

CHARACTERISTICS OF ANATOMICAL AND MOLECULAR MARKER *trnH-psbA* IN IDENTIFICATION OF YELLOW CAMELLIA SPECIES IN THAI NGUYEN

Nguyen Thi Thu Nga*, Manivanh Yongsa, Vu Khanh Linh

TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 21/3/2023	<i>Camellia</i> sp. is rare and a valuable nutritious drink and medicinal herb. It has been considered a high economic plant. To date, the research of this genus has only been carried out on a few species, with the main focus on morphology but some camellia species have many similar morphological characteristics, so they are easily influenced and inaccurate. Therefore, there is a need to research the gene's characteristics to improve efficiency to preserve precious genetic resources. This study was conducted to analyze morphological and molecular characteristics for species identification purposes and to provide more information about a chloroplast DNA barcode on the subject of <i>Camellia</i> , serving species identification service to improve the efficiency and conservation of the rare and precious <i>Camellia</i> species in Vietnam. The results of the study have described in detail the anatomical characteristics of the stem, leaf, and petiole. Using the <i>trnH-psbA</i> sequence analyzing method, the sequence of the <i>trnH-psbA</i> gene has a size of 396 nucleotides. <i>trnH-psbA</i> zone similarity index on the nucleotide sequence of yellow flower tea sample compared to 10 <i>trnH-psbA</i> sequences on GenBank varies between 97.51% to 99.49%. As such, the <i>trnH-psbA</i> sequence of the yellow flower tea sample is 99.49% similar to that of <i>Camellia tamdaoensis</i> coded as NC 069227.1.
Revised: 20/4/2023	
Published: 28/4/2023	
KEYWORDS	
Camellia sp.	
DNA Barcode	
<i>trnH-psbA</i>	
Sequence	
Species identification	

ĐẶC ĐIỂM GIẢI PHẪU VÀ TRÌNH TỰ CHỈ THỊ *trnH-psbA* PHÂN LẬP TỪ MẪU CÂY TRÀ HOA VÀNG THU THẬP TẠI THÁI NGUYÊN

Nguyễn Thị Thu Nga*, Manivanh Yongsa, Vũ Khánh Linh

Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 21/3/2023	Trà hoa vàng là loài cây quý hiếm, có nhiều giá trị sử dụng và đa tác dụng trong y học. Đây là loài cây dược liệu quý, đã và đang mang lại nhiều giá trị kinh tế cao. Hiện nay, phân tích về Trà hoa vàng chủ yếu dựa vào chỉ thị hình thái nhưng còn gặp nhiều khó khăn, bởi một số loài Trà hoa vàng có nhiều đặc điểm hình thái tương tự nhau nên dễ bị nhầm lẫn. Vì vậy, cần có các nghiên cứu đặc điểm trình tự gen để nâng cao hiệu quả và bảo tồn nguồn gen quý. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân tích đặc điểm hình thái giải phẫu và phân tử phục vụ mục đích định danh loài và cung cấp thêm thông tin về một mã vạch DNA lục lạp trên đối tượng cây Trà hoa vàng, phục vụ giám định loài để nâng cao hiệu quả và bảo tồn loài Trà hoa vàng quý hiếm ở Việt Nam. Bằng phương pháp giải phẫu, kết quả nghiên cứu đã mô tả chi tiết đặc điểm cấu tạo của các bộ phận thân, lá và cuống lá. Bằng phương pháp phân tích trình tự gen của mẫu cây Trà hoa vàng, trình tự gen <i>trnH-psbA</i> thu được có kích thước 396 bp. So sánh với 10 trình tự <i>trnH-psbA</i> trên Genbank, chỉ thị <i>trnH-psbA</i> của mẫu thí nghiệm dao động từ 97,51% đến 99,49% và có đặc điểm về di truyền gần nhất (99,49%) với loài <i>Camellia tamdaoensis</i> mang mã số NC_069227.1.
Ngày hoàn thiện: 20/4/2023	
Ngày đăng: 28/4/2023	
TỪ KHÓA	
Trà hoa vàng	
Mã vạch DNA	
<i>trnH-psbA</i>	
Định danh	
Trình tự	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7587>

