

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TRÌNH TỰ ADN MÃ VẠCH CỦA LOÀI ĐÌNH MẬT (*Fernandoa brilletii*) TẠI TỈNH THÁI NGUYÊN

Hà Bích Hồng¹, Nguyễn Thế Hưởng¹, Vũ Phạm Thảo Vy², Vũ Văn Thông³

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

²Bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên

³Công ty TNHH Phát triển nông nghiệp Vỹ Anh

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.2022.4.030-039>

TÓM TẮT

Đình mật (*Fernandoa brilletii* (Dop) Steen) là loài cây đặc hữu và có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Đây là loài cây đang có nguy cơ tuyệt chủng cao ngoài tự nhiên nhưng đến nay chưa có nghiên cứu đánh giá đầy đủ nhằm bảo tồn và phát triển loài cây này. Do đó, những nghiên cứu phục vụ công tác đánh giá đa dạng di truyền là rất cần thiết để kiến nghị và đưa ra biện pháp bảo tồn nguồn gen đối với loài Đình mật trên cả nước nói chung và trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên nói riêng. Hiện nay, ADN mã vạch đã được sử dụng như những chỉ thị phân tử có độ chính xác cao trong việc định danh loài và đánh giá đa dạng di truyền. Ở thực vật, các trình tự ADN được sử dụng làm mã vạch trong giám định hay phân loại thường là các trình tự nucleotide thuộc hệ gen lục lạp và hệ gen nhân, bao gồm cả vùng mã hóa và vùng không mã hóa. Trong nghiên cứu này, ba chỉ thị ADN mã vạch là *matK*, *trnH-psbA* và *ITS* được sử dụng để nghiên cứu bước đầu về ADN mã vạch cho loài Đình mật phân bố tại tỉnh Thái Nguyên. Hiệu quả nhân bản bằng PCR và giải trình tự nucleotide của ba chỉ thị ADN mã vạch ở loài Đình mật đều đạt 100%. Trong đó, trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* và *trnH-psbA* của tất cả các mẫu Đình mật tại 5 huyện của tỉnh Thái Nguyên có sự tương đồng tuyệt đối. Trong 848 nucleotide của vùng gen *ITS* đã xác định được hai vị trí nucleotide sai khác giữa các mẫu Đình mật nghiên cứu. Các trình tự *matK*, *trnH-psbA* và *ITS* của loài Đình mật được đăng ký thành công trên Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) với các mã số lần lượt là ON603621, ON603622, ON614190, ON614191. Cơ sở dữ liệu về ADN mã vạch thế giới cũng như Ngân hàng gen Quốc tế chưa công bố trình tự ADN mã vạch nào của loài Đình mật. Do đó, nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên về xác định các trình tự ADN mã vạch cho loài cây gỗ quý và đặc hữu này, góp phần làm phong phú thêm cơ sở dữ liệu về ADN mã vạch cho hệ thống ADN mã vạch của thực vật.

Từ khóa: ADN mã vạch, Đình mật, *ITS*, *matK*, *trnH-psbA*.

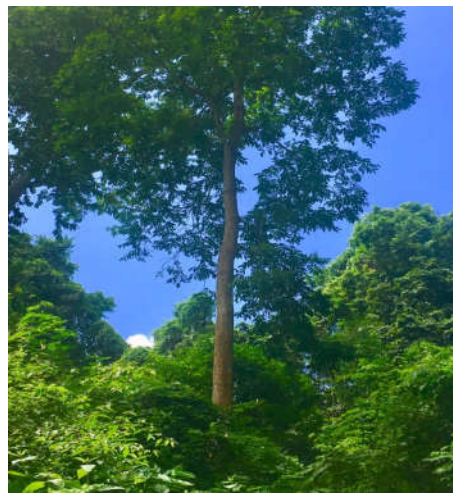
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đình mật (*Fernandoa brilletii* (Dop) Steen) là loài cây đặc hữu tại Việt Nam có giá trị kinh tế cao, thân gỗ dùng trong xây dựng, đóng đồ dùng nội thất cao cấp do có vân gỗ đẹp và chất lượng gỗ vô cùng tốt. Cây gỗ lớn, cao 25 - 30 m, đường kính có thể tới 50 - 100 cm. Vỏ màu xám tro bong mảng, có nhiều lớp mỏng, lớp trong nâu vàng. Phân cành thấp. Cành non hơi vuông cạnh phủ lông nâu vàng. Lá kép lông chim 1 lần lẻ mọc đối, dài 40 - 45 cm. Lá chét hình trái xoan hay trứng trái xoan, đầu có mũi nhọn, đuôi gần tròn, dài 10 - 13 cm, rộng 5 - 6 cm, mặt dưới có lông mịn và tuyến nhỏ ở gốc, gân bên nổi rõ ở mặt dưới, gân nhỏ gần song song. Cuống lá chét ngắn. Hoa tự xim viên chùy ở đầu cành. Hoa to, thưa, lưỡng tính, không đều. Đài hình chuông, tràng hợp gốc, màu trắng hay trắng vàng tạo thành 2 môi. Nhị 5 có 2 nhị dài, bầu 2 ô. Quả nang hình trụ dài khoảng 40 cm, rộng 4 cm, đầu quả nhọn. Vỏ quả hoá gỗ khi chín tách ô. Hạt dẹt nhẵn bóng, có cánh màu trắng, xếp thành 2 hàng trong mỗi ô. Cây mọc

