

## Phát triển các DNA mã vạch đặc trưng để giám định loài Nghiến gân ba (*Excentrodendron tonkinensis*) tại Thái Nguyên

Hà Bích Hồng<sup>1\*</sup>, Dương Thị Hoàn<sup>2</sup>, Nguyễn Thế Hưởng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Huyền<sup>1</sup>, Lê Huệ Anh<sup>1</sup>, Vũ Văn Thông<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>2</sup>Trường THPT Nguyễn Gia Thiều - Hà Nội

<sup>3</sup>Công ty TNHH Phát triển nông nghiệp Vy Anh

### Developing DNA barcodes for the identification of *Excentrodendron tonkinensis* in Thai Nguyen

Ha Bich Hong<sup>1\*</sup>, Duong Thi Hoan<sup>2</sup>, Nguyen The Huong<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Huyen<sup>1</sup>, Le Hue Anh<sup>1</sup>, Vu Van Thong<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Nguyen Gia Thieu High School - Hanoi

<sup>3</sup>Vy Anh Agriculture Development Limited Liability Company

\*Corresponding author: honghb@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.1.2025.003-014>

#### TÓM TẮT

Nghiến gân ba (*Excentrodendron tonkinensis*) là cây gỗ lớn có giá trị kinh tế cao, thân gỗ dùng trong xây dựng, chế biến các sản phẩm đồ gia dụng cao cấp, đồ thủ công mỹ nghệ. Than trắng (Binchotan) sản xuất từ cành Nghiến gân ba là một trong những loại than có giá trị xuất khẩu cao. Tuy có khu phân bố rộng, nhưng bị khai thác rất mạnh ngay cả tại các khu bảo tồn thiên nhiên hay rừng quốc gia, số cá thể trưởng thành đã bị chặt phá chiếm hơn 70%. Vì vậy, loài này đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên và cần được bảo tồn để phát triển trở lại. Trong nghiên cứu này, trình tự DNA mã vạch của các gen *rbcl*, *trnH-psbA* và ITS đã được sử dụng để đánh giá khả năng giám định loài Nghiến gân ba tại một số địa điểm thuộc tỉnh Thái Nguyên. Trình tự các gen *rbcl* và *trnH-psbA* có mức độ tương đồng rất cao (100%) ở tất cả 20 mẫu Nghiến gân ba nghiên cứu, còn trình tự gen ITS cho thấy sự sai khác tại 20 vị trí nucleotide tương ứng với 7 nhóm trình tự của các mẫu. Cả ba trình tự đều cho thấy khả năng giám định loài tương đối cao (từ 99,38% đến 100%) và theo thứ tự sắp xếp như sau: *trnH-psbA* > *rbcl* > ITS. Trình tự nucleotide của các DNA mã vạch này ở loài Nghiến gân ba đã được đăng ký thành công trên GenBank và là cơ sở dữ liệu DNA để ứng dụng trong công tác giám định loài này tại Việt Nam.

#### ABSTRACT

*Excentrodendron tonkinensis* is a valuable, large tree with significant economic potential. Its timber is prized for construction and high-end furniture production, and handicrafts. White charcoal (Binchotan) produced from its branches is a highly valued export. Despite its wide distribution, *E. tonkinensis* is heavily exploited, even within protected areas like nature reserves and national forests. Over 70% of mature individuals have been felled. Consequently, it faces a high risk of extinction in the wild and requires urgent conservation efforts. In this study, three commonly used DNA barcoding markers, *rbcl*, *trnH-psbA*, and ITS, were evaluated for their ability to identify *E. tonkinensis* samples, collected in some districts of Thainguyen province. The *rbcl* and *trnH-psbA* sequences exhibited high

#### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/11/2024

Ngày phản biện: 18/12/2024

Ngày quyết định đăng: 13/01/2025

#### Từ khóa:

DNA mã vạch, ITS, Nghiến gân ba, *rbcl*, *trnH-psbA*.

#### Keywords:

DNA barcode, *Excentrodendron tonkinensis*, ITS, *rbcl*, *trnH-psbA*.

levels of similarity (100%) among all 20 samples analyzed. In contrast, the ITS sequence revealed variation at 20 nucleotide positions, separating the samples into seven distinct groups. All three DAN barcodes demonstrated strong species identification capabilities, with success rates ranging from 99.38% to 100% as they were ranked in order of identification efficacy as follows: *trnH-psbA* > *rbcl* > ITS. The nucleotide sequences of these three DNA barcoding for *E. tonkinensis* have been successfully deposited on GenBank, providing a valuable genetic resource for species identification and conservation efforts in Vietnam.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghiến gân ba (còn gọi là Nghiến đỏ, Nghiến trứng, Kiêng mật, Kiêng đỏ) có tên khoa học là *Excentrodendron tonkinensis*, thuộc chi Nghiến *Excentrodendron*, họ Đay Malvaceae (hay Tiliaceae), bộ Bông Malvales; tên đồng nghĩa *Burretiodendron tonkinensis* (Gagnep.) Kosterm. 1960, *Burretiodendron hsienmu* Chun & How 1956, *Excentrodendron hsienmu* auct, non (Chun & How) Chang & Miao 1956. Cành non không có lông. Lá hình trứng rộng, kích thước 10 - 12 x 7 - 10 cm, mép nguyên, gân bên 5 - 7 đôi, trong đó có 3 gân gốc; cuống lá dài 3 - 5 cm (Hình 1). Hoa đơn tính, hoa có đường kính 1,5 cm. Đài hình chuông, ở đầu xẻ 5 thùy sâu, đài dài khoảng 1,5 cm. Cánh hoa 5, cánh hoa dài 1,3 cm. Nhị khoảng 25, xếp thành 5 bó; chỉ nhị dài 1 - 1,3 cm; bao phấn hình bầu dục, dài khoảng 3 mm. Quả khô hình 5 cạnh (giống quả Khế), tự mở, đường kính 1,8 cm. Ra hoa tháng 3 - 4, có quả tháng 8 - 10 [1, 2]. Nghiến gân ba là loài cây ưa sáng, mọc rải rác trong rừng thường xanh ở vùng núi đá vôi, có độ cao dưới 800 m, độ ẩm tương đối hàng tháng trên 80%, nhiệt độ trung bình năm từ 15°C đến 23°C. Cây tái sinh bằng hạt, cây mẹ và cây con gặp khá phổ biến dưới tán rừng. Nghiến gân ba là cây gỗ lớn có giá trị kinh tế cao, thân gỗ dùng trong xây dựng, chế biến các sản phẩm đồ gia dụng cao cấp. Hầu hết các bộ phận khác của cây như rễ, gốc cây, u bướu ở thân cây là nguyên liệu để chế tác các sản phẩm thủ công mỹ nghệ có giá trị kinh tế và nghệ thuật cao. Than trắng (Binchotan) được sản xuất từ cành Nghiến gân ba là một trong những loại than có giá trị xuất khẩu cao, một số thị trường khó tính như

Nhật, Mỹ đã chấp nhận nhập khẩu [3]. Mặc dù có khu phân bố rộng, Nghiến gân ba lại bị khai thác rất mạnh (trước đây để lấy gỗ dùng trong xây dựng và làm tà vẹt, hiện nay dùng làm thốt chủ yếu xuất khẩu trái phép qua biên giới), số cá thể trưởng thành đã bị chặt phá chiếm hơn 70%. Tuy có ở các Khu Bảo tồn thiên nhiên Pà Cò - Hang Kia, Hữu Liên và Vườn quốc gia Ba Bể, rừng đặc dụng Thần Sa-Phượng Hoàng, ATK, nhưng tại những nơi đó vẫn bị chặt trộm. Loài này đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên [3].