* Corresponding author. Email: ngantt.bio@tue.edu.vn

1. Giới thiệu

Trà hoa vàng là tên chung chỉ các loài thuộc chi *Camellia*, họ Chè (*Theaceae*), có hoa màu vàng ở các mức độ khác nhau. Trên thế giới, Trà hoa vàng có khoảng 350 loài, phân bố ở vùng nhiệt đới châu Á, đặc biệt ở khu vực Đông Nam Á [1], [2]. Đây là loài cây có nhiều giá trị sử dụng như lấy gỗ, trồng làm cây cảnh, cây trồng tầng dưới ở các đai rừng phòng hộ, làm đồ uống cao cấp và có tác dụng làm dược liệu quý trong y học. Cây Trà hoa vàng có tác dụng hạ huyết áp, hạ đường huyết, giảm cholesterol máu, tăng cường hệ miễn dịch,... [3]-[5]. Do có nhiều giá trị nên nhiều doanh nghiệp và người dân ở Việt Nam đã trồng với diện tích tương đối lớn tại các khu vực như Vườn Quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Lạng Sơn,... Những năm gần đây, các nhà nghiên cứu đã phát hiện được 68 loài Trà hoa vàng tại Việt Nam và có 32 loài đặc hữu [6].

Do có nhiều đặc tính dược học quý, cây Trà hoa vàng hiện nay là đối tượng được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Tuy nhiên, các nghiên cứu chủ yếu mang tính khám phá, sàng lọc, tập trung vào đa dạng sinh học và việc nhân giống. Về thành phần hoá học và tác dụng sinh học của loài này chưa được chú ý phân tích đầy đủ [6], [7]. Nhiều công bố về phân loại các Trà hoa vàng còn chủ yếu tập trung vào chỉ thị đặc điểm hình thái. Tuy nhiên, phương pháp phân loại dựa trên hình thái gặp nhiều khó khăn và hạn chế, bởi vì một số loài Trà hoa vàng có nhiều đặc điểm hình thái tương tự nhau nên dễ dẫn tới kết quả phân loại thiếu chính xác. Do đó, các kỹ thuật sử dụng chỉ thị phân tử như ITS, *rbcL*, *matK*,... để nhân diện và phân loại sinh vật đã được sử dụng phổ biến và đem lại hiệu quả cao như thời gian nhanh chóng, độ chính xác, có thể tiến hành quanh năm trên các mẫu vật khô hoặc các mẫu vật hư hại [8], [9]. Đã có nghiên cứu sử dụng kỹ thuật này để giám định một số loài trà như: *C. sinensis*, *C. petelotii*, *C. yunnanensis*, *C. oleifera*, *C. taliensis*, *C. pachyandra*, *C. japonica*, *C. reticulata*, *C. Sasanqua*, *C. Chrysantha*,... [4], [10], [11].

Mã vạch DNA là một trình tự nucleotide của chuỗi DNA, sử dụng trong việc định danh các loài sinh vật chưa biết loại bằng phương pháp so sánh với trình tự DNA trên Genbank. Các gen thường được sử dụng làm mã vạch trong phân loại các loài thực vật là: gen ITS, *atpB*, *rbcL*, *matK*, *intron trnL*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA*,... [12]. Trong đó, các chỉ thị *matK* và *trnH-psbA* đã được ứng dụng phổ biến [13]. Chỉ thị *trnH-psbA* là đoạn trình tự có chiều dài thay đổi ở các loài thực vật khác nhau (khoảng 286 - 504 bp). Với ưu điểm là dễ dàng nhân lên bằng một cặp mồi ở 95% các loài, đoạn trình tự này cho thấy điểm ưu thế so với *matK* [14], [15]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân tích được đặc điểm hình thái giải phẫu và trình tự *trnH-psbA* phân lập mẫu Trà hoa vàng phục vụ mục đích định danh loài và cung cấp thêm thông tin về một mã vạch DNA lục lạp trên đối tượng cây Trà hoa vàng, phục vụ giám định loài để nâng cao hiệu quả và bảo tồn loài Trà hoa vàng quý hiếm ở Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cây Trà hoa vàng được sử dụng làm mẫu nghiên cứu do phòng Công nghệ tế bào thực vật - khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái nguyên cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* *Phân tích đặc điểm hình thái giải phẫu*: Thân, lá và cuống lá của mẫu *Camellia* sp. được thực hiện giải phẫu cấu tạo theo tài liệu của Hoàng Thị Sản và Nguyễn Phương Nga (2008) [16].

- Đặc điểm hình thái được mô tả theo phương pháp mô tả phân tích.

- Tiêu bản vi học thân, lá và cuống lá được làm bằng phương pháp cắt, tẩy, nhuộm kép.

* Tách chiết DNA của mẫu Trà hoa vàng bằng phương pháp mini - CTAB và Dneasy Plant Mini Kit (hãng Qiagen).