chậm, mùa hoa tháng 9 - 11. Mọc rải rác trong rừng kín lá rộng thường xanh ở các tỉnh miền Bắc. Hiện nay, ADN mã vạch đã được chứng minh là những chỉ thị phân tử có độ chính xác cao trong việc định danh loài và đánh giá đa dạng di truyền. Đặc điểm quan trọng nhất của ADN mã vạch là phải phổ biến và đặc hiệu trong các biến dị và dễ dàng sử dụng. Ở thực vật, các đoạn ADN mã vạch có thể là những đoạn ADN nằm trong hệ gen nhân (28S rDNA, *ITS*...) (Baharum, 2012; Chen, 2010; Schoch et al., 2012) hoặc hệ gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *rpo*, *trnL-trnF*, *ycf*...) (Yu et al., 2011; Hollingsworth, 2011). Ba mã vạch ADN (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*) được sử dụng để đánh giá sự đa dạng của các loài cây trong rừng mưa nhiệt đới tại Queensland, Úc và kết luận rằng ADN mã vạch là một trợ giúp đáng kể trong đánh giá đa dạng sinh học và xác định các quần thể cây ngay cả khi chúng không thể phân biệt được tất cả các loài bằng phương pháp hình thái (Costion et al., 2011). ADN mã vạch được sử dụng để giải quyết vấn đề bảo tồn đa dạng sinh học theo

hai cách sau: (1) Là một phương tiện giám sát đa dạng sinh học chính xác và nhanh chóng cả trước và sau các hành động bảo tồn, (2) 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 (Krishnamurthy & Francis, 2012). Đinh mật là loài cây có nguy cơ tuyệt chủng cao ngoài tự nhiên nhưng đến nay vẫn chưa được đưa vào sách Đỏ Việt Nam và Nghị định 06/2019 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp. Tại Thái Nguyên, Đinh mật còn lại rất ít, phân bố rải rác ở các vườn rừng, các diện tích

rừng tự nhiên tại các huyện Võ Nhai, Đồng Hỷ, Định Hóa, Phú Lương và Đại Từ. Do đó, những nghiên cứu phục vụ công tác định danh và đánh giá đa dạng di truyền là rất cần thiết để kiến nghị và đưa ra biện pháp bảo tồn nguồn gen đối với loài Đinh mật trên cả nước nói chung và trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên nói riêng. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào phân tích ADN của loài Đinh mật, hiện trên ngân hàng gen quốc tế mới chỉ có một số ít trình tự ADN mã vạch của một số loài trong chi *Fernandoa* như: *F. coccinea*, *F. macrantha*, *F. bracteata*, *F. serrata*, *F. magnifica*, và *F. adolfi-friderici*.



Hình 1. Cây Đinh mật tại Vũ Chấn, huyện Võ Nhai, tỉnh Thái Nguyên

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Lựa chọn mẫu và cách lấy mẫu

Lá của 15 cây Đinh mật được thu thập từ 05

huyện của tỉnh Thái Nguyên. Các mẫu được kí hiệu như trên Bảng 1.

Bảng 1. Địa điểm và thời gian thu thập các mẫu Đinh mật tại Thái Nguyên

STT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu nhận mẫu	Thời gian thu mẫu	Tọa độ	
				Kinh độ	Vĩ độ
1	DH 01	Định Hóa - Thái Nguyên	4/2022	2432139	565781
2	DH 02	Định Hóa - Thái Nguyên	4/2022	2432146	565781
3	DH 03	Định Hóa - Thái Nguyên	4/2022	2432158	565789
4	DHY 01	Đồng Hỷ - Thái Nguyên	4/2022	2415195	0587737
5	DHY 02	Đồng Hỷ - Thái Nguyên	4/2022	2415707	0588155
6	DHY 03	Đồng Hỷ - Thái Nguyên	4/2022	2415106	0587542
7	PL 01	Phú Lương - Thái Nguyên	4/2022	2410434	0579768
8	PL 02	Phú Lương - Thái Nguyên	4/2022	2408229	0579011
9	PL 03	Phú Lương - Thái Nguyên	4/2022	2410841	0579392
10	VN 01	Võ Nhai - Thái Nguyên	4/2022	2420007	0604997
11	VN 02	Võ Nhai - Thái Nguyên	4/2022	2419938	0604979
12	VN 03	Võ Nhai - Thái Nguyên	4/2022	2419964	0605034
13	DT 01	Đại Từ - Thái Nguyên	4/2022	2377435	568815
14	DT 02	Đại Từ - Thái Nguyên	4/2022	2375015	568216
15	DT 03	Đại Từ - Thái Nguyên	4/2022	2374222	572578

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 nylon 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 ADN tổng số.

2.2. Phương pháp tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết từ mẫu lá Đinh mật theo hướng dẫn sử dụng của bộ kit tách chiết ADN thực vật “DNA mini kit Qiagen” của hãng Qiagen, CHLB Đức. Các mẫu ADN tổng số sau khi tách chiết được đánh giá nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ hấp phụ ScanDrop (Analytik Jena, Germany) và 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 (Germany) với thành phần bao gồm: 10μl PCR master mix 2X, 1μl mỗi xuôi (10μM) và 1μl mỗi ngược (10μM), 1μl ADN khuôn (50 ng), bổ sung H₂O deion tới 20μl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ lặp lại của ba bước 95°C – 30 giây, 51°C - 60°C (tùy môi) – 30 giây, 72°C – 1 phút; kết thúc tổng hợp ở 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Tên mỗi, trình tự nucleotide các môi ADN mã vạch và nhiệt độ gắn mỗi của các môi sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 2.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

Bảng 2. Danh sách và trình tự nucleotide của các cặp môi

Gen	Kí hiệu môi	Trình tự môi (5' - 3')	Ta (°C)	Kích thước	Tham khảo
<i>matK</i>	<i>matK_F</i>	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTGGTTC	52	850	Kress and Erickson, 2007
	<i>matK_R</i>	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG			
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH_F</i>	CGCGCATGGTGGATTACACAATCC	51	460	Sang et al., 1997
	<i>psbA_R</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC			
<i>ITS</i>	<i>ITS_F</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	60	900	Wen and Zimmer, 1996
	<i>ITS_R</i>	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC			

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.