Hiện trạng loài Nghiến gân ba ở Thái Nguyên còn lại rất ít, phân bố chủ yếu ở các xã của huyện Võ Nhai, Định Hóa, Đổng Hỷ, Phú Lương. Sự suy giảm về số lượng cá thể Nghiến gân ba là do phá rừng làm nương rẫy, khai thác rừng tự nhiên quá mức trong những thập kỷ cuối của thế kỷ XX. Cây Nghiến gân ba gỗ có khối lượng thể tích lớn được người dân khai thác làm nhà, đóng đồ và cắt làm thốt bán sang Trung Quốc. Mặt khác do Nghiến gân ba phân bố chủ yếu ở núi đá vôi, nơi có địa hình hiểm trở việc khai thác gặp khó khăn, nên người dân thường đốt gốc để cây đổ xuống. Hình thức khai thác này rất lãng phí và còn hủy diệt những cây con tái sinh sống quanh gốc cây mẹ, làm cho số lượng cá thể Nghiến gân ba ngày càng giảm mạnh. Ngoài ra cây Nghiến gân ba là cây sống chủ yếu trên núi đá vôi, sinh trưởng rất chậm, khả năng tái sinh tự nhiên kém, mặc dù giai đoạn cây mẹ cây con rất nhiều nhưng số cây vượt qua giai đoạn này để trở thành cây trưởng thành thì rất ít ỏi [4].

DNA mã vạch (DNA barcode) đã được chứng minh là những chỉ thị phân tử có độ chính xác cao trong việc định danh loài, kết

hợp với chỉ thị hình thái truyền thống. Yêu cầu của DNA mã vạch là phải phổ biến, đặc hiệu trong các biến dị và dễ dàng sử dụng. Điều này có nghĩa là các đoạn gen được sử dụng như một DNA mã vạch nên thích hợp cho nhiều đơn vị phân loại, có sự biến đổi giữa các loài nhưng ổn định và bảo thủ cao bên trong loài hoặc biến đổi không đáng kể. Vì vậy, DNA mã vạch lý tưởng là một đoạn DNA có trình tự nucleotide ngắn, bắt cặp được với cặp mồi được thiết kế đặc hiệu để dễ dàng khuếch đại bằng PCR [5]. Ở thực vật, các đoạn DNA mã vạch có thể là những đoạn DNA nằm trong hệ gen nhân (28S rDNA, ITS...) [6, 7] hoặc hệ gen lục lạp (*matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpo*, *trnL-trnF*, *ycf...*) [8, 9]. DNA mã vạch được sử dụng để giải quyết vấn đề bảo tồn đa dạng sinh học theo hai cách sau: một là giám sát đa dạng sinh học chính xác và nhanh chóng cả trước và sau các hoạt động bảo tồn, hai là cung cấp dữ liệu để hỗ trợ trong việc ước tính sự đa dạng phát sinh loài để thiết lập các ưu tiên bảo tồn.

Li và cộng sự (2004) đã sử dụng trình tự ITS để xác nhận sự phân tách nhánh chi em của *Excentrodendron* và *Burretiodendron*. Kết quả này cũng phù hợp với dữ liệu về phần hoa, các loài *Excentrodendron* có phần hoa dạng lưới thô, trong khi các loài *Burretiodendron* có phần hoa gai; và dữ liệu về sinh thái, chi *Excentrodendron* gồm các loài đặc hữu của núi đá vôi, còn *Burretiodendron* không được tìm thấy ở những vùng này [10]. Những nghiên cứu về DNA mã vạch của loài Nghiến gân ba gần như không được công bố trên các tạp chí quốc tế, hiện tại trên GenBank đã công bố trình tự nucleotide của lục lạp và một số trình tự như *trnH-psbA*, *rbcl* và ITS dưới tên đồng nghĩa là *Excentrodendron hsienmu*. Xuất phát từ những cơ sở khoa học trên, nghiên cứu này xác định các chỉ thị DNA mã vạch phục vụ giám định loài Nghiến gân ba ở mức phân tử và tạo cơ sở dữ liệu DNA cho những nghiên cứu giám định loài này tại Việt Nam.



Hình 1. Cây và lá của loài Nghiến gân ba  
(Nguồn: Sinh vật rừng Việt Nam)

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Lựa chọn mẫu và cách lấy mẫu

20 cây Nghiến gân ba được thu thập tại 4 huyện của tỉnh Thái Nguyên vào tháng 3/2023. Ký hiệu mẫu, địa điểm và tọa độ thu mẫu được thể hiện ở Bảng 1.

Yêu cầu về mẫu lá và cách bảo quản: cắt những lá bánh tẻ, xanh và không bị sâu bệnh. Sau đó bảo quản mẫu lá trong túi nilon có chứa hạt hút ẩm silica gel, vận chuyển về phòng thí nghiệm ngay trong ngày. Các mẫu lá được bảo quản trong tủ lạnh -20°C cho đến khi được sử dụng để tách chiết DNA tổng số.

**Bảng 1. Địa điểm và thời gian thu thập các mẫu Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên**

TT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu nhận mẫu	Tọa độ	
			Vĩ độ	Kinh độ
1	NL 01	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	587224	2415037
2	NL 02	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	586882	2415083
3	NL 03	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	586698	2415402
4	NL 04	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	588155	2415707
5	NL 05	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	588048	2415534
6	NL 06	Phú Lương – Thái Nguyên	0579768	2410434
7	NL 07	Phú Lương – Thái Nguyên	0579392	2410841
8	NL 08	Phú Lương – Thái Nguyên	0579858	2411014
9	NL 09	Phú Lương – Thái Nguyên	0579790	2411058
10	NL 10	Phú Lương – Thái Nguyên	0579633	2410806
11	NL 11	Định Hóa – Thái Nguyên	0565662	2420505
12	NL 12	Định Hóa – Thái Nguyên	0565680	2420491
13	NL 13	Định Hóa – Thái Nguyên	0565662	2420505
14	NL 14	Định Hóa – Thái Nguyên	0565680	2420491
15	NL 15	Định Hóa – Thái Nguyên	0560669	2420490
16	NL 16	Võ Nhαι – Thái Nguyên	0599622	2415164
17	NL 17	Võ Nhαι – Thái Nguyên	600347	2415451
18	NL 18	Võ Nhαι – Thái Nguyên	600481	2415753
19	NL 19	Võ Nhαι – Thái Nguyên	600481	2415753
20	NL 20	Võ Nhαι – Thái Nguyên	600481	2415753

Ghi chú: Sử dụng hệ tọa độ VN2000 múi chiếu 3° tại tỉnh nghiên cứu.

