

CHARACTERIZATION OF *atpB-rbcL* AND *trnL* DNA SEQUENCES OF *Hoya lockii*

Hoang Phu Hiep^{1*}, Duong Thi Bich Huong², Tu Quang Trung¹, Tran Thi Hong¹

¹TNU - University of Education, ²King Mongkut's University of Technology Thonburi

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 31/8/2022</p> <p>Revised: 04/11/2022</p> <p>Published: 23/11/2022</p>	<p><i>Hoya lockii</i> is endemic to Viet Nam and currently endangered. <i>Hoya lockii</i> is one of the plants used as ornamental plants as well as medicinal plants. The classification of plants is usually based on morphological characteristics and DNA barcodings such as <i>matK</i>, <i>ITS</i>, <i>rpoC1</i>,... Molecular characteristics are necessary for studying the molecular taxonomy of each species. Therefore, additional molecular sequences are needed to find the most specific markers for each species. In this study, the gene sequences <i>atpB-rbcL</i> and <i>trnL</i> in chloroplasts were isolated from samples of <i>Hoya lockii</i>. The obtained <i>atpB-rbcL</i> gene sequence has a size of 713 nucleotides and the <i>trnL</i> gene has a size of 524 nucleotides. Sequences with high similarity when analyzed by Blast with sequences of the same genus have been published. Both amplified DNA of the two regions <i>rbcL</i> and <i>trnL</i> were used to construct the phylogenetic tree.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p><i>Hoya lockii</i> DNA barcoding <i>atpB-rbcL</i> gene <i>trnL</i> gene Classification</p>	

ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ GEN *atpB-rbcL* VÀ *trnL* CỦA CẨM CÙ LỘC (*Hoya lockii*)

Hoàng Phú Hiệp^{1*}, Dương Thị Bích Hương², Từ Quang Trung¹, Trần Thị Hồng¹

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

²Trường Đại học Công nghệ Thonburi của King Mongkut

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 31/8/2022</p> <p>Ngày hoàn thiện: 04/11/2022</p> <p>Ngày đăng: 23/11/2022</p>	<p>Cẩm cù lộc là loài đặc hữu của Việt Nam và hiện đang có nguy cơ tuyệt chủng. Cẩm cù lộc là một trong những loài được sử dụng làm cây cảnh cũng như cây dược liệu. Việc phân loại thực vật hiện nay thường được dựa trên đặc điểm hình thái và DNA barcoding như <i>matK</i>, <i>ITS</i>, <i>rpoC1</i>,... Các đặc điểm phân tử là cần thiết cho việc nghiên cứu phân loại phân tử của từng loài; vì vậy, cần phải bổ sung các trình tự phân tử để tìm ra những marker đặc trưng nhất cho từng loài. Trong nghiên cứu này, trình tự gen <i>atpB-rbcL</i> và <i>trnL</i> trong lục lạp đã được phân lập từ mẫu cây Cẩm cù lộc. Trình tự gen <i>atpB-rbcL</i> thu được có kích thước 713 nucleotide và gen <i>trnL</i> có kích thước 524 nucleotide. Các trình tự có độ tương đồng cao với các trình tự cùng chi đã được công bố. Cả hai vùng <i>atpB-rbcL</i> và <i>trnL</i> được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Cẩm cù lộc DNA barcoding Gen <i>rbcL</i> Gen <i>trnL</i> Phân loại</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6410>

* Corresponding author. Email: hiephoangphu@tue.edu.vn

1. Giới thiệu

Từ khi được phát hiện vào năm 2012 đến nay [1], Cẩm cù lộc (*Hoya lockii*) là loài đặc hữu của Việt Nam và hiện đang có nguy cơ tuyệt chủng. Cẩm cù lộc là một trong những loài được sử dụng làm cây cảnh. Hoa Cẩm cù lộc có dạng khối cầu tròn, có mùi thơm dễ chịu và được nhiều người yêu thích. Cẩm cù lộc được coi là loài đặc hữu của Việt Nam với tình trạng bảo tồn được đề nghị xem xét là rất nguy cấp (CR) (theo hướng dẫn các hạng mục Danh lục đỏ của IUCN phiên bản 8.1.2010). Loài Cẩm cù lộc có hình dạng tương đối giống với loài Cẩm cù tên lửa (*Hoya multifolia*), sự khác nhau cơ bản nhất giữa 2 loài là màu sắc hoa. Vì vậy, để phân biệt loài Cẩm cù lộc với Cẩm cù tên lửa nói riêng và các loài Cẩm cù khác nói chung cần áp dụng thêm phương pháp phân tích mã vạch DNA.

