

**GIÁM ĐỊNH VÀ ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN LOÀI XÁ XỊ
(*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn)
TẠI VƯỜN QUỐC GIA TAM ĐẢO BĂNG CHỈ THỊ ADN MÃ VẠCH**

Hà Bích Hồng¹, Nguyễn Thế Hưởng¹, Nguyễn Thị Lan Anh²,
Phùng Văn Phê¹, Hoàng Văn Sâm¹, Nguyễn Xuân Vinh³

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

²Công ty TNHH Vestergaard Frandsen Vietnam

³Trường THPT Chương Mỹ A

TÓM TẮT

Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) là loài cây gỗ cao cấp cho giá trị kinh tế cao, có nguồn gen hiếm được xếp trong nhóm IIA (Nghị định 06/2019/NĐ-CP của Chính phủ năm 2019) và nhóm CR cực kỳ nguy cấp. Loài cây này có khả năng tái sinh tự nhiên kém và bị khai thác bừa bãi để cất tinh dầu nên chúng đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng và cần được bảo tồn, phát triển trong tự nhiên. Trong nghiên cứu này, ba chỉ thị ADN mã vạch là *matK*, *rbcL*, và *trnH-psbA* được sử dụng để giám định và phân tích đa dạng di truyền của các cây Xá xị điều tra được tại vườn quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. Kết quả cho thấy cả ba chỉ thị ADN mã vạch đều cho hiệu quả giám định loài Xá xị, trong đó chỉ thị *trnH-psbA* có hiệu quả giám định loài thấp hơn so với chỉ thị *matK* và *rbcL*. Trình tự *trnH-psbA* được cho là chỉ thị hiệu quả trong phân tích đa dạng di truyền giữa các cây Xá xị tại Vườn quốc gia Tam Đảo, cụ thể vị trí nucleotide bảo thủ (không biến đổi) giữa 07 mẫu nghiên cứu là 453 nucleotide, còn số vị trí biến đổi là 10 nucleotide với 06 vị trí có ý nghĩa tiến hóa thể hiện sự khác biệt giữa ba mẫu trở lên. Chỉ số đa dạng haplotype tương đối cao ($Hd = 0,9524$) và chỉ số đa dạng nucleotide thấp ($Pi = 0,00926$). Kết quả về giám định và đánh giá đa dạng di truyền loài Xá xị tại Vườn quốc gia Tam đảo là cơ sở khoa học để đưa ra giải pháp bảo tồn và phát triển hữu hiệu loài cây này.

Từ khóa: đa dạng di truyền, ADN mã vạch, Xá xị, *Cinnamomum parthenoxylon*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) là loài cây gỗ, kích thước trung bình hoặc lớn; thân hình trụ thẳng, cao 20-25 m, đường kính thân 40-70 cm; gốc cây phình to và đôi khi có bạnh góc. Vỏ ngoài màu nâu, nâu xám đến xám đậm, thường nứt dọc và bong ra từng mảng; thịt vỏ có màu nâu đỏ nhạt. Lá đơn nguyên, mọc cách; phiến lá hình trứng hay

hình bầu dục thuôn; đầu có mũi nhọn, ngắn; gốc hình nêm hay nêm rộng; hai mặt nhẵn; gân bên 3-8 đôi; cuống lá dài 1,2-3 cm. Cụm hoa dạng chùy hay tán; mọc ở đầu cành hay nách lá; mỗi cụm mang khoảng 10 hoa. Quả mọng, hình cầu, đường kính 0,6-1 cm; đế hình chén, có khía răng, khi chín màu xanh vàng hoặc tím đen (Hình 1).



**Hình 1. Cành mang hoa và quả cây Xá xị ở Tam Đảo, Vĩnh Phúc
(Phùng Văn Phê, 2019)**

Tại Vườn quốc gia Tam Đảo tỉnh Vĩnh Phúc, Xá xị phân bố rải rác chủ yếu thuộc kiểu rừng thứ sinh nhân tác. Số lượng cá thể Xá xị tìm thấy ở đây còn rất ít khoảng 10 cây (Phùng Văn Phê, 2019). Xá xị cho gỗ tốt, có vân đẹp, khi khô ít bị nứt nẻ hay biến dạng, không bị mối mọt, chịu nước, dễ gia công chế biến. Lá dùng làm thuốc

cầm máu, chữa đau dạ dày, phong thấp, mẩn ngứa ngoài da. Quả được dùng chữa cảm, sốt, lỵ, ho gà. Tinh dầu Xá xị được sử dụng rộng rãi trong công nghệ hoá mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm, do đó có giá trị thương mại rất lớn trên thị trường thế giới (Nguyễn Tiên Bản, 2003; Phạm Hoàng Hộ, 1999).

Là loài cây có giá trị kinh tế cao lại cộng thêm khả năng tái sinh tự nhiên kém, bị khai thác bừa bãi để cất tinh dầu làm cho loài Xá xị đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Do vậy, bảo tồn nguồn gen Xá xị là việc làm hết sức cấp thiết. Tuy nhiên, để công tác bảo tồn có hiệu quả, cần phối hợp đồng bộ cả biện pháp bảo tồn ngoại vi và bảo tồn nội vi. Trong đó giải pháp tối ưu và thiết thực nhất đó là nghiên cứu phát triển cùng với các chương trình trồng rừng (Sách Đỏ Việt Nam, 2007). Những nghiên cứu về đặc điểm sinh học, sinh thái và một số biện pháp nhân giống của loài Xá xị đã được thực hiện (Lê Đình Khả, 2003; Phùng Văn Phê, 2012). Tuy nhiên, những nghiên cứu về định danh loài và đánh giá đa dạng di truyền dựa trên các chỉ thị phân tử của cây Xá xị lại chưa được thực hiện tại Việt Nam. Do đó, mục tiêu của đề tài là định danh và nghiên cứu sự đa dạng di truyền loài Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc để đưa ra chiến lược bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây có giá trị này.

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. Điều này có nghĩa là các đoạn gen được sử dụng như một 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. Do đó, ADN mã vạch lý tưởng là một đoạn ADN có trình tự nucleotide ngắn, bắt cặp được với cặp môi được thiết kế đặc hiệu để dễ dàng khuếch đại bằng PCR. 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 là *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* được sử dụng để đánh giá sự đa dạng của các loài cây trong một lô 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 trong lô (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 và Francis, 2012).

