

NUCLEOTIDE SEQUENCE CHARACTERISTICS OF THE ITS REGION ISOLATED FROM *Ficus simplicissima* LOUR. COLLECTED IN THAI NGUYEN

Vu Thi Thu Thuy^{1*}, Luc Van Duong², Chu Hoang Mau¹

¹TNU - University of Education

²Ky Phu Secondary School, Dai Tu District, Thai Nguyen Province

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 20/7/2023 Revised: 30/8/2023 Published: 13/9/2023	<i>Ficus simplicissima</i> Lour plant contains some biologically active substances with anti-oxidant, anti-cancer, and anti-diabetic effects. Identifying <i>F. simplicissima</i> species has encountered many difficulties due to its morphological and anatomical characteristics similar to some species of the <i>Ficus</i> genus. Therefore, it is necessary to use DNA markers that support species identification of <i>F. simplicissima</i>. In this study, the ITS region was isolated from <i>F. simplicissima</i> sample collected in Thai Nguyen by PCR, nucleotide sequencing and phylogenetic analysis of species of the <i>Ficus</i> genus. The results show that the ITS region sequence of the sample <i>F. simplicissima</i> collected in Thai Nguyen has a size of 814 bp, with a high similarity rate (97.46%) compared with that of <i>Ficus hirta</i>. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the ITS region has shown that the ITS sequence is a potential DNA barcode candidate that can be used to distinguish species of the <i>Ficus</i> genus.
KEYWORDS <i>Ficus simplicissima</i> Lour DNA barcode ITS Species identification Phylogeny	

ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE CỦA VÙNG ITS PHÂN LẬP TỪ CÂY VÚ BÒ (*Ficus simplicissima* LOUR.) THU THẬP TẠI THÁI NGUYÊN

Vũ Thị Thu Thủy^{1*}, Lục Văn Dương², Chu Hoàng Mậu¹

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

²Trường Trung học cơ sở Ký Phú, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 20/7/2023 Ngày hoàn thiện: 30/8/2023 Ngày đăng: 13/9/2023	Cây Vú bò (<i>Ficus simplicissima</i> Lour.) chứa một số chất có hoạt tính sinh học có tác dụng chống oxy hoá, chống ung thư, trị bệnh tiểu đường... Hiện nay, việc nhận diện loài Vú bò (<i>F. simplicissima</i>) còn gặp nhiều khó khăn do đặc điểm hình thái, giải phẫu tương tự một số loài thuộc chi <i>Ficus</i>. Vì vậy, việc sử dụng chỉ thị DNA hỗ trợ định danh loài <i>F. simplicissima</i> là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, vùng ITS phân lập từ mẫu Vú bò thu thập tại Thái Nguyên bằng phương pháp PCR, giải trình tự nucleotide và phân tích phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi <i>Ficus</i>. Kết quả cho thấy trình tự vùng ITS của mẫu Vú bò thu tại Thái Nguyên có kích thước 814 bp, có tỷ lệ tương đồng cao (97,46%) so với loài <i>Ficus hirta</i>. Phân tích sự phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS đã cho thấy trình tự ITS là ứng cử viên mã vạch DNA tiềm năng có thể được sử dụng để phân biệt các loài thuộc chi <i>Ficus</i>.
TỪ KHÓA Vú bò (<i>Ficus simplicissima</i>) Mã vạch DNA ITS Định danh loài Phát sinh chủng loại	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8364>

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

1. Giới thiệu

Chi sung (*Ficus*) là một trong 50 chi thực vật hạt kín lớn nhất gồm khoảng 850 loài phân bố rộng rãi ở các vùng ôn đới, nhiệt đới và bán nhiệt đới như: *F. abutilifolia*; *F. aguaraguensis*; *F. albert-smithii*; *F. albipila*; *F. benghalensis*...; có giá trị sinh thái và cảnh quan cao. Các loài thuộc chi *Ficus* có cấu tạo hình thái rất đa dạng, có thể là cây thân gỗ, bụi, leo... [1].