**2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số**

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá Nghiến gân ba theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit tách chiết DNA thực vật “innuPREP Plant DNA Kit” của hãng Analytik Jena, CHLB Đức. Các mẫu DNA tổng số sau khi tách chiết sẽ được đo nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp quang phổ (Scandrop- Analytik Jena, Đức), sau đó được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

**2.3. Phương pháp khuếch đại PCR và xác định trình tự nucleotide**

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy

Biometra Tadvanced PCR Systems 96S (Analytik Jena, Đức) với thành phần bao gồm: 10µl PCR master mix 2X, 1µl mỗi xuôi (10 µM) và 1 µl mỗi ngược (10 µM), 1µl DNA khuôn (50 ng), bổ sung H<sub>2</sub>O deion tới 20 µl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 35 chu kì lặp lại của ba bước 95°C – 30 giây, 50°C đến 60°C (tùy thuộc vào cặp mồi) – 30 giây, 72°C – 1 phút; kết thúc tổng hợp ở 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Cặp mồi sử dụng để nhân bản đoạn gen *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS* được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2. Trình tự và thông tin về cặp mồi**

Gen đích	Tên mồi	Trình tự mồi 5' – 3'	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Kích thước đoạn gen (bp)	Tham khảo
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> _F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	52	600	[11]
	<i>rbcl</i> _R	GTAATAATCAAGTCCACCTCG			
<i>ITS</i>	<i>ITS</i> _F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCCG	60	900	[12]
	<i>ITS</i> _R	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC			
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH</i> _F	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	50	500	[13]
	<i>psbA</i> _R	GTTATGGATGAACGTAATGCTC			

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

Những sản phẩm PCR sau khi khuếch đại thành công sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit Purification Kit của hãng InTRON – Hàn Quốc.

Sản phẩm PCR tinh sạch được gửi cho phòng thí nghiệm 1<sup>st</sup> Base ở Malaysia để giải trình tự nucleotide theo cả hai chiều xuôi và ngược. Trình tự nucleotide của đoạn DNA được xác định bằng máy giải trình tự tự động dựa trên nguyên lý của Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

#### 2.4. Phương pháp xử lý và phân tích trình tự nucleotide

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm BioEdit 7.2.5 [14], Mega7 [15] và các công cụ trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây quan hệ di truyền được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum likelihood, với số lần lặp (Bootstrap) là 1000, sử dụng phần mềm Mega7.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số từ 20 mẫu lá loài Nghiến gân

ba được tách chiết theo bộ Kit tách chiết DNA tổng số (innuPREP Plant DNA Kit) của hãng Analytik Jena. Sau khi tiến hành tách chiết, DNA tổng số được kiểm tra hàm lượng và độ tinh sạch bằng phương pháp quang phổ kế (đo trên máy Scandrop- Analytik Jena, Đức). Kết quả cho thấy nồng độ DNA đạt từ 35,22 ng/μl đến 601,73 ng/μl và độ tinh sạch (tỷ số A260/A280) đạt từ 1,54 đến 1,98. Sự khác biệt về nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA tách chiết phụ thuộc vào loại lá và chất lượng lá sử dụng để tách chiết. Mẫu lá non sẽ thu được hàm lượng DNA cao hơn và độ tinh sạch cao hơn, còn mẫu lá già hoặc lá đã có dấu hiệu vàng úa thì hàm lượng DNA và cả độ tinh sạch thu được đều thấp hơn. Kết quả này cho thấy phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng Kit là phù hợp với mẫu lá cây Nghiến gân ba. Đối với những mẫu có hàm lượng DNA thấp, chúng tôi tăng thể tích DNA tổng số cho một phản ứng PCR để đảm bảo hàm lượng DNA đạt khoảng 50 ng trong một phản ứng PCR, còn với những mẫu có hàm lượng DNA cao thì chúng tôi tiến hành pha loãng đến hàm lượng 50 ng/μl và sử dụng 1 μl cho một phản ứng PCR (Bảng 3).

**Bảng 3. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch DNA của 20 mẫu Nghiến gân ba**

TT	Ký hiệu mẫu	Vị trí lấy mẫu	Độ tinh sạch của DNA	Hàm lượng (ng/μl)
1	NL 01	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	1,93	601,73
2	NL 02	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	1,54	35,22
3	NL 03	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	1,67	314,29
4	NL 04	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	1,69	70,50
5	NL 05	Đồng Hỷ – Thái Nguyên	1,58	68,02
6	NL 06	Phú Lương – Thái Nguyên	1,73	57,89
7	NL 07	Phú Lương – Thái Nguyên	1,82	67,73
8	NL 08	Phú Lương – Thái Nguyên	1,69	77,15
9	NL 09	Phú Lương – Thái Nguyên	1,91	100,53
10	NL 10	Phú Lương – Thái Nguyên	1,75	83,01
11	NL 11	Định Hóa – Thái Nguyên	1,67	152,25
12	NL 12	Định Hóa – Thái Nguyên	1,84	59,75
13	NL 13	Định Hóa – Thái Nguyên	1,98	87,52
14	NL 14	Định Hóa – Thái Nguyên	1,56	89,03
15	NL 15	Định Hóa – Thái Nguyên	1,77	93,27
16	NL 16	Võ Nhai – Thái Nguyên	1,85	68,50
17	NL 17	Võ Nhai – Thái Nguyên	1,57	72,78
18	NL 18	Võ Nhai – Thái Nguyên	1,65	70,56
19	NL 19	Võ Nhai – Thái Nguyên	1,75	85,60
20	NL 20	Võ Nhai – Thái Nguyên	1,82	69,30