* Sau khi tách chiết, DNA tổng số của mẫu Trà hoa vàng được điện di bằng đệm TBE 1X với gel agarose 1% ở hiệu điện thế 90V (marker 1kb). Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA

tổng số bằng phương pháp đo quang phổ hấp phụ ở bước sóng 260 và 280 nm. Pha loãng dịch chiết 100 lần (5 μ l mẫu + 450 μ l DDW), mỗi mẫu đo ba lần. Sau khi mẫu có giá trị trung bình được làm kết quả cuối cùng. Thể hiện độ tinh sạch của mẫu qua thông số A260/280 (1,8-2,0).

* *Phương pháp nhân gen:*

- Cặp mồi được sử dụng để nhân trình tự gen trnH-psbA bằng kỹ thuật PCR trong nghiên cứu này là trnH-psbA F/ trnH-psbA R với thông tin và trình tự thể hiện ở bảng 1 [17].

Bảng 1. Thông tin và trình tự cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên cặp mồi	Trình tự (5' - 3')	Nhiệt độ gắn mồi	Kích thước dự kiến
trnH-psbA F	GTTATGCATGAACGTAATTGCTC	54°C	400bp
trnH-psbA R	CGCGCATGGTGGATTACAATCC		

- Thành phần để phản ứng PCR: master mix (2X): 7,5 μ l; mồi xuôi (10 μ mol/ μ l): 0,5 μ l; mồi ngược (10 μ mol/ μ l): 0,5 μ l; DNA khuôn (10ng/ μ l): 0,5 μ l và H₂O: 6 μ l. Tổng thể là 15 μ l.

- Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân trình tự đoạn trnH-psbA: 94°C/4 phút; lặp lại 35 chu kỳ với (94°C/30 giây, 54°C/40 giây, 72°C/40 giây); 72°C/10 phút, giữ ở 4°C.

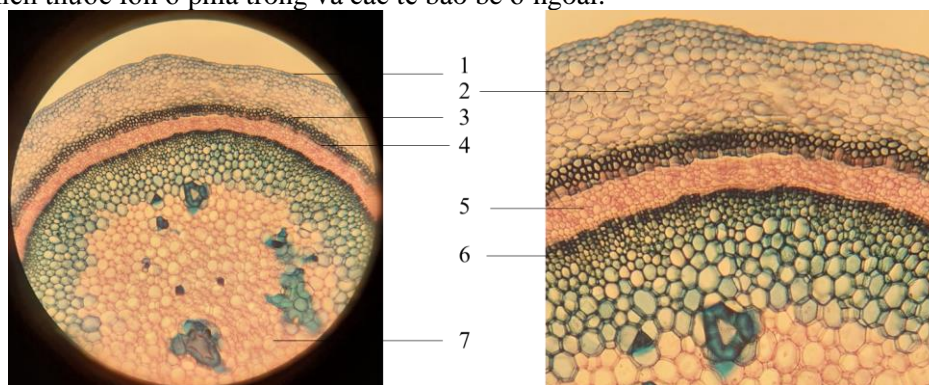
- Xác định trình tự gen trnH-psbA bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu.

- Phân tích, so sánh và xây dựng sơ đồ phát sinh chủng loại bằng các chương trình Bioedit và MegaX.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm giải phẫu mẫu cây Trà hoa vàng

