

ĐẶC ĐIỂM MÃ VẠCH ADN VÙNG GEN *rbcL* VÀ *trnF-trnL* CHO LOÀI THÔNG XUÂN NHA (*Pinus cernua* L.K. Phan ex Aver., K. S. Nguyen & T.H. Nguyen) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Trần Hồ Quang, Nguyễn Thị Hồng Hà

Viện Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu xác định đặc điểm mã vạch ADN vùng gen lục lạp *rbcL* và *trnF-trnL* của loài Thông xuân nha (*Pinus cernua* L.K. Phan ex Aver., K. S. Nguyen & T.H. Nguyen), loài Thông năm lá đặc hữu quý hiếm tại Việt Nam, nhằm bổ sung dữ liệu giám định loài. Mẫu lá từ 5 cây tự nhiên tại khu bảo tồn Xuân Nha (tỉnh Sơn La) được tách chiết ADN bằng kit Qiagen, khuếch đại PCR với mỗi đặc hiệu, giải trình tự và phân tích bằng chương trình BioEdit và MEGA12. Kết quả cho thấy trình tự vùng gen *rbcL* dài 519 bp, có mức tương đồng cao (99,8 - 100%) so với các loài thông gần gũi như *P. armandii*, *P. bhutanica*, *P. morrisonicola* và *P. wallichiana*, phản ánh đặc tính bảo thủ cao của vùng gen này. Trình tự vùng gen *trnF-trnL* dài 938 bp, có mức tương đồng từ 86,5 - 100% với các loài *P. bungeana*, *P. koraiensis*, *P. strobus* và *P. lambertiana*, cho thấy vùng gen này có biến dị trung bình, phù hợp cho định danh và nghiên cứu phát sinh loài. Cây phát sinh chủng loại từ hai vùng gen đều thể hiện mối quan hệ gần gũi của *P. cernua* với nhóm Thông năm lá châu Á. Kết quả nghiên cứu đã công bố lần đầu tiên trình tự của hai vùng gen *rbcL* và *trnF-trnL* của Thông xuân nha (*P. cernua*) trên Ngân hàng Gen Quốc tế (GenBank), đóng góp dữ liệu quan trọng cho cơ sở dữ liệu mã vạch ADN thực vật Việt Nam. Đồng thời, nghiên cứu khẳng định tiềm năng kết hợp nhiều vùng gen lục lạp trong phân loại và giám định các loài thông bản địa quý hiếm, góp phần hỗ trợ công tác bảo tồn nguồn gen và đa dạng sinh học rừng.

Từ khóa: Mã vạch ADN, Thông xuân nha, *rbcL*, *trnF-trnL*.

DNA BARCODING CHARACTERISTICS OF THE *rbcL* AND *trnF-trnL* REGIONS IN XUAN NHA PINE (*Pinus cernua* L.K. Phan Ex Aver., K.S. Nguyen & T.H. Nguyen) FOR SPECIES IDENTIFICATION

Tran Ho Quang, Nguyen Thi Hong Ha

Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

The study characterizes the DNA barcodes of the chloroplast genes *rbcL* and *trnF-trnL* in *Pinus cernua* L.K. Phan ex Aver., K. S. Nguyen & T.H. Nguyen, a rare and endemic five - needle pine species in Vietnam, to supplement species identification data. Leaf samples from five naturally occurring trees at Xuan Nha Nature Reserve (Son La province) were used for DNA extraction with the Qiagen kit, PCR amplification using specific primers, sequencing, and analysis with BioEdit and MEGA12 software. Results revealed that the *rbcL* gene sequence is 519 bp in length, exhibiting high similarity (99.8 - 100%) with closely related pine species such as *P. armandii*, *P. bhutanica*, *P. morrisonicola* and *P. wallichiana*, reflecting the highly conserved nature of this region. The *trnF-trnL* sequence is 938 bp long, showing moderate similarity (86.5 - 100%) with species including *P. bungeana*, *P. koraiensis*, *P. strobus* and *P. lambertiana*, indicating intermediate variability suitable for species identification and phylogenetic studies. Phylogenetic trees constructed from both gene regions consistently demonstrated the close evolutionary relationship of *P. cernua* with the Asian five - needle pine group. This study reports for the first time the sequences of *rbcL* and *trnF-trnL* from *Pinus cernua* (xuan nha pine) deposited in the International GenBank database, contributing valuable data to Vietnam's plant DNA barcode repository. Furthermore, the research underscores the potential of combining multiple chloroplast gene regions for accurate classification and identification of rare native pine species, thereby supporting gene resource conservation and forest biodiversity preservation efforts.

