

CHARACTERISTICS OF *rrn16S*, *trnK-UUU* GENES AND PHYLOGENY OF *Adinandra megaphylla* Hu SPECIES COLLECTED IN LAO CAI PROVINCE, VIETNAM

Pho Thi Thuy Hang^{1,2}, Nguyen Thi Thu Nga¹, Nguyen Huu Quan^{1*}, Chu Hoang Mau¹

¹TNU - University of Education, ²TNU - University of Medicine and Pharmacy

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 01/4/2022	<i>Adinandra megaphylla</i> Hu is a plant commonly referred to in Vietnamese as “Sum Lá Lớn” or “Hồng đạm Sapa” which belongs to the <i>Adinandra</i> genus. The extracts from the leaves and stems of this species contain several bioactive compounds which present pharmacological activities. The <i>rrn16S</i> and <i>trnK-UUU</i> genes in the chloroplast genome of <i>A. megaphylla</i> Hu were analyzed to determine the genetic relationship among the species collected in Vietnam and <i>Adinandra</i> species published on GenBank. The results show that the <i>rrn16S</i> and <i>trnK-UUU</i> genes in the chloroplast genome of <i>A. megaphylla</i> Hu are 1490 and 2591 nucleotides, respectively. The nucleotide sequences of the <i>rrn16S</i> and <i>trnK-UUU</i> of <i>A. megaphylla</i> Hu in Northern Vietnam were determined to have high similarity with several species of the <i>Adinandra</i> genus, and this plant is most closely related to <i>A. bockiana</i> . A combination of the <i>rrn16S</i> and <i>trnK-UUU</i> genes can be a DNA barcoding candidate for determining the genetic relationship of <i>A. megaphylla</i> Hu. These results are fundamental for further studies on <i>A. megaphylla</i> Hu and other species of the <i>Adinandra</i> genus and contribute to research on the diversity and conservation of genetic resources in Vietnam.
Revised: 25/4/2022	
Published: 26/4/2022	
KEYWORDS	
<i>Adinandra</i>	
<i>rrn16S</i>	
<i>trn-UUU</i>	
<i>Adinandra megaphylla</i> Hu	
DNA barcode	

ĐẶC ĐIỂM CỦA GENE *rrn16S*, *trnK-UUU* VÀ SỰ PHÁT SINH LOÀI *Adinandra megaphylla* Hu THU TẠI TỈNH LÀO CAI, VIỆT NAM

Phó Thị Thúy Hằng^{1,2}, Nguyễn Thị Thu Nga¹, Nguyễn Hữu Quân^{1*}, Chu Hoàng Mậu¹

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 01/4/2022	Loài <i>Adinandra megaphylla</i> Hu còn gọi là Sum lá lớn hay Hồng đạm Sapa, thuộc chi Dương đồng (<i>Adinandra</i>), có tính ứng dụng cao trong đời sống. Các cao chiết từ lá và thân của loài này chứa một số hợp chất có hoạt tính sinh học, có giá trị về mặt dược học. Ở nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích hai gene <i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i> từ hệ gene lục lạp của loài <i>A. megaphylla</i> Hu để xác định mối quan hệ di truyền của loài với các loài thuộc chi Dương đồng đã được công bố trên GenBank. Kết quả bước đầu cho thấy, gene <i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i> từ hệ gene lục lạp của loài <i>A. megaphylla</i> Hu với kích thước lần lượt là 1490 và 2591 nucleotide. Trình tự nucleotide của gene <i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i> của loài <i>A. megaphylla</i> Hu thu tại miền Bắc Việt Nam được xác định có sự tương đồng cao với một số loài thuộc chi <i>Adinandra</i> và có quan hệ gần nhất với loài <i>A. bockiana</i> . Trình tự nucleotide kết hợp hai vùng gene <i>rrn16S</i> và <i>trn-UUU</i> có thể là ứng viên mã vạch DNA cho xác định mối quan hệ di truyền của loài <i>A. megaphylla</i> Hu. Kết quả này là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về loài <i>A. megaphylla</i> Hu và những loài khác thuộc chi <i>Adinandra</i> , phục vụ cho nghiên cứu và đánh giá đa dạng và bảo tồn nguồn gene ở Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 25/4/2022	
Ngày đăng: 26/4/2022	
TỪ KHÓA	
Dương đồng	
<i>rrn16S</i>	
<i>trn-UUU</i>	
Sum lá lớn	
Mã vạch DNA	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5795>

* Corresponding author. Email: quannh@tnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Loài *Adinandra megaphylla* Hu còn gọi là Sum lá lớn hay Hồng đạm Sapa, thuộc chi Dương đồng (*Adinandra*) phân bố ở Vườn Quốc gia Hoàng Liên, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai, Việt Nam. Theo sách đỏ Việt Nam, loài Sum lá lớn là nguồn gene quý, hiếm và độc đáo, hiện đang ở tình trạng đe dọa Bậc T [1]. Hiện nay, loài Sum lá lớn cùng với các loài thuộc chi Dương đồng (như Sum millet, Sum nguyên, Sum Hải nam) đã được chứng minh là các cây dược liệu quý chứa nhiều hợp chất có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa, diệt trừ các gốc tự do, gây độc đối với một số dòng tế bào ung thư cũng như điều trị bong gân, rắn cắn [2], [3]. Cao chiết từ thân và lá của loài *A. megaphylla* Hu được chứng minh có chứa các hợp chất polyphenol, coumarin và có hoạt tính kháng một số loài khuẩn (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Lactobacillus plantarum* và *Escherichia coli*), khử gốc tự do DPPH và ức chế các dòng tế bào ung thư vú, ung thư dạ dày và ung thư phổi trong điều kiện *in vitro* [4], [5]. Như vậy, loài Sum lá lớn bước đầu đã được chứng minh có vai trò trong y học, tuy nhiên số lượng cá thể của loài này hiện nay còn rất ít, cần được bảo tồn và phát triển loài cây thuốc quý này.