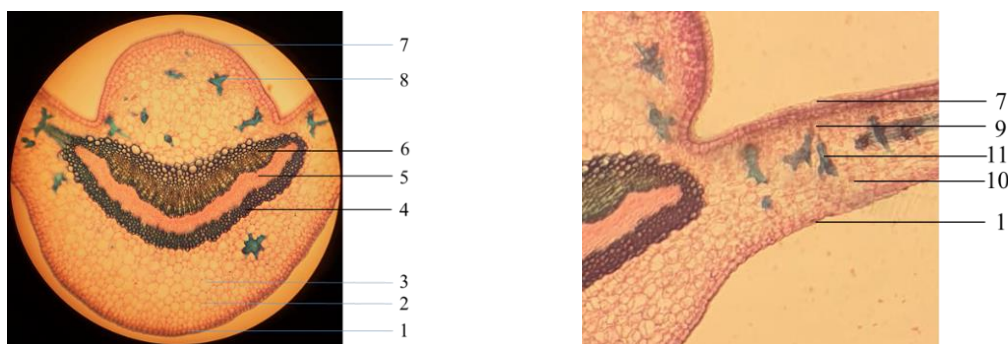
Giải phẫu thân: Kết quả giải phẫu thân Trà hoa vàng cho thấy, mặt cắt ngang có thiết diện gần tròn (Hình 1) gồm những bộ phận như: (1) *Biểu bì:* có một lớp tế bào hình gần chữ nhật có kích thước đều nhau, có phủ lớp cutin ở phía ngoài; (2) *Mô mềm vỏ:* gồm nhiều lớp tế bào đa giác có kích thước không đều và sắp xếp lộn xộn; (3) *Vòng mô cứng:* gồm 2 - 3 lớp tế bào có kích thước khác nhau, các tế bào bắt màu xanh. (4) *Bó libe gỗ cấp hai:* có libe ở ngoài, gỗ nằm phía trong, gồm các tế bào hình tròn, kích thước không đều, xếp thành dãy xuyên tâm. Trong libe xuất hiện rải rác các thể cứng với kích thước khác nhau; (5) *Tầng trước phát sinh:* nằm ở giữa libe và gỗ, gồm các tế bào dẹt mỏng; (6) *Gỗ cấp hai:* gồm các mạch gỗ xếp rất sát nhau, tia ruột hẹp; (7) *Mô mềm ruột:* ở phần giữa của thân, gồm các tế bào đa giác, kích thước không đều nhau, các tế bào có kích thước lớn ở phía trong và các tế bào bé ở ngoài.



Hình 1. Cấu tạo lát cắt ngang thân của cây Trà hoa vàng

(1) *Biểu bì;* (2) *Mô mềm vỏ;* (3) *Mô cứng;* (4) *Libe;* (5) *Tầng phát sinh;* (6) *Mạch gỗ;* (7) *Mô mềm ruột*

Giải phẫu lá: Kết quả phân tích tiêu bản giải phẫu cấu tạo của mẫu Trà hoa vàng thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Cấu tạo lá của mẫu cây Trà hoa vàng

A. Gân chính

(1) Biểu bì dưới; (2) Mô dày xốp; (3) Mô mềm; (4) Mô cứng; (5) Libe; (6) Mạch gỗ; (7) Biểu bì trên; (8) Thể cứng

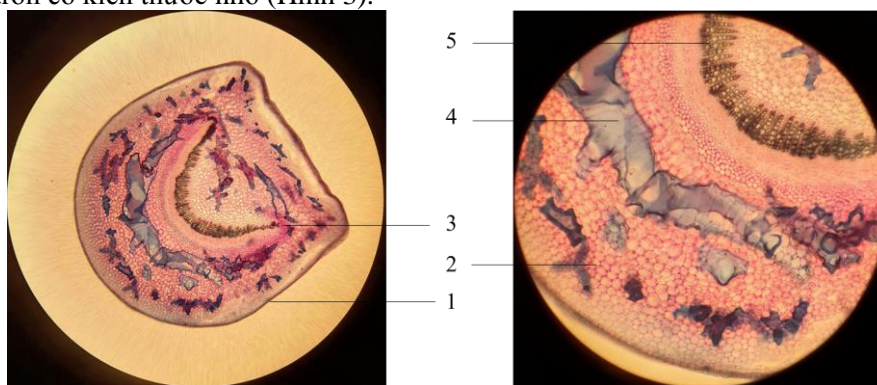
B. Phiến lá

(1) Biểu bì dưới; (7) Biểu bì trên; (9) Mô khuyết; (10) Mô giậu; (11) Tinh thể calci oxalat

A. Phần gân lá: Lòi rõ cả 2 mặt, gồm các cấu trúc: (1) *Biểu bì dưới*: gồm nhiều tế bào hình chữ nhật, kích thước khác nhau và có phủ một lớp cutin mỏng; (2) *Mô dày xốp*: gồm 4-5 lớp tế bào hình đa giác khác nhau, tế bào xếp sát làm nhiệm vụ nâng đỡ; (3) *Mô mềm*: gồm các lớp tế bào hình gần tròn có kích thước khác nhau, tế bào sắp xếp lộn xộn; (4) *Mô cứng*: có 4-5 lớp tế bào hình đa giác có kích thước khác nhau và sắp xếp thành một cung bao quanh bó libe-gỗ (libe phía dưới và gỗ ở phía trên); (5) *Libe*: có nhiều lớp tế bào hình đa giác kích thước đều nhau và xếp lộn xộn; (6) *Mạch gỗ*: hình đa giác, xếp thành dãy xen lẫn với mô mềm gỗ hóa mô cứng; (8) *Thể cứng*: nằm rải rác trong mô mềm, hình đa dạng, có kích thước lớn và nhánh nhọn.

