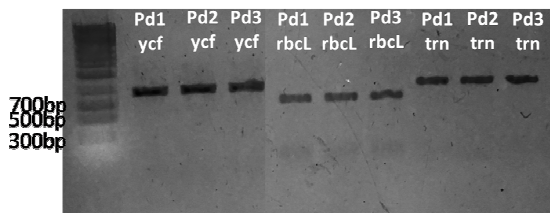
Pd1: Phi điệp 1; Pd2: Phi điệp 2; Pd3: Phi điệp 3

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Phi điệp tím 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 µg/µl; tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} 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.

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 Phi điệp tím Hòa Bình được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA* và *ycf* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 3. Kết quả PCR các đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA*, *ycf* của 3 mẫu Phi điệp tím Hòa Bình

Pd1: Phi điệp 1; Pd2: Phi điệp 2; Pd3: Phi điệp 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 3) cho thấy, xuất hiện

CGCGCATGGGTGATTCAACAATCCACTGCCTTGATCCACTTGGCTACATCCGCCCTTCCCTTATCTA
GCTAAAGGGTTTTCTCTTTTTTCCATTCATCATTATACTTCAGATTAAGATCGAGATATTGGACATAGAAT
GCCAATTTAAAAAATGGAAAAAAGGAGTAATCAGCCGTGACACGTTCACTAAAAAAAATCCTTTTGTA
GCTAATCATTTAGCGGAAGAATTGAAAACTCAACAGGAGGGAGAGAAAGAAATCATAGTGACTTGG
TCTCGGGCATCTACCATTATACCCACAATGATTGGCCATACAATCGCTATTCATAATGGAAAGGAACATT
TACCTATTTATATCACAGATCGTATGGTCCGTCACAAATTGGGAGAATTTGCACCTACTCTAACTTTTCGT
GAGACACGCGAGAAACGATAATAAATCTCGTCTAGTCTGTTCTACTAAGTATTCATGTGAAAAGCCTTA
TCTTAATAGTATTTCTAATAGTATTTAGACTTAAGAGTCTTTATCTTATAGTAAGAGTATAGGTATATTTT
TTTTTCTAGTATACTAATACTCACTTTTCTGACTTATCTTATACTATACTTCACCTAGGCACCTTATCAT
TCATTGGCGGGGGAGAACTTTTATGATAAAGAACGAAAATTCGGATAGAGAAGCAAAAGACCCCTGAAT
CCGAATCCAAGAATGCAAATCCAACAAGATAGCAATCCCCCAATATCTTGTCTTAGAACAAGATATTGG
GGGATTGCTATCTTGAAAGATTCTGTATACATGGATAAGTATTATCCATTATAGATGGAGCTTCCACAGA
AGCTAGATCTAGAGGGAAGTTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC

Bảng 1. Một số loài có trình tự đoạn gen *trnH-psbA* tương đồng với loài Phi điệp tím Hòa Bình *Dendrobium* sp. trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Dendrobium anosmun</i>	MT019474.1	100
2	<i>Dendrobium loddigesii</i>	EU887940.1	99,67
3	<i>Dendrobium tosaense</i>	EU672794.1	98,52
4	<i>Dendrobium pendulum</i>	EU887933.1	99,18
5	<i>Dendrobium salaccense</i>	LC193510.1	98,74

bằng 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

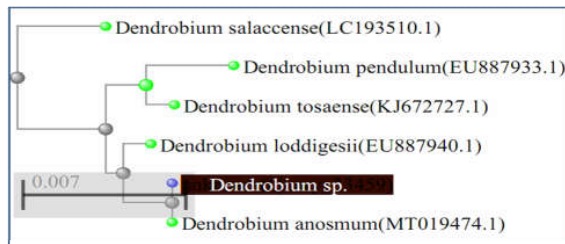
Kết quả xác định trình tự nucleotide của các sản phẩm PCR, sau khi phân tích cho thấy trình tự nucleotide của mỗi đoạn ADN ở cả 3 lần lặp không có sự khác biệt về trình tự nucleotide của mỗi đoạn ở các lần lặp lại và các mẫu trong cùng một loài.

3.3.1. Trình tự đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *trnH-psbA* được nhân bản có kích thước 844 bp, trong đó không có sự sai khác nào giữa 3 mẫu nghiên cứu, kết quả tương đồng 100%. Kết quả giải trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của mẫu Phi điệp tím Hòa Bình như sau:

Trình tự này sau đó được xử lý trên NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *trnH-psbA* ở loài Phi điệp tím Hòa Bình bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Phi điệp tím Hòa Bình được thể hiện ở bảng 1.