Keywords: DNA barcode, *rbcL*, *Pinus cernua*, *trnF-trnL*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mã vạch ADN (DNA barcoding) là những đoạn trình tự ADN ngắn ở những vùng chuẩn hóa của hệ gen có chiều dài từ 400 đến 800 cặp ba zo được dùng để định danh và giám định loài dựa trên sự khác biệt về trình tự nucleotide (Hebert, P. D *et al.*, 2003). Mã vạch DNA cũng có thể được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau như hỗ trợ quyền sở hữu hoặc quyền sở hữu trí tuệ (Stewart, 2005); phát hiện các loài ẩn sinh (Hebert *et al.*, 2004), trong giám định pháp y với các mẫu sinh học tại hiện trường (Mildenhall, 2006); trong nghiên cứu hệ gen sinh thái và môi trường (Valentini *et al.*, 2009) và trong hỗ trợ giám định loài (Fazekas *et al.*, 2008).

Hiện nay, việc định danh, phân loại các loài thực vật thường được thực hiện thông qua phương pháp phân loại truyền thống (phân loại hình thái) kết hợp với phương pháp sinh học phân tử (mã vạch ADN). Các vùng mã vạch ADN nếu được lựa chọn phù hợp sẽ làm tăng hiệu quả định danh loài. Đối với nghiên cứu định danh loài ở thực vật, mã vạch ADN thường được sử dụng tại (1) vùng gen nhân gồm *ITS*, *ETS* và (2) vùng gen lục lạp gồm *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnL-trnF*, *psbK-psbI* và *atpF-atpH* (Letsiou *et al.*, 2024). Trong đó, mã vạch ở vùng gen lục lạp mang tính bảo thủ cao về trình tự và cấu trúc đặc trưng loài và ít bị biến đổi trong quá trình tiến hóa so với hệ gen nhân rất phù hợp cho các nghiên cứu phát sinh loài của các quần thể thực vật phức tạp.

Nghiên cứu về mã vạch ADN được thực hiện cho nhiều loài cây rừng. Han và đồng tác giả (2016) đã sử dụng mã vạch *matK*, *rbcL*, *ITS* và *trnS-trnG* để xác định mức độ định danh của 85 loài thuộc họ Phong (Aceraceae). Tan Han và đồng tác giả (2018) đã sử dụng 3 vùng gen lục lạp là *rbcL*, *matK* và *trnH-psbA* và 1 vùng gen nhân là *ITS* để xác định mức độ định danh loài bằng sự phối hợp của các vùng mã vạch ADN cho 201 loài (gồm 72 loài cây gỗ cứng và 129 loài thảo dược). Ba vùng gen *matK*, *rbcL*, *rpoC1* đã được sử dụng cho xác định mã vạch

ADN của 4 loài giổi trồng tại Việt Nam (Huyen *et al.*, 2020). Các vùng gen *matK*, *rbcL* và *ITS* cũng đã được sử dụng cho xác định mã vạch loài Đàn hương trắng (Gám *et al.*, 2023).

Thông xuân nha (*Pinus cernua* L.K. Phan ex Aver., K. S. Nguyen & T.H. Nguyen) là loài cây năm lá bản địa quý hiếm, đặc hữu được phát hiện tại Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Nha huyện Mộc Châu, tỉnh Sơn La vào năm 2014 và được công bố trên tạp chí Thực vật Nordic số 32 (Averyanov *et al.*, 2014). Đây là loài cây gỗ thường xanh, chiều cao vút ngọn từ 6 - 25 m, đường kính ngang ngực từ 0,06 - 0,7 m. Số lượng Thông xuân nha trưởng thành ước còn khoảng 150 cây, phân bố tập trung trên diện tích khoảng 80 km². Cây sinh trưởng, phát triển tốt, tuy nhiên rất hiếm cây con tái sinh. Do bị khai thác nhiều nên hiện nay, loài cây này quần thể cây bị suy giảm (Nguyễn Văn Hợp, Nguyễn Thị Hạnh, 2017). Nghiên cứu về mã vạch ADN cho Thông xuân nha đã được thực hiện cho 2 vùng gen *matK* và *trnH-psbA*, trong đó vùng gen *trnH-psbA* có khả năng phát hiện loài Thông xuân nha so với các loài thông khác (Hải *et al.*, 2021).