B. Phần phiến lá: (1, 7) *Biểu bì*: gồm một lớp tế bào hình chữ nhật, tế bào biểu bì trên (7) lớn, có vách trong rất dày và cutin dày, còn tế bào biểu bì dưới (1) nhỏ và có lỗ khí nhiều; (9) *Mô khuyết*: có các lớp tế bào đa giác hoặc tròn, sắp xếp lộn xộn; (10) *Mô giậu*: gồm các tế bào thuôn dài xếp sát nhau; (11) *Tinh thể calci oxalat*: hình đa giác và nhánh nhọn.

Đặc điểm giải phẫu cuống lá: Quan sát tiêu bản giải phẫu cho thấy: cấu tạo cuống lá của mẫu Trà hoa vàng có thiết diện bán nguyệt, gồm những bộ phận như: (1) *Biểu bì*: được cấu tạo từ nhiều tế bào hình chữ nhật kích thước khác nhau và có phủ một lớp cutin mỏng; (2) *Mô mềm*: có các lớp tế bào hình tròn có kích thước khác nhau; (3) *Libe*: có nhiều lớp tế bào hình đa giác, kích thước đều nhau và tế bào sắp xếp lộn xộn tạo thành từng đám; (4) *Tinh thể calci oxalat*: có hình dài; (5) *Gỗ*: gồm nhiều bó, một số bó gồm 1-2 mạch, một số bó gồm 3-4 mạch, tế bào hình đa giác hoặc tròn có kích thước nhỏ (Hình 3).



Hình 3. Cấu tạo cuống lá cây Trà hoa vàng

(1) Biểu bì; (2) Mô mềm; (3) Libe; (4) Tinh thể calci oxalat; (5) Gỗ

3.2. Kết quả khuếch đại chỉ thị trnH-psbA

Để chắc chắn chỉ thị *trnH-psbA* phân lập được từ mẫu cây Trà hoa vàng (*Camellia*), chúng tôi tiến hành so sánh bằng BLAST trên Genbank - NCBI. Kết quả cho thấy, chỉ thị *trnH-psbA* phân lập được có độ tương đồng cao, dao động từ 97,51% đến 99,49% với các trình tự gen đã công bố ở một số loài khác thuộc chi *Camellia*. Trong đó, có 4 trình tự có độ tương đồng trên 98,00% là *C. tamdaoensis*, *C. sinensis*, *C. amplexifolia* và *C. luteocalpandria*. Kết quả so sánh trình tự chỉ thị *trnH-psbA* của mẫu cây Trà hoa vàng bằng BLAST trên Genbank - NCBI được thể hiện trên hình 6.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia tamdaoensis chloroplast complete genome	Camellia tamdao...	719	719	100%	0.0	99.49%	156633	NC_069227.1
<input type="checkbox"/> Camellia tamdaoensis chloroplast complete genome	Camellia tamdao...	719	719	100%	0.0	99.49%	156633	OP066526.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia sinensis isolate Leikouchai cultivar Phoenix Dancong Tea chloroplast complete genome	Camellia sinensis	693	693	100%	0.0	98.24%	157103	OL690362.1
<input type="checkbox"/> Camellia sinensis isolate Baxian cultivar Phoenix Dancong Tea chloroplast complete genome	Camellia sinensis	693	693	100%	0.0	98.24%	157103	OL690353.1
<input type="checkbox"/> Camellia sinensis var. sinensis cultivar TTES No. 13 photosystem II protein D1 gene complete cds chloroplast	Camellia sinensi...	693	693	100%	0.0	98.24%	1673	AY741458.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia amplexifolia chloroplast complete genome	Camellia amplex...	691	691	100%	0.0	98.00%	156591	NC_061610.1
<input type="checkbox"/> Camellia amplexifolia chloroplast complete genome	Camellia amplex...	691	691	100%	0.0	98.00%	156591	OL435568.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia luteocalpandria plastid	Camellia luteoca...	691	691	100%	0.0	98.01%	156772	OK546696.1
<input type="checkbox"/> Camellia flava PsbA (psbA) gene partial cds and psbA-trnH intergenic spacer partial sequence chloroplast	Camellia flava	691	691	100%	0.0	98.00%	469	GQ487340.1
<input type="checkbox"/> Camellia tonkinensis PsbA (psbA) gene partial cds and psbA-trnH intergenic spacer partial sequence chloroplast	Camellia tonkine...	686	686	100%	0.0	97.76%	512	KX098581.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia longipedicellata voucher YangSX 5001 plastid complete genome	Camellia longipe...	686	686	100%	0.0	97.76%	156669	NC_065391.1
<input type="checkbox"/> Camellia longipedicellata voucher YangSX 5001 plastid complete genome	Camellia longipe...	686	686	100%	0.0	97.76%	156669	MZ382808.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia aurea chloroplast complete genome	Camellia aurea	686	686	100%	0.0	97.76%	156588	NC_062050.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia nitidissima var. nitidissima chloroplast complete genome	Camellia nitidissi...	686	686	100%	0.0	97.76%	157567	MT157618.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia zhaiana voucher YangSX 6023 plastid complete genome	Camellia zhaiana	686	686	100%	0.0	97.76%	156627	NC_058253.1
<input type="checkbox"/> Camellia sinensis sangmok chloroplast DNA complete genome	Camellia sinensis	680	680	100%	0.0	97.51%	153044	LC488797.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia oleifera chloroplast complete genome	Camellia oleifera	680	680	100%	0.0	97.51%	156995	MF541730.2
<input type="checkbox"/> Camellia flava PsbA (psbA) gene partial cds and psbA-trnH intergenic spacer partial sequence chloroplast	Camellia flava	680	680	100%	0.0	97.51%	470	KY172820.1
<input checked="" type="checkbox"/> Camellia reticulata plastid complete genome	Camellia reticulata	680	680	100%	0.0	97.51%	156754	KY406793.1
<input type="checkbox"/> Camellia crappnelliana chloroplast complete genome	Camellia crappne...	680	680	100%	0.0	97.51%	156997	NC_024541.1