Trên đối tượng các loài thuộc họ Long Não (Lauraceae), nhóm nghiên cứu của Liu (Liu et al., 2016) đã sử dụng 04 trình tự ADN mã vạch là *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* và *ITS2* để đánh giá hiệu quả phân biệt loài. Kết quả cho thấy, trình tự *ITS2* không phù hợp để làm mã vạch cho các loài thuộc họ Long não. Trình tự *matK* và *rbcL* có tỷ lệ định danh loài thành công lần lượt là 30,9% và 25,0%. Trong khi đó trình tự *trnH-psbA* có khả năng xác định loài tốt với tỷ lệ đạt 84,0%. Nghiên cứu cũng cho thấy việc sử dụng chỉ thị *trnH-psbA* có hiệu quả xác định loài trong họ Long não cao hơn hẳn các chỉ thị *matK*, *rbcL*, hay sự kết hợp của cả *matK* và *rbcL*. Sudmoon et al. (2014) đã sử dụng các vùng *rpoB*, *rbcL* và *matK* để xác định bảy loài đã biết là *Cinnamomum aromaum* (dầu cassia), *C. camphora* (dầu cây xá xị và lá ho), *C. bejolghota*, *C. tamala*, *C. zeylanicum* (*C. verum*) và *C. burmannii* và bảy loài chưa biết là các loài quế (họ Long não). So sánh với một số trình tự từ Ngân hàng gen, khoảng cách di truyền ở các vùng gen *matK*, *rbcL* và *rpoB* lần lượt là 0,00 đến 0,52; 0,00 đến 0,36 và 0,00 đến 0,30. Nhưng ba vùng *rpoB*, *rbcL* và *matK* không thể được sử dụng để xác định nhóm loài *Cinnamomum* vì không có sự khác biệt về trình tự giữa nhiều loài khác nhau.

Một số nghiên cứu về đa dạng di truyền các loài *Cinnamomum* dựa trên chỉ thị RAPD đối với loài *C. zeylanicum* cho thấy 89% biến đổi di truyền giữa các mẫu nghiên cứu

(Sandigawad và Patil, 2011), chỉ thị EST-SSR đối với loài *C. camphora* tại miền Nam Trung Quốc sử dụng chỉ thị EST-SSR cho thấy sự khác biệt di truyền giữa các quần thể là thấp, chỉ 17% biến đổi được quan sát giữa các quần thể (Zhong et al., 2019), kết hợp chỉ thị EST-SSR và cpADN loài *C. chago* tại tỉnh Vân Nam, Trung Quốc cho thấy 5 quần thể nghiên cứu có mức đa dạng di truyền thấp nhưng sự

khác biệt di truyền đáng kể giữa các quần thể được phát hiện (Zhang et al., 2021).

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Lựa chọn mẫu và cách lấy mẫu

Lá của 07 cây Xá xị được thu thập từ Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. Các mẫu được kí hiệu như sau: VP 01, VP 02, VP 03, VP 04, VP 05, VP 07, và VP 12 (Bảng 1).

Bảng 1. Địa điểm và thời gian thu thập các mẫu Xá xị tại vườn Quốc gia Tam Đảo

STT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu nhận mẫu	Thời gian thu mẫu	Tọa độ	
				Kinh độ (m)	Vĩ độ (m)
1	VP 01	Minh Quang – Tam Đảo	9/2019	565059	2372626
2	VP 02	Minh Quang – Tam Đảo	9/2019	565617	2371482
3	VP 03	Hồ Sơn – Tam Đảo	9/2019	565599	2371517
4	VP 05	Hồ Sơn – Tam Đảo	9/2019	565154	2371501
5	VP 06	Hồ Sơn – Tam Đảo	9/2019	565144	2372595
6	VP 07	Hồ Sơn – Tam Đảo	9/2019	563635	2371620
7	VP 12	Tam Quan – Tam Đảo	9/2019	565800	2373831

(Sử dụng hệ tọa độ VN2000 múi chiếu 3° tỉnh Vĩnh Phúc)

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 Xá xị 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 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

PCR TC1000-G (Biologix) với thành phần bao gồm: 10µl PCR master mix 2X, 1µl mỗi xuôi (10µM) và 1µl mỗi ngược (10µM), 1µl ADN khuôn (50ng), 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-52°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 môi, trình tự nucleotide các môi ADN mã vạch và nhiệt độ gắn môi 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 đoạn gen	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>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	51	460	Sang et al., 1997
	<i>psbA_R</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC			
<i>rbcL</i>	<i>rbcL_F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	52	600	Kress and Erickson, 2007
	<i>rbcL_R</i>	GTAATAATCAAGTCCACCTCG			

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., 2015), 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. Đa dạng nucleotide (Pi) và đa dạng haplotype (Hd) được tính toán dựa trên phần mềm DnaSP v.5.0 (Librado và Rozas, 2009).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN tổng số