Hiện nay, có nhiều loại DNA barcoding được sử dụng để phân loại phân tử như ITS, matK, rpoC1,... [2]. Hai trình tự gen *rbcL* và matK là một trong những DNA barcoding tiêu chuẩn đang được sử dụng cho tất cả các loại cây trồng [3]. Đã có nhiều nghiên cứu kết hợp trình tự gen *rbcL* và các trình tự mã vạch khác để phân loại phân tử [4]–[6]. Ở Việt Nam, đã có nhiều nhóm nghiên cứu sử dụng gen *rbcL* và *trnL* để đánh giá đặc điểm di truyền của một số loài như Sơn đảo [6], Bách bộ [7], Balsams [8]. Từ 2012 đến nay, các trình tự DNA barcoding cây Cẩm cù lộc được công bố tương đối ít, trên Genbank chỉ có 3 trình tự gen của loài Cẩm cù lộc là *ITS1* (JQ823005), *psbA-trnH* (JQ82300), *matK* (JQ823006). Trong nghiên cứu này, đặc điểm trình tự đoạn gen *atpB-rbcL* và *trnL-UUA* của cây Cẩm cù lộc đã được xác định và sử dụng nhằm bổ sung trình tự gen lục lạp cho mục đích phân loại loài.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu cây Cẩm cù lộc do phòng Công nghệ tế bào thực vật, khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái nguyên cung cấp.

Cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

Cặp môi được sử dụng để nhân bản đoạn gen đích là *trnL* và *rbcL*, trình tự và thông tin về cặp môi được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi nghiên cứu

Tên môi	Trình tự môi	Nhiệt độ gắn môi	Kích thước dự kiến	Tham khảo
<i>trnL-F</i>	5'- CGAAATCGGTAGACGCTACG -3'	54°C	700 bp	Taberlet và cộng sự (1991) [9]
<i>trnL-R</i>	5'- GGGGATAGAGGGACTTGAAC -3'			
<i>atpB</i>	5'- ACATCTAGTACCGGACCAATGA-3'	50°C	500 bp	Janssens và cộng sự (2006) [10]
<i>rbcL</i>	5'- AACACCAGCTTTGAATCCAA-3'			

Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mô lá non tươi theo quy trình của kit DNeasy Plant Mini Kit hãng QiaGen.

Kiểm tra sản phẩm DNA sau tách chiết

DNA tổng số của mẫu sau khi tách chiết được điện di trên gel agarose 1%, trong đệm TBE 1X, ở hiệu điện thế 90V. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được kiểm tra qua phương pháp đo quang phổ hấp phụ ở bước sóng 260 và 280 nm. Pha loãng 100 lần (5µl mẫu + 450 µl nước), mỗi mẫu đo ba lần và giá trị trung bình của ba lần đo được lấy làm kết quả cuối cùng. Độ tinh sạch của mẫu thể hiện qua thông số A260/280 (1,6-2,0 được coi là mẫu tinh sạch).

Nhân gen bằng kỹ thuật PCR và kiểm tra DNA trên gel agarose

Phản ứng PCR được tiến hành với cặp môi đặc hiệu trong 25 µl bao gồm: master mix (2X-Thermo Fisher Scientific) – 12,5 µl, môi xuôi (10 pmol/µl) – 1,0 µl, môi ngược (10 pmol/µl) – 1,0 µl, DNA khuôn (10 ng/µl) – 0,5 µl, H₂O – 10 µl. Chu trình nhiệt cho gen *trnL*: 94°C/4 phút; lặp lại 35 chu kỳ với (94°C/30 giây, 54°C/40 giây, 72°C/40 giây); 72°C/10 phút và giữ ở 4°C. Chu trình