Hình 6. Kết quả so sánh trình tự chỉ thị *trnH-psbA* của mẫu cây Trà hoa vàng bằng BLAST trên Genbank - NCBI

Bằng phần mềm MegaX, tiến hành xây dựng sơ đồ mối quan hệ di truyền về trình tự chỉ thị *trnH-psbA* với 10 trình tự được công bố trên Genbank-NCBI. Các thông tin được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Các thông tin trình tự gen trên Genbank được sử dụng để so sánh với mẫu Trà hoa vàng nghiên cứu

STT	Mã số gen	Tên loài	Năm công bố	Kích thước (bp)	Tác giả
1	Trà hoa vàng - <i>trnH-psbA</i>			396	
2	NC_069227.1	<i>Camellia tamdaoensis</i>	2023	433	J. Zhang và cs
3	OL690362.1	<i>Camellia sinensis</i>	2022	503	Y. Liu và cs
4	NC_061610.1	<i>Camellia amplexifolia</i>	2022	491	X. Ding và cs
5	OK546696.1	<i>Camellia luteocalpandria</i>	2021	472	X. Q. Yu và cs
6	NC_065391.1	<i>Camellia longipedicellata</i>	2022	569	Q. Zhang và cs
7	NC_062050.1	<i>Camellia aurea</i>	2022	588	J. Zhang và cs
8	MT157618.1	<i>Camellia nitidissima var. nitidissima</i>	2021	567	S. Liu và cs
9	NC_058253.1	<i>Camellia zhaiana</i>	2021	527	F. Y. Wu và cs
10	MF541730.2	<i>Camellia oleifera</i>	2019	495	Q. Zhang và cs
11	KY406793.1	<i>Camellia reticulata</i>	2017	454	X. Q. Yu và cs

Tiến hành xây dựng sơ đồ mối quan hệ di truyền về trình tự của chỉ thị *trnH-psbA* với 10 trình tự được công bố trên Genbank. Kết quả so sánh trình tự chỉ thị *trnH-psbA* của cây Trà hoa vàng so với 10 trình tự của các chi *Camellia* được thể hiện trên Bảng 3 và Hình 7.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự chỉ thị *trnH-psbA* của cây Trà hoa vàng với 10 loài thuộc chi *Camellia*