Vú bò hay còn gọi là Thổ hoàng kỳ, Vú bò sẻ, Vú chó, Vú lợn, Ngải phún, Sung ba thùy... có tên khoa học là *Ficus simplicissima* Lour. [2]. Loài Vú bò phân bố rộng khắp trên thế giới, đặc biệt ở vùng có khí hậu ẩm ướt như nhiệt đới, chúng phát triển mạnh mẽ trong tự nhiên ở các nước như: Bangladesh, Campuchia, Nam Trung Quốc, Đông Nam Trung Quốc, Đông Himalaya, Hải Nam, Jawa, Lào, Malaya, Myanmar, Nepal, Thái Lan, Việt Nam... [1]. Cây Vú bò chứa một số thành phần hoá học quan trọng như phenol, flavonoid, alcaloid, tannin... Các thành phần chính và nồng độ các hợp chất hoá học có thể khác nhau tùy thuộc vào loài cây Vú bò cụ thể và điều kiện môi trường. Một số hoạt tính sinh học được công bố bao gồm chất chống oxy hóa, trị đái tháo đường, chống viêm, chống ung thư, chống khối u và chống tăng sinh, chống đột biến, kháng khuẩn, chống giun sán, bảo vệ gan, chữa lành vết thương, chống đông máu, hoạt động điều hòa miễn dịch, chống căng thẳng và nghiên cứu độc tính. Các nhà máy cũng được sử dụng như thuốc chống côn trùng [1]-[3]. Các nghiên cứu về cây Vú bò cho thấy cây có nhiều loài khác nhau mặc dù chúng có hình thái tương đối giống nhau [1]-[3]. Vì vậy, việc sử dụng các phương pháp để phân loại cây Vú bò là cần thiết.

Mã vạch DNA đã mang lại nhiều tiềm năng trong nghiên cứu sinh học, hỗ trợ trong công tác phân loại và xác định loài. Đặc điểm ổn định và khả năng phân biệt giữa các loài đã mang lại lợi ích lớn trong giám định, phát hiện loài mới và theo dõi di truyền của sinh vật [4].

DNA mã vạch có thể là những đoạn DNA phân bố ở trong nhân như: 18S, 5,6S, 26S, 5,8S spacer...và vùng ITS; nằm ở ty thể như: Cytb và vùng kiểm soát; nằm ở lục lạp như: *matK*, *rbcL*, *atpβ*, *ndnF*, 16S... [4]-[9].

Vùng gene ITS có tỷ lệ biến đổi cao, tức là có sự khác biệt trong chuỗi nucleotide giữa các loài thực vật khác nhau. Điều này có thể nghiên cứu sử dụng vùng ITS để phân loại và phân tích quan hệ họ hàng giữa các loài thực vật. Vùng ITS chứa thông tin phân loại quan trọng, đặc biệt trong cấp độ thấp như chi và loài. Sự biến đổi trong vùng ITS cho phép nhận dạng và phân loại các loài thực vật, đồng thời xác định quan hệ họ hàng và tiến hóa của chúng [10]-[12].

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu cây Vú bò (*F. simplicissima*) thu thập tại xã Hùng Sơn, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu. Mẫu cây đã được xác định và mô tả các đặc điểm về hình thái, giải phẫu theo nghiên cứu trước đây của Vũ Thị Thu Thủy và cộng sự [13].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle và cộng sự (1987) [14]. Các bước cơ bản gồm: Làm mịn khoảng 150-200 mg lá với nitor lỏng; Bổ sung 700μL đệm rửa lắc mạnh trong 40 giây, ly tâm (10000 vòng/phút, 4°C, 15 phút), loại dịch nổi; Bổ sung 700 μL đệm chiết, đảo đều và giữ 65°C trong 60 phút, giữ mẫu trong nhiệt độ phòng 5 phút. Bổ sung 700 μL dung dịch chloroform/isoamyl alcohol (24:1), đảo đều trong 15 phút. Ly tâm 10000 vòng/phút trong 15 phút. Hút 600 μL dịch nổi sang ống eppendorf, bổ sung thêm 600 μL dung dịch phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1), đảo đều ống trong 15 phút. Ly tâm 10000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Hút 500 μL dung dịch sang ống eppendorf mới, thêm 50 μL isoamyl alcohol, đặt ở -20°C khoảng 2 giờ. Ly tâm 7000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Loại

dịch nổi, rửa DNA bằng cách thêm 500 μL cồn 70%, ly tâm với tốc độ 7000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Hòa tan trong 50 μL nước cất. Kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8%.

