

Đánh giá hiệu quả giám định loài Chò nâu (*Dipterocarpus retusus*)

tại tỉnh Thái Nguyên của một số chỉ thị DNA mã vạch

Bê Thị Cúc¹, Hà Bích Hồng², Nguyễn Thế Hưởng², Lương Thị Thu Trang², Vũ Văn Thông³

¹Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

²Trường Đại học Lâm nghiệp

³Công ty TNHH Phát triển Nông nghiệp Vy Anh

Assessment of indentified effectiveness *Dipterocarpus retusus* species

in Thai Nguyen province of some DNA barcode markers

Be Thi Cuc¹, Ha Bich Hong², Nguyen The Huong², Luong Thi Thu Trang², Vu Van Thong³

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

²Vietnam National University of Forestry

³Vy Anh Agriculture Development Limited Liability Company

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuaf.12.5.2023.018-028>

TÓM TẮT

Các loài cây họ dầu được coi là loài ưu tiên bảo tồn ở nhiều quốc gia trong phạm vi phân bố tự nhiên của loài. Trong các loài cây họ Dầu, Chò nâu là cây gỗ lớn có giá trị kinh tế cao so với các loài cây gỗ khác. Hiện trạng loài cây Chò nâu ở Thái Nguyên còn lại rất ít, phân bố rải rác ở các vườn rừng, rừng tự nhiên thứ sinh. Trong nghiên cứu này, 03 trình tự DNA mã vạch là *matK*, *trnH-psbA* và *ITS2* của 12 cây Chò nâu tại Thái Nguyên được nhân bản và giải trình tự nucleotide thành công. Trình tự *matK* và *trnH-psbA* tương đồng 100% giữa các mẫu Chò nâu nghiên cứu, với kích thước tương ứng là 814 bp và 292 bp. Trình tự *ITS2* dài 377 bp thể hiện sự sai khác tại 13 vị trí nucleotide giữa các mẫu Chò nâu. Hiệu quả giám định loài Chò nâu tại Thái Nguyên của ba trình tự DNA mã vạch được đánh giá theo thứ tự như sau: *matK* > *trnH-psbA* > *ITS2*. Các trình tự DNA mã vạch của loài Chò nâu tại Thái Nguyên được đăng ký thành công trên GenBank là *matK* mã số OQ606887, *trnH-psbA* có mã số OQ606888 và *ITS2* với các mã số OR335043, OR335044, OR335045. Việc giám định chính xác loài Chò nâu dựa trên chỉ thị DNA mã vạch là một nội dung quan trọng phục vụ công tác bảo tồn và phát triển loài cây này tại Thái Nguyên nói riêng và trên cả nước nói chung.

ABSTRACT

Hollong (*Dipterocarpus retusus*) is a large tree with high economic value compared to other species of the Dipterocarpaceae family. Hollong tree brings high use value, almost all parts of the tree such as trunk, root, branches, leaves, sapwood are used. Hollong species are considered conservation priority species in many countries within their natural range. There are very few remaining species of Hollong in Thai Nguyen, scattered in forest gardens and secondary natural forests. In this study, 03 DNA barcoding sequences *matK*, *trnH-psbA* and *ITS2* of 12 Hollong plants in Thai Nguyen were cloned and nucleotide sequenced successfully. The *matK* and *trnH-psbA* sequences were 100% similar to the studied Hollong samples, with sizes of 814 bp and 292 bp, respectively. The *ITS2* sequence is 377 bp long, showing the difference at 13 nucleotide positions between the Hollong samples. The effectiveness of identification of the Hollong species in Thai Nguyen of three DNA barcoded sequences was evaluated in the following order: *matK* > *trnH-psbA* > *ITS2*. The barcoded DNA sequences of the Hollong species in Thai Nguyen successfully registered on GenBank are *matK* with accession number OQ606887, *trnH-psbA* with OQ606888 and *ITS2* with OR335043, OR335044, OR335045. Accurate identification of *D. retusus* species based on barcoded DNA marker is an important content serving the conservation and development of this plant species in Thai Nguyen province in particular and across the country in general.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 26/07/2023

Ngày phản biện: 28/08/2023

Ngày quyết định đăng: 08/09/2023

Từ khóa:

Chò nâu, *Dipterocarpus retusus*, DNA mã vạch, *ITS2*, *matK*, *trnH-psbA*.

Keywords:

Dipterocarpus retusus, DNA barcode, Hollong, *ITS2*, *matK*, *trnH-psbA*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ Dầu (*Dipterocarpaceae*) là một họ của 17 chi và khoảng 580-680 loài cây thân gỗ chủ yếu mọc ở vùng đất thấp, rừng thường xanh ẩm ướt và rừng trên núi. Loài Chò nâu (*Dipterocarpus retusus*) có nguồn gốc từ Châu Á, được tìm thấy ở Ấn Độ, trên khắp Đông Dương và các tỉnh thuộc Tây Tạng và Vân Nam của Trung Quốc [1]. Loài này cũng được tìm thấy trên các đảo của Indonesia. Phân bố ở độ cao từ 300 m đến 1500 m so với mặt nước biển và có phạm vi xuất hiện ước tính (EOO) vượt quá 4 triệu km². Ở Việt Nam, cây Chò nâu mọc ở các tỉnh như Sơn La, Yên Bái, Hà Giang, Tuyên Quang, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Phú Thọ, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Hoà Bình, Hà Nội, Quảng Bình, Đà Nẵng, Quảng Nam. Tập trung nhất ở tỉnh Bắc Kạn, Thái Nguyên. Hiện trạng loài Chò nâu ở Thái Nguyên còn lại không nhiều, phân bố rải rác ở các vườn rừng, rừng tự nhiên thứ sinh tại các huyện Võ Nhai (Nghinh Tường, Sảng Mộc, Vũ Chân...), Đồng Hỷ (Văn Lãng, Văn Hán, Cây Thị, Trại Cau), Định Hóa (Phú Đình, Bảo Linh, Bảo Cường, Diềm Mặc, Phượng Tiến), Phú Lương (Vô Chanh, Tứ Chanh, Hợp Thành, Ôn Lương) và Đại Từ (Quân Chu, Bản Ngoại, Bình Thuận, Ký Phú, Lục Ba, Phú Lạc...). Tuy nhiên, tại các địa điểm đã khảo sát chỉ bắt gặp những cá thể Chò nâu đơn lẻ sống chung với các loài cây khác như Trường sinh, Chò chỉ, Đái bò, Phân mã, Máu chó lá to... mà không bắt gặp bất kỳ một quần thể Chò nâu nào (trừ quần thể Chò nâu ở xóm Đồng Tâm, xã Tứ Chanh).