### 3.2. Kết quả nhân bản các trình tự DNA mã vạch bằng kỹ thuật PCR

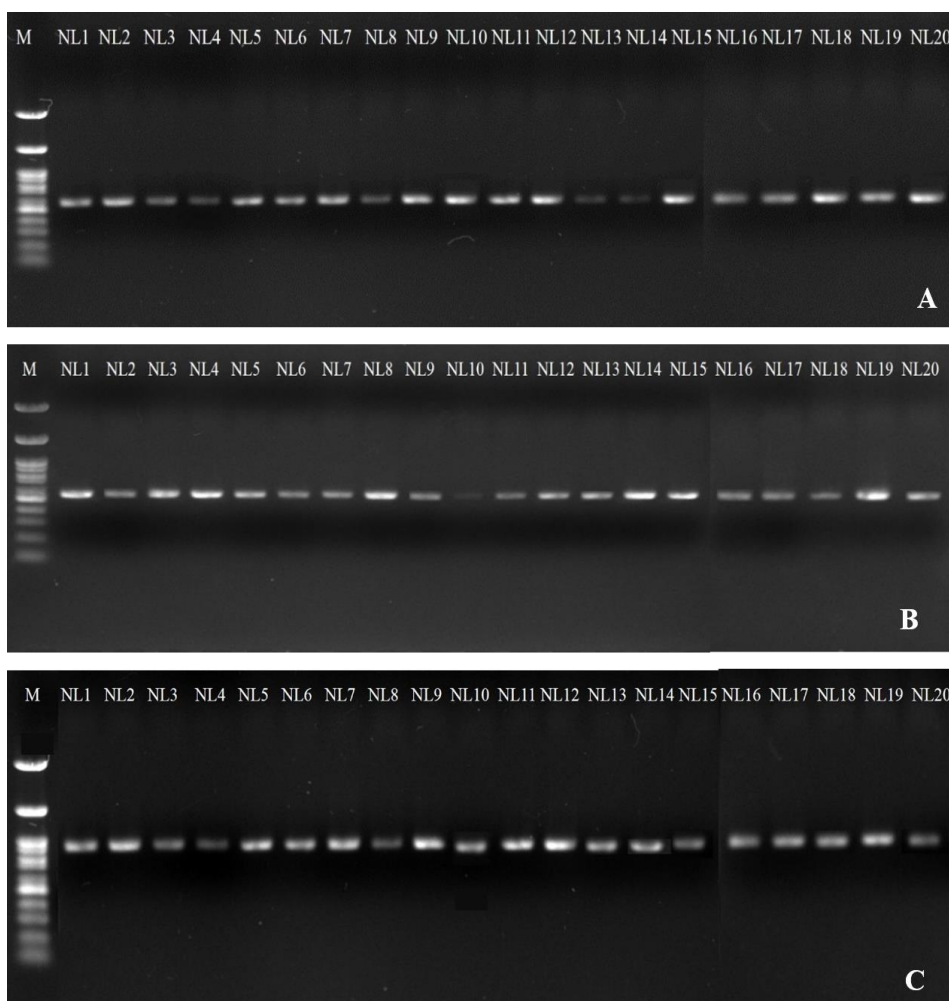
Nhân bản thành công trình tự *rbcl* ở tất cả 20 mẫu Nghiền gân ba thuộc 04 huyện của tỉnh Thái Nguyên, các băng DNA sáng rõ và chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng 600 bp.

Đoạn *trnH-psbA* được nhân bản thành công ở 20 mẫu Nghiền gân ba, kích thước đoạn nhân bản khoảng 500 bp. Sản phẩm PCR là đặc hiệu thể hiện thành một băng DNA duy nhất ở mỗi mẫu.

Trình tự *ITS* được nhân bản thành công ở 20 mẫu Nghiền gân ba tại tỉnh Thái Nguyên, các mẫu đều xuất hiện một băng DNA đặc hiệu duy nhất với kích thước khoảng 900 bp, không có băng phụ. Các băng DNA tương ứng

với sản phẩm PCR đều sáng rõ nét và sẽ được tinh sạch để phục vụ bước giải trình tự nucleotide.

Kết quả nhân bản cả ba trình tự DNA mã vạch là *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS* của 20 mẫu Nghiền gân ba được thể hiện ở Hình 2. Sản phẩm PCR của các mẫu là đặc hiệu, tuy nhiên có một số mẫu độ sáng của băng DNA không cao nguyên nhân có thể là do phản ứng PCR chưa được tối ưu vì sự có mặt của một số tạp chất (có thể với hàm lượng rất thấp) vẫn còn trong DNA khuôn. Toàn bộ sản phẩm PCR của 20 mẫu Nghiền này sẽ được tinh sạch và thực hiện bước giải trình tự nucleotide theo phương pháp tự động dựa trên nguyên lý Sanger.



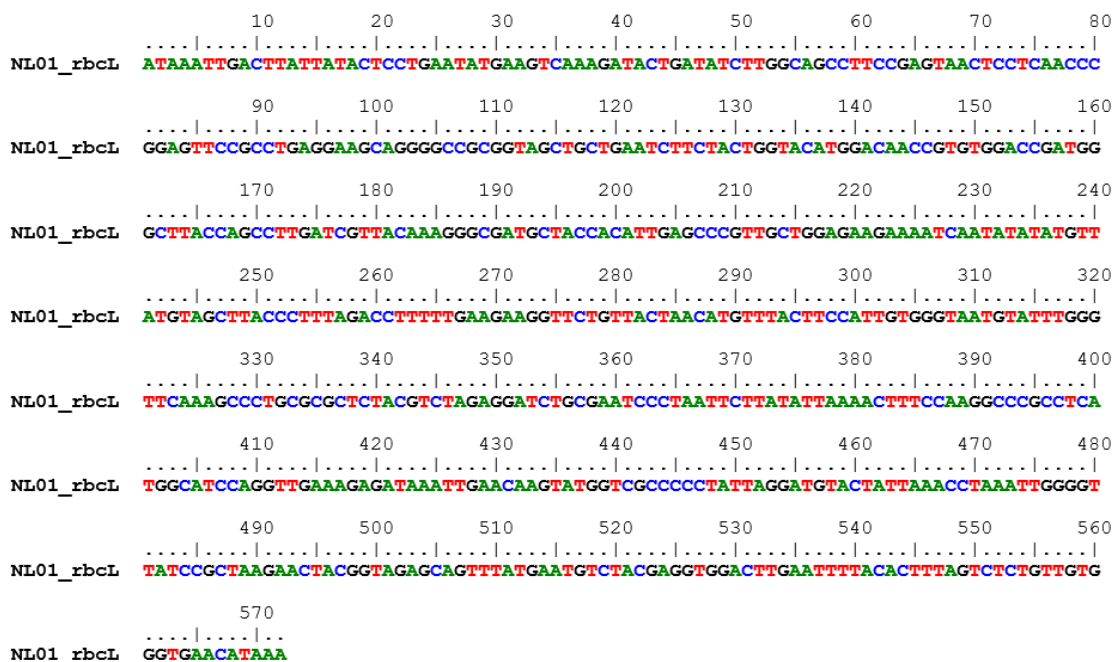
Hình 2. Điện di sản phẩm PCR nhân bản trình tự *rbcl* (A), *trnH-psbA* (B) và *ITS* (C) ở 20 mẫu Nghiền gân ba tại tỉnh Thái Nguyên (NL1 đến NL20: 20 mẫu Nghiền gân ba; M: Marker DNA 100 bp)



### 3.3. Trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* của loài Nghiến gân ba tại Thái Nguyên

Chất lượng giải trình tự nucleotide là cao ở tất cả các mẫu, tỷ lệ giải trình tự nucleotide thành công là 100%. Trình tự gen *rbcL* của các mẫu Nghiến tại Thái Nguyên sau khi được giải trình tự có kích thước khoảng 600 bp nhưng sau khi xử lý các trình tự nucleotide sử dụng phần mềm BioEdit, chúng tôi xác định được đoạn trình tự có kích thước 572 bp có chất lượng tốt để phân tích do đoạn trình tự nucleotide ở phần đầu và cuối của đoạn gen