Vùng gen *rbcL* và *trnF-trnL* là hai vùng gen lục lạp phổ biến thường được sử dụng trong định danh loài bằng mã vạch ADN. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn hai vùng gen này để nghiên cứu đặc điểm vùng gen của loài Thông xuân nha, góp phần cung cấp thêm cơ sở dữ liệu mã vạch ADN của loài. Kết quả nghiên cứu sẽ đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu phân loại, giám định loài Thông xuân nha.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá cây (hình 1) được thu thập từ 5 cây phân bố tự nhiên tại vùng sinh trưởng nguyên gốc của loài Thông xuân nha tại đỉnh Khò Hồng, xã Chiềng Sơn, tỉnh Sơn La (xã Chiềng Xuân, huyện Vân Hồ, tỉnh Sơn La cũ) xung quanh tọa độ trung tâm là Bắc 20.7118807, Đông 104.6723579 ở độ

cao 800 m so với mực nước biển. Mẫu lá sau đó được bảo quản trong túi ni lông chứa silicagen hút ẩm và được chuyển về phòng thí nghiệm thuộc Viện Sinh học và bảo quản ở -20°C để phục vụ tách chiết ADN.



Hình 1. Mẫu Thông xuân nha

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết từ bộ kit tách chiết ADN thực vật “DNA mini kit Qiagen” của hãng Qiagen, CHLB Đức.

Các mẫu ADN tổng số sau khi tách chiết được đánh giá nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ hấp phụ Nanodrop và kiểm tra chất lượng trên bản gel agarose 0,8%. Mẫu ADN sau đó được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

2.2.2. Phương pháp khuếch đại vùng gen

Nhân bản các vùng gen bằng kỹ thuật PCR sử dụng các cặp mồi: *rbcL* (F: GACAAGTGTGTGGACCGATG, R: CCACCGCGAAGACATTCA TA) (Kress and Erickson, 2007) và primer *trnF-trnL* (F: CGCGCATGGTGGATTCACAATCC, R: GTTATG CATGAACGTAATGCTC) (Taberlet

et al., 1991). Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25µL với các thành phần: 7 µL H₂O deion, 12,5 µL PCR Master mix kit (2X), 1,25 µL mỗi xuôi (10 pmol/µL), 1,25 µL mỗi ngược (10 pmol/µL), 3 µL DNA (10 - 20 ng). Phản ứng được thực hiện trên máy PCR Systems (Eppendorf Master Cycler C50). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 94°C trong 3 phút; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 60 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72°C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4°C.

Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và điện di trên gel agarose 1,0% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe) để kiểm tra. Sản phẩm PCR sau đó được gửi đến Công ty TNHH ADN, (Thành phố Cần Thơ) để giải trình tự bằng máy giải trình tự với bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

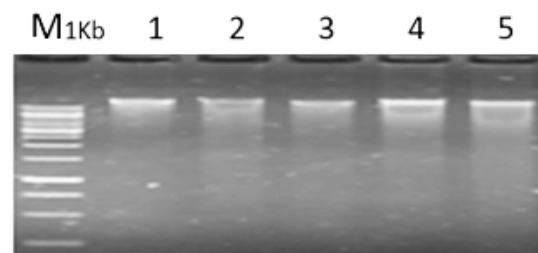
2.2.3. Phương pháp phân tích vùng gen

Trình tự sau khi thu được, được hiệu chỉnh bằng chương trình BioEdit (Alzohairy, 2011). Cây phân loại được xây dựng bằng chương trình Mega 12 (Kumar *et al.*, 2024) với phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura - Nei, sử dụng bootstrap 10.000.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết ADN

Các mẫu ADN tổng số sau khi tách chiết từ bộ kit được đánh giá nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ hấp phụ Nanodrop và kiểm tra chất lượng trên bản gel agarose 0,8%. Kết quả được thể hiện ở hình 2.