* *Phương pháp khuếch đại vùng ITS*

Nhân bản vùng ITS bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi có đặc điểm được trình bày ở bảng 1.

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

Mồi	Trình tự mồi	Kích thước dự kiến	Tham khảo
ITS-12F	5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG-3'	800bp	Lepcha C. và Sharma B. (2021) [7]
ITS-12R	5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'		

Thành phần để phản ứng PCR: master mix (2X): 7,5 μL ; mồi xuôi (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$): 0,5 μL ; mồi ngược (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$): 0,5 μL ; DNA khuôn (10 ng/ μL): 0,5 μL và H_2O : 6 μL . Tổng thể là 15 μL .

Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân trình tự vùng ITS: 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 vùng ITS bằng phương pháp Sanger trên máy giải trình tự ABI3500 (Hãng Applied Biosystem) tại Công ty TNHH T & N Biosolution, thành phố Hồ Chí Minh.

Phân tích, so sánh và xây dựng sơ đồ phát sinh chủng loại bằng các chương trình BioEdit và MEGAX theo hướng dẫn của Chu Hoàng Mậu và cộng sự (2019) [15].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập và xác định trình tự nucleotide vùng gene ITS của cây Vú bò

Sau khi tách chiết và tinh sạch DNA, cặp mồi ITS-12F/ITS-12R được sử dụng để khuếch đại vùng gene ITS của cây Vú bò. Sản phẩm PCR được làm sạch bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification của hãng Thermo Fisher và giải trình tự tự động trên máy ABI3500 (hãng Applied Biosystem), kết quả trình tự nucleotid thu được trình bày trên hình 1.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
TTGCTGCCCC GTGACGTGCG GAGAAGTCCA CTGAACCTTA TCATTTAGAG GAAGGAGAAG TCGTAACAAG GTTTCGTAG GTGAACCTGC GGAAGGATCA

110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
TTGTGGAAC CTGCCACGA GAGAGACCCG CGAACACGTT ACAACACCCG AGGGGGTAA GGGGGAACA CTCCTCGAC CCTCTCGCC GGTGCGTGT

210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
GGCCCCGCC CTGGCTTCG GCACAAACG AACCCGACG CGGAATGCT CAAGGAAAGA CAACGAGAC ATCCAGCCA TCAGGCCCC GGAGCGGTG

310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
ACTCTGCTC GGTGGTTCG TCGGATCGG CGCGAGTATA AAGAATGACT CTCGGCAACG GATATCTCG CTCTCGCATC GATGAAGATT GTAGCAAAAT

410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
CGGATACCTG GTGTGAATTG CAGAACTCTG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC CCCCAGAGCC ATCAGGTGGA GGCAATGTCT CCCTGGCGCT

510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
CACACCGCGT TGCTCCCCC CCCCCCCCA AACCCCGTG CCGCTCTGG GGGGCGAGG GGGGACATC GGGGCGGAA AATGACCTCC CGTGCATCT

610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
TCGACCCCGG GTTGGTCCA AAATCGAGTC CCCTGTCAAG TCGTCTTGG AACAGGTAGT CGATCATTCG GTCCACCGC CATGTGCTC GGACACGCAT

710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
CGGGACTCCG ACAGACCCCA ATGGGCCGT CACGGGTGCG TCCAACGCGA CCCCAGGTCA GCGGGGCTA CCGCTGAGT TTAAGCATAT CAATAAGCGG