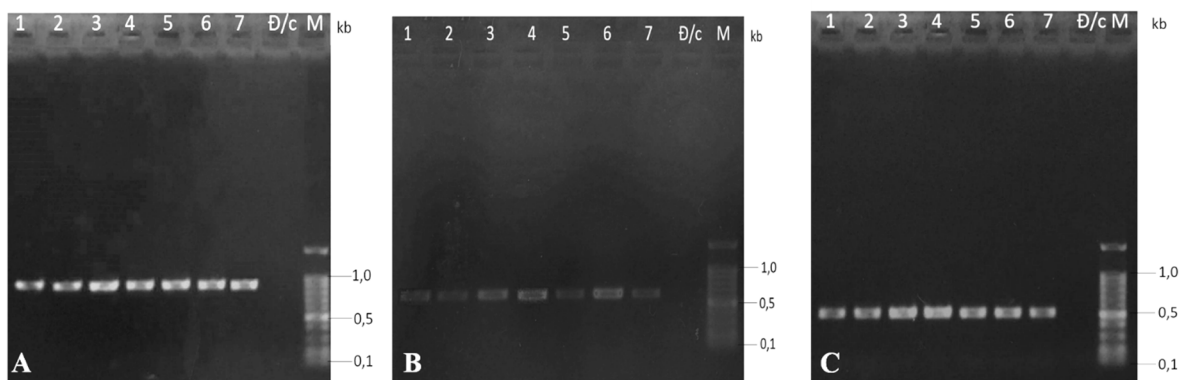
Bước đầu chúng tôi thử nghiệm phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá theo phương pháp CTAB (Saghai-Marooof và cộng sự, 1984), sử dụng hai nồng độ đệm CTAB khác nhau là 2% và 4% nhưng đều không thu được ADN tổng số. Nguyên nhân có thể là do lá cây Xá xị có nhiều tinh dầu, khi ủ ở nhiệt độ 65°C cùng với đệm CTAB thì hỗn hợp trở nên đặc quánh, dịch thu được sau khi ly tâm cũng có độ nhớt rất cao. Do đó, hiệu quả thu nhận ADN tổng số không cao ở các bước tiếp theo. Kết quả tách chiết ADN tổng số không thành công này đã được kiểm nghiệm thông qua phản ứng PCR sử dụng cặp mồi *matK*_F/R (như trong bảng 1). Chúng tôi thực hiện phản ứng PCR với các nồng độ ADN tổng

số khác nhau nhưng đều không thành công. Qua đây có thể thấy phương pháp CTAB không phù hợp để tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá loài Xá xị.

Sau đó quá trình tách chiết ADN được thực hiện theo chỉ dẫn của bộ Kit tách chiết ADN tổng số “DNA mini kit Qiagen” của Đức. Khi sử dụng phương pháp này ADN tổng số thu được không còn nhớt, dung dịch ADN hòa tan có màu trong chứ không có màu vàng nâu như phương pháp CTAB. Do đặc tính của cây Xá xị (trong cây có tinh dầu) nên trong quá trình tách chiết ADN tổng số thu được rất ít lượng ADN, do đó không thể hiển thị được băng ADN tổng số trên bản gel agarose 1,0%. Khi đo các mẫu ADN tổng số tách chiết được bằng phương pháp quang phổ trên máy Scandrop cho kết quả về nồng độ và độ tinh sạch cũng không tốt (nồng độ rất thấp chỉ từ 1,0 đến 3,0 ng/μl và độ tinh sạch tương ứng với chỉ số A260/A280 đạt dưới 1,5) nên chúng tôi phải tiến hành kiểm tra hiệu quả của việc tách chiết ADN bằng phản ứng PCR với cặp mồi *matK*_F/R. Kết quả thu được tất cả các mẫu ADN tổng số đều xuất hiện sản phẩm PCR là băng ADN có kích thước khoảng 850bp. Từ kết quả PCR này khẳng định đã tách chiết thành công ADN tổng số từ 07 mẫu lá Xá Xị sử dụng bộ Kit “DNA mini kit Qiagen” của Đức. Các mẫu ADN này được sử dụng trực tiếp cho thí nghiệm nhân bản các trình tự ADN mã vạch ở loài Xá xị nghiên cứu.

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

07 mẫu ADN tổng số được tách chiết từ lá của 07 cây Xá xị được sử dụng làm khuôn để nhân bản đoạn gen *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu.



Hình 2. Kết quả nhân bản 03 đoạn trình tự ADN mã vạch của 07 mẫu Xá xị tại Tam Đảo, Vĩnh Phúc ((A): Trình tự *matK*, (B): Trình tự *rbcL*, (C): Trình tự *trnH-psbA*. Giếng 1-7: mẫu VP 01, VP 02, VP 03, VP 04, VP 05, VP 07, và VP 12; M: Thang đo ADN 100bp)

Cặp mồi *matK_F/R* được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR nhân bản đoạn gen *matK* trong 07 mẫu Xá xị, kết quả PCR được thể hiện trên hình 2A. Từ kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *matK* cho thấy cả 07 mẫu Xá xị đều xuất hiện một băng ADN đặc hiệu với kích thước khoảng 850 bp như dự kiến. Mẫu đối chứng âm, trong đó ADN khuôn được thay bằng nước không xuất hiện băng ADN. Kết quả này thể hiện cặp mồi *matK_F/R* rất đặc hiệu và đoạn gen *matK* được nhân bản thành công ở tất cả các mẫu Xá xị nghiên cứu.

Từ kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *rbcL* cho thấy cả 07 mẫu Xá xị đều xuất hiện một băng ADN đặc hiệu với kích thước khoảng 600 bp, băng ADN tương đối rõ nét và tương đồng nhau như dự kiến (Hình 2B). Kết quả này thể hiện cặp mồi *rbcL_F/R* rất đặc hiệu và hiệu quả nhân bản rất cao ở các mẫu Xá xị nghiên cứu.

Hình 2C cho thấy cả 07 mẫu Xá xị đều xuất hiện băng sản phẩm PCR đặc hiệu của cặp mồi *trnH_F/psbA_R*, băng ADN rõ và tương đồng nhau, kích thước băng ADN khoảng 460 bp (khi so sánh với thang ADN chuẩn 100 bp). Kết quả này cho thấy cặp mồi *trnH_F/psbA_R* đặc hiệu và có khả năng nhân bản thành công ở tất cả các mẫu Xá xị nghiên cứu.

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*

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 784 bp với chất lượng giải trình tự tốt. Vì vậy, chúng tôi sử dụng đoạn trình tự có kích thước 784 bp của đoạn gen *matK* để thực hiện phân tích, so sánh. Kết quả so sánh 07 trình tự đoạn gen *matK* của 07 mẫu Xá xị (VP 01, VP 02, VP 03, VP 05, VP 06, VP 07 và VP 12) cho thấy tất cả 07 mẫu có sự tương đồng 100%. Các trình tự này được đăng ký lên GenBank với mã số MZ821041.