Sau đó đã sử dụng các loài trong bảng 1 để xây dựng cây phát sinh chủng loại với loài Phi điệp tím Hòa Bình được thể hiện ở hình 4.



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

ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGCGTTGGATTAAAGCTGGTGTTAAAGATTACAAATTGA
CTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCGAGTAACCTCAACC
GGGAGTTCCGCCTGAAGAAGCGGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTG
TGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTG
GGGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAA
CATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTG
CGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACCTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAAT
TGAACAAGTATGGTCGTCCTTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATTATCCGCAAAAACTA
CGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAAATTC
ACAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCAATCTTTAAAGCGCAAGCCGAA
ACGGGTGAAATTAAAGGACATTACTTGAATGCTACTGCAGGAACATGCGA

Trình tự này sau đó được xử lý trên NCBI để tìm ra sự khác biệt giữa các loài có trình tự tương đồng theo đoạn gen *rbcl* ở loài Phi điệp tím Hòa Bình bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Một số loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với loài Phi điệp tím Hòa Bình được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Một số loài có trình tự đoạn gen *rbcl* tương đồng với loài Phi điệp tím Hòa Bình *Dendrobium sp.* trên NCBI

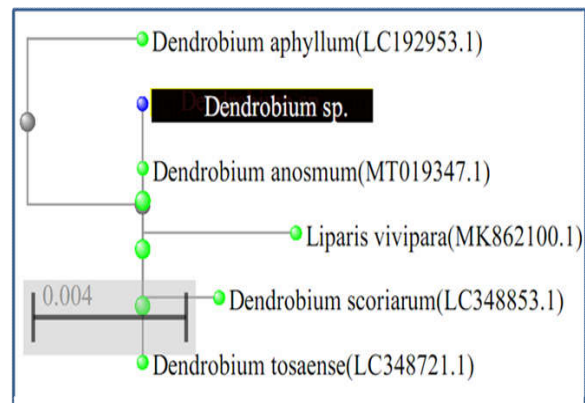
STT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Dendrobium anosmum</i>	MT019474.1	100
2	<i>Dendrobium scoriarum</i>	LC348853.1	99,80
3	<i>Dendrobium tosaense</i>	LC348532.1	100
4	<i>Dendrobium aphyllum</i>	LC192953.1	99,18
5	<i>Liparis vivipara</i>	MK862100.1	98,74

Sau đó đã sử dụng các loài trong bảng 2 để xây dựng cây phát sinh chủng loại với loài Phi điệp tím Hòa Bình được thể hiện ở hình 5.

AAGCACCTCTCCCTCTTCATTTGATCATCGTTTTATCATTGTTACTAGTATTTTGAATACTAGAAAT
AGAATTGGTATTCTGATCATTATCGTTATAAATTACCACAAGTTTGGCTCTTCTGAATTAATCTCATGAT
CGTCTTCCCTCAATTCTTCTTCATTTCTTCTTCTTCTTCAAAATTCGCTTAATTTGTATGACCAT
CGAGAAACCTTTTTACTTACTTCTTCTTCTTCTTCTTCAAAATTCGCTTAATTTGTATGACCAT
GTATGTGTTGTAATTACATCAAATACAAATTGCAAAATTTTGTCTTGACTTCTGAATCAATTCCTTTTC
TTCTTTAGAAATTCAAAAATGATTGACGGTGGAGTTCTACGGAATCATTAAATAAGTAGATCATGAATCTTA

3.3.2. Trình tự đoạn gen *rbcl*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *rbcl* được nhân bản có kích thước 740 bp, trong đó không có sự sai khác nào giữa 3 mẫu nghiên cứu, kết quả tương đồng 100%. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcl* của mẫu Phi điệp tím Hòa Bình như sau:



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

3.3.3. Trình tự ADN của đoạn gen *ycf*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *ycf* được nhân bản có kích thước 821 bp, trong đó không có sự sai khác nào giữa 3 mẫu Phi điệp tím Hòa Bình. Kết quả giải trình tự đoạn gen *ycf* của mẫu Phi điệp tím Hòa Bình như sau:

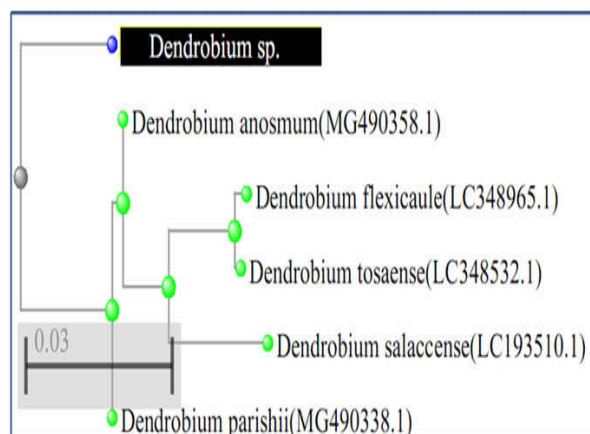
TTTATAAAAAAGATTCTACTAAATCTTCTGTATCTGTATCTGTATAAGTATTCATGATTGCGCGTGAATC
TAATTCTTTTCTCGTTTCCTCGATATGGTCCGTTGAAAAAAGGATCATATGCTTTTGGCAAGCATTTTTTTT
TTTTTTCACCATCCCATAATAGGGTTTTTTTTTTCAAGCAAATCCAACTAGGGAATCCCTCATTTTTTTTCA
AAAAATTGAATTGGTTTTTTCAATTCATTGTTCAAATTGCACTTTTTTTTTTCTTAATTAATAATCCCAAAAA
TTAAAAAATCTTCCCCGAAAAGTTTTTCTATTATGTNNAAAAAATTTCTTTGTTCAACCATTTCCAAAA
AGTCAAAAAACGGGGCGAATATGTAAAGAATATAATTTGTTTC

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

Bảng 3. Một số loài có trình tự đoạn gen *ycf* tương đồng với loài Phi điệp tím Hòa Bình *Dendrobium* sp. trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Dendrobium anosmun</i>	MG490358.1	96,16
2	<i>Dendrobium flexicaule</i>	LC348965.1	93,21
3	<i>Dendrobium parishii</i>	MG490338.1	96,24
4	<i>Dendrobium salaccense</i>	LC193510.1	92,00
5	<i>Dendrobium tosaense</i>	LC348532.1	92,61

Sau đó đã sử dụng các loài trong bảng 3 để xây dựng cây phát sinh chủng loại với loài Phi điệp tím Hòa Bình được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *ycf* tạo bởi NCBI

Như vậy, dựa vào cây phân loại của cả 3 đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA* và *ycf* đều cho thấy loài Phi điệp tím Hòa Bình thuộc loài *Dendrobium anosmun* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcl*, 100% của đoạn gen *trnH-psbA*, 96,16% của đoạn *ycf*.

Dựa vào kết quả so sánh trình tự các đoạn gen *ycf*, *trnH-psbA* và *rbcl* của loài Phi điệp tím Hòa Bình với trình tự gen của loài *Dendrobium tosaense* công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế NCBI, lập được bảng so sánh khả năng phân biệt của đoạn trình tự *ycf*, *trnH-psbA* và *rbcl* (Bảng 4).

Bảng 4. Bảng so sánh khả năng phân biệt của các đoạn trình tự *rbcl*, *trnH-psbA* và *ycf*

Tên đoạn gen	<i>ycf</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcl</i>
Số điểm sai khác	60	8	0
Kích thước trình tự	821	612	501
Tỷ lệ sai khác	7,3%	1,3%	0%

Kết quả phân tích cho thấy khi so sánh trình tự các đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA* và *ycf* của loài Phi điệp tím Hòa Bình (*Dendrobium* sp.) với loài *Dendrobium tosaense* công bố trên Ngân hàng Gen quốc tế NCBI, trình tự đoạn gen *ycf* có 60 điểm sai khác, trình tự đoạn gen *trnH-psbA* có 8 điểm sai khác và trình tự đoạn gen *rbcl* không có điểm sai khác. Tỷ lệ sai khác của trình tự *ycf* là cao nhất (7,3%) do đó khả năng phân biệt loài của gen *ycf* cũng là tốt nhất và tỷ lệ sai khác của trình tự *rbcl* là thấp nhất (0%) đồng nghĩa với khả năng phân biệt loài kém nhất trong 3 gen. Như vậy, đoạn gen *ycf* có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *trnH-psbA* và *rbcl* khi so sánh loài Phi điệp tím Hòa Bình với loài *Dendrobium tosaense*.