810
AGGAAAAGAA ACTA

```

Hình 1. Trình tự nucleotid của vùng ITS của cây Vú bò (*F. simplicissima*)

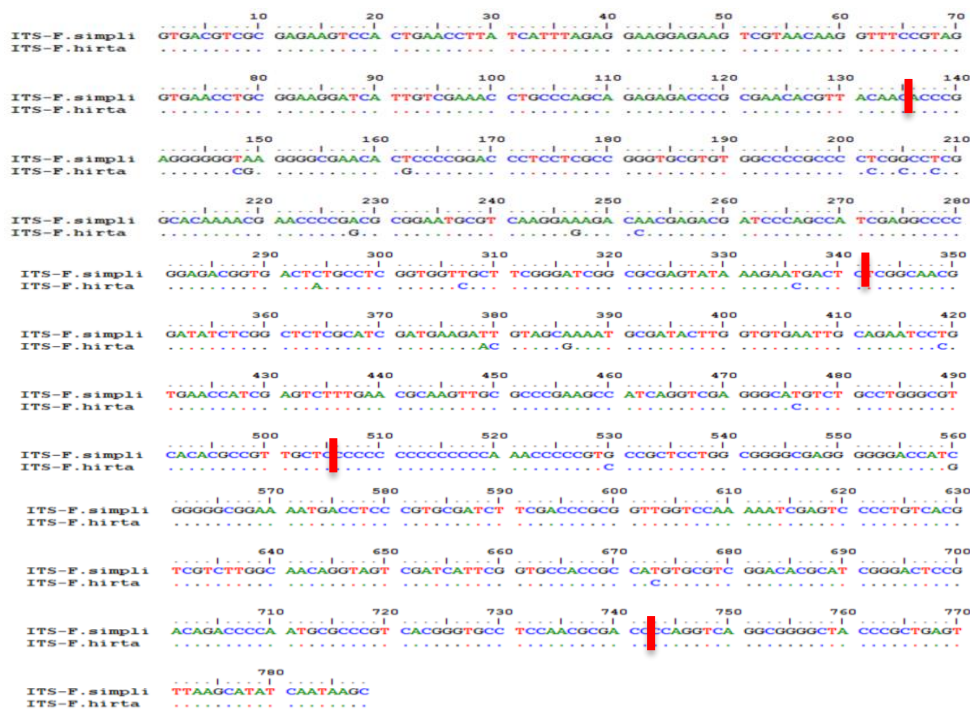
Hình 1 cho thấy số lượng và thứ tự của 814 nucleotide vùng ITS của cây Vú bò (*F. simplicissima*) thu thập tại Thái Nguyên.

3.2. Đặc điểm trình tự nucleotid vùng ITS của cây Vú bò

So sánh vùng ITS của mẫu *F. simplicissima* thu thập được với những công bố trên NCBI bằng phần mềm BLAST. Kết quả phân tích thông qua các số liệu về điểm cao nhất (Max core), tổng điểm (Total score), tỷ lệ bao phủ (Query cover) và mức độ tương đồng (Per. Ident). Theo đó, max core là điểm cao nhất khi BLAST trình tự muốn nghiên cứu với các trình tự trên cơ sở dữ liệu của NCBI; Total score là tổng điểm khi BLAST, được sinh ra khi hai đoạn có tương đồng; Query cover là tỷ lệ bao phủ tính qua độ dài của hai đoạn trình tự; Per. Ident (Percentage Identity) là mức độ tương đồng giữa hai trình tự [16].

Vùng ITS của mẫu *F. simplicissima* thu thập tại Thái Nguyên có tổng điểm (1345) và độ che phủ (96%) là cao nhất đối với vùng ITS của loài *F. hirta*, có mã số gene AY730127.1. Nghiên cứu của Ronsted và cộng sự (2006) cho biết, vùng ITS của loài *F. hirta* có kích thước 788 bp, được chia làm 5 phần: đoạn thứ nhất mã hóa gen 18S của ribosome kích thước 125 bp (từ vị trí 1-125), phần thứ 2 là đoạn chèn thứ nhất (ITS1) có 206 bp (từ vị trí 126 đến 331), đoạn thứ 3 là phần mã hóa gen 5,8S có 164 bp (từ vị trí 332 đến 495), phần thứ 4 là đoạn chèn thứ hai (ITS2) có 237 bp (từ vị trí 496 đến 732), đoạn thứ 5 mã hóa gene 28S có 56 bp (từ vị trí 733 đến 788) [16].

Sử dụng phần mềm BioEdit, xác định được cấu trúc vùng ITS của mẫu *F. simplicissima* thu thập tại Thái Nguyên gồm đoạn 18S từ vị trí 11 đến 135; đoạn ITS1 từ vị trí 136 đến 341; đoạn 5,8S từ vị trí 342 đến 505; đoạn ITS2 từ 506 đến 742 và đoạn 28S từ vị trí 743 đến 798. Các đoạn được ngăn cách nhau bởi gạch đỏ trên hình 2. Bên cạnh đó, các điểm khác biệt của *F. simplicissima* và *Ficus hirta* cũng được thể hiện ở hình 2.

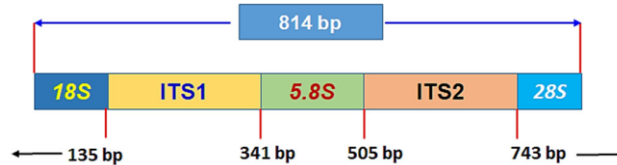


Hình 2. Trình tự vùng gene ITS phân lập từ cây Vú bò (*F. simplicissima*) và ITS thuộc loài *F. hirta* (AY730127.1) trên GenBank (Thanh dọc màu đỏ là điểm ngăn cách giữa các vùng)

Hình 2 là vị trí đoạn tương đồng của vùng ITS (mẫu thu thập tại Thái Nguyên và loài *F. hirta*). Kết quả trên hình cũng cho thấy, có 20 vị trí sai khác, sự sai khác xảy ra trên 3 vùng: vùng ITS1 (có 11 vị trí, chiếm 5,34% sự sai khác), vùng 5,8S (có 5 vị trí, chiếm 3,05% sự sai khác), vùng ITS2 (có 3 vị trí, chiếm 1,27% sự sai khác). Các vị trí sai khác cụ thể gồm (1) vùng ITS1: vị trí 148 (T → C), vị trí 149 (A → G), vị trí 162 (T → G), vị trí 202 (T → C), vị trí 205 (G → C), vị trí 208 (T → C), vị trí 228 (A → G), vị trí 247 (A → G), vị trí 252 (A → C), vị trí 294 (C → A), vị

trí 336 (T → C); (2) vùng 5,8S gồm: vị trí 379 (T → A), vị trí 380 (T → C), vị trí 386 (A → G), vị trí 419 (T → C), vị trí 476 (T → C); (3) vùng ITS2: ở vị trí 530 (G → C), vị trí 560 (C → G), vị trí 633 (T → C).