Từ kết quả này, chúng tôi lựa chọn trình tự

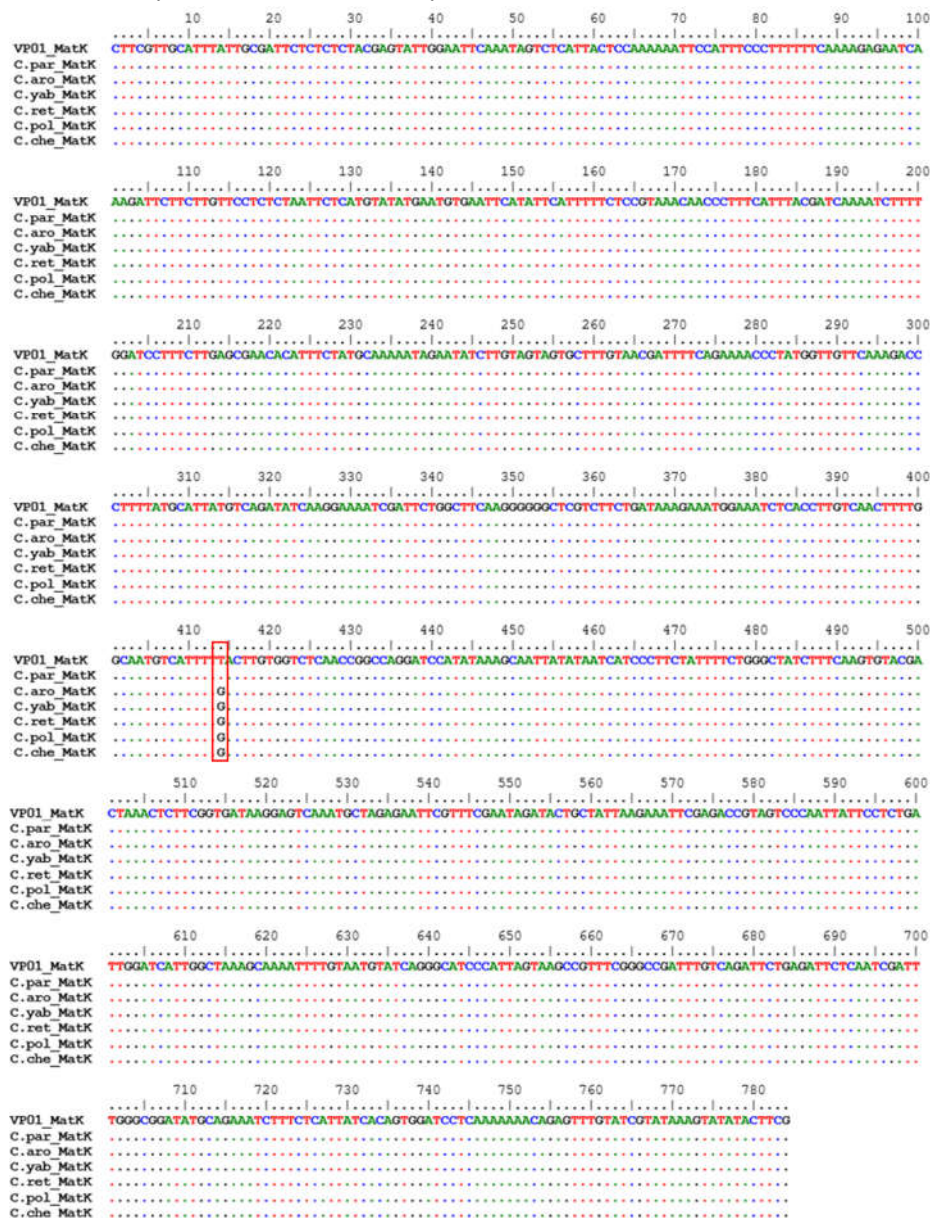
đoạn gen *matK* của mẫu VP 01 làm đại diện để so sánh với các trình tự tương đồng trên GenBank. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen *matK* của các mẫu Xá xị tại Tam Đảo (đại diện là mẫu VP 01) và 06 trình tự *matK* của các loài thuộc chi *Cinnamomum* được thể hiện trên hình 3. Trình tự đoạn gen *matK* của mẫu VP 01 có tỉ lệ tương đồng 100% với loài *Cinnamomum parthenoxylon* (KJ510895.1). Mẫu VP 01 có mức độ sai khác rất nhỏ so với loài *Cinnamomum aromaticum* (NC046019.1); *Cinnamomum yabunikkei* (NC044864.1); *Cinnamomum reticulatum* (MF651971.1); *Cinnamomum polyadepum* (AB924731.1); *Cinnamomum chekiangense* (HQ427409.1) với tỷ lệ phần trăm sai khác về trình tự nucleotide cùng là 0.13%. Vị trí sai khác của mẫu Xá xị nghiên cứu với 05 loài khác cùng thuộc chi *Cinnamomum* được thể hiện tại vị trí số 414, trong đó mẫu Xá xị nghiên cứu và loài *C. parthenoxylon* (KJ510895.1) là nucleotide loại T, còn 05 loài còn lại là nucleotide loại G. Sự khác nhau về một vị trí nucleotide duy nhất giữa mẫu VP 01 và loài *Cinnamomum parthenoxylon* với 05 loài còn lại có thể giả thuyết là do một đột biến thay thế đồng nghĩa đã dẫn đến sự hình thành các loài mới trong chi Long Não và các loài này có cùng nguồn gốc. Như vậy, đoạn trình tự mã vạch *matK* sử dụng trong nghiên cứu này tuy không phân biệt được 5 loài trong chi *Cinnamomum* trên GenBank (*C. aromaticum* (NC046019.1); *C. yabunikkei* (NC044864.1); *C. reticulatum* (MF651971.1); *C. polyadepum* (AB924731.1); *C. chekiangense* (HQ427409.1)) nhưng lại có khả năng phân biệt được loài Xá xị với độ chính xác cao và tương đồng với kết quả định danh dựa theo hình thái do Phùng Văn Phê mô tả (2012). Tại Việt nam, nghiên cứu đa dạng di truyền một số giống hãn dựa trên trình tự *matK* cho thấy một vị trí đột biến dị hoán (T>G) đã có ý nghĩa trong việc nhận dạng 11 giống hãn (Nguyễn Thị Ngọc Lan et al., 2019). Vì vậy, đoạn trình tự *matK* sử dụng trong nghiên cứu này có hiệu quả đối với mục tiêu giám định loài nhưng đoạn trình tự này không phân biệt được các cây Xá xị tại vườn quốc gia Tam Đảo vì trình tự nucleotide của tất cả các mẫu đều giống nhau.