Phương pháp phân loại học thực vật truyền thống chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái, giải phẫu, đặc điểm hóa sinh,... từ đó xây dựng khóa phân loại. Tuy nhiên, phương pháp này gặp nhiều khó khăn khi cần phân loại những mẫu cây đang trong giai đoạn chưa ra hoa, hoặc khó nhận biết khi mẫu vật có nhiều điểm tương đồng về mặt hình thái và giải phẫu với các loài cùng chi hoặc khó phân loại với những mẫu cây đã được chế biến một phần hay ở dạng bột [6]. Do đó, phương pháp này dễ dẫn đến nhầm lẫn trong quá trình phân loại loài. Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học hiện đại, phân loại học phân tử ở thực vật dựa trên một số đoạn DNA bảo thủ trong hệ gene nhân hay hệ gene lục lạp cho phép nhận diện ở mức độ chính xác cao, đặc biệt đối với các loài có quan hệ gần gũi, khắc phục được hạn chế của phương pháp hình thái so sánh [7]. Ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng mã vạch DNA trong việc xác định mối quan hệ di truyền và phân loại học các cây dược liệu như nghiên cứu của Lê Thanh Hương và cộng sự (2017) đã sử dụng 5 mã vạch phân tử là gene 18S, ITS, *matK*, *psbA-trnH* và *rbcL* để đánh giá khả năng phân biệt loài của 11 mẫu sâm (*Panax* L.) [8]. Vũ Thị Như Trang và cộng sự (2019) đã sử dụng mã vạch gene *matK* để nhận diện mẫu Thổ nhân sâm (*Talinum paniculatum*) thu tại một số địa phương phía bắc Việt Nam, đồng thời cũng xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài Thổ nhân sâm nghiên cứu [9]. Năm 2021, Phạm và cộng sự đã sử dụng mã vạch gene *matK* kết hợp với vùng ITS giúp phân biệt và xác định mối quan hệ di truyền cây thuốc *Stephania brachyandra* diels được thu thập tại tỉnh Lào Cai [10]. Huỳnh Thị Thu Huệ và cộng sự (2021) đã đánh giá khả năng phân loại của hai chỉ thị gene *rbcL* và *trnL* với một số mẫu Bách bộ (*Stemonaceae*) thu tại phía Bắc Việt Nam và chứng minh trình tự nucleotide kết hợp hai vùng chỉ thị mã vạch trên có thể là ứng viên mã vạch DNA cho định danh loài *S. tuberosa* Lour [11].

Hiện nay, các nghiên cứu phân loại các loài thuộc chi *Adinandra* bằng mã vạch DNA còn hạn chế. Nguyễn Hữu Quân và cộng sự (2019) đã sử dụng gene *matK* để định danh mẫu Sum liên thu tại tỉnh Lào Cai, Việt Nam. Đồng thời, nghiên cứu đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại và xác định được mối quan hệ di truyền của đoạn gene *matK* giữa các loài thuộc chi *Adinandra* dựa trên phần mềm MegAlig [12]. Đặc biệt, hệ gene lục lạp từ loài *A. megaphylla* Hu đã được giải mã và công bố trình tự trên GenBank với mã số MW697901 [13]. Trong đó, bước đầu đã xác định được gene *matK* có tiềm năng trở thành mã vạch giúp xác định mối quan hệ di truyền của loài. Tuy nhiên, trong hệ gene lục lạp của loài *A. megaphylla* Hu còn rất nhiều các gene chỉ thị khác, liệu các gene đó có được đánh giá là gene tiềm năng trong phân loại của loài, cũng như việc lựa chọn sự kết hợp giữa hai gene chỉ thị là câu hỏi đặt ra trong nghiên cứu. Từ thực tế đó, nghiên cứu đã sử dụng gene *rrn16* và *trnK-UUU* để xác định mối quan hệ di truyền của loài *A. megaphylla* Hu được thu tại Lào Cai, Việt Nam phục vụ trong công tác lưu giữ và bảo tồn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Dữ liệu trình tự gene *rrn16S* và *trnK-UUU* được xác định từ loài *A. megaphylla* Hu thu tại tỉnh Lào Cai, Việt Nam và các loài sử dụng trong nghiên cứu được khai thác từ cơ sở dữ liệu NCBI.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm gene *rrn16S* và *trnK-UUU*

Đặc điểm của gene *rrn16S* và *trnK-UUU* được phân tích dựa trên thông tin từ hệ gene lục lạp của loài *A. megaphylla* Hu trong nghiên cứu của Nguyễn Hữu Quân và cộng sự (2021) [13] với mã số MW697901 [14] và các loài trên GenBank dựa trên phần mềm BLAST trong NCBI (Bảng 1).