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

2.4. Phương pháp phân tích dữ liệu ADN mã vạch

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), Mega7 (Kumar et al., 2016), 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 là 1000.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN tổng số

Sử dụng bộ kit tách chiết ADN thực vật của Qiagen-Đức để tách chiết ADN tổng số từ 15 mẫu lá Đinh mật. Kết quả tách chiết ADN tổng số được đo trên máy Scandrop với nồng độ thấp (dao động từ 14,99 đến 29,25 ng/μl) nhưng độ tinh sạch tương đối tốt (tỉ số A260/A280 chỉ đạt từ 1,57 – 1,83). Chi tiết về hàm lượng ADN tổng số và độ tinh sạch của từng mẫu được thể hiện ở bảng 3. Với kết quả tách chiết ADN tổng số này chúng tôi tiến hành thử nghiệm các nồng độ ADN khuôn phù hợp cho phản ứng PCR thông

qua cặp mồi *matK_F/R* thì tất cả các mẫu ADN tổng số đều xuất hiện sản phẩm PCR đặc hiệu với kích thước khoảng 850 bp ở nồng độ ADN tổng số là 30 ng đến 50 ng trong một phản ứng PCR. Đoạn gen nhân bản thể hiện trên gel

agarose 1,0% là một băng rõ, sắc nét và không có sản phẩm phụ. Từ kết quả thử nghiệm PCR này, chúng tôi khẳng định đã tách chiết được ADN tổng số từ các mẫu lá Đinh mật sử dụng bộ kit tách chiết ADN thực vật của Qiagen-Đức.

Bảng 3. Hàm lượng và độ tinh sạch của 15 mẫu ADN tổng số tách chiết từ lá loài Đinh mật

STT	Địa điểm lấy mẫu	Mẫu	Độ tinh sạch của	Hàm lượng ADN
1	Định Hóa	ĐH1	1,77	24,52
2		ĐH2	1,65	27,50
3		ĐH3	1,59	21,30
4	Đồng Hỷ	ĐHY1	1,57	17,11
5		ĐHY2	1,65	20,50
6		ĐHY3	1,78	22,03
7	Phú Lương	PL1	1,57	14,99
8		PL2	1,76	18,90
9		PL3	1,83	27,50
10	Võ Nhai	VN1	1,83	29,25
11		VN2	1,74	19,50
12		VN3	1,78	22,68
13	Đại Từ	ĐT1	1,73	27,15
14		ĐT2	1,71	22,76
15		ĐT3	1,61	22,12

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

15 mẫu ADN tổng số được tách chiết từ lá của 15 cây Đinh mật được sử dụng làm khuôn để nhân bản đoạn gen *matK*, *trnH-psbA*, và *ITS* bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu như ở Bảng 2.

Gen *matK* là trình tự gen nằm trong lục lạp có thể nhân bản một cách dễ dàng ở nhiều loài thực vật. Trình tự gen *matK* đã được sử dụng rộng rãi để xây dựng mối quan hệ các hệ sinh thái giữa các loài có liên quan chặt chẽ hoặc để định danh các loài thực vật. Cặp mồi sử dụng là *matK_F* và *matK_R* để nhân bản đoạn gen *matK*. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy gen *matK* được khuếch đại thành công ở tất cả các mẫu Đinh mật nghiên cứu, các băng thu được sáng đều với kích thước tương tự nhau khoảng 850 bp (khi so sánh với thang ADN chuẩn 100 bp), không có băng phụ xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu (Hình 2A).

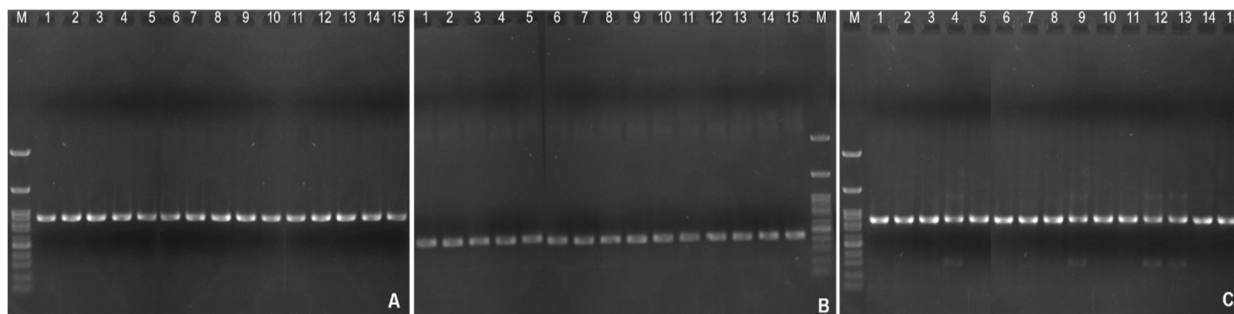
Vùng xen *trnH-psbA* là một trong những vùng biến đổi nhất trong bộ gen của lục lạp ở

các loài hạt kín. Nó là một công cụ phổ biến để nghiên cứu di truyền quần thể thực vật và phát sinh ở cấp loài và đã được đề xuất là phù hợp cho các nghiên cứu mã vạch DNA. Cặp mồi *trnH_F* và *psbA_R* được thiết kế để nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Kết quả kiểm tra sản phẩm nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,0% cho thấy đoạn gen *trnH-psbA* được khuếch đại thành công ở tất cả 15 mẫu Đinh mật nghiên cứu. Hình 2B là kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* ở 15 mẫu Đinh mật tại tỉnh Thái Nguyên, các băng ADN được nhân bản đặc hiệu với một băng duy nhất, sáng rõ. Sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* sẽ được tinh sạch và xác định trình tự nucleotide.