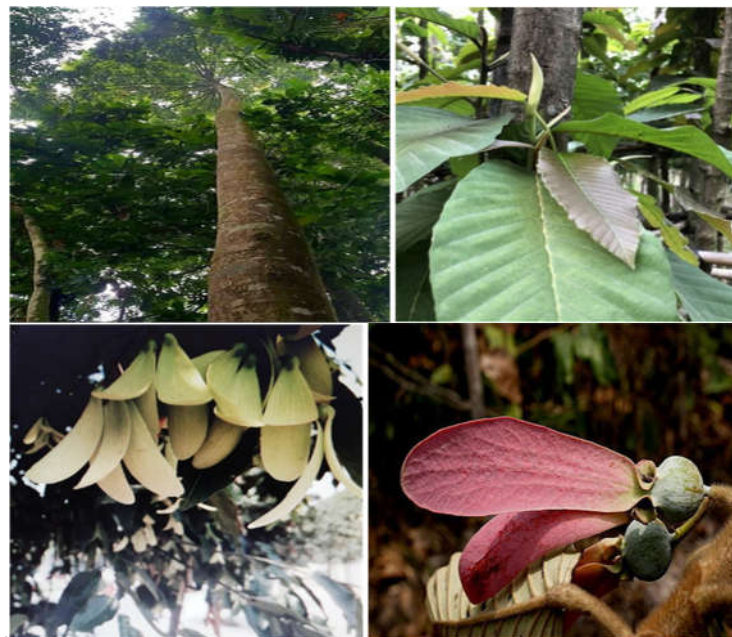
Sách Đỏ Việt Nam (2007) mô tả cây Chò nâu: thuộc cây gỗ lớn, cao 30 – 40 m, đường kính tới 1 m. Thân thẳng, hình trụ, phân cành cao; tán thưa, hình cầu. Cành non mập, phủ lông dày nhưng sớm rụng. Lá hình trái xoan hay trái xoan thuôn, dài 20 – 40 cm, rộng 15 – 25 cm, mép lượn sóng. Gân bên 15 – 20 đôi, có lông cứng, nổi rõ ở mặt dưới. Cuống lá dài 3 – 4 cm, khi non có lông, khi già màu đen, không lông. Lá kèm lớn, hình

búp, dài 8 – 12 cm. Cụm hoa hình chùm, ống đài hình cầu, dài 2,5 cm, rộng 2 cm. Quả hình trứng hơi tròn, đường kính 2 – 3 cm, 5 thùy đài tồn tại, trong đó 3 thùy tiêu giảm, hình tim, đỉnh tròn, dài 0,7 cm; 2 thùy phát triển mạnh thành cánh, dài 15 – 20 cm, rộng 2 – 3 cm, có 3 gân rõ. Mùa hoa tháng 1 - 2, mùa quả tháng 8 – 9 [2]. Cây mọc ở độ cao từ 100 - 1000 m, tập trung nhất ở 300 - 700 m, ưa đất sâu, dày, thoát nước. Đây là loài cây ưa sáng, mọc với tốc độ tương đối nhanh, khi non hơi ưa bóng. Tái sinh tự nhiên tốt trên các đất rừng mới khai thác vì cây mẹ thường cho nhiều quả và khả năng phát tán tốt của quả. Là loài cây gỗ lớn có thể cao tới 50 m [3]. Chò nâu đang bị đe dọa do mất môi trường sống và bị chia cắt. Môi trường sống bản địa của nó đang tiếp tục suy giảm về diện tích, mức độ và chất lượng do giải phóng mặt bằng để mở rộng đất nông nghiệp. Loài này cũng có nguy cơ bị khai thác chọn lọc để lấy gỗ. Trước tình hình đó, việc bảo tồn và phát triển loài Chò nâu là một nhiệm vụ cấp thiết đối với tỉnh Thái Nguyên và việc giám định chính xác loài bằng các chỉ thị phân tử hiện đại như DNA mã vạch để bảo tồn, phát triển là rất quan trọng.

DNA mã vạch trên đối tượng thực vật đã được công bố tương đối nhiều với các trình tự như *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS*, *ITS1*, *ITS2*, *trnL-trnF*... [4]. Các loài cây họ dầu được coi là loài ưu tiên bảo tồn ở nhiều quốc gia trong phạm vi phân bố tự nhiên của loài [5]. Các loài cây họ dầu cũng được nghiên cứu phân loại dựa trên các chỉ thị DNA mã vạch [6, 7]. Trình tự *matK* được sử dụng làm mã vạch DNA để xác định các loài Dipterocarpaceae ở Việt Nam. Kết quả phân tích 33 cây, đại diện cho 11 loài (8 trong chi *Dipterocarpus*, 1 trong *Hopea* và 1 trong *Vatica*), cho thấy sự khác biệt trong và giữa các loài *Dipterocarpus* là thấp, với mức trung bình là 0,08% và 0,19%, rất ít sự khác biệt về trình tự giữa hầu hết các loài *Dipterocarpus* [8]. Sử dụng các trình tự *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF* và *ITS2*

để nhận dạng các mẫu từ họ Dipterocarpaceae. Kết quả thu được 899 trình tự từ 244 loài cho 14 chi kết hợp với trình tự từ GenBank, trong đó trình tự *ITS2* cho thấy hiệu quả nhận dạng cao nhất. Trình tự *matK* cho thấy sự biến đổi di truyền rõ ràng và hiệu quả giải trình tự cũng như khuếch đại là 100%, đồng thời khả năng nhận dạng của nó cao hơn so với các dấu hiệu lục lạp khác. *ITS2* và *matK* là các chỉ thị thích hợp cho các cây nhiệt đới thuộc họ Dầu Dipterocarpaceae [9]. Trình tự *matK*, *rbcL* và *trnL-F* được sử dụng để đánh giá hiệu quả của DNA mã vạch trong việc xác định các loài họ dầu ở Sumatra, Indonesia. Kết quả cho thấy phù hợp với nhận dạng hình thái cho các nhánh *Anthoshorea*, *Hopea*, *Richetia*, *Parashorea* và *Anisoptera*, những dấu hiệu này không hiệu quả để giải quyết các mối quan hệ trong nhóm Rubroshorea. Khả năng tối đa và các phát sinh loài đã xác định *Shorea* là một chi cận ngành,