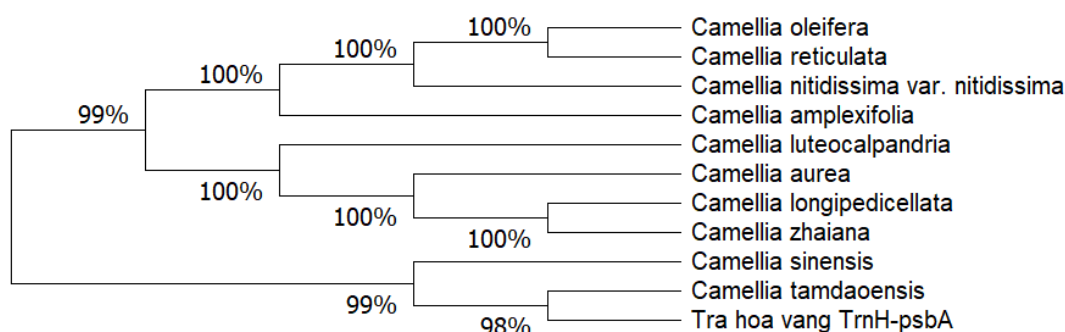
STT	Tên loài/ giống	Vị trí sai khác							
		50	149	177-181	236	252	285	340	385
	<i>Tra_hoa_vang_TrnH-psbA</i>	A	C	-----	-	T	T	A	A
1	<i>Camellia tamdaoensis</i>	C	C	-----	-	-	-	G	-
2	<i>Camellia sinensis</i>	C	T	-----	A	C	C	G	-
3	<i>Camellia amplexifolia</i>	C	C	CTTTT	-	-	-	G	-
4	<i>Camellia luteocalpandria</i>	C	C	CTTTT	A	-	-	G	-
5	<i>Camellia longipedicellata</i>	C	C	CTTTT	A	-	-	G	-
6	<i>Camellia aurea</i>	C	C	CTTTT	A	-	-	G	-
7	<i>Camellia nitidissima var. nitidissima</i>	C	C	CTTTT	-	C	C	G	-
8	<i>Camellia zhaiana</i>	C	C	CTTTT	A	-	-	G	-
9	<i>Camellia oleifera</i>	C	C	CTTTT	-	C	C	G	-
10	<i>Camellia reticulata</i>	C	C	CTTTT	-	C	C	G	-

Hình 7. Kết quả so sánh trình tự chỉ thị *trnH-psbA* của cây Trà hoa vàng so với 10 loài chi *Camellia*

Hệ số tương đồng thể hiện mối quan hệ di truyền của 10 loài thuộc chi *Camellia* dựa trên trình tự chỉ thị *trnH-psbA* thể hiện ở Bảng 4 và sơ đồ cây phân loại (Hình 8).

Bảng 4. Hệ số tương đồng thể hiện mối quan hệ di truyền của 10 loài thuộc chi *Camellia* dựa trên trình tự chỉ thị *trnH-psbA*

<i>Camellia_amplexifolia</i>									
<i>Camellia_aurea</i>	0,3822								
<i>Camellia_longipedicellata</i>	0,3822	0,0000							
<i>Camellia_luteocalpandria</i>	0,3868	0,0025	0,0025						
<i>Camellia_nitidissima_var._nitidissima</i>	0,0075	0,3868	0,3868	0,3822					
<i>Camellia_oleifera</i>	0,0050	0,3822	0,3822	0,3868	0,0025				
<i>Camellia_reticulata</i>	0,0050	0,3822	0,3822	0,3868	0,0025	0,0000			
<i>Camellia_sinensis</i>	0,5470	0,5949	0,5949	0,6013	0,5639	0,5580	0,5580		
<i>Camellia_tamdaoensis</i>	0,5919	0,4954	0,4954	0,4901	0,5973	0,6037	0,6037	0,4022	
<i>Camellia_zhailana</i>	0,3822	0,0000	0,0000	0,0025	0,3868	0,3822	0,3822	0,5949	0,4954
Tra_hoa_vang_TrnH-psbA	0,5947	0,4990	0,4990	0,4936	0,6002	0,6065	0,6065	0,3968	0,00250,4990



Hình 8. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 10 loài chi *Camellia* theo trình tự chỉ thị *trnH-psbA*

Như vậy, thông qua bảng hệ số tương đồng và sơ đồ phân loại hình cây dựa trên trình tự chỉ thị *trnH-psbA* phân lập từ mẫu Trà hoa vàng thu thập, nghiên cứu đã bước đầu khẳng định được chính xác mẫu thí nghiệm là loài thuộc chi *Camellia*. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, mẫu Trà hoa vàng có đặc điểm về di truyền gần nhất 99,49% với mẫu thuộc loài *Camellia tamdaoensis* mang mã số NC_069227.1 trên Genbank.