3.3.2. Phân tích trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL*

Sau khi xử lý trình tự, đoạn gen *rbcL* với kích thước 526 bp của 07 mẫu Xá xị nghiên cứu (VP 01, VP 02, VP 03, VP 05, VP 06, VP 07, VP 12) được so sánh và cho kết quả tương đồng 100% về trình tự nucleotide, được đăng ký trên GenBank với mã số MZ821043. Vì vậy, mẫu VP 01 được sử dụng làm đại diện cho tất cả 07 mẫu Xá xị nghiên cứu để so sánh với các trình tự trên Genbank.

Mẫu VP 01 và 05 loài *C. parthenoxylon*, *C. aromaticum*, *C. dubium*, *C. heyneanum*, *C. malabratrum* ở vị trí 38 đều là nucleotide loại A chỉ có loài *C. burmannii* là nucleotide loại C. Ở vị trí 45 và 46 của mẫu VP 01 và 03 loài *C. parthenoxylon*, *C. burmannii*, *C. aromaticum* lần lượt là nucleotide loại G và nucleotide loại

A. Còn 03 loài *C. dubium*, *C. heyneanum*, *C. malabratrum* ở vị trí 45,46 lần lượt là nucleotide loại A và nucleotide loại G. Vị trí 261 ở mẫu VP 01 và 05 loài *C. parthenoxylon*, *C. burmannii*, *C. dubium*, *C. heyneanum*, *C. malabratrum* đều là nucleotide loại T, loài *C. aromaticum* là nucleotide loại C (Hình 4). Qua phân tích sự khác nhau tại các vị trí nucleotide cho thấy mẫu VP01 và loài *C. parthenoxylon* có trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* tương đồng 100%, loài *C. burmannii* và *C. aromaticum* có mức độ tương đồng rất cao (chỉ khác 1 nucleotide), còn ba loài *C. dubium*, *C. heyneanum* và *C. malabratrum* tương đồng 100%.



Hình 3. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* giữa mẫu VP 01 với 06 trình tự tương đồng trên ngân hàng gen

Kết quả cho thấy mẫu VP 01 có sự tương đồng rất cao với loài *Cinnamomum parthenoxylon* (KX546848.1) (100%) và cao với một số loài thuộc chi *Cinnamomum* (99,62% đến 99,81%): tương đồng với *C. burmannii* (KX546826.1) và *C. aromaticum* (KP094936.1) là 99,81%; với loài *C. dubium* (MK243402.1), *C. heyneanum* (KY945255.1), và *C. malabatrums* (KY945245.1) là 99,62%. Sự sai khác về trình tự nucleotide của hai đoạn gen *matK* và *rbcL* giữa các mẫu Xá xị nghiên

cứu với các loài trong chi *Cinnamomum* trên GenBank không nhiều, sự tương đồng 100% của 07 mẫu Xá xị với loài *C. parthenoxylon* được thể hiện rất rõ ràng trong hình 3 và hình 4 khi so sánh trình tự nucleotide. Do đó, cây quan hệ di truyền thể hiện sự tương đồng di truyền cũng như mối quan hệ gần gũi của 07 mẫu Xá xị nghiên cứu với loài *C. parthenoxylon* và các loài khác thuộc chi *Cinnamomum* là không cần thiết.



Hình 4. So sánh trình tự nucleotide đoạn gen *rbcL* của mẫu VP 01 với 06 trình tự tương đồng trên ngân hàng gen

ADN mã vạch được sử dụng rộng rãi trong sinh học thực vật để phân loại các đơn vị phân loại gần nhau. Sự sai khác về trình tự nucleotide trong các vùng tiêu chuẩn đủ để phân biệt thậm chí cả những đơn vị phân loại gần nhau. Tuy nhiên, trong vài trường hợp, sự sai khác về trình tự nucleotide trong các vùng tiêu chuẩn là không đủ để phân biệt các đơn vị

phân loại có quan hệ gần nhau (Chen et al., 2015). Sudmoon et al. (2014) cho rằng đoạn trình tự *matK* và *rbcL* có hiệu quả thấp trong việc phân biệt các loài trong chi *Cinnamomum* vì rất nhiều loài không có sự sai khác về trình tự nucleotide. Chandrasekara et al. (2021) ghi nhận một vị trí nucleotide sai khác duy nhất trong vùng *rbcL* giữa một mẫu của loài *C.*

ovalifolium với một số loài khác thuộc chi *Cinnamomum* tại Sri Lanka và đó là một sự thay thế đồng nghĩa. Trình tự *matK* cho thấy sự sai khác tại 4 vị trí nucleotide trong khi đó trình tự *trnH-psbA* xuất hiện 11 vị trí sai khác nucleotide giữa các loài *Cinnamomum* nghiên cứu. Cả ba trình tự ADN mã vạch đều không đủ để phân loại 8 loài *Cinnamomum* đặc hữu tại Sri Lanka mặc dù kết quả phân tích trình tự nucleotide của từng chỉ thị ADN mã vạch cho thấy sự gần gũi về mặt di truyền của 8 loài nghiên cứu và sự đa dạng bên trong loài khá cao ở một số loài.

Trong nghiên cứu này hai đoạn trình tự *matK* và *rbcL* cũng cho thấy sự sai khác rất nhỏ giữa các loài trong chi *Cinnamomum*, do các gen này đều là những gen chức năng nên trình tự rất bảo thủ, các vị trí sai khác đều là những đột biến thay thế đồng nghĩa. Trình tự *matK* chỉ sai khác một vị trí nucleotide giữa loài Xá xị *C. parthenoxylon* với 05 loài khác thuộc chi *Cinnamomum* trên GenBank, mặc dù cả 05 loài này tương đồng 100% về trình tự nucleotide của đoạn gen *matK*. Còn trình tự *rbcL* cho thấy sự sai khác từ một đến hai nucleotide. Kết quả này bổ sung thêm những bằng chứng về việc sử dụng hiệu quả các trình tự ADN mã vạch ở các loài khác nhau là rất khác nhau, cho dù là các loài cùng thuộc một chi. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu thêm một số trình tự ADN mã vạch khác để có thể khẳng định về sự phân biệt giữa loài *C. parthenoxylon* với các loài khác cùng chi.