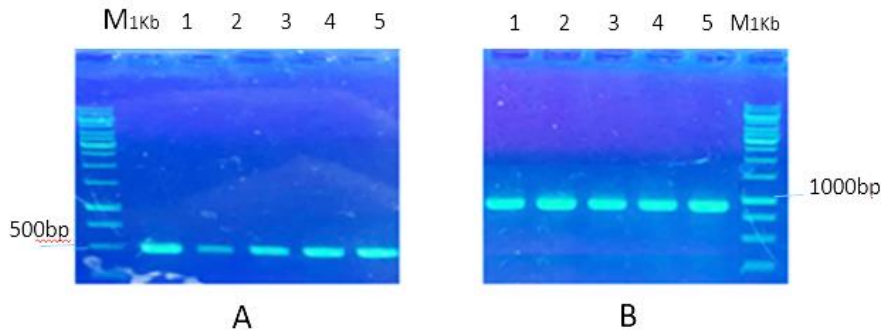


Hình 2. Kết quả điện di ADN tổng số của các mẫu Thông xuân nha

Kết quả phân tích cho thấy, ADN tổng số từ mẫu thông được tách chiết có sản phẩm tạo ra rõ nét, không đứt gãy, đảm bảo chất lượng thực hiện phản ứng PCR. Các mẫu có độ tinh sạch cao, thể hiện qua tỷ lệ bước sóng 260/280 dao động trong khoảng 1,7 đến 1,87, nồng độ ADN tổng số từ 150 ng/ μ L - 200 ng/ μ L.

3.2. Kết quả khuếch đại các vùng gen mã vạch ADN bằng phản ứng PCR

Khuếch đại 2 vùng ADN tổng số của 5 mẫu thông phân tích, kết quả PCR được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Kết quả PCR với các môi, **A:** gen *rbcL*, **B** gen *trnF-trnL*

Kết quả PCR cho thấy đã tạo sản phẩm có kích thước lần lượt khoảng 500 bp đối với gene *rbcL* (hình 3A), 900 bp đối với vùng gene *trnF-trnL* (hình 3B). Từ sản phẩm PCR thu được, 10 sản phẩm khuếch đại từ 5 mẫu Thông xuân nha trên hai vùng gene *rbcL* và *trnF-trnL* được gửi đi giải trình tự và phân tích ở các bước tiếp theo.

3.3. Kết quả phân tích trình tự vùng gen *rbcL*

Trình tự vùng gen *rbcL* của cây Thông xuân nha có chiều dài 519 bp và được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế (PX516299) và đây là công bố đầu tiên về vùng gen *rbcL* của Thông xuân nha.

So sánh trình tự vùng gen *rbcL* của loài Thông xuân nha với các loài thông khác được công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế bằng công cụ BLAST cho thấy mức độ tương đồng như sau:

Bảng 1. Mức độ tương đồng của vùng gen *rbcL* của Thông xuân nha với các loài thông khác

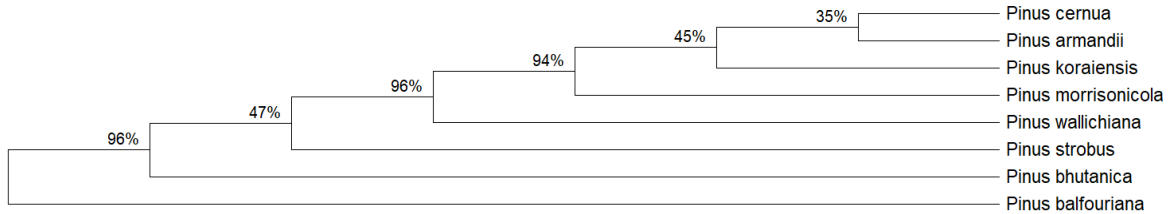
Tên khoa học (Scientific name)	Điểm cao nhất (Max Score)	Tổng điểm (Total Score)	Độ phủ trình tự truy vấn (Query Cover)	Giá trị E (E Value)	Độ tương đồng (Per. Ident)	Chiều dài (Acc. Len)	Số truy cập (Accession No.)
<i>Pinus armandii</i>	959	959	100%	0,0	100,00%	668	MH116483.1
<i>Pinus bhutanica</i>	953	953	100%	0,0	99,81%	1436	DQ353719.1
<i>Pinus morrisonicola</i>	953	953	100%	0,0	99,81%	1442	AY497227.1
<i>Pinus wallichiana</i>	953	953	100%	0,0	99,81%	1474	AY734483.1
<i>Pinus strobus</i>	953	953	100%	0,0	99,81%	703	GQ436673.1
<i>Pinus koraiensis</i>	953	953	100%	0,0	99,81%	1428	JQ512578.1
<i>Pinus balfouriana</i>	942	942	100%	0,0	99,42%	1418	AY115760.1