Anthoshorea xuất hiện với tư cách là chị em với *Hopea* và *Richetia* là chị em với *Parashorea*. Trình tự *matK* có tốc độ tiến hóa cao hơn so với hai dấu hiệu còn lại được thử nghiệm [10]. Harnelly và cộng sự (2018) phân tích phát sinh loài Dipterocarpaceae tại Trạm nghiên cứu Ketambe, Công viên Quốc gia Gunung Leuser (Sumatra, Indonesia) dựa trên trình tự *rbcL* và *matK*. Kết quả cho thấy, dựa vào nhận dạng hình thái đã phát hiện được 5 loài thuộc họ Dầu Dipterocarpaceae là: *Parashorea lucida*, *Shorea parvifolia*, *Shorea lepidota*, *Shorea johorensis*, và *Hopea Dryobalanoides*. Cây phát sinh loài dựa trên gen *rbcL* cho thấy có 2 nhóm đơn ngành, nhóm thứ nhất là *S. johorensis*, *S. lepidota* và *H. dryobalanoides*; nhóm thứ hai bao gồm *S. parvifolia* và *P. lucida*. Việc tái tạo cây phát sinh loài dựa trên gen *matK* cho thấy *Shorea parvifolia* và *S. johorensis* được tách thành hai nhóm đơn ngành khác nhau [11].



Hình 1. Cây, lá, hoa và quả của loài Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thu nhận và lựa chọn những mẫu lá non và bánh tẻ, không bị sâu bệnh của 12 cây Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên (Bảng 1) làm vật liệu tách

chiết DNA tổng số. Mẫu lá được đựng trong túi nilon kín và bổ sung túi hút ẩm (silica gel), sau đó được đưa về phòng thí nghiệm và bảo quản trong tủ lạnh -20°C cho đến khi tiến hành tách chiết DNA tổng số.

Bảng 1. Danh sách mẫu Chò nâu thu thập tại 5 huyện của tỉnh Thái Nguyên

STT	Kí hiệu mẫu	Tọa độ		Địa điểm thu mẫu	Thời gian thu mẫu	Số lượng mẫu
		Vĩ độ	Kinh độ			
1	CN1	O403117	O2386169	Đại Từ	2022	03
2	CN2	O403149	O2386429			
3	CN3	O403311	O2386629			
4	CN4	O423873	O2404832	Phú Lương	2022	02
5	CN5	O423814	O2404882			
6	CN6	O551429	O2408021	Định Hóa	2022	02
7	CN7	O551652	O2408229			
8	CN8	O586505	O2414679	Đông Hy	2022	02
9	CN9	O587868	O2415327			
10	CN10	O468319	O2421823			
11	CN11	O458466	O2421718	Võ Nhai	2022	03
12	CN12	O610048	O2411877			
Tổng cộng						12

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu lá của cây Chò nâu bằng innuPREP Plant DNA Kit của hãng Analytik Jena, Đức, các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA tổng số được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang (ScanDrop – Annalytik Jena, Đức) và phương pháp điện di trên gel agarose 1,0%.

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

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Biomera Tadvance 96S (Analytik Jena, Đức)

với thể tích mỗi phản ứng là 20 µl, trong đó chứa các thành phần và nồng độ các chất tham gia phản ứng như sau: 10 µl PCR Master mix 2X, 10 µM mỗi xuôi và 10 µM mỗi ngược, 50 ng DNA khuôn, bổ sung H₂O 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 hoặc 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. Trình tự cặp môi sử dụng để nhân bản các trình tự DNA mã vạch được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự và thông tin về cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

Gen đích	Tên môi	Trình tự môi 5' – 3'	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Kích thước đoạn gen (bp)	Tham khảo
<i>matK</i>	<i>matK_F</i>	ACCCAGTCCATCTAGGAAATCTTGGTTC	52	850	Kress & Erickson, 2007
	<i>matK_R</i>	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG			
<i>ITS2</i>	<i>ITS2_F</i>	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	50	400	White et al., 1990
	<i>ITS2_R</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH_F</i>	CGCGCATGGTGGATTACAAATCC	50	300	Sang et al., 1997
	<i>psbA_R</i>	GTTATGGATGAACGTAATGCTC			

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm Redsafe. Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh bằng máy chụp gel Quantum CX5 (Vilber Lourmat, Pháp).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit innuPREP PCR pure Kit (Analytik Jena, Đức).

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được đóng gói trong ống eppendorf 1,5 ml và gửi đến phòng thí nghiệm 1st BASE ở Malaysia để giải trình tự theo cả hai chiều. Trình tự nucleotide của đoạn DNA được xác định bằng máy giải trình tự tự động theo nguyên lý Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

2.2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit v.7.2.5 [12], Mega7 [13] và công cụ BLAST trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

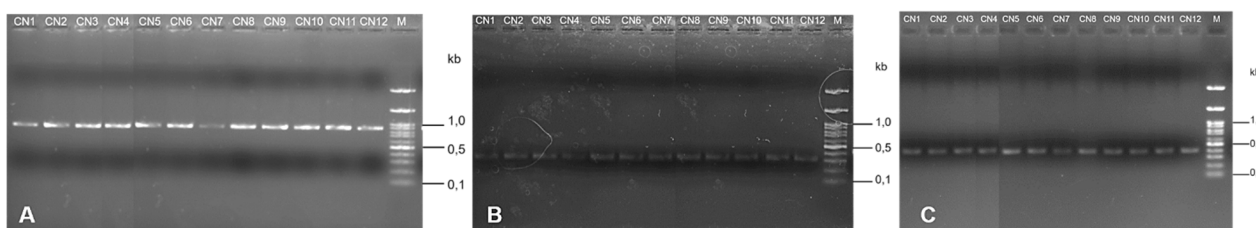
3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Trong nghiên cứu này vật liệu dùng để tách chiết DNA là 12 mẫu lá Chò nâu được thu thập từ 5 huyện của tỉnh Thái Nguyên. Kết quả thu được ở Bảng 3 cho thấy, nồng độ DNA đạt từ 55,85 ng/μl đến 211,40 ng/μl và độ tinh sạch (tỷ số A260/A280) đạt từ 1,64 đến 2,12. Kết quả này cho thấy phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng Kit là phù hợp với mẫu lá cây Chò nâu. Tuy nhiên, lá cây Chò nâu chứa nhiều dầu nên khi tách chiết DNA nhóm tác giả sử dụng một lượng mẫu rất nhỏ, do đó sau quá trình tách chiết DNA tổng số thu được có hàm lượng không được cao, chỉ có 2 mẫu lá tương đối non là thu được hàm lượng trên 200 ng/μl (CN9 và CN12). Tất cả các mẫu DNA tổng số của Chò nâu đều có nồng độ trên 50 ng/μl, đối với những mẫu có hàm lượng DNA cao thì nhóm tác giả tiến hành pha loãng đến hàm lượng 50 ng/μl và sử dụng 1,0 μl cho một phản ứng PCR.