Trong tế bào, rDNA được sắp xếp như các đơn vị được lặp lại ngẫu nhiên bao gồm ADN mã hóa ribosome 18S, 5, 8S, 28S và xen giữa các trình tự không mã hóa *ITS1*, *ITS2* (internal transcribed spacers) nằm ở hai bên sườn của vùng 5,8S. Vùng *ITS* (bao gồm *ITS1* và *ITS2*) vừa có tính bảo thủ vừa có tính đa dạng thích

hợp để phân biệt các loài gần gũi. Kết quả nhân bản đoạn gen *ITS* ở 15 mẫu Đinh mật tại tỉnh Thái Nguyên được thể hiện trên hình 2C. Đoạn gen *ITS* khuếch đại thành công ở tất cả các

mẫu Đinh mật. Các mẫu đều xuất hiện một băng ADN sáng rõ nét, kích thước khoảng trên 800 bp phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen *ITS* dự kiến nhân bản.



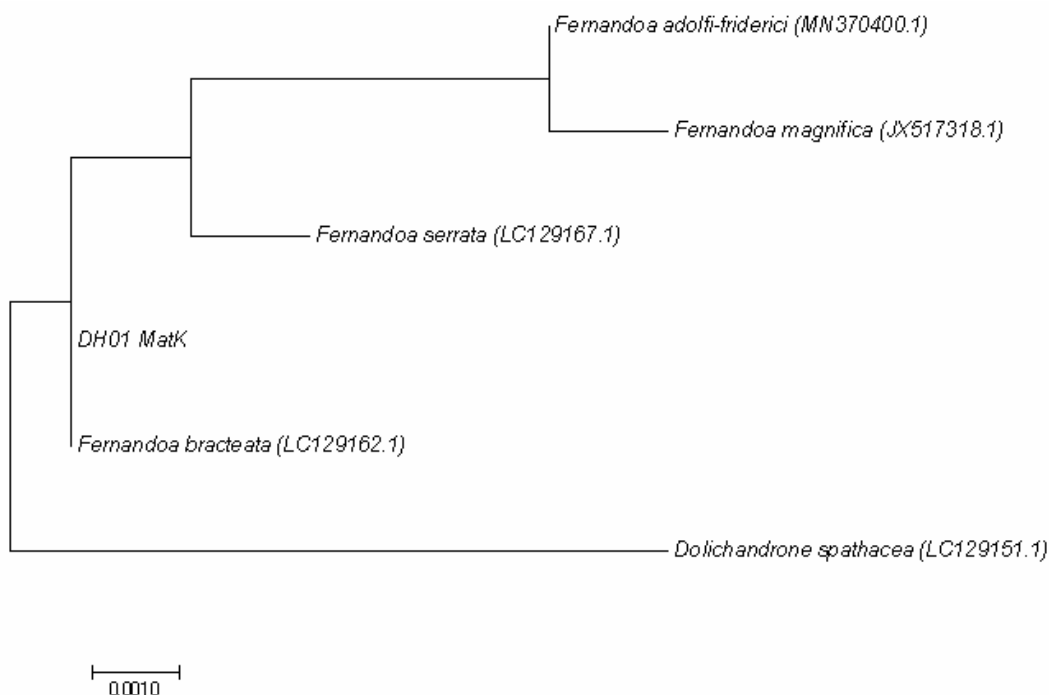
Hình 2. Kết quả nhân bản 03 đoạn trình tự ADN mã vạch của 15 mẫu Đinh mật tại Thái Nguyên
(A): Trình tự *matK*, (B): Trình tự *trnH-psbA*, (C): Trình tự *ITS*. Giếng 1-3: mẫu DH 01-DH 03; Giếng 4-6: DHY 01- DHY 03; Giếng 7-9: PL 01 – PL 03; Giếng 10-12: VN 01 – VN 03; Giếng 13-15: DT 01- DT 03; M: Thang đo (marker) ADN 100 bp

3.3. Phân tích trình tự nucleotide các đoạn ADN mã vạch

Các sản phẩm PCR đều được tinh sạch bằng bộ kit PCR Purification Kit của InTRON – Hàn Quốc theo hướng dẫn của nhà sản xuất và trình

tự nucleotide của các đoạn gen được xác định bởi công ty 1st BASE - Malaysia.

3.3.1. Phân tích trình tự nucleotide đoạn gen *matK*



Hình 3. Cây quan hệ di truyền của loài Đinh mật tại Thái Nguyên với 04 loài trong chi *Fernandoa* dựa trên trình tự nucleotide *matK*

Sau khi xác định trình tự nucleotide bằng phương pháp tự động và xử lý trình tự bằng phần mềm BioEdit, chúng tôi thu được đoạn gen *matK* với kích thước 839 bp với các đỉnh peak rõ ràng. Trình tự nucleotide của đoạn gen *matK*

là giống nhau 100% ở tất cả các mẫu Đinh mật nghiên cứu và được đăng ký lên GenBank với mã số ON603621. Trên Ngân hàng gen Quốc tế chưa công bố trình tự nucleotide của loài Đinh mật nên đây là công bố đầu tiên về loài này.