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

Đa dạng di truyền giữa 07 mẫu Xá xị dựa trên trình tự *trnH-psbA*

Trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của 7 mẫu Xá xị có sự sai khác tại 10 vị trí nucleotide (Hình 5). Tại các vị trí sai khác có thể nhận thấy mẫu VP 06 và VP 07 có trình tự tương đồng nhau 100%, còn các mẫu khác có sự sai khác một cách ngẫu nhiên. Phân tích trình tự nucleotide của vùng *trnH-psbA* ở các mẫu Xá xị cho kết quả vùng bảo tồn là 453/463 nucleotide, vùng biến đổi là 10/463 nucleotide, trong đó có 4 vị

trí nucleotide khác biệt trên trình tự của một mẫu VP01 với tất cả các mẫu còn lại (vị trí 207, 300, 351, và 436) và 6 vị trí nucleotide có sự khác biệt từ hai mẫu trở lên và đây là vị trí nucleotide biến đổi mang thông tin tiến hóa (parsimony informative sites) tại các vị trí nucleotide số 133, 175, 265, 314, 339 và 408. Trình tự *trnH-psbA* là trình tự không mã hóa nên có sự biến đổi giữa các cá thể cùng loài cũng như biến đổi lớn giữa các loài (Kress and Erickson, 2007).

Chỉ số haplotype (h) là 6, bao gồm haplotype 1: VP 01, haplotype 2: VP 02, haplotype 3: VP 03, haplotype 4: VP 05, haplotype 5: VP 06 và VP07, haplotype 6: VP 12. Đa dạng haplotype (Hd) là 0,9524, chỉ số đa dạng nucleotide (Pi) là 0,00926. Kết quả này cho thấy đa dạng di truyền của quần thể Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo tương đối cao, do đó loài này vẫn có tiềm năng phát triển ngoài tự nhiên khi môi trường thay đổi. Đa dạng di truyền bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố như tuổi đời, phạm vi phân bố, khả năng sinh sản và hệ thống sinh sản của loài (Nybom, 2004; Wu et al., 2015). Đối với quần thể Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo, có thể do hoạt động khai thác quá mức và khả năng tái sinh kém mà loài này có số lượng cá thể ít và phân bố rải rác. Zhang et al. (2021) nghiên cứu đoạn trình tự *trnH-psbA* dài 452 bp của 5 quần thể loài *C. chago* tại Trung Quốc cho thấy sự đa dạng nucleotide tại 13 vị trí, có 4 haplotype trong các quần thể nghiên cứu. Đa dạng di truyền của loài *C. chago* thấp hơn nhiều so với các loài phân bố rộng trong họ Long não như *C. camphora*. Trong nghiên cứu này, tác giả cho rằng các hoạt động gây xáo trộn thường xuyên của con người như sự tàn phá và phân cách môi trường sống tự nhiên trong quần thể có tương quan chặt chẽ với mức độ đa dạng di truyền thấp của loài *C. chago*.

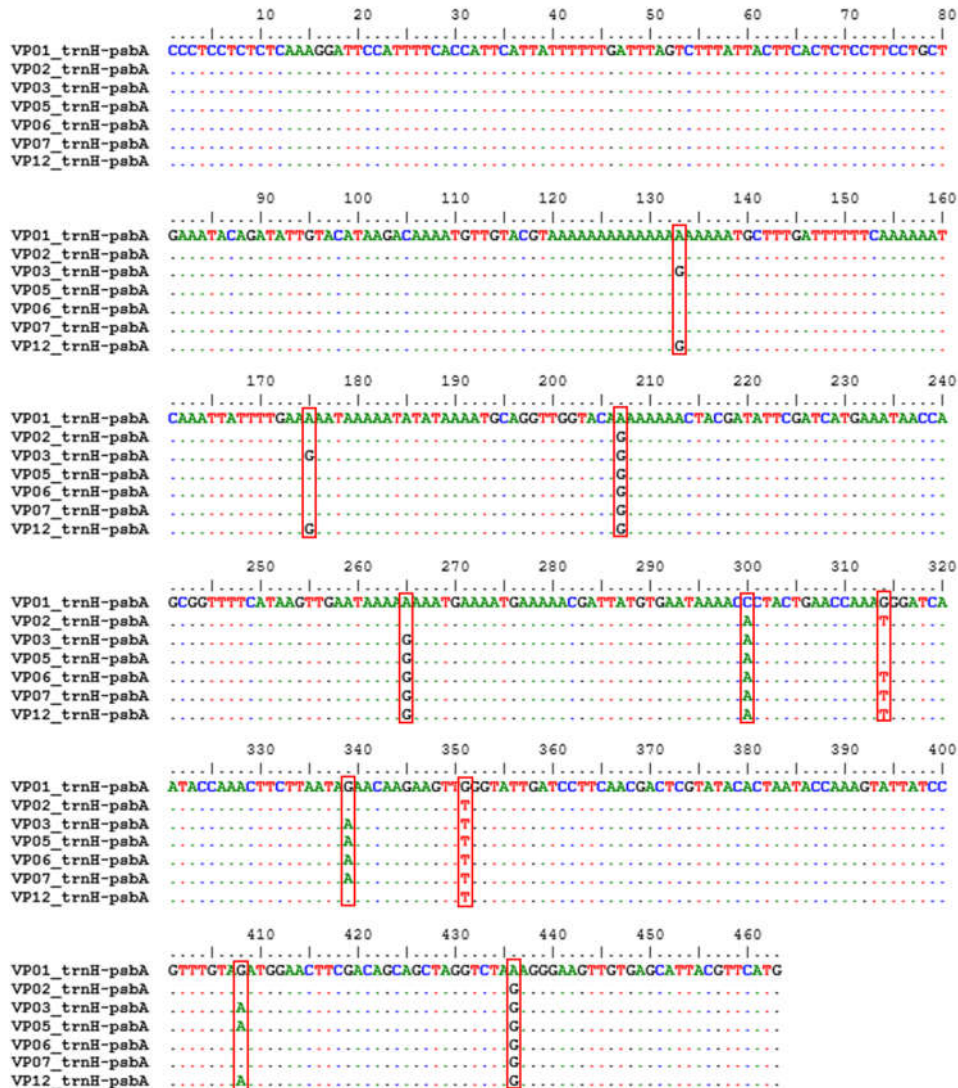
Giám định loài Xá xị dựa trên trình tự *trnH-psbA*

Sử dụng trình tự *trnH-psbA* của 07 mẫu Xá xị nghiên cứu để BLAST, chúng tôi xác định được 07 loài thuộc chi *Cinnamomum* trên

GenBank có mức độ tương đồng cao để xây dựng cây quan hệ di truyền.