Bảng 3. Hàm lượng và chất lượng DNA tổng số tách chiết từ mẫu máu Gà ri vàng Tân Cương

STT	Địa điểm lấy mẫu	Mẫu	Độ tinh sạch của DNA (OD _{260nm/280nm})	Hàm lượng DNA (ng/μl)
1	Huyện Đại Từ	CN1	1,91	77,65
2		CN2	1,69	75,78
3		CN3	1,83	86,60
4	Huyện Phú Lương	CN4	1,84	78,50
5		CN5	1,85	89,45
6	Huyện Định Hóa	CN6	1,84	59,75
7		CN7	1,73	86,56
8	Huyện Đồng Hỷ	CN8	1,88	55,85
9		CN9	1,64	211,40
10	Huyện Võ Nhai	CN10	1,93	97,65
11		CN11	1,69	73,74
12		CN12	2,12	204,40

3.2. Kết quả khuếch đại các trình tự DNA mã vạch



Hình 2. Kết quả khuếch đại trình tự matK (A), trnH-psbA (B) và ITS2 (C) của loài Chò nâu tại Thái Nguyên

(M: DNA marker 100 bp, giếng 1 – 12 tương ứng với sản phẩm PCR của các mẫu DNA Chò nâu như trên Bảng 3)

Đoạn gen *matK* đã được nhân bản đặc hiệu ở tất cả 12 mẫu nghiên cứu, các băng DNA sáng đều nhau (trừ mẫu CN7 có mờ hơn) và đều có kích thước khoảng 850 bp như tính toán lý thuyết, không xuất hiện băng DNA không đặc hiệu (Hình 2A). Do đó, có thể khẳng định đã nhân bản thành công đoạn gen *matK* ở loài Chò nâu với kích thước khoảng 850 bp. Tương tự, đoạn gen *trnH-psbA* được nhân bản thành công 100% với kích thước khoảng trên 300 bp (Hình 2B) và đoạn *ITS2* nhân bản được là khoảng 400 bp (Hình 2C). Sản phẩm PCR của ba trình tự DNA mã vạch nhân bản từ 12 mẫu Chò nâu sẽ được tinh sạch và giải trình tự nucleotide.

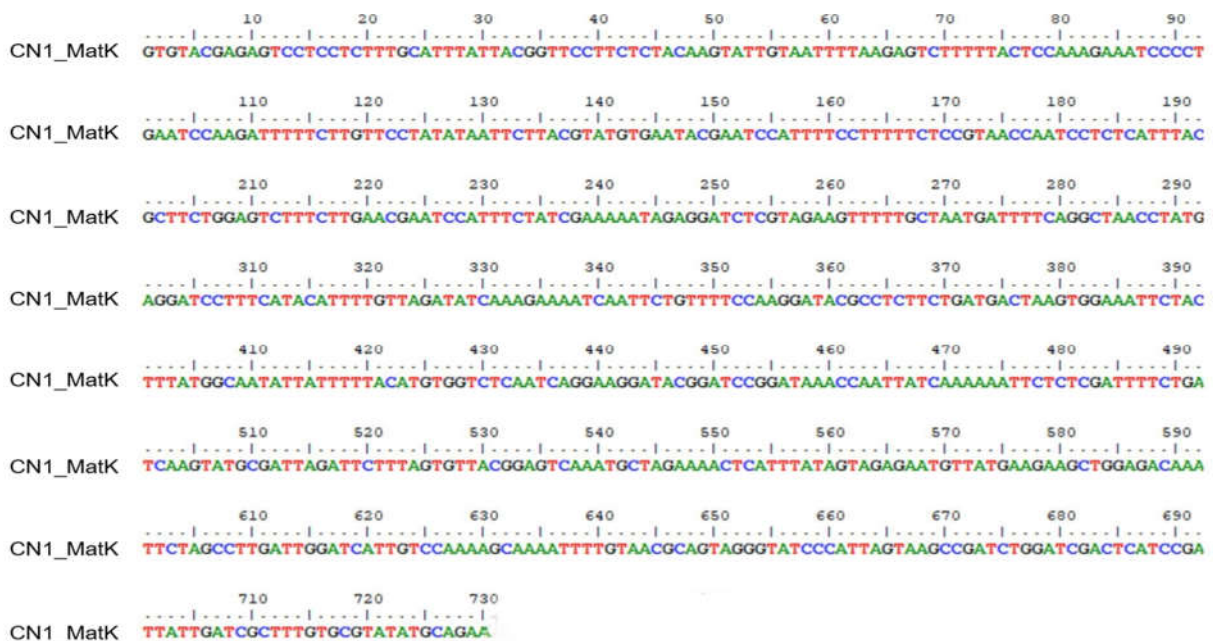
3.3. Trình tự nucleotide của các chỉ thị DNA mã vạch và xây dựng cây quan hệ di truyền với một số loài tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế

3.3.1. Trình tự nucleotide đoạn gen *matK* của loài Chò nâu tại Thái Nguyên

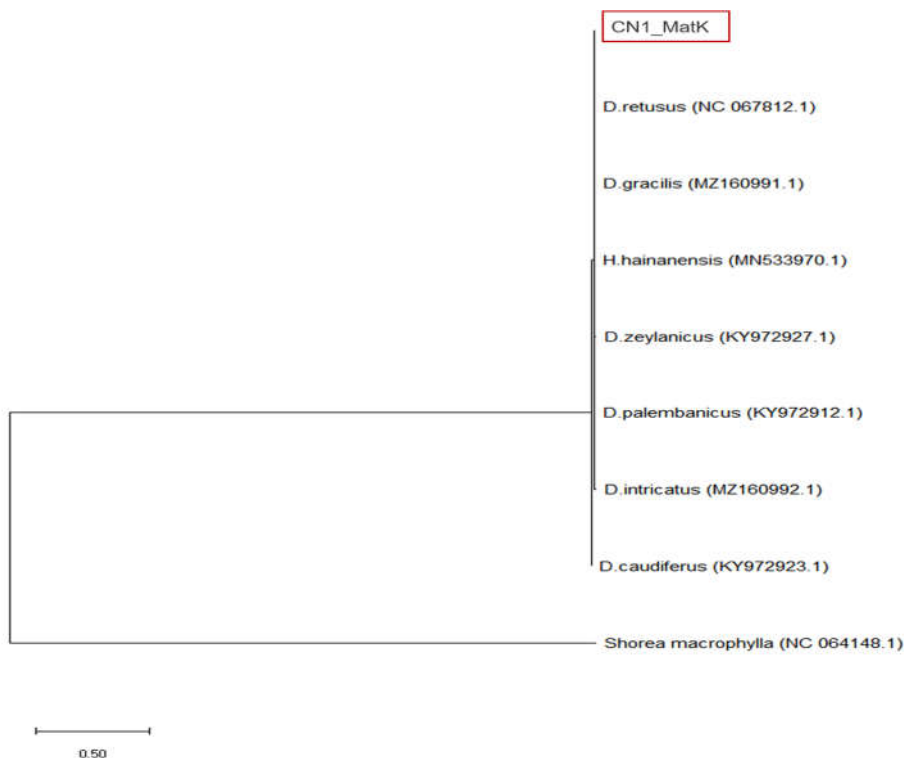
Trình tự gen *matK* của các mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên sau khi được giải trình tự có kích thước khoảng 850 bp nhưng sau khi xử lý các trình tự nucleotide sử dụng phần mềm BioEdit, nhóm tác giả xác định được đoạn trình tự có kích thước 814 bp có chất lượng tốt để phân tích do đoạn trình tự nucleotide ở phần đầu và cuối của đoạn gen thường bị nhiễu nên bị cắt bỏ. Do đó, đoạn *matK* có kích thước 814 bp của tất cả

12 mẫu Chò nâu được so sánh với nhau sử dụng công cụ BioEdit cho thấy trình tự nucleotide của chúng tương đồng 100% và trình tự *matK* của mẫu Chò nâu CN1 được đại diện cho 12 mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên như trên Hình 3. Trình tự này được đăng ký thành công trên GenBank với mã số OQ606887.

Để xây dựng cây quan hệ di truyền dựa trên trình tự *matK*, nghiên cứu này sử dụng mẫu CN1 để so sánh với các trình tự tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế. Kết quả so sánh đã xác định được 07 loài có tỷ lệ tương đồng cao nhất với trình tự *matK* ở mẫu Chò Nâu CN1 đại diện cho nhóm các cá thể tại Thái Nguyên và 01 loài khác chi được sử dụng làm đối chứng (*Shore macrophylla*). Qua cây quan hệ di truyền ta có thể nhận thấy mẫu CN1 là loài Chò Nâu *D. retusus* (NC067812.1) và có quan hệ rất gần với loài *D. gracilis* (MZ160991.1), *Hopea hainanensis* (MN533970.1), *D. turbinatus* (NC_046842.1), *D. zeylanicus* (KY972927.1), *D. caudiferus* (KY972923.1), *D. palembanicus* (KY972912.1). Sử dụng 01 loài xa làm đối chứng *Shore macrophylla* (NC_064148.1) đã cho thấy rõ hơn mối quan hệ di truyền gần gũi giữa mẫu Chò nâu nghiên cứu với các loài thuộc chi Dầu (*Dipterocarpus*), thể hiện ở khoảng cách di truyền rất lớn khi loài đó nằm riêng một nhánh khác (giá trị bootstrap đạt 100%).



Hình 3. Trình tự nucleotide đoạn gen *matK* của các mẫu Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên

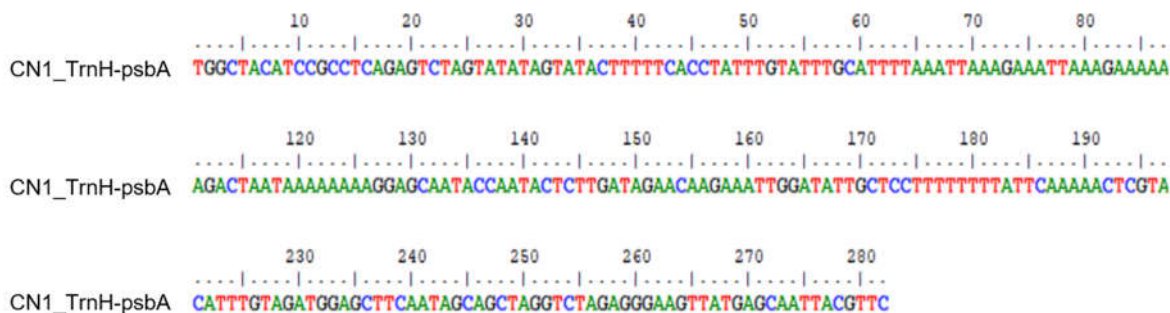


Hình 4. Cây quan hệ di truyền giữa loài Chò Nâu tại tỉnh Thái Nguyên với các loài tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế dựa trên trình tự matK

3.3.2. Trình tự nucleotide của đoạn trnH-psbA ở loài Chò nâu tại Thái Nguyên

Trình tự *trnH-psbA* của các mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên sau khi được nhân bản và giải trình tự nucleotide thành công có kích thước khoảng trên 300 bp. Sau khi xử lý trình tự sử dụng phần mềm BioEdit, chúng tôi xác định được đoạn trình tự có kích thước 292 bp của tất cả 12 mẫu. Tiến hành so sánh đoạn trình tự có

kích thước 292 bp của tất cả 12 mẫu Chò nâu với nhau cho thấy tất cả 12 mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên có độ tương đồng 100% và trình tự này được đăng ký thành công trên GenBank với mã số OQ606888. Trình tự nucleotide của mẫu Chò nâu CN1 đại diện cho nhóm gồm những mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên được thể hiện trên Hình 5.