Bảng 1. Thông tin về trình tự gene *rrn16S* và *trnK-UUU* của các loài sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên loài	Tên loài viết tắt	Mã số GenBank	Tên gene
1	<i>Adinandra megaphylla</i> Hu	<i>A. megaphylla</i>	MW697901.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
2	<i>Adinandra millettii</i>	<i>A. millettii</i>	NC035678.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
3	<i>Adinandra angustifolia</i>	<i>A. angustifolia</i>	NC035653.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
4	<i>Adinandra bockiana</i>	<i>A. bockiana</i>	MW699853.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
5	<i>Eurya alata</i>	<i>E. alata</i>	NC041510.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
6	<i>Eurya loquaiana</i>	<i>E. loquaiana</i>	NC050937.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
7	<i>Anneslea fragrans</i>	<i>A. fragrans</i>	NC035709.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
8	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	<i>T. gymnanthera</i>	MF179490.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>
9	<i>Pentaphylax euryoides</i>	<i>P. euryoides</i>	NC035710.1	<i>rrn16S</i> và <i>trnK-UUU</i>

2.2.2. Nghiên cứu đặc điểm gene, sự sai khác và mức độ tương đồng giữa các trình tự nucleotide của gene *rrn16S* và *trnK-UUU*

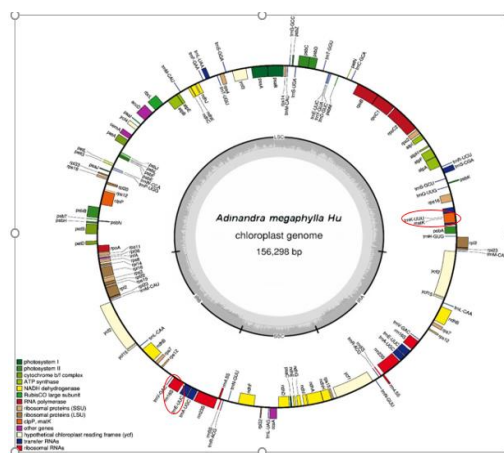
Sử dụng phần mềm BioEdit và phần mềm BLAST trong NCBI để khai thác cơ sở dữ liệu về đặc điểm gene và so sánh trình tự nucleotide của gene *rrn16S* và *trnK-UUU* của loài *A. megaphylla* Hu với các loài trên GenBank (Bảng 1).

2.2.3. Phân tích sự đa dạng di truyền và phát sinh loài của gene *rrn16S* và *trnK-UUU*

Phân tích sự đa dạng di truyền và cây phát sinh chủng loại của gene *rrn16S* và *trnK-UUU* được thực hiện bằng phần mềm MEGA-X theo phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap được lặp lại 1000 [15].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm gene *rrn16S* và *trnK-UUU* của loài *A. megaphylla* Hu



Hình 1. Vị trí của gene *rrn16S* và gene *trnK-UUU* trong bản đồ hệ gene lục lạp của loài *A. megaphylla* Hu (nguồn của Nguyễn Hữu Quân và cộng sự (2021) [13])

Khai thác cơ sở dữ liệu của hệ gene lục lập từ loài *A. megaphylla* Hu có mã số MW697901 [13], [14] đã xác định được gene *rrn16S* và *trnK-UUU* có tính bảo thủ cao. Trong đó, gene *rrn16S* phiên mã tổng hợp ARN ribosome loại 16S với kích thước 1490 nucleotide nằm ở vị trí từ 102131-103620 trên hệ gene lục lập. Gene *trnK-UUU* phiên mã tổng hợp ARN vận chuyển phụ trách việc vận chuyển Lysine trong quá trình dịch mã. Gene *trnK-UUU* có kích thước 2591 nucleotide nằm ở vị trí từ 1722-4312 trên hệ gene lục lập. Vị trí của gene *rrn16S* và *trnK-UUU* được đánh dấu trên bản đồ hệ gene lục lập của loài *A. megaphylla* Hu (Hình 1).

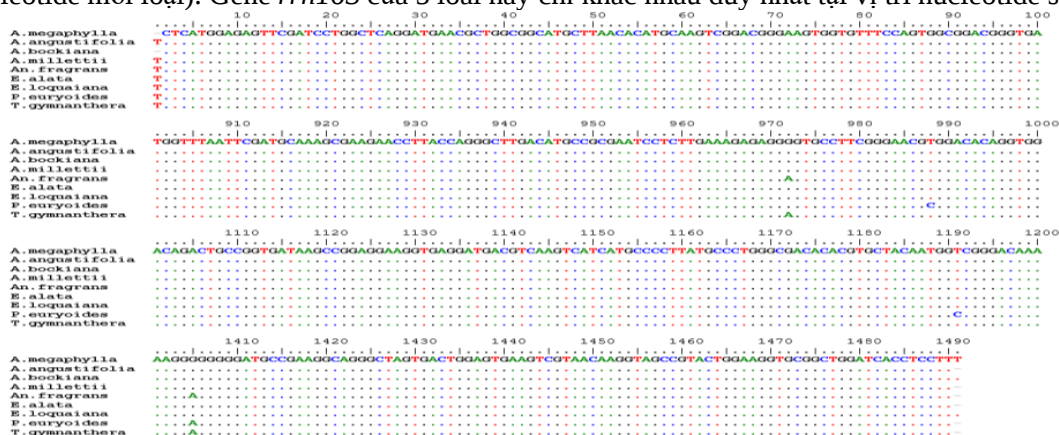
3.2. Đặc điểm gene, sự sai khác và mức độ tương đồng giữa các trình tự nucleotide của gene *rrn16S* ở các loài nghiên cứu