thu được trình tự có độ tương đồng cao, dao động từ 98,60% đến 98,88% với các vùng gen *atpB-rbcL* và *trnL* của lục lạp thuộc một số loài Hoya như *H. hamiltoniorum* (MW719068, tương đồng 98,88%), *H. carnososa* (NC045868, tương đồng 98,74%), *H. verticillata* (MW719071, tương đồng 98,74%). Trong đó có 14 trình tự có độ tương đồng trên 98,74%. Trong các trình tự so sánh có cả một số trình tự thuộc họ Trúc đào (*Oreosparte celebica*-MW719062, *Micholitzia*-AB586187) và một số họ khác (hình 5).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya hamiltoniorum chloroplast	Hoya hamiltoniorum	1267	2155	99%	0.0	98.88%	176245	MW719068.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya carnososa isolate S2708 chloroplast complete genome	Hoya carnososa	1262	2133	99%	0.0	98.74%	176340	NC_045868.1
<input type="checkbox"/> Hoya carnososa	Hoya carnososa	1262	2133	99%	0.0	98.74%	176340	MN781974.1
<input type="checkbox"/> Hoya serpens voucher Chase_17118 (Hc) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxxygenase large subunit (rbc...	Hoya serpens	1262	1262	57%	0.0	98.74%	1383	JQ933365.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya verticillata chloroplast	Hoya verticillata	1262	2138	99%	0.0	98.74%	175227	MW719071.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya latifolia chloroplast	Hoya latifolia	1262	2144	99%	0.0	98.74%	176040	MW719069.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya insularis chloroplast	Hoya insularis	1262	2122	99%	0.0	98.74%	176481	MW719067.1
<input type="checkbox"/> Oreosparte celebica chloroplast	Oreosparte cele...	1262	2144	99%	0.0	98.74%	176056	MW719066.1
<input type="checkbox"/> Paquahoya urniflora chloroplast complete genome	Paquahoya urnif...	1262	2133	99%	0.0	98.74%	178400	MW719062.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya ignorata chloroplast complete genome	Hoya ignorata	1262	2149	99%	0.0	98.74%	175892	MW719061.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya omlorii chloroplast complete genome	Hoya omlorii	1262	2144	99%	0.0	98.74%	178525	MW719060.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya lyi chloroplast complete genome	Hoya lyi	1262	2133	99%	0.0	98.74%	176567	MW719055.1
<input type="checkbox"/> Micholitzia sp. SH-2010 chloroplast gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxxygenase large subunit...	Micholitzia sp. S...	1262	1262	57%	0.0	98.74%	1344	AB586187.1
<input type="checkbox"/> Micholitzia obscurata chloroplast partial rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxxygenase large...	Micholitzia obscu...	1262	1262	57%	0.0	98.74%	1444	AJ419750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya pottsii chloroplast complete genome	Hoya pottsii	1256	2133	99%	0.0	98.60%	161565	NC_042246.1
<input type="checkbox"/> Hoya pottsii chloroplast complete genome	Hoya pottsii	1256	2133	99%	0.0	98.60%	161565	MH679667.1
<input type="checkbox"/> Dischidia albidia chloroplast	Dischidia albidia	1256	2127	99%	0.0	98.60%	133891	MG963260.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hoya thailandica chloroplast	Hoya thailandica	1256	2138	99%	0.0	98.60%	177648	MW719072.1
<input type="checkbox"/> Hoya coronaria chloroplast	Hoya coronaria	1256	2138	99%	0.0	98.60%	178895	MW719064.1
<input type="checkbox"/> Hoya lithophydica chloroplast complete genome	Hoya lithophydica	1256	2138	99%	0.0	98.60%	176580	MW719058.1
<input type="checkbox"/> Hoya lianqi chloroplast complete genome	Hoya lianqi	1251	2219	99%	0.0	98.46%	162989	NC_042245.1

Hình 5. Kết quả BLAST trình tự gen *atpB-rbcL* và *trnL* trên ngân hàng gen

3.3. Khoảng di truyền (P-Distances) giữa các loài thuộc chi Hoya

Dựa trên các trình tự nghiên cứu và một số trình tự gen tương ứng của các loài gần gũi trên GenBank (bảng 2), khoảng di truyền (P-Distances) và cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm Mega X.

Bảng 2. Thông tin mã số các trình tự trên Genbank sử dụng để so sánh

STT	Mã số gen	Tên loài/ giống	Độ tương đồng (%)
1	MW719068	<i>Hoya hamiltoniorum</i>	98,88
2	NC_045868	<i>Hoya carnososa</i>	98,74
3	MW719071	<i>Hoya verticillata</i>	98,74
4	MW719069	<i>Hoya latifolia</i>	98,74
5	MW719067	<i>Hoya insularis</i>	98,74
6	MW719061	<i>Hoya ignorata</i>	98,74
7	MW719060	<i>Hoya omlorii</i>	98,74
8	MW719055	<i>Hoya lyi</i>	98,74
9	NC_042246	<i>Hoya pottsii</i>	98,60
10	MW719072	<i>Hoya thailandica</i>	98,60

Sau khi xử lý loại bỏ các khoảng trống, trình tự còn lại sẽ được sử dụng cho phân tích khoảng cách di truyền. Khoảng cách di truyền được phân tích dựa trên phương pháp p- distance với chỉ số bootstrap là 1000 lần. Kết quả so sánh khoảng di truyền giữa một số loài thuộc chi *Hoya* được thể hiện trên bảng 3.