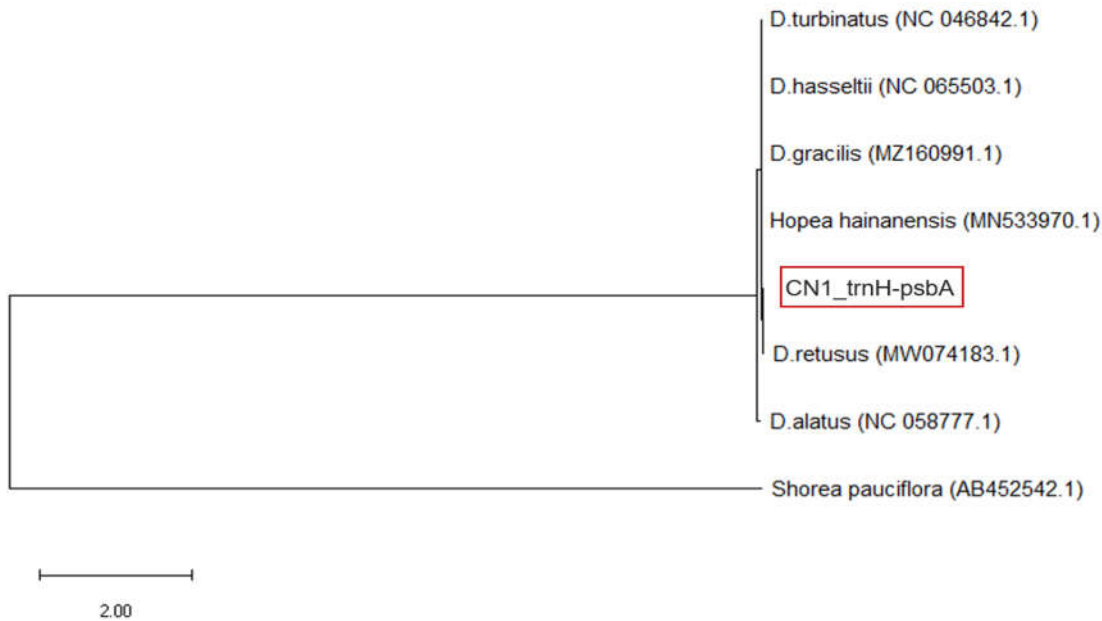
Hình 5. Trình tự nucleotide đoạn gen trnH-psbA của mẫu Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên

Cây quan hệ di truyền giữa loài Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên với 06 loài có độ tương đồng cao nhất và 01 loài đối chứng trên Ngân hàng gen quốc tế được xây dựng dựa trên phần mềm

Mega 7 (Hình 6). Qua cây quan hệ di truyền ta có thể nhận thấy mẫu CN1 có quan hệ di truyền gần nhất với loài Chò nâu *Dipterocarpus retusus* (MW074183.1) và có quan hệ tương đối

gần với loài *Dipterocarpus gracilis* (MZ160991.1), *Dipterocarpus alatus* (NC_058777.1), *Hopea hainanensis* (MN533970.1), *Dipterocarpus turbinatus* (NC_046842.1), *Dipterocarpus hasseltii* (NC_065503.1). Sử dụng 01 loài xa làm đối

chứng *Shorea pauciflora* (AB4452542.1) đã cho ta thấy rõ hơn mối quan hệ di truyền giữa mẫu Chò nâu nghiên cứu với các loài thuộc chi Dầu (*Dipterocarpus*), thể hiện ở khoảng cách di truyền rất lớn khi loài đó nằm riêng một nhánh khác (giá trị bootstrap là 100%).



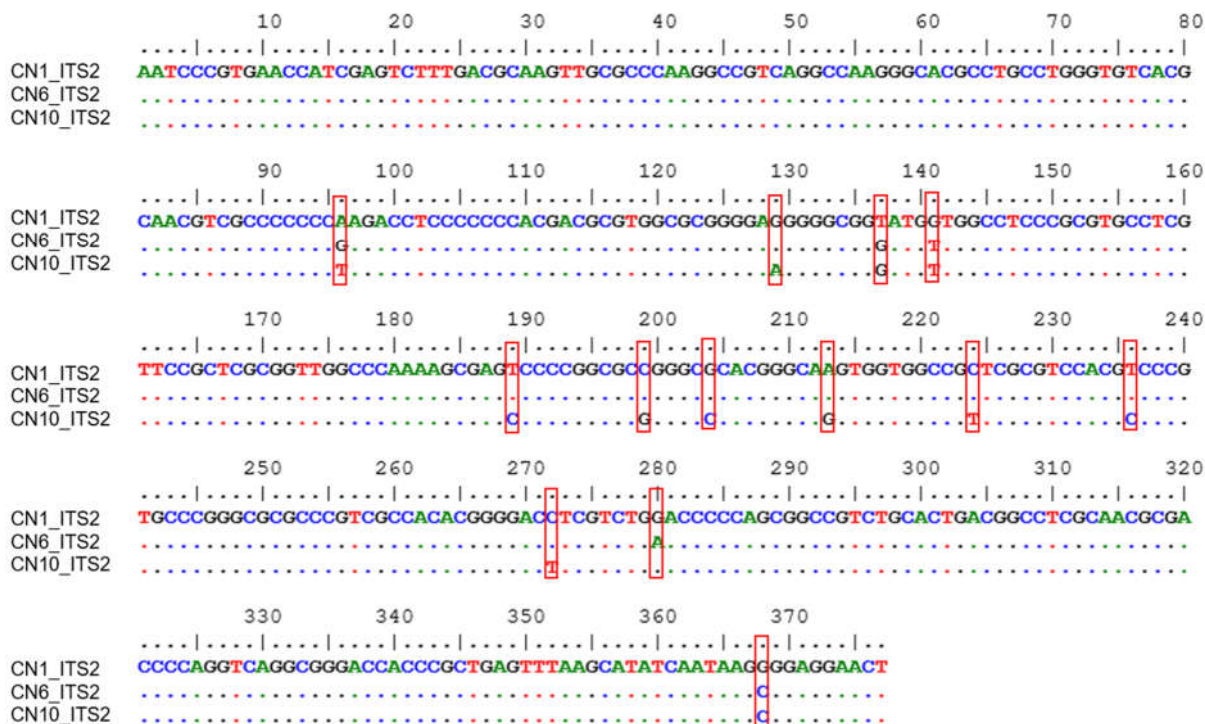
Hình 6. Cây quan hệ di truyền giữa loài Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên với các loài tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế dựa trên trình tự trnH-psbA