Đối với vùng gen *rbcL*, loài Thông xuân nha có mức độ tương đồng 100% với loài *P. armandii* (Mã truy cập MH116483.1), 99,81% với loài

P. bhutanica (Mã truy cập DQ353719.1)
P. morrisonicola (Mã truy cập AY497227.1)
P. wallichiana (Mã truy cập AY734483.1)

P. strobus (Mã truy cập GQ436673.1)
P. koraiensis (Mã truy cập JQ512578.1) và
P. balfouriana (Mã truy cập AY115760.1).

Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ di truyền giữa loài Thông xuân nha với các loài thuộc chi *Pinus* được xây dựng (hình 4).



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *rbcL* của loài Thông xuân nha với các loài thông khác thuộc chi *Pinus*. Tỷ lệ % là giá trị bootstrap

Vùng gen *rbcL* (ribulose - 1,5 - bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) là vùng gen có mức độ bảo thủ cao do có mức độ tiến hóa chậm, nghĩa là trình tự của nó ít bị biến dị di truyền giữa các loài, đặc biệt là cùng một loài hoặc chi (Armenise *et al.*, 2012). Do đó vùng gen *rbcL* có mức độ tương đồng cao giữa các loài gần gũi, nhất là các loài trong cùng một chi. Armenise và đồng tác giả (2012) đã sử dụng vùng gen đơn *rbcL* và phối hợp giữa vùng gen *rbcL* + *matK* để xác định mức độ phân biệt giữa 25 loài thông. Kết quả cho thấy nếu chỉ sử dụng vùng gen đơn *rbcL* sẽ cho mức độ phân biệt thành công được 57%, trong khi đó phối hợp giữa 2 vùng gen

rbcL + *matK* cho mức độ phân biệt thành công là 100% các loài nghiên cứu.

3.4. Kết quả phân tích trình tự vùng gen *trnF-trnL*

Trình tự vùng gen *trnF-trnL* của cây Thông xuân nha có chiều dài 938 bp và được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế (PX516299) và đây là công bố đầu tiên về vùng gen *trnF-trnL* của Thông xuân nha.

So sánh trình tự vùng gen *trnF-trnL* của loài Thông xuân nha với các loài thông khác được công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế bằng công cụ BLAST cho thấy mức độ tương đồng như bảng 2 sau:

Bảng 2. Mức độ tương đồng của vùng gen *trnF-trnL* của Thông xuân nha với các loài thông khác

Tên Khoa học (Scientific name)	Điểm cao nhất (Max Score)	Tổng điểm (Total Score)	Độ phủ trình tự truy vấn (Query Cover)	Giá trị E (E Value)	Độ tương đồng (Per. Ident)	Chiều dài (Acc. Len)	Số truy cập Accession
<i>Pinus bungeana</i>	1672	1672	96%	0	100%	1342	DQ010641.1
<i>Pinus flexilis</i>	1472	1534	93%	0	97,48%	853	FJ529004.1
<i>Pinus koraiensis</i>	1615	1677	94%	0	99,66%	883	KT159791.1
<i>Pinus strobiformis</i>	1221	1283	73%	0	98,84%	682	JN040921.1
<i>Pinus strobus</i>	1640	1703	96%	0	99,45%	1339	DQ010640.1
<i>Pinus albicaulis</i>	1480	1542	86%	0	99,75%	807	EF546753.1
<i>Pinus lambertiana</i>	1491	1491	76%	0	86,5%	712	EF546755.1