Khai thác dữ liệu về đặc điểm và sự sai khác giữa các trình tự nucleotide của gene *rrn16S* bằng phần mềm BioEdit của các loài nghiên cứu được trình bày ở bảng 2 và hình 2. Kết quả cho thấy, gene *rrn16S* của loài *A. megaphylla* Hu có kích thước 1490 bp, khối lượng 907456 Dal, có tỷ lệ C+G và A+T lần lượt là 56,51 và 43,49%; số lượng nucleotide mỗi loại A, T, G, C tương ứng là 365; 283; 485 và 357. Gene *rrn16S* của các loài nghiên cứu còn lại có kích thước 1490 bp, trừ loài *E. loquaiana* là 1491 bp. Khối lượng phân tử gene *rrn16S* của 09 loài đạt từ 907422-908055 Dal, tỷ lệ C+G và A+T lần lượt từ 56,38-56,58% và 43,42-43,62%.

Bảng 2. Đặc điểm trình tự gene *rrn16S* của 09 loài nghiên cứu bằng phần mềm BioEdit

Loài	Kích thước (bp)	Khối lượng (Dal)	C+G (%)	A+T (%)	Số lượng nucleotide			
					A	T	G	C
<i>A. megaphylla</i> Hu	1490	907456	56,51	43,49	365	283	485	357
<i>A. millettii</i>	1490	907456	56,51	43,49	365	283	485	357
<i>A. angustifolia</i>	1490	907456	56,51	43,49	365	283	485	357
<i>A. bockiana</i>	1490	907456	56,51	43,49	365	283	485	357
<i>E. alata</i>	1490	907456	56,51	43,49	365	283	485	357
<i>E. loquaiana</i>	1491	908055	56,47	43,53	365	284	485	357
<i>A. fragrans</i>	1490	907422	56,38	43,62	367	283	483	357
<i>T. gymnanthera</i>	1490	907422	56,38	43,62	367	283	483	357
<i>P. euryoides</i>	1490	907473	56,58	43,42	366	281	484	359

So sánh trình tự nucleotide của gene *rrn16S* cho thấy có 05 vị trí sai khác là 1; 972; 988; 1191; 1405. Trong đó, sai khác ở vị trí 1 do mất nucleotide loại T ở loài *A. megaphylla* Hu và *A. bockiana*, các vị trí sai khác còn lại đều là sự thay thế nucleotide (Hình 2). Trình tự gene *rrn16S* của loài *A. megaphylla* Hu có rất ít sự sai khác so với các loài khác trong nghiên cứu. Đặc biệt, các loài *A. megaphylla* Hu, *A. millettii*, *A. angustifolia*, *A. bockiana* và *E. alata* giống nhau hoàn toàn về các đặc điểm của gene *rrn16S* (kích thước, khối lượng, tỷ lệ C+G, A+T, số lượng nucleotide mỗi loại). Gene *rrn16S* của 5 loài này chỉ khác nhau duy nhất tại vị trí nucleotide số 1.



Hình 2. So sánh trình tự nucleotide của gene *rrn16S* của 09 loài nghiên cứu

Trình tự nucleotide của gen *rrn16S* từ các vị trí: 1-100, 910-1200, 1410-1490 sử dụng phần mềm BioEdit

Phân tích sự tương đồng về trình tự nucleotide bằng BLAST cho thấy, trình tự gene *rrn16S* của 9 loài nghiên cứu cung cấp cho 100% phạm vi truy vấn với tổng điểm BLAST từ 5472-5505, mức độ tương đồng rất cao từ 99,8-100%. Trong đó, loài *A. megaphylla* Hu, *A. millettii*, *A. angustifolia*, *A. bockiana* và *E. alata* có mức độ tương đồng đạt 100% (Bảng 3). Kết quả này bước đầu cho phép xác định 05 loài này có mối quan hệ rất gần gũi với nhau về mặt di truyền.

Bảng 3. Bảng thống kê kết quả 9 trong tổng số 100 BLAST đối với đoạn gene *rrn16S*

Tên loài	Tên chi	Mã số GenBank	Tổng điểm	Phạm vi truy vấn	Tỉ lệ tương đồng
<i>A. megaphylla</i>	<i>Adinandra</i>	MW697901.1	5505	100%	100,00%
<i>A. bockiana</i>	<i>Adinandra</i>	MW699853.1	5505	100%	100,00%
<i>A. millettii</i>	<i>Adinandra</i>	NC035678.1	5505	100%	100,00%
<i>A. angustifolia</i>	<i>Adinandra</i>	NC035653.1	5505	100%	100,00%
<i>E. alata</i>	<i>Eurya</i>	NC041510.1	5505	100%	100,00%
<i>E. loquaiana</i>	<i>Eurya</i>	NC050937.1	5505	100%	100,00%
<i>A. fragrans</i>	<i>Anneslea</i>	NC035709.1	5483	100%	99,87%
<i>T. gymnanthera</i>	<i>Ternstroemia</i>	MF179490.1	5483	100%	99,87%
<i>P. euryoides</i>	<i>Pentaphylax</i>	NC035710.1	5472	100%	99,80%