3.3.3. Trình tự nucleotide của chỉ thị ITS2 ở loài Chò nâu tại Thái Nguyên

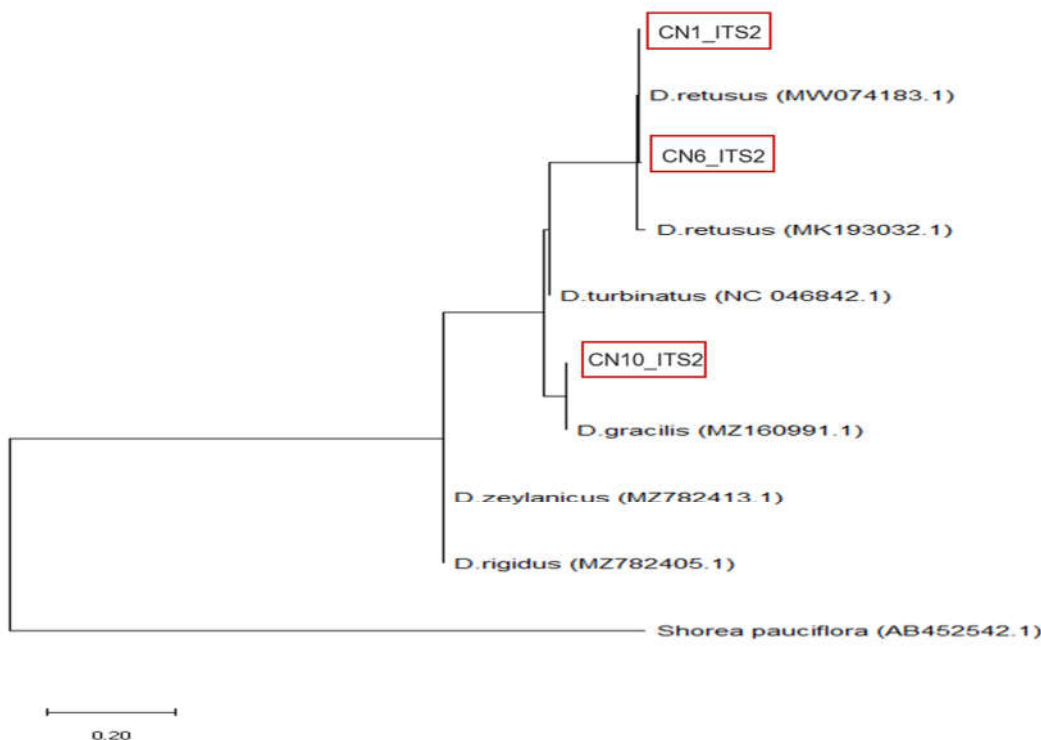
Trình tự ITS2 của các mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên sau khi được nhân bản và giải trình tự nucleotide thành công có kích thước 377 bp. Sử dụng công cụ ClustalW Multiple alignment trên phần mềm BioEdit để so sánh 12 trình tự ITS2 cho thấy chúng có độ tương đồng cao, có 13 vị trí nucleotide sai khác giữa 12 mẫu Chò nâu được thể hiện trên Hình 7. Sự sai khác tại các vị trí nucleotide được thể hiện qua 3 nhóm mẫu như sau: Nhóm 1 (đại diện là mẫu CN1): bao gồm 3 mẫu Chò nâu tại huyện Đại Từ (CN1-CN3), 2 mẫu tại huyện Phú Lương (CN4, CN5); Nhóm 2 (đại diện là mẫu CN6): bao gồm 2 mẫu Chò nâu tại huyện Định Hóa (CN6, CN7) và 2 mẫu tại huyện Đông Hỷ (CN8, CN9); Nhóm 3 (đại diện là mẫu CN10): bao gồm 3 mẫu Chò nâu tại huyện Võ Nhai (VN10-VN12).

Cây quan hệ di truyền giữa 03 mẫu Chò nâu

CN1, CN6 và CN10 (đại diện cho 3 nhóm Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên) với 06 loài có độ tương đồng cao nhất và 01 loài xa trên Ngân hàng gen quốc tế cho thấy mẫu CN1 và CN6 có quan hệ gần nhất với loài Chò Nâu *Dipterocarpus retusus* (MW074183.1 và MK193032.1), trong khi đó mẫu CN10 lại có quan hệ gần nhất với loài *Dipterocarpus gracilis* (MZ160991.1). Tuy nhiên, tất cả các mẫu Chò nâu tại Thái Nguyên và các loài trong chi *Dipterocarpus* đều được nhóm chung vào một nhóm với khoảng cách di truyền thấp (Hình 8). Sử dụng 01 loài xa làm đối chứng *Shorea pauciflora* (AB452542.1) đã cho ta thấy rõ hơn mối quan hệ di truyền giữa mẫu Chò nâu nghiên cứu với các loài thuộc chi Dầu (*Dipterocarpus*), thể hiện ở khoảng cách di truyền rất lớn khi loài đó nằm riêng một nhánh khác (giá trị bootstrap là 100%).



Hình 7. So sánh trình tự các nucleotide đoạn gen ITS2 của 3 mẫu đại diện cho 12 mẫu Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên



Hình 8. Cây quan hệ di truyền giữa loài Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên với các loài có tương đồng trên Ngân hàng gen quốc tế dựa trên trình tự ITS2

3.4. Đánh giá hiệu quả giám định loài Chò nâu tại Thái Nguyên của ba chỉ thị DNA mã vạch

Gen *matK* của loài Chò nâu trong nghiên cứu này được giải trình tự với kích thước 814 bp và

tương đồng 100% ở tất cả 12 mẫu tại Thái Nguyên. Điều này cho thấy ở các vùng sinh thái khác nhau thì trình tự gen *matK* vẫn không bị biến đổi. 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 [14]. Trình tự *matK* của loài Chò nâu tại Thái Nguyên tương đồng 100% với một loài Chò nâu (*Dipterocarpus retusus*) trên GenBank, đồng thời cũng tương đồng 99% với loài *Dipterocarpus gracilis* trên GenBank, do đó có thể thấy khả năng phân biệt 2 loài này trong chi *Dipterocarpus* dựa trên trình tự *matK* hiệu quả.

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 [14]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, trình tự *trnH-psbA* của tất cả 12 mẫu Chò nâu nghiên cứu đều giống nhau 100%. Kết quả này cho thấy trình tự *trnH-psbA* là rất bảo thủ trong loài Chò nâu. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của tác giả Hà Bích Hồng và cộng sự (2022) trên loài Đinh mật [15]. Điều này 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.

Trình tự *ITS2* 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 [16, 17]. Đối với loài Chò nâu thì trình tự *ITS2* cũng giống nhau 364/377 nucleotide giữa 12 mẫu nghiên cứu, có 13/377 vị trí nucleotide sai khác giữa các mẫu. Đây là trình tự có sự biến đổi nhất trong số 03 trình tự DNA mã vạch sử dụng trong nghiên cứu này.

Dựa vào kết quả so sánh trình tự nucleotide của ba chỉ thị DNA mã vạch là *matK*, *trnH-psbA* và *ITS2* của các mẫu Chò nâu nghiên cứu với trình tự nucleotide của loài *Dipterocarpus retusus* công bố trên GenBank cho thấy: trình tự *matK* không có nucleotide sai khác với loài *D. retusus*, tỷ lệ sai khác là 0% và trình tự *trnH-psbA* có 01 vị trí sai khác, chiếm 0,34%. Trong khi đó trình tự *ITS2* có sự sai khác giữa các mẫu Chò nâu nghiên cứu và các mức độ sai khác với loài *D. retusus* trên GenBank, cụ thể nhóm mẫu CN1 tương đồng 100%, nhóm mẫu CN6 tương đồng 99,66% và nhóm mẫu CN10 tương đồng 98,14%. Bảng 4 thể hiện hiệu quả giám định loài Chò nâu dựa trên tỷ lệ phần trăm sai khác về trình tự nucleotide của mẫu Chò nâu nghiên cứu so với loài *D. retusus* đã được công bố trên GenBank.