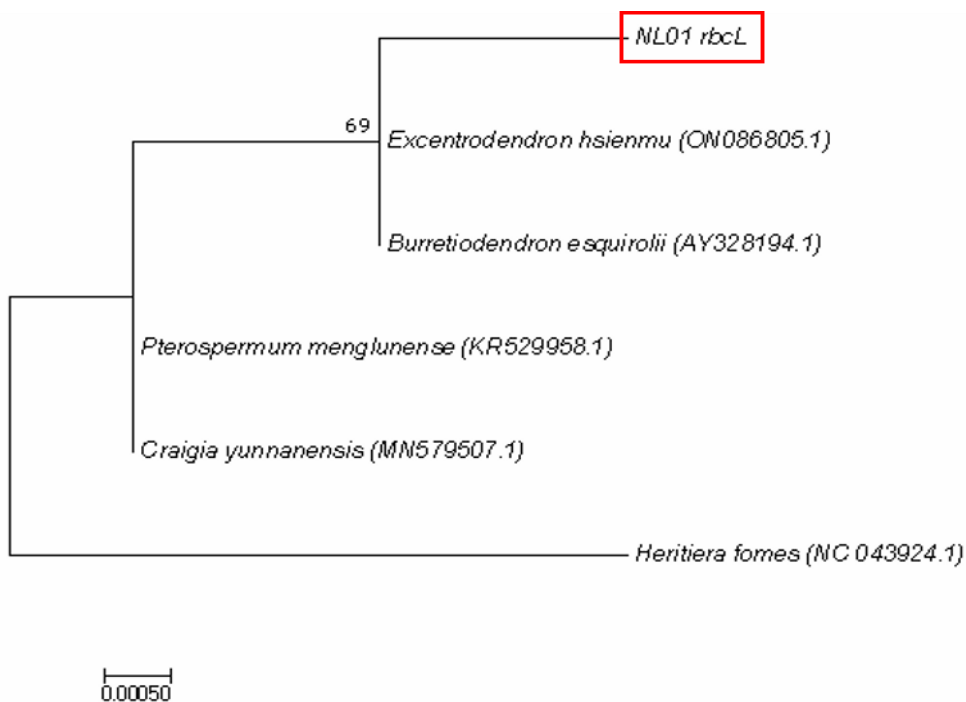
thường bị nhiễu và bị cắt bỏ. Do đó, đoạn *rbcL* có kích thước 572 bp của tất cả 20 mẫu Nghiến được so sánh với nhau sử dụng công cụ BioEdit cho thấy trình tự nucleotide tương đồng 100% do đó nhóm tác giả đã sử dụng trình tự nucleotide đại diện là mẫu NL01 để phân tích và so sánh trình tự nucleotide trên ngân hàng gen quốc tế. Trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* của loài Nghiến gân ba tại Thái Nguyên được thể hiện trên Hình 3 và được đăng ký trên GenBank với mã số OR095900.



Hình 3. Trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* của mẫu Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên

Để xây dựng cây quan hệ di truyền dựa trên trình tự *rbcL*, nhóm tác giả sử dụng mẫu NL01 (là mẫu đại diện cho nhóm 20 cây Nghiến tại Thái Nguyên) làm đối tượng so sánh, sử dụng công cụ Blastn trên Ngân hàng gen quốc tế để xác định những loài có độ tương đồng cao với loài Nghiến nghiên cứu. Kết quả Blast cho thấy mẫu Nghiến gân ba NL01 có tỷ lệ tương đồng cao nhất, đạt 99,63% với loài *Excentrodendron hsienmu* (mã số GenBank ON086805.1) và *Burretiodendron esquirolii* (AY328194.1). Ngoài ra, ba loài khác là *Pterospermum menglunense*, *Craigia yunnanensis* và *Heritiera fomes* có tỷ lệ tương đồng khá cao với loài

Nghiến gân ba tại Thái Nguyên với tỷ lệ tương đồng là 99,45% và 98,89%. Cây quan hệ di truyền cho thấy mẫu NL01 có tỷ lệ tương đồng cao nhất với loài Nghiến là *E. hsienmu* (tên đồng nghĩa với Nghiến gân ba) (Trung tâm dữ liệu thực vật rừng Việt Nam) và một loài cùng thuộc chi *Day* là *B. esquirolii* (Hình 4). Như vậy, trình tự *rbcL* dù có thể được sử dụng để định danh được loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên nhưng lại chưa có sự phân biệt rõ ràng với loài *B. esquirolii* do tỷ lệ tương đồng cao (99,63%), vì vậy khi phân biệt 2 loài này cần có kết hợp với so sánh về các đặc điểm hình thái.



Hình 4. Cây quan hệ di truyền giữa loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên với các loài tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế dựa trên trình tự rbcL

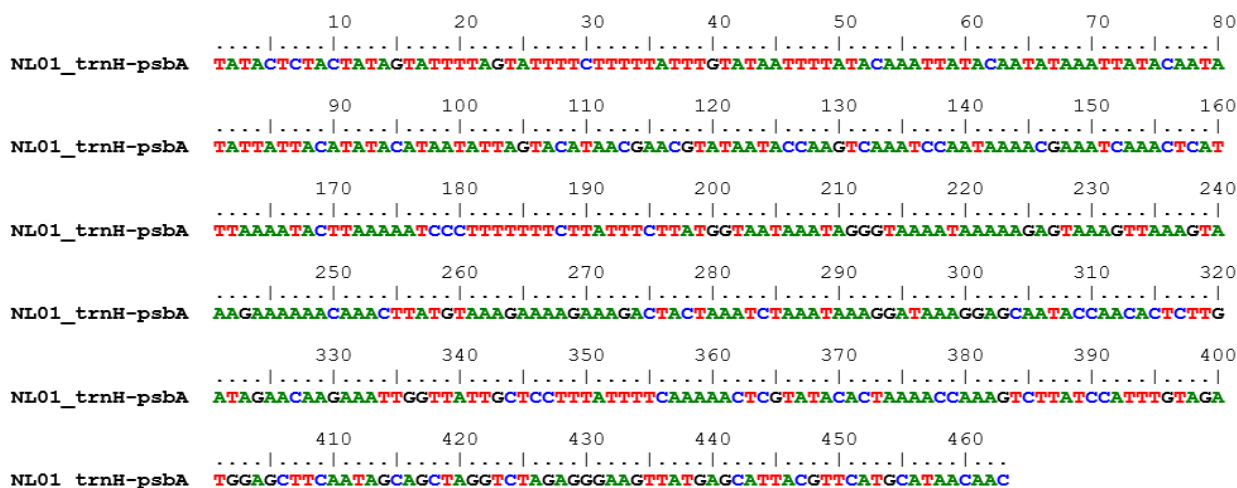
### 3.4. Trình tự nucleotide đoạn gen trnH-psbA của loài Nghiến gân ba tại Thái Nguyên

Trình tự *trnH-psbA* của các mẫu Nghiến gân ba tại Thái Nguyên sau khi được nhân bản và giải trình tự nucleotide thành công có kích thước khoảng 500 bp. Sau khi xử lý trình tự chúng tôi thu được đoạn trình tự *trnH-psbA* có kích thước 463 bp để phân tích. Do đó, đoạn trình tự có kích thước 463 bp của tất cả 20 mẫu Nghiến gân ba được so sánh với nhau và kết quả cho thấy tất cả 20 mẫu Nghiến gân ba tại Thái Nguyên có độ tương đồng 100%. Vì vậy, nhóm tác giả sử dụng mẫu Nghiến gân ba NLO1 đại diện cho nhóm gồm những mẫu Nghiến gân ba tại Thái Nguyên. Trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA* của 20 mẫu Nghiến gân ba được thể hiện trên Hình 5 và được đăng ký thành công trên GenBank với mã số OR095901.