Từ kết quả so sánh trình tự nucleotide của vùng ITS phân lập từ loài *F. simplicissima* thu tại Thái Nguyên với loài *F. hirta* trên GenBank, cấu trúc vùng ITS của loài Vú bò (*F. simplicissima*) có thể biểu diễn bằng sơ đồ ở hình 3.



Hình 3. Sơ đồ cấu trúc của vùng ITS phân lập từ loài Vú bò (*F. simplicissima* L.)

Nghiên cứu cũng cho thấy vùng ITS1 là vùng có thay đổi nhiều hơn so với hai vùng còn lại trên cây Vú bò (*F. simplicissima*). Kết quả này có nét tương tự như nghiên cứu của Mullineux T. và cộng sự (2009) và R. Henrik Nilsson và cộng sự (2008) khi sử dụng độc lập các tiểu phần ITS1 và ITS2 để xác định các loài trong nhiều dòng nấm và các tác giả cho rằng ITS1 thay đổi nhiều hơn ITS2 [11], [12].

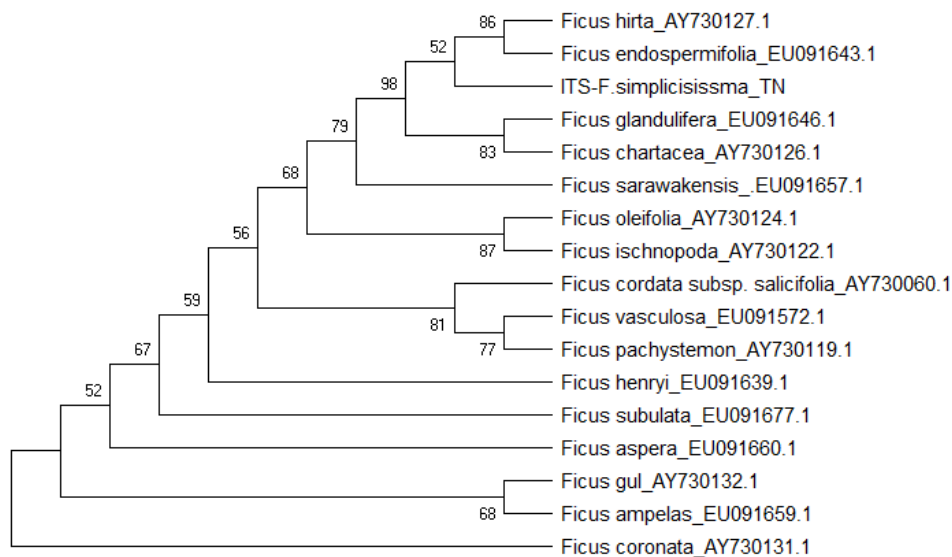
Mười sáu trình tự ITS có tổng điểm, tỷ lệ bao phủ và mức độ tương đồng cao khi so sánh làm căn cứ để lựa chọn thiết lập sơ đồ mô tả sự tiến hóa phân tử giữa các loài thuộc chi *Ficus*. Thông tin của 16 trình tự được lựa chọn để nghiên cứu trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích BLAST Nucleotide với trình tự gene ITS mẫu cây Vú bò

STT	Mã số gene	Loài	Tổng điểm (Total score)	Độ che phủ (Query cover)	Độ tương đồng (Per. Ident)	Kích thước (bp)	Tham khảo
1	AY730127.1	<i>F. hirta</i>	1345	96	97,46%	788	[16]
2	EU091646.1	<i>F. glandulifera</i>	1306	97	96,35%	793	[17]
3	AY730126.1	<i>F. chartacea</i>	1253	93	95,96%	767	[18]
4	AY730132.1	<i>F. gul</i>	1219	97	94,38%	794	[19]
5	EU091659.1	<i>F. ampelas</i>	1214	97	94,26%	794	[20]
6	EU091639.1	<i>F. henryi</i>	1208	97	94,33%	787	[21]
7	EU091643.1	<i>F. endopermifolia</i>	1195	88	96,80%	714	[22]
8	AY730122.1	<i>F. ischnopoda</i>	1195	96	94,18%	783	[23]
9	EU091660.1	<i>F. aspera</i>	1192	96	93,95%	786	[24]
10	AY730060.1	<i>F. cordata</i>	1192	97	93,84%	791	[25]
11	EU091657.1	<i>F. sarawakensis</i>	1190	97	93,84%	788	[26]
12	EU091677.1	<i>F. subulata</i>	1188	97	93,62%	799	[27]
13	AY730119.1	<i>F. pachystemon</i>	1186	96	93,92%	783	[28]
14	AY730131.1	<i>F. coronata</i>	1179	96	93,70%	787	[29]
15	AY730124.1	<i>F. oleifolia</i>	1179	97	93,70%	786	[30]
16	EU091572.1	<i>F. vasculosa</i>	1177	97	93,60%	789	[31]

Qua bảng 2 cho thấy, 16 trình tự có tổng điểm từ 1177 đến 1345, kích thước từ 714 bp đến 799 bp, tỷ lệ bao phủ từ 88% đến 97% và có độ tương đồng từ 93,60% đến 97,46%. Mười sáu trình tự thuộc 16 loài khác biệt trong chi *Ficus*, các loài đó là: *F. hirta*, *F. glandulifera*, *F. chartacea*, *F. gul*, *F. ampelas*, *F. henryi*, *F. endopermifolia*, *F. ischnopoda*, *F. aspera*, *F. cordata*, *F. sarawakensis*, *F. subulata*, *F. pachystemon*, *F. coronata*, *F. oleifolia*, và *F. vasculosa*.

Trình tự nucleotide của vùng ITS của cây Vú bò (*F. simplicissima* L.) tiếp tục được sử dụng để thiết lập sơ đồ mô tả sự tiến hóa phân tử bằng phương pháp Maximum Likelihood theo mô hình Tamura và Nei (1993) [9], trong MEGAX [32]. Cây dòng thuận bootstrap được suy ra từ 1000 lần lặp lại và dùng để biểu thị lịch sử tiến hóa của các đơn vị phân loại được phân tích. Tỷ lệ được hiển thị bên cạnh các nhánh là các đơn vị phân loại liên quan được nhóm lại với nhau trong thử nghiệm bootstrap (1000 lần lặp lại) [33].