Bảng 4. So sánh hiệu quả giám định loài Chò nâu của 03 trình tự DNA mã vạch

Chỉ tiêu đánh giá	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>ITS2</i>		
			CN1	CN6	CN10
Tỷ lệ PCR thành công (%)	100	100	100	100	100
Tỷ lệ đọc trình tự thành công (%)	100	100	100	100	100
Chiều dài đoạn trình tự so sánh (bp)	814	292	377	377	377
Số nucleotide sai khác	0	1	0	2	7
Tỷ lệ sai khác (%)	0	0,34	0	0,53	1,86

Xét một cách tổng thể, hiệu quả giám định loài Chò nâu của chỉ thị *matK* là tốt nhất (tỷ lệ sai khác 0%), sau đó đến chỉ thị *trnH-psbA* (tỷ lệ sai khác là 0,34%) và cuối cùng là chỉ thị *ITS2* (tỷ lệ sai khác trung bình là 0,8%). Hu và cộng sự (2019) cho rằng *ITS2* là trình tự có hiệu quả nhận dạng loài cao nhất trong họ Dipterocarpaceae khi sử dụng 4 chỉ thị *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF* và *ITS2* và sử dụng kết hợp *ITS2* với *matK* là thích hợp với các loài cây thuộc họ dầu Dipterocarpaceae [9]. Một số

nghiên cứu giám định loài tại Việt Nam cũng sử dụng các trình tự như *matK*, *trnH-psbA* và *ITS* cho thấy hiệu quả giám định tương đối, bổ sung thêm cơ sở khoa học ở mức độ phân tử cho những nghiên cứu về phân loại thực vật [18, 19].

4. KẾT LUẬN

- Nghiên cứu này phân lập và giải trình tự nucleotide thành công 03 đoạn trình tự DNA mã vạch là *matK*, *trnH-psbA*, và *ITS2* ở 60 mẫu Chò Nâu tại tỉnh Thái Nguyên với kích thước mỗi đoạn tương ứng là 814 bp, 292 bp, và 377

bp; đăng ký thành công trình tự *matK*, *trnH-psbA* và *ITS2* của loài Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên trên ngân hàng gen quốc tế, với các mã số lần lượt là OQ606887, OQ606888, OR335043, OR335044, OR335045;

- Nghiên cứu này giám định được loài Chò nâu có xuất xứ tại Thái Nguyên có tên khoa học là *Dipterocarpus retusus* sử dụng các trình tự DNA mã vạch *matK*, *trnH-psbA*, *ITS2*;

- Hiệu quả giám định loài Chò nâu tại tỉnh Thái Nguyên được sắp xếp theo thứ tự sau: *trnH-psbA* > *matK* > *ITS2*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Nguyễn Tiến Bản (2003). Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.

[2]. Đỗ Tất Lợi (1999). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học.

[3]. Arun P Singh, Lina Gogoi & Jis Sebastain (2015). The seasonality of butterflies in a semi-evergreen forest: Gibbon Wildlife Sanctuary, Assam, Northeastern India. *Journal of Threatened Taxa*. 7(1): 6774-6787.

[4]. CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 12794-12797.

[5]. T Luoma-Aho (2004). Bioversity International. Forest Genetic Resources Conservation and Management: Proceedings of the Asia Pacific Forest Genetic Resources Programme (APFORGEN) Inception Workshop, Kepong, Kuala Lumpur, Malaysia, 15-18 July, 2003.

[6]. Maslin Osathanunkul & Panagiotis Madesis (2021). The identification of several Dipterocarpaceae and Fagaceae trees by barcode DNA coupled with high-resolution melting analysis. *Forests*. 12(11): 1466.

[7]. Nguyen T. P. Trang, Nguyen M. Duc, Nguyen V. Sinh & L. Triest (2015). Application of DNA barcoding markers to the identification of *Hopea* species. *Genet Mol Res*. 14(3): 9181-9190.

[8]. Nguyen M. Duc, Nguyen H. Hoang, Nghiem N. Minh, Vu D. Duy, Nguyen M. Tam, Truong N. Minh, Tran H. M. Duc, Bui Q. Minh, Nguyen H. Khanh, Nguyen P. L. Hong & Nguyen T. T. Huong (2022). DNA Barcoding for *Dipterocarpus* Species in Vietnam Based on Chloroplast Gene Region *matK*. *Mod Agric Biotechnol*. 1(2): 12.

[9]. Jianlin Hu, Zhifang Liu, Xiuqin Ci & Jie Li (2019). Use of DNA barcoding in identifying tropical trees from dipterocarpaceae. *Chinese Bulletin of Botany*.

54(3): 350.

[10]. Carina Carneiro de Melo Moura, Fabian Brambach, Kevin Jair Hernandez Bado, Konstantin V Krutovsky, Holger Kreft, Sri Sudarmiyati Tjitrosoedirdjo, Iskandar Z Siregar & Oliver Gailing (2019). Integrating DNA barcoding and traditional taxonomy for the identification of dipterocarps in remnant lowland forests of Sumatra. *Plants*. 8(11): 461.

[11]. Essy Harnelly, Zairin Thomy & Nir Fathiyah (2018). Phylogenetic analysis of Dipterocarpaceae in ketambe research station, gunung leuser national park (Sumatra, Indonesia) based on *rbcL* and *matK* genes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 19(3): 1074-1080.

[12]. 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.

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

[14]. 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.

[15]. Hà Bích Hồng, Nguyễn Thế Hoàng, 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*. (4): 30-39.

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

[16]. Hui Yao, Jingyuan Song, Chang Liu, Kun Luo, Jianping Han, Ying Li, Xiaohui Pang, Hongxi Xu, Yingjie Zhu & Peigen Xiao (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*. 5(10): e13102.

[17]. 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.

[18]. Vũ Quang Nam, Vũ Đình Duy, Vũ Thị Thu Hiền & Lư 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):44.

[19]. Hà Văn Huân & Nguyễn Văn Phong (2015). Xác định đoạn mã vạch DNA cho Trà hoa vàng tam đảo (*Camellia tamdaoensis*): loài cây đặc hữu của Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*. (5): 123-130.