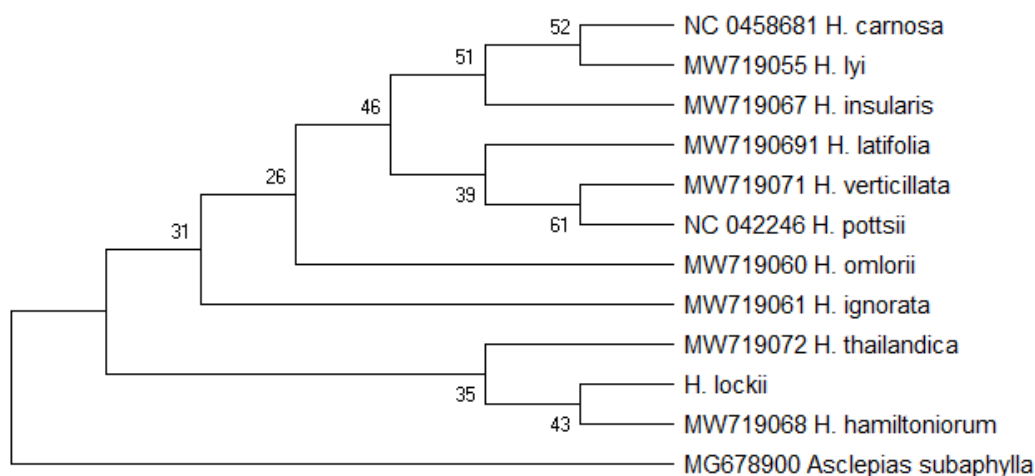
Bảng 3. Khoảng cách di truyền một số loài thuộc chi Hoya dựa trên trình tự gen *atpB-rbcL* và *trnL*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>H. lockii</i>										
2 MW719068 <i>H. hamiltoniorum</i>	0.0131									
3 NC_045868 <i>H. carnososa</i>	0.0163	0.0032								
4 MW719071 <i>H. verticillata</i>	0.0155	0.0024	0.0024							
5 MW719069 <i>H. latifolia</i>	0.0147	0.0016	0.0016	0.0008						
6 MW719067 <i>H. insularis</i>	0.0155	0.0024	0.0024	0.0032	0.0024					
7 MW719061 <i>H. ignorata</i>	0.0139	0.0008	0.0024	0.0016	0.0008	0.0016				
8 MW719060 <i>H. omlorii</i>	0.0147	0.0016	0.0032	0.0024	0.0016	0.0024	0.0008			
9 MW719055 <i>H. lyi</i>	0.0163	0.0032	0.0016	0.0024	0.0016	0.0024	0.0024	0.0032		
10 NC_042246 <i>H. pottsii</i>	0.0163	0.0032	0.0032	0.0008	0.0016	0.0041	0.0024	0.0032	0.0032	
11 MW719072 <i>H. thailandica</i>	0.0155	0.0041	0.0057	0.0049	0.0041	0.0049	0.0032	0.0041	0.0057	0.0057

Qua bảng 3 cho thấy khoảng cách di truyền giữa 12 loài trong chi *Hoya* đều nhỏ hơn 1,63%, dao động trung bình 0,75% (từ 0,16% tới 1,63%). Trong đó, trình tự *atpB-rbcL* và *trnL* của *H. lockii* giống nhất với loài *H. hamiltoniorum* có mã số MW719068 (1,31%) và có khoảng cách xa nhất với *H. carnososa* (NC_0458681), *H. lyi* (MW719055) và *H. pottsii* (NC_042246) với hệ số là 1,63%.

3.4. Phân tích cây phát sinh chủng loại giữa các loài thuộc chi *Ficus*

Dựa trên trình tự *atpB-rbcL* và *trnL* giữa 11 loài trong chi *Hoya*, cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp Neighbor-Joining với giá trị bootstrap lặp lại 1000. Trong đó, trình tự *atpB-rbcL* và *trnL* của loài *Asclepias subaphylla* (Họ La bố- *Apocynaceae*) có mã số MG678900 làm cây ngoài nhóm (outgroup). Phân tích được thực hiện bằng phần mềm MEGA X. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ giữa một số loài thuộc chi *Hoya* thể hiện trên hình 6.