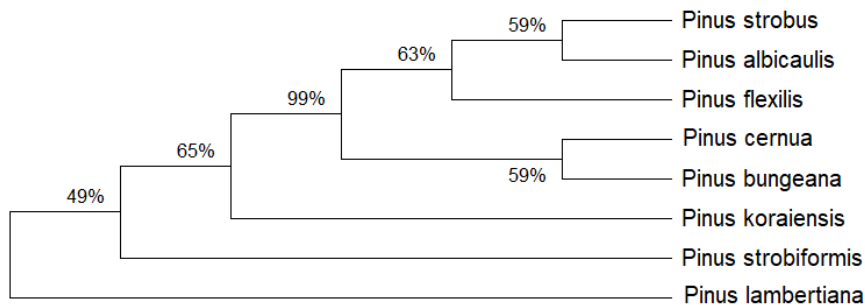
Vùng gen *trnF-trnL* của loài Thông xuân nha có mức độ tương đồng 100% với loài *P. bungeana* (Mã truy cập DQ010641.1), 99,45% với loài *P. strobus* (Mã truy cập DQ010640.1), 99,75%

với loài *P. albicaulis* (Mã truy cập EF546753.1) và thấp nhất là 97,48% với loài *P. flexilis* (Mã truy cập FJ529004.1).

Nghiên cứu về mức độ phân biệt các loài thuộc họ Cà (Solanaceae) và họ Đậu (Fabaceae) bằng vùng gen *trnF-trnL* cho thấy đây là vùng gen hữu hiệu để phân biệt các loài thuộc cùng chi, trong khi vùng gen *matK* không phân biệt được (Herman *et al.*, 2023). Vùng gen *trnF-trnL* là vùng gen có tính bảo thủ trung bình và vùng gen này có tốc độ tiến hóa tương đối chậm, nghĩa là nó bảo thủ đủ để duy trì sự tương đồng

giữa các loài gần gũi, nhưng cũng có đủ biến dị di truyền để phân biệt các loài khác nhau (Armenise *et al.*, 2012). Điều này làm cho vùng gen này phù hợp để sử dụng trong định danh loài, đặc biệt ở thực vật.

Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ di truyền giữa loài Thông xuân nha với các loài thuộc chi *Pinus* được xây dựng (hình 5).



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *trnF-trnL* của loài Thông xuân nha với các loài thông khác thuộc chi *Pinus*. Tỷ lệ % là giá trị bootstrap

Han và đồng tác giả (2016) đã sử dụng các vùng gen đơn lẻ *matK*, *rbcL* and *ITS* và *trnS-trnG* để xác định mức độ định danh của 85 loài thuộc họ Phong (Aceraceae) trong đó vùng gen *matK* phân biệt được 33,33% các loài với nhau, vùng gen *trnS-trnG* phân biệt được 23,81% và *rbcL* là 8,11%. Tuy nhiên, nếu phối hợp 4 vùng gen này thì mức độ phân biệt các loài tăng lên khá cao (90,5%). Tan và đồng tác giả (2018) đã sử dụng 3 vùng gen lục lạp là *rbcL*, *matK* và *trnH-psbA* và 1 vùng gen nhân là *ITS* để xác định mức độ định danh loài bằng sự phối hợp của các vùng mã vạch ADN cho 201 loài (gồm 72 loài cây gỗ cứng và 129 loài thảo dược). Kết quả cho thấy tổ hợp mã vạch *rbcL + ITS* phân biệt được 88,6% các loài, sau đó là *rbcL + matK* phân biệt được 86,6% và tổ hợp *rbcL + trnH-psbA* phân biệt được 86,01%; trong khi đó phối hợp cả 4 vùng mã vạch này (*rbcL + ITS + matK + trnH-psbA*) phân biệt được 90,21% (Tan *et al.*, 2018). Armenise và đồng tác giả (2012) đã phối hợp 2 vùng gen *rbcL* và *matK* để đánh giá khả năng phân biệt 25 loài thông, kết quả cho thấy vùng

gen *rbcL* phân biệt được 57%, trong khi đó tổ hợp *rbcL + matK* phân biệt 100%.