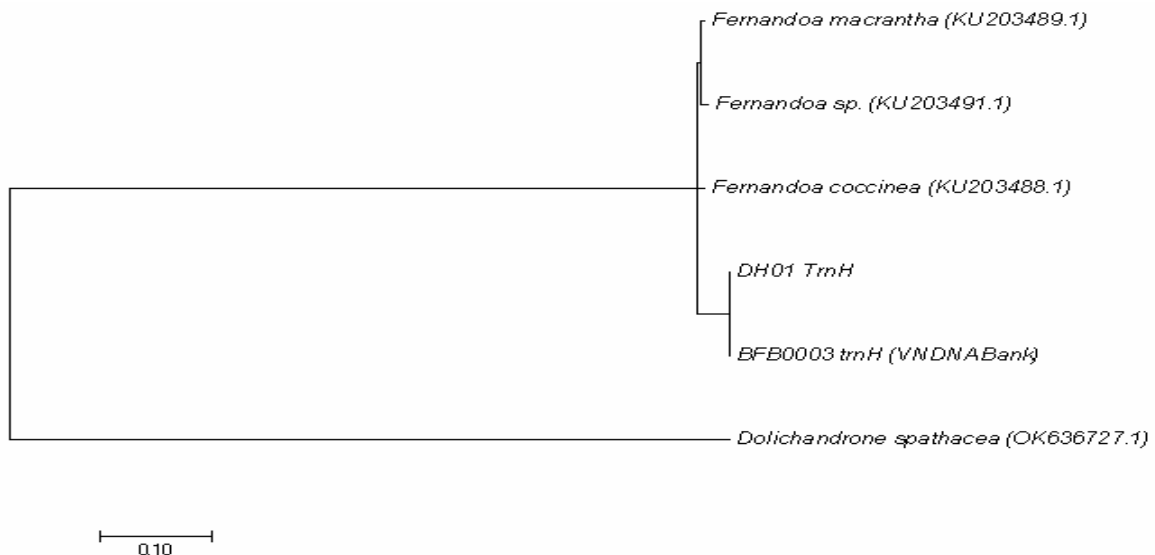
Trên Ngân hàng gen Quốc tế hiện có 04 trình tự nucleotide đoạn gen *matK* của 4 loài thuộc chi *Fernandoa*, đó là: *F. bracteata* (LC129162.1), *F. serrata* (LC129167.1), *F. adolfi-friderici* (MN370400.1), và *F. magnifica* (JX517318.1). Cây quan hệ di truyền giữa loài Đinh mật tại Thái Nguyên với 04 loài thuộc chi *Fernandoa* được thể hiện trên Hình 3. Mẫu DH 01 đại diện cho tất cả 15 mẫu Đinh mật nghiên cứu và có mức độ tương đồng 100% với loài *F. bracteata* (LC129162.1), ba loài còn lại của chi *Fernandoa* được nhóm thành một nhóm và cũng tương đối gần với loài Đinh mật nghiên cứu. Loài *Dolichandrone spathacea* là một loài thuộc cùng họ Bignoniaceae với loài Đinh mật được sử dụng như một loài ngoài nhóm (outgroup) để thể hiện mối quan hệ di truyền gần giữa các loài trong chi *Fernandoa*.

3.3.2. Phân tích trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA*

Trình tự nucleotide của đoạn gen *trnH-psbA* tương đồng 100% giữa các mẫu Đinh mật nghiên cứu và được đăng ký lên GenBank với mã số ON603622. Trình tự nucleotide của đoạn

gen *trnH-psbA* của tất cả 15 mẫu Đinh mật nghiên cứu có chiều dài 399 bp.

Trên Ngân hàng gen Quốc tế chưa công bố trình tự nucleotide nào của loài Đinh mật (*Fernandoa brilletii*) nhưng một cơ sở dữ liệu ADN của Việt Nam (VNDNABANK) đã công bố một trình tự *trnH-psbA* của loài này ở Thượng Tiến, Hòa Bình với kích thước 394 bp (Hà Văn Huân, 2015). So sánh trình tự *trnH-psbA* của các mẫu Đinh mật tại Thái Nguyên với trình tự mẫu Đinh mật tại Hòa Bình cho thấy sự tương đồng là 100%. Cây quan hệ di truyền của loài Đinh mật tại Thái Nguyên với một số loài trong chi *Fernandoa* đã công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế được thể hiện trên Hình 4. Trong đó, các mẫu Đinh mật tại Thái Nguyên mà đại diện là mẫu DH 01 tương đồng 100% với loài *F. brilletii* có mã số BF0003 trên Ngân hàng ADN Việt Nam và cả hai đều được nhóm chung với ba loài thuộc chi *Fernandoa* có trên Ngân hàng gen Quốc tế. Kết quả này cho thấy các mẫu Đinh mật tại Thái Nguyên chính là loài *F. brilletii* khi so sánh với cơ sở dữ liệu ADN của Việt Nam.



Hình 4. Cây quan hệ di truyền của loài Đinh mật tại Thái Nguyên với các loài thuộc chi *Fernandoa* dựa trên trình tự nucleotide *trnH-psbA*