Sử dụng trình tự *trnH-psbA* của mẫu NLO1 làm đại diện để so sánh và tìm kiếm các loài có tỷ lệ tương đồng cao nhất trên GenBank với loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên. Kết quả cho thấy mẫu Nghiến gân ba NLO1 có tỷ lệ

tương đồng cao nhất (đạt 100%) với loài Nghiến *E. hsienmu*. Có thể kết luận đoạn trình tự *trnH-psbA* có khả năng giám định loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên và càng khẳng định loài Nghiến gân ba tại Thái Nguyên có tên đồng nghĩa là *E. hsienmu* như các tài liệu trước đã đưa ra. Ngoài ra, 4 loài khác (*Pterospermum menglunense* (NC\_057978.1), *Craigia yunnanensis* (MN579507.1), *Tilia oliveri* (NC\_028590.1), *Abelmoschus esculentus* (NC\_035234.1)) thuộc họ Malvaceae có mức độ tương đồng thấp (từ 86,04% đến 95,92%) với loài Nghiến gân ba nghiên cứu. Cây quan hệ di truyền giữa loài Nghiến tại tỉnh Thái Nguyên với 05 loài có độ tương đồng cao trên Ngân hàng gen quốc tế được xây dựng dựa trên phần mềm Mega 7 (Hình 6). Kết quả cho thấy mẫu NLO1 có quan hệ di truyền gần nhất với loài Nghiến *E. hsienmu* (ON086805.1) và có quan hệ họ hàng gần với hai loài *Pterospermum menglunense* (NC\_057978.1), *Craigia yunnanensis* (MN579507.1).

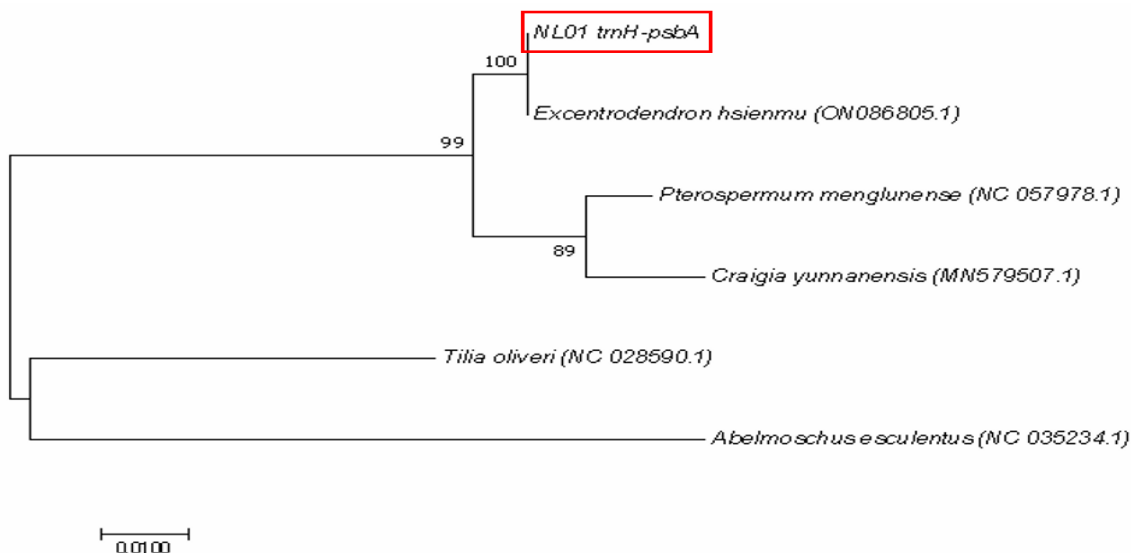




Hình 5. Trình tự nucleotide đoạn trnH-psbA của mẫu Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên

Qua các kết quả so sánh và phân tích đoạn trình tự *trnH-psbA* ở 20 mẫu Nghiến gân ba tại Thái Nguyên có thể nhận thấy trình tự *trnH-psbA* có thể định danh được loài Nghiến gân ba với hiệu quả cao. Trình tự *trnH-psbA* là trình tự không mã hóa và biến đổi nhiều nên việc kết hợp với một trình tự mã hóa và bảo thủ như *matK* hay *rbcl* sẽ làm giảm bớt những sai sót trong định danh loài [11]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, trình tự *trnH-psbA* của

tất cả 20 mẫu Nghiến nghiên cứu đều tương đồng 100%. Kết quả này cho thấy trình tự *trnH-psbA* là rất bảo thủ trong loài Nghiến gân ba. Điều này cũng tương đồng với nghiên cứu của tác giả Hà Bích Hồng và cộng sự (2022) với trình tự *trnH-psbA* trên loài Đinh mật [16]. Có thể thấy đối với những loài cây gỗ có tuổi đời cao và tồn tại đặc hữu ở những vùng sinh thái nhất định thì sự biến đổi về trình tự nucleotide cũng ít xảy ra hơn.



Hình 6. Cây quan hệ di truyền giữa loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên với các loài tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế dựa trên trình tự trnH-psbA

### 3.5. Trình tự nucleotide đoạn gen ITS của loài Nghiến gân ba tại Thái Nguyên

Sản phẩm PCR nhân bản trình tự ITS của 20 mẫu Nghiến tại Thái Nguyên có kích thước khoảng 850 bp. Nhưng chất lượng giải trình tự