Hình 4. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ của các mẫu trong chi *Ficus* dựa trên trình tự vùng ITS

Hình 4 là kết quả phân tích liên quan đến 17 trình tự nucleotide của vùng ITS với tổng cộng 683 vị trí trong bộ dữ liệu cuối cùng. Các phân tích tiến hóa đã được tiến hành trong MEGA X [32]. Kết quả nghiên cứu cho thấy cây phát sinh tách thành 2 nhóm lớn: nhóm I gồm 16 trình tự và nhóm II chỉ có 1 trình tự mang mã số EU091660.1 (*F. aspera*).

Vùng ITS của *F. aspera* có kích thước 786 bp, có cấu trúc gồm 5 đoạn giống như vùng ITS của mẫu có mã số AY730127.1 (*F. hirta*). Tuy nhiên, có sự khác về vị trí và số lượng của các nucleotide trong các đoạn, cụ thể gồm: đoạn mã hóa gen 18S kích thước 125 bp (từ vị trí 1-125), đoạn ITS1 có 212 bp (từ vị trí 126 đến 337), đoạn mã hóa gen 5,8S có 166 bp (từ vị trí 335 đến 500), đoạn ITS2 có 232 bp (từ vị trí 501 đến 732), đoạn mã hóa gene 28S có 53 bp (từ vị trí 733 đến 786) [16]. Kết quả nghiên cứu tiếp tục khẳng định sự vừa bảo thủ và vừa khác biệt về vùng ITS của chi *Ficus*.

Kết quả trên sơ đồ hình 4 cũng cho thấy, *F. simplicissima* có quan hệ gần với 2 loài có mã số AY730127.1 (*F. hirta*) và EU091643.1 (*F. endospermifolia*). Tuy nhiên, trong nhóm số thử nghiệm bootstrap nhỏ, đạt 52%. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này là căn cứ để chúng tôi đề xuất vùng gene ITS là ứng cử viên tiềm năng có thể sử dụng để phân biệt các loài thuộc chi *Ficus*.

4. Kết luận

Trình tự gene ITS của Vú bò (*F. simplicissima* Lour.) thu thập tại Thái Nguyên có kích thước 814 nucleotide, tương đồng đến 97,46% với loài *F. hirta*. Xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự ITS bằng phần mềm MEGAX cho thấy loài Vú bò (*F. simplicissima* Lour.) có quan hệ gần gũi với 2 loài gồm: *F. hirta* và *F. endospermifolia*, số thử nghiệm bootstrap là 52. Vùng gene ITS được đề xuất là ứng cử viên tiềm năng để phân biệt các loài thuộc chi *Ficus*.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Cơ sở có mã số CS.2021.19 do Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên cấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] C. C. Berg, "Classification and distribution of *Ficus*," *Experientia*, vol. 45, no. 7, pp. 605-611, 1989, doi: 10.1007/BF01975677.
- [2] T. L. Do, *Vietnamese medicinal plants and medicine taste*. Medical Publishing House, Hanoi, 2004.

- [3] S. Murugesu, J. Selamat, and V. Perumal, "Phytochemistry, Pharmacological Properties, and Recent Applications of *Ficus benghalensis* and *Ficus religiosa*," *Plants*, vol. 10, no. 12, 2021, Art. no. 2749, doi: 10.3390/plants10122749.
- [4] V. H. Ha, "DNA barcode: Principle and applied," 2015. [Online]. Available: genbank.org.vn. [Accessed June 12, 2023].
- [5] S. Antil, J. S. Abraham, S. Sripoorna, S. Maurya, J. Dagar, S. Makhija, P. Bhagat, R. Gupta, U. Sood, R. Lal, and R. Toteja, "DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review," *Molecular Biology Reports*, vol. 50, pp. 761-775, 2023, doi: 10.1007/s11033-022-07843-9.