4. Kết luận

Mẫu Trà hoa vàng thu thập tại Thái Nguyên đã được mô tả giải phẫu chi tiết thân, cuống lá và phiến lá. Trình tự chỉ thị *trnH-psbA* của mẫu cây Trà hoa vàng có kích thước 396 nucleotide. Kết quả khi so sánh với 10 trình tự trên Genbank-NCBI bằng BLAST cho thấy độ tương đồng dao động từ 97,51% đến 98,24%. Trong đó, có 4 trình tự có độ tương đồng trên 98,00%. Trình tự chỉ thị *trnH-psbA* phân lập từ mẫu cây Trà hoa vàng có đặc điểm về di truyền gần nhất (99,49%) với loài *Camellia tamdaoensis* mang mã số NC_069227.1 trên Genbank.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn tới Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã hỗ trợ thiết bị và cơ sở vật chất cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. Tran, "Results of the study on yellow Camellias of Vietnam," *International Camellia Journal*, vol. 35, pp.73-75, 2003.
- [2] N. Hakoda, S. Kirino, and N. Tran, "New species of Genus *Camellia* in Vietnam," *International Camellia Journal*, vol. 39, pp. 54-57, 2007.
- [3] K. Vijayan, W. J. Zhang, and C. H. Tsou, "Molecular taxonomy of *Camellia* (Theaceae) inferred from nrITS sequences," *American Journal of Botany*, vol. 96, no. 7, pp. 1348-1360, 2009.
- [4] C. Kole, *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Springer, pp. 332, 2011.

- [5] N. N. H. Le, C. Uematsu, H. Katayama, and D. V. Luong, "Camellia tuyenquangensis (Theaceae), a new species from Vietnam," *Korean Journal of Plant Taxonomy*, vol. 47, no. 2, pp. 95-99, 2017.
- [6] N. Tran and N. H. N. Linh, "A new yellow *Camellia* species from North Vietnam," *International Camellia Journal*, vol. 47, pp. 36-45, 2015.
- [7] T. S. Hoang and V. D. Luong, "Adinandra hongiaoensis (Theaceae), a New Species from Lam Dong, Vietnam," *Journal of Japanese Botany*, vol. 89, pp. 331-334, 2014.
- [8] M. D. Logacheva, A. A. Penin, T. H. Samigullin, C. M. Vallejo-Roman, and A. S. Antonov, "Phylogeny of Flowering Plants by the Chloroplast Genome Sequences: in Search of a "Lucky Gene"," *BIOCHEMISTRY (Moscow)*, vol. 72, pp. 1324-1330, 2007.
- [9] W. J. Kress, "Plant DNA barcodes: Applications today and in the future," *Journal of Systematics and Evolution*, vol. 55, no. 4, pp. 291-307, 2017.
- [10] W. Fan, Y. Xu, T. Xu, J. Xu, T. Yonezawa, J. Gao, and W. Zhang, "Intragenomic Polymorphism of the Internal Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA in *Camellia hongkongensis* (Theaceae) and Species Identification," *Chinese Bulletin of Botany*, vol. 50, no. 2, pp. 217-226, 2015.
- [11] D. Rahardiyani, "Antibacterial potential of catechin of tea (*Camellia sinensis*) and its applications," *Food Research*, vol. 3, no. 1, pp. 1-6, 2019.
- [12] M. Manoj, J. Pavankumar, and H. A. Kumar, "DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of Indian wild coffee species," *Urkish Journal of Botany*, vol. 46, no. 2, pp. 109-122, 2022.
- [13] L. Jiao, T. He, E. E. Dormontt, Y. Zhang, A. J. Lowe, and Y. Yin, "Applicability of chloroplast DNA barcodes for wood identification between *Santalum album* and its adulterants," *Holzforschung*, pp. 1-10, 2018, doi:10.1515/hf-2018-0047
- [14] X. Pang, C. Liu, L. Shi, R. Liu, D. Liang, H. Li *et al.*, "Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, 2012, Art. no. e48833.
- [15] E. K. Yessoufou, B. H. Daru, L. T. Mankga, O. Maurin, and M. van der Bank, "Incorporating trnH-psbA to the core DNA barcodes improves significantly species discrimination within southern African Combretaceae," *Zookeys*, vol. 365, pp. 129-147, 2013.
- [16] T. S. Hoang and P. N. Nguyen, *Practice Morphology - Plant Anatomy*, Pedagogical University Publishing House, Ha Noi, 2008.
- [17] I. Khan, Z. K. Shinwari, N. B. Zahra, S. A. Jan, S. Shinwari, and S. Najeebullah, "DNA barcoding and molecular systematics of selected species of family Acanthaceae," *Pak. J. Bot.*, vol. 52, no. 1, pp. 205-212, 2020.