Cây quan hệ di truyền được chia làm hai nhóm chính. Nhóm thứ nhất gồm 07 mẫu Xá xị nghiên cứu VP 01, VP 02, VP 03, VP 05, VP 06, VP 07, VP 12 và 05 loài của chi *Cinnamomum* với độ tin cậy cao (bootstrap 100%). Các mẫu Xá xị nghiên cứu không có sự sai khác nhiều về trình tự nucleotide do chúng

có cùng xuất xứ. Trong đó, 07 mẫu Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo có mối quan hệ gần nhất với loài *C. parthenoxylon*, sau đó là hai loài *C. aromaticum* và *C. chago*, và xa hơn là hai loài *C. camphora* và *C. micranthum*. Loài *Cascabela thevetia* được sử dụng như một loài bên ngoài (outgroup) để thể hiện rõ hơn mối quan hệ gần gũi giữa các loài cùng thuộc chi *Cinnamomum* (Hình 6).



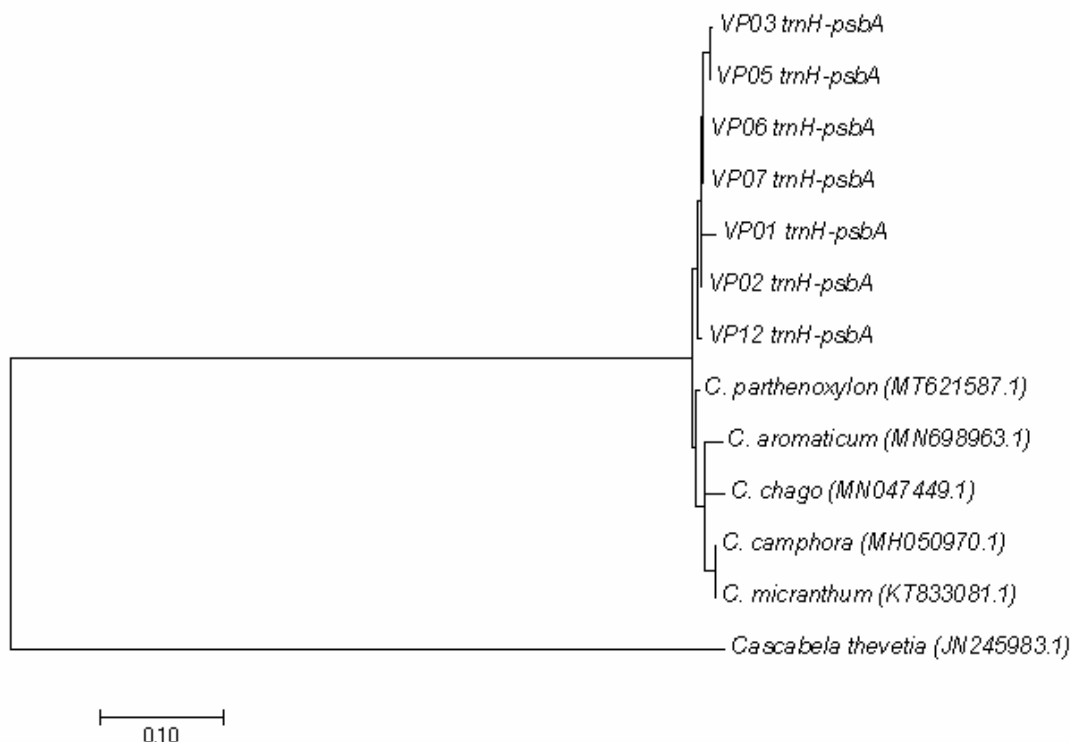
Hình 5. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen trnH-psbA ở 07 mẫu Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo

Như vậy, đoạn trình tự mã vạch *trnH-psbA* cũng cho thấy hiệu quả trong việc giám định loài Xá xị nhưng tỷ lệ tương đồng với loài *C. parthenoxylon* không cao như hai trình tự *matK* và *rbcL* ở trên. Tuy nhiên, đoạn trình tự mã vạch này lại có hiệu quả trong sự đánh giá đa dạng di truyền giữa các cá thể trong cùng xuất xứ, trong cùng một vùng địa lý các cá thể

khác nhau có sự sai khác về trình tự nucleotide. Kết quả này cũng tương tự như 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. 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 và Erickson, 2007).



Hình 6. Cây qua hệ di truyền giữa 07 mẫu Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo và 05 loài tương đồng trên Genbank

4. KẾT LUẬN

- Đã xác định được 03 trình tự ADN mã vạch là trình tự *matK* (mã GenBank: MZ821041), *rbcL* (MZ821043), *trnH-psbA* (MZ821045 và MZ821046) cho loài Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn). Trong đó, bước đầu đánh giá hai trình tự *matK* và *rbcL* có thể sử dụng để giám định loài Xá xị mặc dù sự sai khác chỉ là 1 hoặc 2 nucleotide, còn trình tự *trnH-psbA* cho thấy khả năng giám định loài Xá xị thấp hơn.

- Bước đầu đánh giá được sự đa dạng di truyền của các cây Xá xị tại Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc dựa trên trình tự *trnH-psbA*, trong đó vị trí nucleotide bảo thủ (không biến đổi) giữa 07 mẫu nghiên cứu là 453 nucleotide, còn số vị trí biến đổi là 10 nucleotide. Trong số 10 vị trí nucleotide sai khác thì có 04 vị trí khác biệt giữa hai mẫu và 06 vị trí khác biệt giữa 3 mẫu trở lên, đa dạng haplotype tương đối cao ($H_d = 0,9524$) và đa

dạng nucleotide thấp ($P_i = 0,00926$). Hai trình tự *matK* và *rbcL* không thể hiện bất kỳ sự đa dạng di truyền nào giữa các cây Xá xị nghiên cứu.