- [6] M. W. Chase, D. E. Soltis, R. G. Olmstead, D. Morgan, D. H. Les, B. D. Mishler, and M. R. Duvall, "Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*," *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 80, no. 3, pp. 528-580, 1993.
- [7] C. Lepcha and B. Sharma, "Diversity of *Ficus* L. (Moraceae) and *ITS* uses in Sikkim Himalayas (India)," *Int. J. Bot. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 39-56, Nov. 2021.
- [8] J. Shaw, E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, and R. L. Small, "The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis," *American Journal of Botany*, vol. 92, no. 1, pp. 142-166, 2005.
- [9] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, pp. 512-526, 1993.
- [10] B. G. Baldwin, "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae," *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 1, no. 1, pp. 3-16, 1992.
- [11] T. Mullineux and G. Hausner, "Evolution of rDNA *ITS1* and *ITS2* sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*," *Fungal Genet Biol.*, vol. 46, pp. 855-867, 2009, doi: 10.1016/j.fgb.2009.08.001.
- [12] N. R. Henrik, E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg, and K.-H. Larsson, "Intraspecific *ITS* variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and *ITS* implications for molecular species identification," *Evol Bioinforma*, vol. 4, pp. 193-201, 2008.
- [13] T. T. T. Vu, V. T. Vu, T. T. H. Nguyen, T. H. Tran, and H. M. Chu, "The morphological, anatomical characteristics and antimicrobial albility of *Ficus simplicissima* plants," *TNU J. Sci. Technol.*, vol. 227, no. 01, pp. 138-145, 2022, doi: 10.34238/tnu-jst.5470.
- [14] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue," *Phytochem Bull*, vol. 19, pp. 11-15, 1987.
- [15] H. M. Chu, P. H. Hoang, and H. Q. Nguyen, *Bioinformatics*. Thai Nguyen University Publishing House, 2019.
- [16] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen, "Ficus hirta isolate FHI-69 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence," GenBank: AY730127.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730127>. [Accessed June 12, 2023].
- [17] N. Ronsted, "Ficus glandulifera isolate GLA-84 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence," GenBank: EU091646.1, 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091646.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [18] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen, "Ficus chartacea isolate FCH-68 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence," GenBank: AY730126.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730126.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [19] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen (2006), "Ficus gul isolate FGU-74 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence," GenBank: AY730132.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730132.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [20] N. Ronsted, "Ficus ampelas isolate AMP-97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;