Hải và đồng tác giả (2021) đã phát triển thành công 2 vùng gen là *matK* và *trnH-psbA* cho Thông xuân nha với chiều dài vùng gen 802 bp và 555 bp (theo thứ tự tương ứng). Nhóm tác giả cũng chỉ ra rằng, vùng gen *matK* có mức độ tương đồng 100% với nhiều loài thông khác, nên không thể sử dụng trong giám định loài, còn vùng gen *trnH-psbA* có khả năng phân biệt loài Thông xuân nha với các loài thông khác, duy chỉ có loài Thông *P. kwangtungensis* có mức độ tương đồng 100%. Kết quả nghiên cứu trên rất có ý nghĩa trong việc sử dụng mã vạch ADN để nhận diện loài Thông xuân nha.

Trong nghiên cứu này, vùng gen *rbcL* có thể được sử dụng để phân biệt loài Thông xuân nha với một số loài thông, trừ loài *P. armandii* có mức độ tương đồng 100%. Đối với vùng gen *trnF-trnL* cũng sử dụng được trong phân biệt loài Thông xuân nha với một số loài thông khác, ngoại trừ loài *P. bungeana* có mức độ tương đồng 100%.

Các kết quả nghiên cứu nêu trên cho thấy, việc sử dụng đơn lẻ một vùng gen mã vạch ADN để phân loại hay giám định loài thường sẽ cho hiệu quả phân biệt thấp, mức độ chính xác chưa cao, nhất là cho các loài cây gỗ cứng. Do đó việc phát triển các vùng gen mã vạch ADN cho Thông xuân nha là cần thiết.

Kết quả nghiên cứu góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu vùng gen Thông xuân nha và là tiền đề cho việc xác định mức độ phân biệt loài bằng sự phối hợp nhiều vùng gen mã vạch với nhau, góp phần vào việc giám định loài thông quý hiếm.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định và đặc trưng hai vùng gen lục lạp *rbcL* và *trnF-trnL* của loài Thông xuân nha (*Pinus cernua* L.K. Phan ex Aver., K.S. Nguyen & T.H. Nguyen), loài thông năm lá đặc hữu, quý hiếm của Việt Nam. Kết quả cho thấy, cả hai vùng gen đều được khuếch đại và giải trình tự thành công, với chiều dài lần lượt là 519 bp (*rbcL*) và 938 bp (*trnF-trnL*). Trình tự vùng gen *rbcL* có mức độ bảo thủ cao, thể hiện sự tương đồng gần như tuyệt đối (99,8 - 100%) với các loài thông cùng chi, trong khi vùng gen *trnF-trnL* thể hiện biến dị di truyền vừa phải (97,5 - 100%), phù hợp cho việc phân biệt và xác định mối quan hệ di truyền giữa các loài gần gũi.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ hai vùng gen đều khẳng định mối quan hệ tiến hóa gần gũi giữa Thông xuân nha (*P. cernua*) và nhóm Thông năm lá châu Á. Việc công bố lần đầu tiên hai trình tự *rbcL* và *trnF-trnL* của loài này trên Ngân hàng Gen Quốc tế (PX516299) đã góp phần mở rộng cơ sở dữ liệu mã vạch ADN thực vật của Việt Nam, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về phân loại, giám định và bảo tồn nguồn gen của các loài thông quý hiếm.

Kết quả nghiên cứu đồng thời cho thấy việc kết hợp đa vùng gen, đặc biệt là các vùng có tốc độ tiến hóa khác nhau, là một chiến lược tối ưu để nâng cao độ chính xác trong giám định và nghiên cứu quan hệ phát sinh loài. Do đó, kết quả nghiên cứu không chỉ cung cấp công cụ phân tử tin cậy cho việc nhận dạng loài Thông xuân nha quý hiếm mà còn tạo cơ sở khoa học vững chắc, góp phần quan trọng vào các chiến lược bảo tồn và quản lý nguồn gen loài cây đặc hữu này một cách hiệu quả và bền vững.

LỜI CẢM ƠN: Công trình nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số NVCC08.06/25-25, nghiên cứu có sử dụng trang thiết bị phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Vắc xin và ADN ứng dụng, Viện Sinh học. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kress JW, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369 - 8374.
2. Kress WJ, Erickson DL, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
3. Armenise, L., Simeone, M., Piredda, R., Schirone, B., 2012. Validation of DNA barcoding as an efficient tool for taxon identification and detection of species diversity in Italian conifers. *European Journal of Forest Research* 131. DOI: 10.1007/s10342-012-0602-0
4. Averyanov, L.V., Nguyen, T.H., Sinh, K.N., Pham, T.V., Lamxay, V., Bounphanmy, S., Lorphengsy, S., Phan, L.K., Lanorsavanh, S., Chantthavongsa, K., 2014. Gymnosperms of Laos. *Nordic Journal of Botany* 32, 765 - 805. DOI: 10.1111/njb.00498
5. Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., Barrett, S.C.H., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLOS ONE* 3, e2802. DOI: 10.1371/journal.pone.0002802