Lời cảm ơn

Kinh phí thực hiện đề tài được hỗ trợ bởi nhiệm vụ cấp Quốc gia “Bảo tồn và phát triển nguồn gen Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) tại một số tỉnh miền Bắc” với mã số NVQG-2019/ĐT.14

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Khả (2003) Chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam. *Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội*.
2. Nguyễn Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lan Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Lê Tuấn Nghĩa (2019) Nghiên cứu đa dạng di truyền của đoạn gen *matK* ở một số nguồn gen nhân Việt Nam. *Tạp chí KH&CN Việt Nam* 61 (2): 61-64.
3. Nguyễn Tiên Bản (2003) Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập II. *Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội*.
4. Phạm Hoàng Hộ (1999) Cây cỏ Việt Nam, Quyển 1. *Nhà xuất bản Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh*.

5. Phùng Văn Phê (2012) Nghiên cứu giâm hom cây Xá xị (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.) làm cơ sở cho công tác bảo tồn ở Vườn quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 50 (6): 645-652.
6. Chandrasekara CHWMRB, Naranpanawa DNU, Bandusekara BS, Pushpakumara DKNG, Wijesundera DSA, Bandaranayake PCG (2021) Universal barcoding regions, *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA* do not discriminate *Cinnamomum* species in Sri Lanka. *PLoS ONE* 16(2): e0245592.
7. Chase M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M., Berg C.V.D., Madriñán S., Petersen G., Seberg O., Jørgensen T., Cameron K.M., Carine M., Pedersen N., Hedderson T.A.J., Conrad F., Salazar G.A., Richardson J.E., Hollingsworth M.L., Barraclough T.G., Kelly L., Wilkinson M. (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all DNA plants. *Taxon* 56 (2): 295-299.
8. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5 (1): e8613.
9. Chen J., Erickson D. L., Xia N., Kress W. J. (2015) Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China. *Mol Ecol Resour* 15 (2): 337-348.
10. Costion C, Ford A, Cross H, Crayn D, Harrington M, Lowe A. (2011). Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. *PLoS ONE* 6: e26841.
11. Hall TA. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
12. Hollingsworth M.L., Clark A. (2009) Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven cDNAidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* 9 (2): 439-457.
13. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
14. Kress W.J., Erickson D.L. (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.
15. Krishnamurthy PK, Francis RA. (2012) A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation* 21: 1901–1919.
16. Librado P., Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
17. 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.
18. Nybom H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143–1155.
19. Saghai-Marroof M. A, Soliman K. M, Jørgensen R. A, Allard R. W (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81: 8014–8019.
20. Sandigawad A.M., Patil C.G. (2011) Genetic diversity in *Cinnamomum zeylanicum* Blume. (Lauraceae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology* 10: 3682-3688.
21. Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84: 1120-1136
22. Schoch C.L., Seifert K.A. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-6246.
23. Sudmoon R., Chaveerach A., Sanublo A., Monkheang P., Kwanda N., Aungkapatatamgul S., Taneet T., Noikotr K., Chuachan C., Kaewdoudengdee N. (2014) Identifying Efficiency in Herbal Medicine *Cinnamomum* Species (Lauraceae) Using Banding Patterns and Sequence Alignments of *rpoB*, *rbcL* and *matK* Regions. *Chiang Mai J. Sci.* 41(5.1): 1094-1108, Contributed Paper.
24. 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.
25. Yu, J., Xue J.H., Zhou S.L. (2011) New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics DNA Evolution* 49 (3): 176-181.
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. Zhong Y., Yang A., Li Z., Zhang H., Liu L., Wu Z., Li Y., Liu T., Xu M., Yu F. (2019) Genetic diversity and population genetic structure of *Cinnamomum camphora* in South China revealed by EST-SSR markers. *Forests* 10: f10111019.

**IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT
OF *CINNAMOMUM PARTHENOXYLON* IN TAM DAO NATIONAL PARK
BY DNA BARCODE MARKERS**

**Ha Bich Hong¹, Nguyen The Huong¹, Nguyen Thi Lan Anh²,
Phung Van Phe¹, Hoang Van Sam¹, Nguyen Xuan Vinh³**

¹ Vietnam National University of Forestry

² Vestergaard Frandsen Vietnam Company Limited

³ Chuong My A High School

SUMMARY

Cinnamomum parthenoxylon (Jack) Meisn) is a high-grade tree with high economic value, with rare genetic resources, classified in group IIA (Decree 06/2019/ND-CP of the Government in 2019) and critically endangered CR group (Vietnam Red Book 2007). This species has a poor natural regeneration ability along with the indiscriminate exploitation of *C. parthenoxylon* to store essential oil, making this tree species in danger of extinction. Therefore, this species should be preserved and developed in the wild. In this study, three DNA barcode markers *matK*, *rbcL*, and *trnH-psbA* were used to identify and analyze the genetic diversity of *C. parthenoxylon* investigated in Tam Dao National Park, Vinh Phuc Province. The results showed that all three DNA barcode markers showed high efficiency in the identification of *C. parthenoxylon* species, in which the *trnH-psbA* marker had lower species identification efficiency than *matK* and *rbcL* markers. The *trnH-psbA* sequence was found to be an effective marker in the analysis of genetic diversity among *C. parthenoxylon* plants in Tam Dao National Park, specifically, the conserved nucleotide position between 07 samples is 453 nucleotides, and the number of variable sites is 10 nucleotides with 6 parsimony informative sites showing differences between three or more samples. The haplotype diversity index was relatively high ($Hd = 0.9524$) and the nucleotide diversity index was low ($Pi = 0.00926$). The results of the genetic diversity assessment of *C. parthenoxylon* in Tam Dao National Park are the scientific basis for an effective conservation solution for this plant.

Keywords: *Cinnamomum parthenoxylon*, Genetic diversity, DNA barcode.

Ngày nhận bài : 23/8/2021

Ngày phản biện : 20/9/2021

Ngày quyết định đăng : 22/10/2021