4. KẾT LUẬN

Đã tách chiết được 3 mẫu ADN tổng số của Phi điệp tím Hòa Bình. Nhân gen thành công các đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA* và *ycf* từ ADN tổng số của loài Phi điệp tím bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xác định trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN cho thấy đoạn *rbcl* có kích thước là 740 bp, đoạn *TrnH-psbA* có 844 bp và đoạn *ycf* có 821 bp. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ycf*) của loài Phi điệp tím với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của các loài khác trên NCBI đã chỉ ra: loài Phi điệp tím Hòa Bình thuộc loài *Dendrobium anosmun* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcl*, 100% của đoạn

gen *trnH-psbA*, 96,16% của đoạn *ycf*. Bằng công cụ Blast trên NCBI đã so sánh trình tự các đoạn *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ycf* của loài Phi điệp tím Hòa Bình với loài *Dendrobium tosaense* tìm ra được đoạn gen *rbcl* tương đồng 100% với loài *Dendrobium tosaense*, đoạn gen *TrnH-psbA* tương đồng 98,52% với loài *Dendrobium tosaense*, đoạn gen *ycf* tương đồng 92,61% với loài *Dendrobium tosaense*. Như vậy, kết quả so sánh của cả 3 đoạn (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ycf*) với loài *Dendrobium tosaense* đã tìm ra được đoạn *ycf* làm mã vạch có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *rbcl* và *trnH-psbA*. Tuy nhiên, để chính xác nhất nên sử dụng cả 3 chỉ thị để định danh loài Phi điệp tím Hòa Bình.

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 *et al.* (2008). Multiple multilocus ADN barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*. 3 (7): e2802.
4. Chase M. W, *et al.* (2005). Land plants and ADN 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., *et al.* (2010). Validation of the *ITS2* region as a novel ADN barcodes for identifying medicinal plant species. *Plos one* 5: e8613.
6. Ford C. S, Ayres K. L, Toomey N *et al.* (2009). Selection of candidate coding ADN barcoding regions for use on ADN plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 159 (1): 1-11.
7. Kress J. W, Wurdack K. J, Zimmer E. A, Weigt L. A, Janzen D. H. (2005). Use of ADN barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (23): 8369 - 74.
8. Von Crautlein M. K. H., *et al.* (2011). ADN barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and conservation* 20: 373 - 389.

THE SCREENING AND IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCES FOR

HOA BINH *Dendrobium* sp.

Bui Thi Mai Huong, Nguyen Van Viet, Ha Van Huan

Summary

Dendrobium sp. is a species of high economic value with ornamental plant and medicinal plant. *Dendrobium* sp. at Hoa Binh have special flower shape and special flower colours compared to another areas. So, it is necessary to identify DNA barcode fragments of the *Dendrobium* sp. for species identification. The genomic DNA was extracted from leaf tissue of *Dendrobium* sp.. The DNA barcodes (*rbcl*, *TrnH-psbA* and *ycf*) were amplified from total DNA of *Dendrobium* sp. by PCR technique. The PCR results indicated that all DNA bands have the size similar to the theoretical size of *rbcl*, *TrnH-psbA* and *ycf*. Results nucleotide sequencing of PCR product samples showed that the size of the isolated *rbcl* fragment is 740 nucleotide, *trnH-psbA* fragment is 844 nucleotide and *ycf* fragment is 821 nucleotide. These sequences were analysed by NCBI we found that: *Dendrobium* sp. is *Dendrobium anosmun* with percent identity 100% of *rbcl*, *TrnH-psbA* gene fragment and 96.16% of *ycf* gene fragment. And then, these sequences were compared with *Dendrobium tosaense* in NCBI showed that: *rbcl* gene fragment is similar to 100%, *TrnH-psbA* gene fragment is similar to 98.52%, *ycf* gene fragment is similar to 92.61%. It is the best for using *ycf* molecular marker as DNA barcode to identify *Dendrobium anosmun* in Vietnam.

Keywords: DNA barcoding, Identify species, *Dendrobium* sp.

Người phản biện: PGS.TS. Khuất Hữu Trung

Ngày nhận bài: 15/5/2020

Ngày thông qua phản biện: 15/6/2020

Ngày duyệt đăng: 22/6/2020