6. Gám, N.T.H., Vũ Thị Lan, A., Huế, K.T., Yên, P.T.K., Nam, N.Đ., Hương, B.T.M., Nhung, N.H., Phát, Đ.T., 2023. Xác định ADN mã vạch cho loài Đàn hương trắng (*Santalum album* L.) phục vụ giám định loài. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp 2, 24 - 32.
7. Hải, P.H., Sâm, H.V., Huân, H.V., Hương, B.T.M., 2021. Ứng dụng một số mã vạch ADN trong nhận diện Thông xuân nha. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp 3, 4 - 12.
8. Han, Y.-W., Duan, D., Ma, X.-F., Jia, Y., Liu, Z.-L., Zhao, G.-F., Li, Z.-H., 2016. Efficient identification of the forest tree species in aceraceae using DNA barcodes. *Frontiers in Plant Science* Volume 7 - 2016.
9. Hebert, P. D., Cywinska A, Ball S. L., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 313 - 321.
10. Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 14812 - 14817. DOI: 10.1073/pnas.0406166101
11. Herman, H., Khairi, H., Hasibuan, A., Asmania, Utami,R.I., Anzaelina, D.N., Oktaviano, Z., Lestari, W., Adiwirman, Indriyani, D., 2023. The ability of *matK* and *trnL - trnL-trnF* intergenic spacer to discern certain species accession of the families Solanaceae and Fabaceae. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 55, 97 - 106. DOI: 10.54910/sabrao2023.55.1.9
12. Huyền, N.T., Thúy, M.T.P., Hà, T.T.T., Thủy, L.T., Hà, N.T.V., Ngọc, H.H., Nguyên, T.C., Hung, T.T., Khương, N.V., Quý, T.H., Bằng, P.T., Dũng, L.V., Bảo, N.T., Sơn, L., 2020. Ứng dụng một số mã vạch ADN trong phân tích quan hệ di truyền và định danh một số loài Giổi tại Gia Lai. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp 5, 63 - 70.
13. 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, e508. DOI: 10.1371/journal.pone.0000508
14. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., Tamura, K., 2024. MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution* 41, msae263. DOI: 10.1093/molbev/msae263
15. Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M.E., Skavdis, G., Moussis, V., Koutelidakis, A.E., Tzakos, A.G., 2024. DNA barcoding as a plant identification method. *Applied Sciences* 14. DOI: 10.3390/app14041415
16. Mildenhall, D.C., 2006. *Hypericum* pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: An example of forensic palynology. *Forensic Science International* 163, 231 - 235. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.11.028
17. Nguyễn Văn Hợp, Nguyễn Thị Hạnh, 2017. Một số đặc điểm sinh học, sinh thái học loài Thông xuân nha (*Pinus cernua* L. K. Phan ex Aver., K. S. Nguyễn & T. H. Nguyễn.) tại Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Nha, tỉnh Sơn La. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp 26 - 34.
18. Stewart, C.N., Jr, 2005. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. *Trends in Plant Science* 10, 390 - 396. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.06.003
19. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology* 17, 1105 - 9. DOI: 10.1007/BF00037152
20. Tan, S.-L., Luo, Y.-H., Hollingsworth, P.M., Burgess, K.S., Xu, K., Li, D.-Z., Gao, L.-M., 2018. DNA barcoding herbaceous and woody plant species at a subalpine forest dynamics plot in Southwest China. *Ecology and Evolution* 8, 7195 - 7205. DOI: 10.1002/ece3.4254
21. Valentini, A., Miquel, C., Nawaz Ali, M., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E., Taberlet, P., 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources* 9, 51 - 60. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x

Email tác giả liên hệ: tranhoquang@ib.ac.vn

Ngày nhận bài: 24/10/2025

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 26/10/2025; 27/10/2025

Ngày duyệt đăng: 11/11/2025