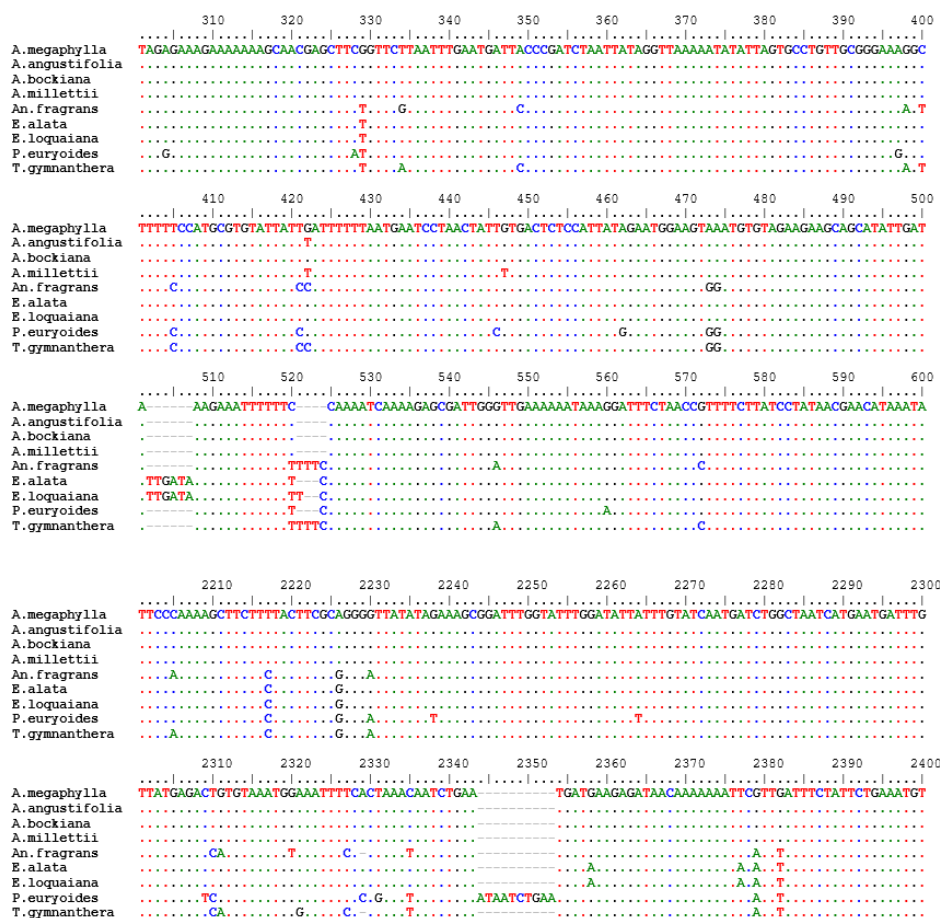
3.3. Đặc điểm gen, sự sai khác và mức độ tương đồng giữa các trình tự nucleotide của gene *trnK-UUU* ở các loài nghiên cứu

Đặc điểm và so sánh trình tự gene *trnK-UUU* của 09 loài nghiên cứu bằng phần mềm BioEdit cho thấy, gene *trnK-UUU* có nhiều điểm sai khác giữa các loài nghiên cứu (Bảng 4). Kích thước gene *trnK-UUU* từ 2591-2599 bp; khối lượng từ 1567820-1572599 Dal; tỷ lệ C+G và A+T lần lượt đạt từ 33,26-33,54% và từ 66,4-66,74%; số lượng nucleotide mỗi loại của gene *trnK-UUU* cũng có nhiều sai khác giữa các loài nghiên cứu.

Bảng 4. Đặc điểm trình tự gene *trnK-UUU* của 09 loài nghiên cứu bằng phần mềm BioEdit

Loài	Kích thước (bp)	Khối lượng (Dal)	C+G (%)	A+T (%)	Số lượng nucleotide mỗi loại			
					A	T	G	C
<i>A. megaphylla</i>	2591	1567820	33,46	66,54	827	897	452	415
<i>A. millettii</i>	2591	1567820	33,46	66,54	827	897	451	416
<i>A. angustifolia</i>	2591	1567837	33,50	66,50	826	897	452	416
<i>A. bockiana</i>	2591	1567854	33,54	66,46	826	896	452	417
<i>E. alata</i>	2598	1572000	33,33	66,67	836	896	450	416
<i>E. loquaiana</i>	2599	1572599	33,32	66,68	836	897	450	416
<i>A. fragrans</i>	2593	1569020	33,44	66,56	834	892	446	421
<i>T. gymnanthera</i>	2598	1571966	33,26	66,74	839	895	444	420
<i>P. euryoides</i>	2597	1571416	33,38	66,62	836	894	451	416