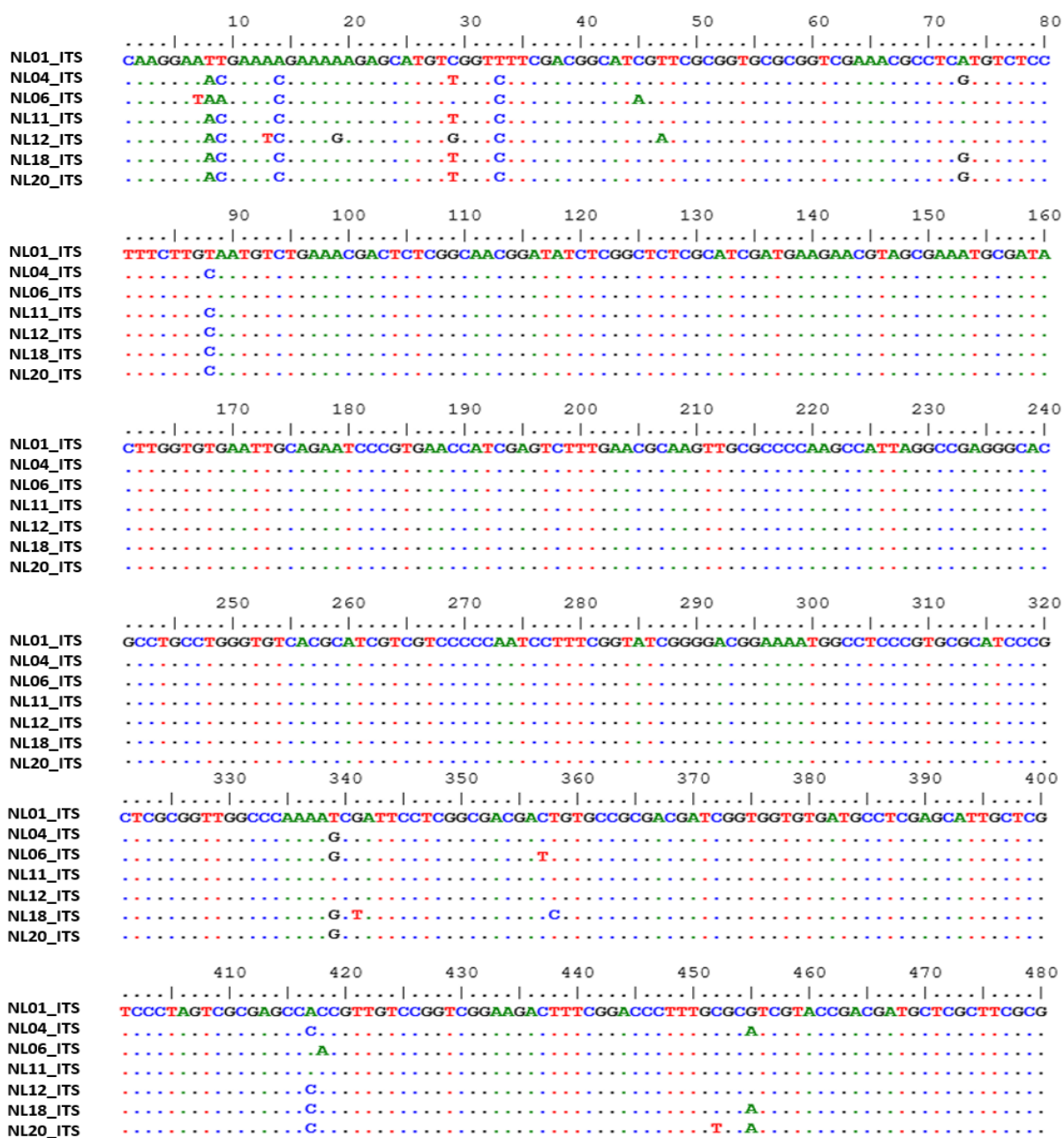
phía hai đầu của đoạn ITS không được tốt nên ở tất cả 20 trình tự đều bị cắt bỏ hai đầu và sử dụng được đoạn giữa có kích thước 544 bp với chất lượng giải trình tự tốt. Khi so sánh 20 trình tự ITS của loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái

Nguyên cho thấy sự sai khác thể hiện rõ ràng giữa các nhóm mẫu (Hình 7). Cụ thể, có 7 nhóm trình tự *ITS* khác nhau như sau:

- Nhóm 1 (đại diện là NL01): gồm các mẫu NL01, NL02, NL03
- Nhóm 2 (đại diện là NL04): gồm các mẫu NL04, NL05 và NL17
- Nhóm 3 (đại diện là NL06): gồm các mẫu NL06 đến NL10
- Nhóm 4 (đại diện là NL11): gồm các mẫu NL11, NL13, NL16
- Nhóm 5 (đại diện là NL12): gồm các mẫu

NL12, NL14, NL15 và NL19

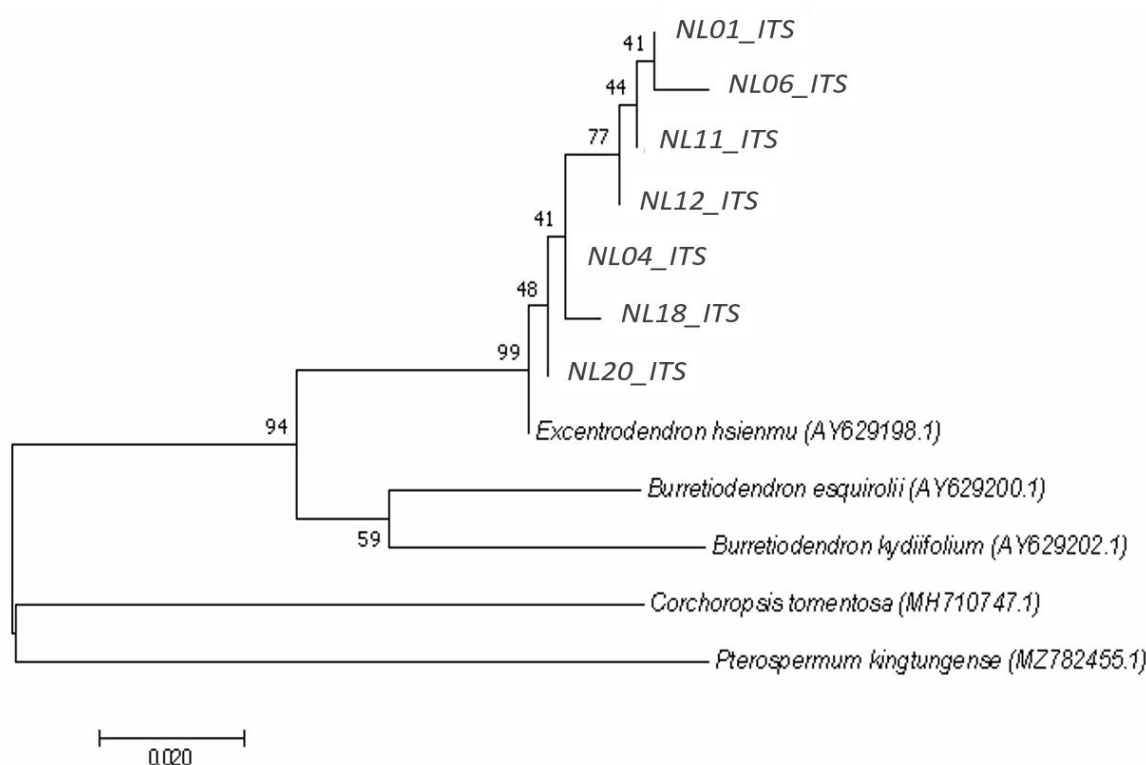
- Nhóm 6 (đại diện là NL18): gồm mẫu NL18
  - Nhóm 7 (đại diện là NL20): gồm mẫu NL20
- Sự sai khác giữa các trình tự nucleotide của đoạn *ITS* chủ yếu là đột biến điểm, một tỷ lệ tương đối nhỏ là đột biến thêm (insert) hoặc bớt (indel) nucleotide trong các trình tự [17]. Chỉ thị *ITS* đã được ứng dụng trong phân loại, giám định và phát sinh loài đối với nhiều loài thực vật như chi *Dendropanax* [18], *Bambusa* [19], *Magnolia* sp. [20].