3.3.3. Phân tích trình tự nucleotide đoạn ITS

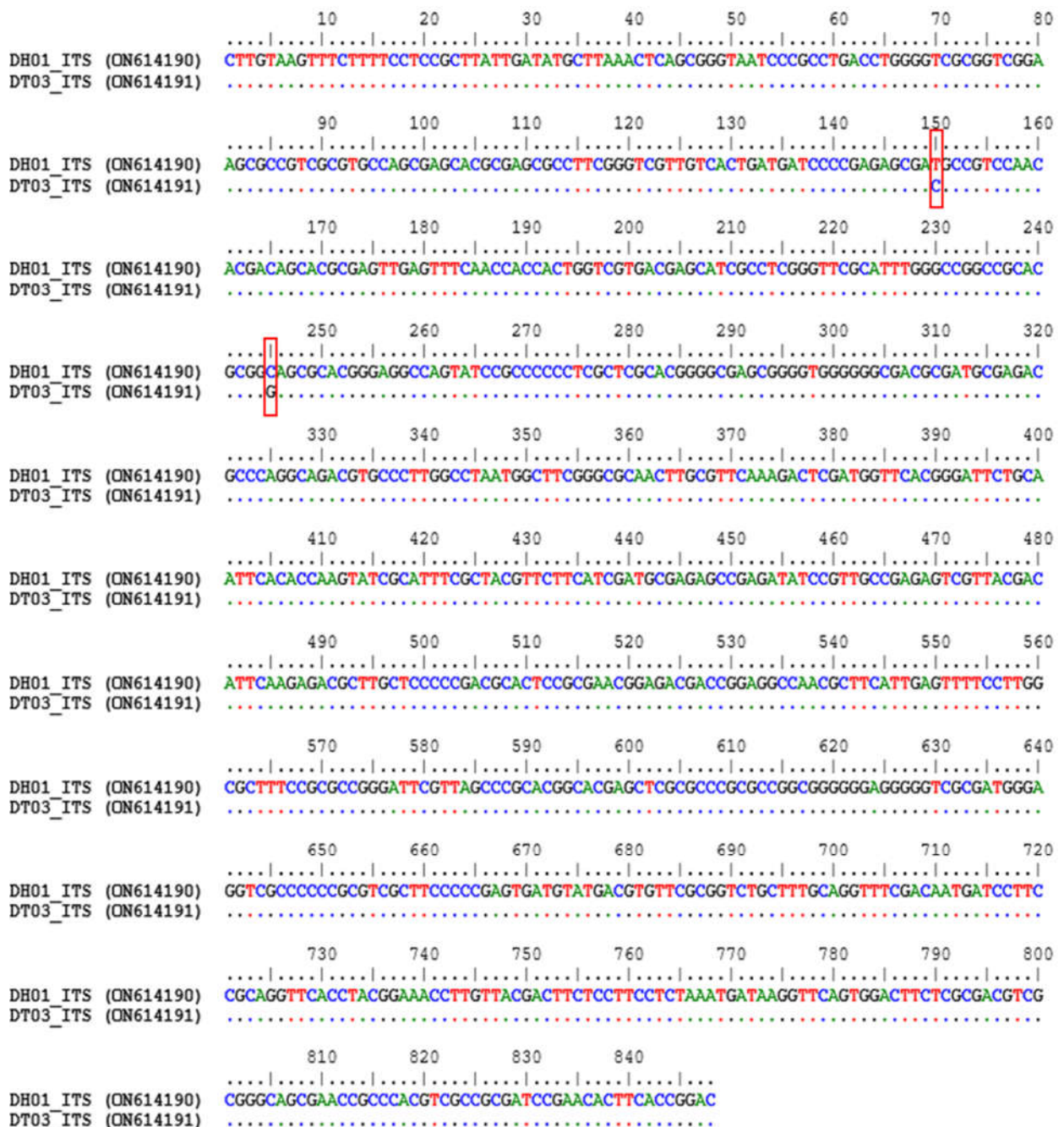
Trình tự nucleotide của đoạn ITS ở các mẫu Đinh mật có chiều dài 848 bp và có một số vị trí nucleotide sai khác giữa các mẫu Đinh mật. Cụ thể, sự sai khác về trình tự nucleotide của đoạn

ITS đã được phân thành hai nhóm trình tự với mã số trên GenBank tương ứng là ON614190 và ON614191. Hai trình tự ITS khác nhau tại hai vị trí nucleotide là vị trí nucleotide số 150 và 245 (Hình 5). Cụ thể trình tự có mã số ON614190

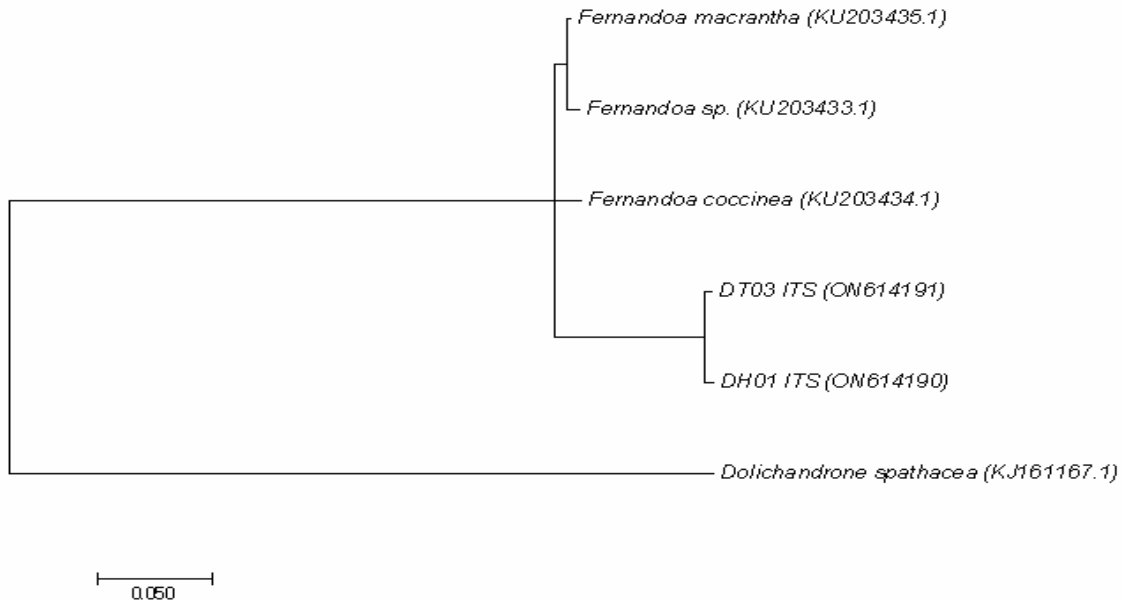
bao gồm các mẫu Đinh mật tại Định Hóa, Phú Lương, Đồng Hỷ và Võ Nhai (đại diện là mẫu DH 01), còn trình tự có mã số ON614191 bao gồm các mẫu Đinh mật tại Đại Từ (đại diện là mẫu DT 03).