Trình tự nucleotide của gene *trnK-UUU* giữa các loài nghiên cứu nhận thấy có 182 vị trí sai khác. Trong đó, có 157 vị trí sai khác do sự thay thế nucleotide, các vị trí này thường đơn lẻ và cách xa nhau; 25 vị trí sai khác do mất nucleotide và các nucleotide bị mất thường liên kề nhau từ 4-10 nucleotide, các vị trí mất nucleotide là 502; 503; 504; 505; 506 và 507 (6 nucleotide liên kề), 521; 522; 523 và 524 (4 nucleotide liên kề), 618; 619; 620; 621 và 622 (5 nucleotide liên kề), 2344; 2345; 2346; 2347; 2348; 2349; 2350; 2351; 2352 và 2353 (10 nucleotide liên kề) (Hình 3). Như vậy, gene *trnK-UUU* có sự sai khác khá lớn (182/2599) giữa 09 loài nghiên cứu. Sự sai khác này chủ yếu xảy ra ở 05 loài *E. alata*, *E. loquaiana*, *A. fragrans*, *T. gymnanthera* và *P. euryoides*. Trong khi, 04 loài *A. megaphylla* Hu, *A. bockiana*, *A. angustifolia* và *A. millettii* chỉ có 08 vị trí sai khác là 422; 447; 501; 1002; 1042; 1049; 1141 và 1447. Tất cả các vị trí sai khác đều là sự thay thế nucleotide. Sự sai khác này có thể nhận thấy, gene *trnK-UUU* được coi là ứng viên mã vạch DNA giúp xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*.



Hình 3. So sánh trình tự nucleotide của gene *trnK-UUU* từ 09 loài nghiên cứu

Trình tự nucleotide của gen *trnK-UUU* từ các vị trí: 310-600, 2210-2400 sử dụng phần mềm BioEdit

Phân tích sự tương đồng về trình tự nucleotide của 09 loài nghiên cứu bằng BLAST cho thấy, gene *trnK-UUU* đã cung cấp cho 100% phạm vi truy vấn với tổng điểm BLAST từ 4101-4785, mức tương đồng khá cao về trình tự nucleotide của gene *TrnK-UUU* từ 95,23-100%. Trong đó, trình tự gene *trnK-UUU* của các loài *A. bockiana*, *A. millettii* và *A. angustifolia* có mức độ tương đồng cao (từ 99,81-99,92%) và là những loài gần nhất với loài *A. megaphylla* Hu (100%). Năm loài còn lại có mức tương đồng thấp hơn từ 95,23-98,85% (Bảng 5). Từ kết quả nghiên cứu về đặc điểm gen, sự sai khác và mức độ tương đồng của gene *trnK-UUU* cho thấy loài *A. megaphylla* Hu có mối quan hệ gần gũi với các loài *A. bockiana*, *A. angustifolia* và *A. millettii*.

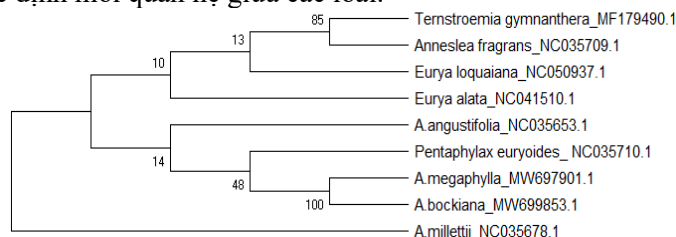
Bảng 5. Bảng thống kê kết quả 9 trong tổng số 100 BLAST đối với đoạn gene *trnK-UUU*

Tên loài	Tên chi	Mã số GenBank	Tổng điểm	Phạm vi truy vấn	Tỉ lệ tương đồng
<i>A. megaphylla</i>	<i>Adinandra</i>	MW697901.1	4785	100%	100,00%
<i>A. bockiana</i>	<i>Adinandra</i>	MW699853.1	4774	100%	99,92%
<i>A. millettii</i>	<i>Adinandra</i>	NC035678.1	4763	100%	99,85%
<i>A. angustifolia</i>	<i>Adinandra</i>	NC035653.1	4758	100%	99,81%
<i>E. alata</i>	<i>Eurya</i>	NC041510.1	4625	100%	98,85%
<i>E. loquaiana</i>	<i>Eurya</i>	NC050937.1	4621	100%	98,81%
<i>A. fragrans</i>	<i>Anneslea</i>	NC035709.1	4355	100%	96,99%
<i>T. gymnanthera</i>	<i>Ternstroemia</i>	MF179490.1	4331	100%	96,81%
<i>P. euryoides</i>	<i>Pentaphylax</i>	NC035710.1	4104	100%	95,23%

3.4. Phân tích mối quan hệ di truyền và cây phát sinh chủng loại

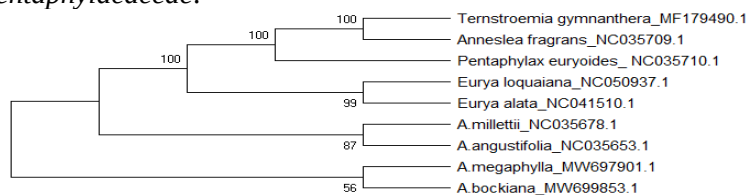
Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu thông qua cây phát sinh chủng loại được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của gene *rrn16S*, *trnK-UUU* và sự kết hợp trình tự nucleotide của cả 2 gene này (*rrn16S/trnK-UUU*) bằng phần mềm MEGA-X.

Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide của gene *rrn16S* từ 09 loài nghiên cứu được chia thành 2 nhánh chính. Nhánh chính 1 gồm 1 loài duy nhất là *A. millettii*. Nhánh chính 2 gồm 08 loài còn lại và được chia thành 02 nhánh phụ, trong mỗi nhánh phụ được chia thành nhiều nhánh con. Nhánh phụ 1 gồm 4 loài *A. bockiana*, *A. megaphylla* Hu, *A. angustifolia* và *P. euryoides*. Nhánh phụ 2 gồm 4 loài *A. fragrans*, *E. loquaiana*, *T. gymnanthera* và *E. alata*. Cây phân loại cho thấy, loài *A. megaphylla* Hu và *A. bockiana* có mối quan hệ rất gần gũi với nhau (cùng thuộc 01 nhánh con) và gần với loài *A. angustifolia* nhưng lại khác xa về mặt di truyền với loài *A. millettii* (Hình 4). Phương pháp so sánh hình thái nhận thấy, loài *A. megaphylla* Hu, *A. bockiana*, *A. millettii* và *A. angustifolia* có mối quan hệ gần và thuộc chi *Adinandra* [1]-[4]; loài *E. alata* và *E. loquaiana* thuộc chi *Eurya* nhưng lại nằm trên hai nhánh con khác nhau của cây phân loại. Như vậy, trình tự nucleotide của gene *rrn16S* chưa thực sự phản ánh đúng các loài cùng chi sẽ có mối quan hệ gần nhau về mặt phân loại. Đồng thời, kết quả này có sự khác biệt so với kết quả phân tích đặc điểm, sự tương đồng và sự sai khác trình tự nucleotide của gene *rrn16S*. Mặt khác, cây phát sinh chủng loại có độ phân giải phát sinh loài thấp, giá trị bootstrap là 13%. Do đó, gene *rrn16S* có thể không phù hợp dùng để xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*. Lý giải cho điều này có thể do gene *rrn16S* có sự sai khác quá ít (05 nucleotide) giữa các loài nghiên cứu. Đặc biệt, giữa các loài thuộc chi *Adinandra* gene *rrn16S* chỉ khác nhau duy nhất 01 nucleotide. Do đó, chưa đủ để xem gene *rrn16S* trở thành mã vạch DNA giúp xác định mối quan hệ giữa các loài.



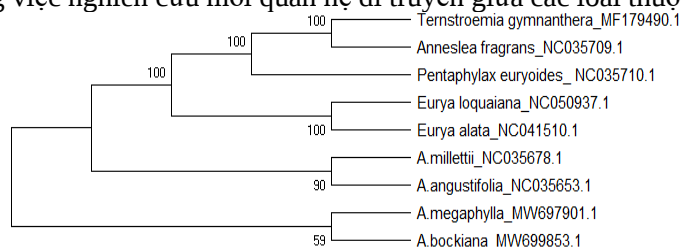
Hình 4. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide của gene *rrn16S* được xây dựng bằng phương pháp Maximum likelihood

Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide của gene *trnK-UUU* từ 09 loài nghiên cứu được chia thành 2 nhánh chính (Hình 5). Nhánh chính 1 gồm 02 loài *A. megaphylla* Hu và *A. bockiana*. Nhánh chính 2 gồm 07 loài, phân bố trong 02 nhánh phụ. Nhánh phụ 1 gồm 02 loài *A. millettii* và *A. angustifolia*. Nhánh phụ 2 gồm 05 loài được sắp xếp vào 02 nhánh con. Trong đó, nhánh con 1 gồm 2 loài *E. loquaiana* và *E. alata*. Nhánh con 2 gồm 3 loài còn lại. Kết quả của cây phân loại này hoàn toàn phù hợp với hệ thống phân loại hiện nay. Đồng thời, kết quả nghiên cứu này có sự thống nhất với kết quả phân tích sự tương đồng về trình tự nucleotide của gene *trnK-UUU* bằng phần mềm BLAST. Do đó, trình tự gene *TrnK-UUU* phù hợp làm mã vạch nhằm xác định sự phát sinh loài và đa dạng di truyền của các loài thuộc chi *Adinandra* và một số loài thuộc họ *Pentaphylacaceae*.



Hình 5. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide của gene *trnK-UUU* được xây dựng bằng phương pháp Maximum likelihood

Cây phát sinh loài được thành lập dựa trên sự kết hợp giữa trình tự gene *rrn16S* và *trnK-UUU* có giá trị bootstrap cao hơn so với kết quả đơn lẻ của mỗi trình tự (Hình 6), giúp nâng cao độ phân giải phát sinh loài. Cây phân loại *rrn16S/trnK-UUU* cho kết quả tương tự như cây phân loại dựa trên trình tự gen *trnK-UUU*. Kết quả của cây phân loại *rrn16S/TrnK-UUU* hoàn toàn phù hợp với hệ thống phân loại hiện nay [1]-[4]. Do đó, sự kết hợp trình tự gene *rrn16S* và *trnK-UUU* thể hiện hiệu quả trong việc nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*.