Hình 7. So sánh trình tự các nucleotide đoạn gen *ITS* của 80 mẫu Nghiên tại tỉnh Thái Nguyên

So sánh trình tự nucleotide đoạn *ITS* của các mẫu Nghiến gân ba nghiên cứu trên GenBank cho thấy các mẫu Nghiến gân ba tại Thái Nguyên có tỷ lệ tương đồng cao nhất (99,38%) với loài Nghiến *E. hsienmu* – một tên đồng nghĩa của Nghiến gân ba *E. tonkinensis*. Có thể thấy đoạn trình tự *ITS* có khả năng

giám định loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên. Kết quả này được thể hiện rõ hơn trên cây quan hệ di truyền (Hình 8), tất cả 07 nhóm mẫu của loài Nghiến gân ba nghiên cứu được nhóm cùng nhóm với loài Nghiến *E. hsienmu* (AY629198.1) với khoảng cách di truyền rất nhỏ (0,006).



Hình 8. Cây quan hệ di truyền giữa loài Nghiến tại tỉnh Thái Nguyên với các loài tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế dựa trên trình tự *ITS*

#### 4. KẾT LUẬN

- Đã xác định được 03 trình tự nucleotide của 3 DNA mã vạch là *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS* cho loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên với kích thước lần lượt là 572 bp, 463 bp, 850 bp.

- Đã đăng ký thành công trình tự nucleotide của các gen *rbcl*, *trnH-psbA* của loài Nghiến gân ba trên GenBank với các mã số lần lượt là OR095900 và OR095901. Trình tự *ITS* được đăng ký trên GenBank với các mã số OR096219, OR096220, OR096221, OR096222, OR096223, OR096224, OR096225.

- Giám định được loài Nghiến gân ba có xuất xứ tại Thái Nguyên có tên khoa học là *Excentrodendron tonkinensis* và là cùng loài

với loài Nghiến *Excentrodendron hsienmu* hiện có trên GenBank, sử dụng 03 trình tự DNA mã vạch với hiệu quả giám định theo thứ tự sau: *trnH-psbA* > *rbcl* > *ITS*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Tiến Bân (2003). Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp.
- [2]. Phạm Hoàng Hộ (2021). Cây cỏ Việt Nam-Quyển I.
- [3]. Bộ KH&CN, Viện CNVN&CN (2007). Sách Đỏ Việt Nam. Phần Thực vật, Phần Động vật. Nxb. Khoa học tự nhiên.
- [4]. Dương Văn Thảo & Vũ Văn Thông (2023). Nghiến cứu đặc điểm lâm học của loài Nghiến gân ba tại tỉnh Thái Nguyên. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp. 2: 47-52.
- [5]. Mark W. Chase, Robyn S. Cowan, Peter M.

Hollingsworth, Cassio Van Den Berg, Santiago Madriñán, Gitte Petersen, Ole Seberg, Tina Jørgensen, Kenneth M Cameron & Mark Carine (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*. 56(2): 295-299.

[6]. CHWMR Bhagya Chandrasekara, D. Nathasha U. Naranpanawa, B. Supun Bandusekara, DKNG Pushpakumara, D. Siril A. Wijesundera & Pradeepa CG Bandaranayake (2021). Universal barcoding regions, rbc L, mat K and trn H-psb A do not discriminate *Cinnamomum* species in Sri Lanka. *PLoS One*. 16(2): e0245592.

[7]. Jing Yu, Jian-Hua Xue & Shi-Liang Zhou (2011). New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics & Evolution*. 49(3): 176-181.

[8]. CBOL Plant Working Group 1, Peter M Hollingsworth, Laura L Forrest, John L Spouge, Mehrdad Hajibabaei, Sujeevan Ratnasingham, Michelle van der Bank, Mark W Chase, Robyn S Cowan & David L Erickson (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(31): 12794-12797.

[9]. Shilin Chen, Hui Yao, Jianping Han, Chang Liu, Jingyuan Song, Linchun Shi, Yingjie Zhu, Xinye Ma, Ting Gao & Xiaohui Pang (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*. 5(1): e8613.

[10]. Jianhua Li, Ya Tang & Suzanne Shoup (2004). Sequences of nrDNA support *Excentrodendron* and *Burretiodendron* (Malvaceae). *Harvard Papers in Botany*. 83-88.

[11]. W John Kress & David L Erickson (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS one*. 2(6): e508.

[12]. Jun Wen & Elizabeth A Zimmer (1996). Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *%J Molecular phylogenetics &*

*evolution*. 6(2): 167-177.

[13]. Tao Sang, Daniel J Crawford & Tod F Stuessy (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American journal of Botany*. 84(8): 1120-1136.

[14]. Tom A Hall (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. Oxford. 95-98.

[15]. Sudhir Kumar, Glen Stecher & Koichiro Tamura (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology & evolution*. 33(7): 1870-1874.

[16]. Hà Bích Hồng, Nguyễn Thế Hưởng, Vũ Phạm Thảo Vy & Vũ Văn Thông (2022). Xác định một số trình tự ADN mã vạch của loài Đinh mật (*Fernandoa brilletii*) tại tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 2: 30-39

DOI: 10.55250/jo.vnuf.2022.4.030-039

[17]. Bruce G Baldwin, Michael J Sanderson, J Mark Porter, Martin F Wojciechowski, Christopher S Campbell & Michael Donoghue (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri botanical garden*. 247-277.

[18]. Jayadri Sekhar Ghosh, Samik Bhattacharya & Amita Pal (2017). Molecular phylogeny of 21 tropical bamboo species reconstructed by integrating non-coding internal transcribed spacer (ITS1 and 2) sequences and their consensus secondary structure. *Genetica*. 145: 319-333.

[19]. Rong Li & Jun Wen (2013). Phylogeny and biogeography of *Dendropanax* (Araliaceae), an amphipacific disjunct genus between tropical/subtropical Asia and the Neotropics. *Systematic Botany*. 38(2): 536-551.

[20]. Vũ Quang Nam, Vũ Đình Duy, Vũ Thị Thu Hiền & Lưu Thị Phương (2021). Sử dụng DNA mã vạch vùng gen nhân (ITS-rDNA) định danh loài hoa Trứng gà yên tử (*Magnolia* sp.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 2: 42-48