Mối quan hệ di truyền của các mẫu Đinh mật tại Thái Nguyên với một số loài thuộc chi *Fernandoa* dựa trên trình tự ITS được thể hiện trên Hình 6. Trong đó, mẫu DH 01 và DT 03 có khoảng cách di truyền rất nhỏ (0,007) và cùng nằm trong một nhóm với các loài của chi

Fernandoa hiện có trên Ngân hàng gen. Các mẫu Đinh mật nghiên cứu có quan hệ tương đối gần với loài *Fernandoa coccinea* (KU203434.1). Loài *Fernandoa macrantha* (KU203435.1) và *Fernandoa* sp. (KU203433.1) nhóm thành một nhóm có quan hệ gần với nhóm loài Đinh mật nghiên cứu. Loài *Dolichandrone spathacea* là một loài thuộc cùng họ Bignoniaceae với loài Đinh mật được sử dụng như một loài ngoài nhóm (outgroup).



Hình 5. Trình tự nucleotide của đoạn ITS có mã số ON614190 và ON614191 của cây Đinh mật tại Thái Nguyên



Hình 6. Cây quan hệ di truyền của loài Đinh mật tại Thái Nguyên và một số loài trong chi *Fernandoa* dựa trên trình tự nucleotide *ITS*

Đặc điểm ADN mã vạch của loài Đinh mật tại tỉnh Thái Nguyên

Gen *matK* của loài Đinh mật trong nghiên cứu này được nhân bản có kích thước gần 900 bp và có trình tự nucleotide tương đồng 100% ở tất cả 15 mẫu. Gen *matK* là một gen chức năng, tổng hợp enzyme maturase K, do vậy thường không có các đột biến thêm hay bớt nucleotide xảy ra trong gen, nên kích thước cũng như trình tự nucleotide của gen này tương đối ổn định. Trình tự *matK* của loài Đinh mật tại Thái Nguyên tương đồng 100% với một loài khác cùng chi là *F. bracteata*, do đó có thể thấy khả năng phân biệt loài trong chi *Fernandoa* dựa trên trình tự *matK* không được tốt.

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 *rbcL* sẽ làm giảm bớt những sai sót (Kress & Erickson, 2007). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, trình tự *trnH-psbA* của tất cả 15 mẫu Đinh mật nghiên cứu đều tương đồng 100% và cũng tương đồng 100% với loài *F. brilletii* tại Thượng Tiến, Hòa Bình. Kết quả này cho thấy trình tự *trnH-psbA* là rất bảo thủ trong loài. Điều này có khác so với kết quả của dự án “Xây dựng bộ cơ sở dữ liệu ADN mã vạch phục vụ công tác quản lý giống cây lâm nghiệp đã được công nhận là giống Quốc gia” do Hà Văn Huân chủ nhiệm đã khẳng định đoạn

trình tự *trnH-psbA* là trình tự hiệu quả nhất trong nghiên cứu đa dạng di truyền ở mức dưới loài (Hà Văn Huân, 2015).

Trình tự *ITS* cũng là một trình tự không mã hóa và có thể có sự biến đổi về một vài vị trí nucleotide trong cùng một loài. Đối với loài Đinh mật tại Thái Nguyên, trình tự *ITS* cho thấy hai biến thể với sự khác nhau tại hai vị trí nucleotide. Trong đó, một biến thể bao gồm các mẫu của 4 huyện Định Hóa, Đồng Hỷ, Phú Lương và Võ Nhai, còn một biến thể bao gồm các mẫu của huyện Đại Từ. Qua đó cho thấy đối với loài Đinh mật thì trình tự *ITS* có thể sử dụng để đánh giá sự đa dạng bên trong loài tốt hơn so với trình tự *matK* và *trnH-psbA*.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được 03 trình tự ADN mã vạch là trình tự *matK* (mã GenBank: ON603621), *trnH-psbA* (ON603622) và *ITS* (ON614190, ON614191) cho loài Đinh mật (*Fernandoa brilletii*) phân bố tại tỉnh Thái Nguyên.

Cả ba chỉ thị ADN mã vạch (*matK*, *trnH-psbA*, *ITS*) đều thể hiện mức độ tương đồng cao về trình tự nucleotide với các loài thuộc chi *Fernandoa* hiện có trên Ngân hàng gen Quốc tế. Tuy nhiên, loài Đinh mật (*F. brilletii*) là loài đặc hữu của Việt Nam nên hiện nay chưa có công bố nào trên Ngân hàng gen Quốc tế, do đó đây là những trình tự đầu tiên của loài Đinh mật

được công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế, đóng góp vào hệ thống cơ sở dữ liệu về ADN mã vạch của thực vật.