Hình 6. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên sự kết hợp trình tự nucleotide của gene *rrn16S* và *TrnK-UUU* được xây dựng bằng phương pháp Maximum likelihood

Nghiên cứu các gene trong hệ gen lục lạp của loài *A. megaphylla* Hu, các loài khác thuộc chi *Adinandra* và một số loài thuộc họ *Pentaphylacaceae*, nhằm mục đích khảo sát sự phát sinh loài *A. megaphylla* Hu thu tại tỉnh Lào Cai, Việt Nam. Do đó, việc lựa chọn gene *rrn16S* và *trnK-UUU* để nghiên cứu giúp khuyến cáo có thể sử dụng gene *trnK-UUU* đơn lẻ hoặc kết hợp trình tự gene *rrn16S* và *trnK-UUU* để xây dựng cây phân loại phát sinh loài và xác định mối quan hệ di truyền sẽ đạt hiệu quả cao hơn.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân tích đặc điểm của gene *rrn16S* và *trnK-UUU* từ hệ gene lục lạp của loài *A. megaphylla* Hu với kích thước lần lượt là 1490 và 2591 nucleotide. Kết quả đã xác định được sự tương đồng cao về trình tự nucleotide của gene *rrn16S* và *trnK-UUU* của loài *A. megaphylla* Hu thu tại miền Bắc Việt Nam với một số loài thuộc chi *Adinandra* và có quan hệ gần nhất với loài *A. bockiana*. Trong đó, trình tự gene *trnK-UUU* phù hợp để sử dụng làm mã vạch tốt hơn so với gene *rrn16S*. Trình tự nucleotide kết hợp hai vùng gene *rrn16S* và *TrnK-UUU* có thể là ứng viên mã vạch DNA cho nghiên cứu phát sinh loài và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Adinandra*.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài có mã số B2022-TNA-43. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Vietnam Ministry of Science and Technology, *Vietnam Red Book*, Plants section. Natural Science and Technology Publishing House, Hanoi, 2007.
- [2] Y. Chen, G. Chen, X. Fu, and R. H. Liu, "Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Different Varieties of *Adinandra* Tea (*Adinandra* Jack)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, pp. 169-176, 2015.
- [3] H. Q. Nguyen, T. K. P. Than, and H. M. Chu, "Study on chemical composition and antibacteria activity of extracts total from leaves of *Adiandra lienii* species," *Proceedings National Biotechnology Conference 2019*, pp. 178-182, 2019.
- [4] T. N. L. Nguyen, H. Q. Nguyen, T. T. N. Nguyen, T. T. X. Vi, T. D. Sy, T. T. Nguyen, and H. M. Chu, "Antibacterial, Antioxidant and Anti - Cancerous Activities of *Adiandra megaphylla* Hu Leaf Extracts," *Biosc. Biotech. Res. Comm.*, vol. 13, pp. 1015-1020, 2020.

-
- [5] T. N. L. Nguyen and H. Q. Nguyen, "Chemical composition and biological activity of extracts total from stem of *Adiandra megaphylla* Hu collected in lao cai, Vietnam," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no.10, pp. 55-61, 2021.
- [6] J. W. Kress, K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Wei, and D. H. Janzen, "Use of DNA barcodes to identify flowering plants," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, pp. 8369-8374, 2005.
- [7] H. Ledford, "Botanical identities: DNA barcoding for plants comes a step closer," *Nature*, vol. 451, p. 616, 2008.
- [8] T. H. Le, N. L. Nguyen, M. M. Bui, H. H. Ha, T. T. H. Huynh, V. H. Nong, V. H. Ha, and T. T. H. Le, "Application of DNA barcodes in identification of ginseng samples in the genus *Panax* L.," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 63-72, 2017.
- [9] T. N. T. Vu and H. M. Chu, "Use of *matK* DNA barcode for identification of Jewels of Opar (*Talinum paniculatum*) samples collected at some localities in the Northern of Vietnam," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 184, no. 08, pp. 101-106, 2019.
- [10] N. T. T. Pham, D. P. Le, K. T. N. Pham, X. Thipphavong, and M. H. Chu, "DNA barcode of *matK* combined with ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Stephania brachyandra* Diels collected in Laocai, Vietnam," *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, vol. 9, pp. 63-70, 2021.
- [11] T. T. H. Huynh, Q. H. Dao, H. D. Le, and D. T. Nguyen, "Assessment of classification ability for *rbcL* and *trnL* barcode in some *Stemonaceae* samples collected from northern Vietnam," *Journal of Science and Technology of Vietnam*, vol. 63, pp. 25-29, 2021.
- [12] H. Q. Nguyen and T. T. G. Kieu, "Use of *matK* DNA barcode to identify *Adinandra* samples collected at Lao Cai, Vietnam," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 197, pp. 205-210, 2015.
- [13] H. Q. Nguyen, T. N. L. Nguyen, T. N. Doan, T. T. N. Nguyen, M. H. Pham, T. L. Le, T. D. Sy, H. H. Chu, and H. M. Chu, "Complete chloroplast genome of novel *Adrinandra megaphylla* Hu species: molecular structure, comparative and phylogeneetic analysis," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 11731, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-91071-z.
- [14] Q. H. Nguyen, L. T. N. Nguyen, N. T. T. Nguyen, T. D. Sy, M. H. Chu, H. H. Chu, L. T. Le, N. T. Doan, H. M. Pham, and G. T. H. Doan, "*Adinandra megaphylla* chloroplast, complete genome," 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW697901.1>.
- [15] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, pp. 1547-1549, 2018.