- and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091659.1, 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091659.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [21] N. Ronsted, “Ficus henryi isolate HEN-77 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091639.1, 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091639.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [22] N. Ronsted, “Ficus endospermifolia isolate END-81 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091643.1, 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091643.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [23] N. Ronsted, “Ficus ischnopoda isolate FIS-64 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: AY730122.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730122.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [24] N. Ronsted, “Ficus aspera isolate ASP-98 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091660.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091660.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [25] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen, “Ficus cordata subsp. salicifolia isolate FCO-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: AY730060.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730060.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [26] N. Ronsted, “Ficus sarawakensis isolate SAR-95 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091657.1, 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091657.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [27] N. Ronsted, “Ficus subulata isolate SUB-115 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091677.1, 2012. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091677.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [28] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen, “Ficus pachystemon isolate FPA-61 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: AY730119.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730119.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [29] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen, “Ficus coronata isolate FCO-73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: AY730131.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730131.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [30] N. Ronsted, G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. A. Machado, and V. Savolainen, “Ficus oleifolia isolate FOL-66 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: AY730124.1, 2006. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY730124.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [31] N. Ronsted, “Ficus vasculosa isolate VAS-10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence,” GenBank: EU091572.1, 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU091572.1>. [Accessed June 12, 2023].
- [32] J. Felsenstein, “Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap,” *Evolution*, vol. 39, pp. 783-791, 1985.
- [33] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, pp. 1547-1549, 2018.