Trình tự *trnH-psbA* của loài Đinh mật tại Thái Nguyên tương đồng 100% với loài Đinh mật tại Thượng Tiên, Hòa Bình được công bố trên Ngân hàng ADN Việt Nam (VNADNBANK).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). Sách Đỏ Việt Nam, Phần II – Thực vật. NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
2. Hà Văn Huân (2015). Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử ADN mã vạch trong phân tích đa dạng di truyền và giám định sinh vật ở Việt Nam. Ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam.
3. Nguyễn Tiến Bản (2003). Danh mục các loài thực vật Việt Nam, tập II. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Bản, Vũ Xuân Phương, Nguyễn Khắc Khôi, Dương Đức Huyền, Trần Thế Bách, Đỗ Thị Xuyên, Trần Thị Phương Anh (1996, 2007). Những loài thực vật có nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng ngoài thiên nhiên ở Việt Nam và biện pháp bảo tồn. Trang web Trung tâm dữ liệu thực vật Việt Nam, cập ngày 20/10/2013.
5. Phạm Hoàng Hộ (1999-2003). Cây cỏ Việt Nam, Quyển 1-3. NXB Trẻ, TP. Hồ Chí Minh.
6. UBND tỉnh Thái Nguyên (2013) Quyết định số 2150/QĐ-UBND ngày 18/10/2013, phê duyệt Đề án khung nhiệm vụ khoa học và công nghệ về quỹ gen cấp tỉnh giai đoạn 2014-2020.
7. CBOL plant working group (2009). A DNA barcode for land plants, 106: 12794-12797.
8. Costion C. M, Kress W. J, Crayn D. M (2016). DNA barcodes confirm the taxonomic and conservation status of a species of tree on the brink of extinction in the Pacific.
9. Chase M. W., Nicolas S., Mike W., James M. D., Rao P. K., Nadia H., and Vincent S. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360 (1462), 1889-1895.
10. Hall T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
11. Kress W. J., Erickson D. L. (2008). DNA barcodes: Gens, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8), 2761-2762.
12. Krishnamurthy P. K, Francis R. A. (2012). A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation* 21, 1901– 1919.
13. Jiao L., Yu M., Wiedenhoef C. A., He T., Li J., Liu B., Jiang X., Yin Y. (2018). DNA barcode Authentication and Library Development for the Wood of Six Commercial Pterocarpus Species: The Critical Role of Xylarium Specimens. *Scientific Reports* 8(1), 265.
14. Liu Z. F., Ci X. Q, Li L., Li H. W., Conran J. G., Li J. (2016). DNA barcoding evaluation and implication for phylogenetic relationships in Lauraceae from China. *PLoS ONE* 12 (4), e0175788.
15. Nybom H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13, 1143–1155.
16. Storchova H., M. S. Olson (2007). The architecture of the chloroplast psbA-trnH non coding region in angiosperms. *Plant systematic and evolution. Biomedical and life sciences*, 268, No 1-4, 235-256.
17. Taberlet P., Eric C., François P., Ludovic G., Christian M., Alice V., Thierry V., Gérard C., Christian B., and Eske W. (2007). Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res*, 35(3), 14.
18. Van DeWiel C. C. M., Van Der Schoot J., Van Valkenburg J. L., Duistermaat C. H., Smulders (2009). DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L.f.), from non-invasive relatives. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1086-1091.
19. Vijayan K. and Tsou C. H. (2010). DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current science*, 99, 1530 - 1540.
20. Wang W., Wu Y., Yan Y., Ermakova M., Kerstetter R. (2010). DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biology*, 10, 205.
21. Dong W., Xu C., Li C., Sun J., Zuo Y., Shi S., Cheng T., Guo J., Zhou S. (2015). *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific reports*, 5, 8348. doi: 10.1038/srep0834.
22. Wu F. Q., Shen S. K., Zhang X. J., Wang Y. H., Sun W. B. (2015). Genetic diversity and population structure of an extremely endangered species: the world's *Rhododendron*. *AoB Plants*, 7, 10696–10700.
23. Pang X., Song J., Zhu Y., Xu H., Huang L., Chen S. (2011). Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics*, 27, 165–170. doi: 10.1111/j.1096-0031.2010.00328.x
24. Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J. (2010). Use of *ITS2* region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE*, 5, 13102.
25. Yong H. L., Jinlan R., Shilin C., Jingyuan S., Kun L., Dong L. and Hui Y. (2010). Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2706-2709.

26. Zhang X., Yang L., Liu Y.H., Zhou X. L., Zhang L.Q., Wang Y.H., Shen S.K. (2021). Genetic diversity, genetic structure, and demographic history of *Cinnamomum chago*, a plant species with extremely small populations in China. *Global Ecology and Conservation*, 31. e01808.
27. Liu Z., Chen L. S., Song Y. J., Zhang J. S., Chen L. K. (2012). Application of deoxyribonucleic acid barcoding in Lauraceae plants. *Pharmacogn Mag*, 8(29), 4–11.doi: 10.4103/0973-1296.93301.

RESEARCH FOR IDENTIFICATION OF SOME DNA BARCODES OF *Fernandoa brilletii* SPECIES IN THAI NGUYEN PROVINCE

Ha Bich Hong¹, Nguyen The Huong¹, Vu Pham Thao Vy², Vu Van Thong³

¹Vietnam National University of Forestry

²Thai Nguyen Central General Hospital

³Vy Anh Agriculture Development Limited Liability Company

SUMMARY

Fernandoa brilletii (Dop) Steen is an endemic tree species in Vietnam with high economic value, its trunk is used in construction and high-class furniture making due to its beautiful wood grain and good quality. This is a highly endangered plant species in the wild but so far has not been included in the Vietnam Red Book. Therefore, studies for the evaluation of genetic diversity are necessary to propose measures to conserve the genetic resources of *F. brilletii* species in the whole country in general and in Thai Nguyen province in particular. Currently, barcoded DNA has been used as molecular markers with high accuracy in species identification and genetic diversity assessment. In plants, the DNA sequences used as barcoding in identification or classification are usually the nucleotide sequences of the chloroplast and nuclear genomes, including both coding and non-coding regions. In this study, three barcoded DNA marker *matK*, *trnH-psbA* and *ITS* were used to initially study the barcoded DNA for *F. brilletii* species distributed in Thai Nguyen province. The cloning efficiency by PCR and nucleotide sequencing of three barcoded DNA markers in *F. brilletii* species reached 100%. In which, the nucleotide sequences of *matK* and *trnH-psbA* gene segments of all *F. brilletii* samples in 5 districts of Thai Nguyen province have an absolute similarity. Particularly, the nucleotide sequence of the *ITS* barcode showed the appearance of two variants with two different nucleotide positions between the studied *F. brilletii* samples. The *matK*, *trnH-psbA*, and *ITS* sequences of *F. brilletii* species were successfully registered on the international gene bank (GenBank) with codes ON603621, ON603622, ON614190, ON614191, respectively. The world database of barcoded DNA as well as the international gene bank has not yet published any barcoded DNA sequences of *F. brilletii* species. Therefore, this study is the first to identify barcoded DNA sequences for this precious and endemic tree species, contributing to enriching the barcode DNA database for the barcoded DNA system of plants.

Keywords: DNA barcode, *Fernandoa brilletii*, *ITS*, *matK*, *trnH-psbA*.

Ngày nhận bài : 09/6/2022

Ngày phản biện : 15/7/2022

Ngày quyết định đăng : 26/7/2022