Hình 6. Sơ đồ mô tả mối quan hệ di truyền một số loài thuộc chi *Hoya* dựa trên trình tự *atpB-rbcL* và *trnL*

Kết quả hình 6 cho thấy, sơ đồ chia làm 2 nhánh: nhánh 1 gồm các loài: *H. carnososa*, *H. lyi*, *H. insularis*, *H. latifolia*, *H. verticillata*, *H. pottsii*, *H. omlorii*, *H. ignorata*; nhánh 2 gồm các loài: *H. thailandica*, *H. lockii*, *H. hamiltoniorum*. Trong đó, loài *H. lockii* gần với loài *H. hamiltoniorum* nhất, với hệ số bootstrap tương đối thấp là 43. Giữa các mẫu nghiên cứu đều thể hiện sự khác biệt ở mức dưới loài với hệ số bootstrap từ 43- 61.

4. Kết luận

Đã xác định được đặc điểm trình tự gen *atpB-rbcL* và *trnL* của cây Cẩm cù lộc (*Hoya lockii*). Đoạn gen *atpB-rbcL* có kích thước 713 nucleotide và đoạn gen *trnL* có kích thước 524 nucleotide. Dựa trên trình tự *atpB-rbcL* và *trnL* đã xác định được quan hệ của mẫu Cẩm cù lộc thu thập ở Việt Nam với một số loài thuộc chi *Hoya*. Trình tự *atpB-rbcL* và *trnL* phân lập được có độ tương đồng cao với các trình tự đã công bố, dao động từ 98,60% đến 98,88%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] P. Van and L. V. Averyanov, "New species from Vietnam - *Hoya lockii* (Apocynaceae, Asclepiadoideae)," *Taiwania*, vol. 57, no. 1, pp. 49-54, 2012.
- [2] I. Bruni *et al.*, "Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach," *Int. J. Legal Med.*, vol. 124, no. 6, pp. 595-603, 2010, doi: 10.1007/s00414-010-0447-3.
- [3] P. M. Hollingsworth *et al.*, "A DNA barcode for land plants," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 31, pp. 12794-12797, Aug. 2009, doi: 10.1073/pnas.0905845106.
- [4] D. Tekdal, "Characterization of *rbcL* and *trnL* Plastid DNA Sequences of *Vuralia turcica* (Fabaceae;

- Papilionoideae),” *Turkish J. Agric. - Food Sci. Technol.*, vol. 7, no. 6, p. 908, 2019, doi: 10.24925/turjaf.v7i6.908-912.2504.
- [5] G. A. de Groot, H. J. During, J. W. Maas, H. Schneider, J. C. Vogel, and R. H. J. Erkens, “Use of rbcL and trnL-F as a two-locus DNA barcode for identification of NW-European ferns: An ecological perspective,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016371.
- [6] X. Q. Nguyen T. P. A. Tran, T. C. Nguyen, T. P. T. Nguyen, T. H. M. Nguyen, and L. T. A. Hoang, “Molecular characteristics of melanorrhoea usitata wall in vietnam based on trnL and rbcL sequences,” in *Proceedings of the 7th national Conference on ecology and biological resources*, 2016, pp. 1416-1420.
- [7] T. T. H. Huynh, Q. H. Dao, H. D. Le, and D. T. Nguyen, “Assessment of classification ability for rbcL and trnL barcode in some Stemonaceae samples collected from northern Vietnam,” *Minist. Sci. Technol. Vietnam*, vol. 63, no. 9, pp. 25-29, 2021.
- [8] P. P. Shajitha *et al.*, “A combined chloroplast atpB–rbcL and trnL-F phylogeny unveils the ancestry of balsams (*Impatiens* spp.) in the Western Ghats of India,” *3 Biotech*, vol. 6, no. 2, pp. 1-5, 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0574-8.
- [9] P. Taberlet, L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet, “Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA,” *Plant Mol. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 1105-1109, Nov. 1991, doi: 10.1007/BF00037152.
- [10] S. Janssens, K. Geuten, Y.-M. Yuan, Y. Song, P. Küpfer, and E. Smets, “Phylogenetics of *Impatiens* and *Hydrocera* (Balsaminaceae) Using Chloroplast atpB-rbcL Spacer Sequences,” *Syst. Bot.*, vol. 31, no. 1, pp. 171-180, Sep. 2006.