

ANALYSIS OF DNA BARCODE REGION *ITS* AND *MATK* IN SOME *POLYSCIAS* PLANTS OF VIETNAM

Huynh Thi Thu Hue^{1,2*}, Nguyen Thi Bich Ngoc¹, Dao Quang Ha¹, Le Thi Thu Hien^{1,2}, Nguyen Xuan Canh³

¹Institute of Genome Research – VAST, ²Graduate University of Science and Technology - VAST

³Vietnam National University of Agriculture

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 01/3/2022	Many polycias species are herbal plants belonging to the Polycias genus which are valuable in traditional medicine. Active ingredients in leaves and roots of Polycias plant includes saponins, vitamins and amino acid that are essential compounds in herb medicine. Although these species have been studied and used for many years, studies on genetic diversity are limited. Nowadays, with the development of barcoding DNA technology, the genetic diversity of plants has begun to be studied at the molecular level instead of based on morphological characteristics. The study was conducted with five samples including <i>P. fruticosa</i> , <i>P. scutellaria</i> , <i>P. serrata</i> Balf, <i>P. filicifolia</i> , <i>P. balfouriana</i> . In this research, we performed amplification, sequencing and analysis of ITS and MatK regions to identify the marker DNA regions for these species. The results showed the ITS and MatK sequences of these five species had high similarities with polycias sequences on the Gene Bank. In addition, the ITS region has many DNA polymorphisms in sequence. The distinguished by ITS sequence is more clear than the MatK sequence in terms of genetic distance between species of the Polycias genus and the Araliaceae family. These results provide the DNA barcoding sequences to contribute to the research on evaluation, taxonomy and gene conservation in medicinal plants of the Polycias genus.
Revised: 29/4/2022	
Published: 29/4/2022	
KEYWORDS	
Polycias	
DNA barcoding	
ITS	
MatK	
Sequencing	

PHÂN TÍCH CHỈ THỊ DNA *ITS* VÀ *MATK* TRÊN MỘT SỐ LOÀI ĐÌNH LĂNG CỦA VIỆT NAM

Huỳnh Thị Thu Huệ^{1,2*}, Nguyễn Thị Bích Ngọc¹, Đào Quang Hà¹, Lê Thị Thu Hiền^{1,2}, Nguyễn Xuân Cảnh³

¹Viện Nghiên cứu Hệ gen - Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 01/3/2022	Đình lăng là cây thảo dược thuộc chi <i>Polycias</i> , có giá trị, được sử dụng trong y học cổ truyền. Hoạt chất ở lá và rễ của cây đình lăng là saponin, vitamin và axit amin. Cây thuốc này đã được nghiên cứu ứng dụng, nhưng những nghiên cứu về đa dạng di truyền thì còn hạn chế. Khi công nghệ chỉ thị DNA phát triển, sự đa dạng di truyền của thực vật được nghiên cứu ở cấp độ phân tử kết hợp đặc điểm hình thái. Trong nghiên cứu này, hai vùng gen ITS và <i>matK</i> được khuếch đại, giải trình tự và phân tích nhằm định danh và tìm hiểu các vùng DNA chỉ thị. Nghiên cứu tiến hành với 5 mẫu đình lăng, gồm Đình lăng lá nhỏ (<i>P. fruticosa</i>), Đình lăng lá đĩa <i>P. scutellaria</i> , Đình lăng lá răng <i>P. serrata</i> Balf, Đình lăng lá to <i>P. filicifolia</i> , Đình lăng lá tròn <i>P. balfouriana</i> . Kết quả cho thấy, đoạn ITS và <i>matK</i> của các mẫu có sự tương đồng cao với những loài thuộc chi <i>Polycias</i> trên NCBI. Bên cạnh đó, trình tự ITS có nhiều đa hình và có sự phân biệt rõ ràng về khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi <i>Polycias</i> và cùng họ Araliaceae hơn. Những kết quả này cung cấp dữ liệu DNA chỉ thị góp phần cho những nghiên cứu về đánh giá, phân loại và bảo tồn gen ở các loài cây thuốc thuộc chi Đình lăng.
Ngày hoàn thiện: 29/4/2022	
Ngày đăng: 29/4/2022	
TỪ KHÓA	
Polycias	
Chỉ thị DNA	
ITS	
matK	
Giải trình tự	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5605>

* Corresponding author. Email: hthue@igr.ac.vn

1. Giới thiệu

Các cây thuốc Đinh lăng thuộc chi *Polyscias*, phổ biến ở một số nước Châu Phi, Đông Nam Á và các đảo nhiệt đới của khu vực Thái Bình Dương, được sử dụng làm thảo dược trong y học cổ truyền. Lá *Polyscias* có chứa tám saponin thường được dùng để bổ sung, chống viêm, chống độc và hỗ trợ hệ tiêu hóa [1]. Phần rễ bao gồm saponin tương tự như nhân sâm, vitamin B1, B2, B6, vitamin C và 20 loại axit amin thiết yếu góp phần quan trọng làm thuốc lợi tiểu, giảm đau như đau thần kinh hoặc điều trị bệnh thấp khớp [2],[3] Nhiều năm trở lại đây, việc sử dụng các loại cây trong Chi này cùng với các loại nhân sâm để làm thực phẩm chức năng đang trở nên phổ biến. Mặc dù, chiết xuất của loại thảo mộc này đã được sử dụng và thử nghiệm trong nhiều năm, nhưng chỉ có một số ít nghiên cứu về phân tích tính đa dạng di truyền. Do vậy việc hiểu đầy đủ về đa dạng di truyền và quần thể của *Polyscias* là rất cần thiết trong việc bảo tồn và quản lý các loài này.

Với sự phát triển nhanh chóng của công nghệ chỉ thị DNA, sự đa dạng di truyền của thực vật bắt đầu được nghiên cứu ở cấp độ phân tử thay vì theo các cách truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái. Từ đó, xác định được các mã vạch DNA hỗ trợ phân loại được chính xác các loài Đinh lăng đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn, khai thác và sử dụng nguồn gen. Mã vạch DNA là một công cụ sinh học hiện đại để xác định loài chính xác, nhanh chóng và giúp xây dựng lại phát sinh loài, những vùng được chọn làm mã vạch bắt buộc phải phổ biến và có sự biến đổi trình tự thích hợp để phân biệt giữa các loài [4]. Do có nhiều loài rất giống nhau về đặc điểm hình thái nên rất khó phân loại và xác định loài dựa vào hình thái, vì vậy mã vạch DNA là phương pháp hữu ích để nhận dạng. Trên thế giới, việc kết hợp dữ liệu từ chỉ thị nhân (ITS) và chỉ thị lục lạp (*trnL-trnF*), Plunkett và các cộng sự (2004) đã xác nhận mối quan hệ phát sinh loài giữa *Polyscias* và họ hàng gần từ lưu vực Tây Ấn Độ Dương [5]. Năm 2012, Liu và cộng sự nghiên cứu năm vùng DNA: *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *ycf5* trong hệ gen lục lạp và ITS2 của rDNA để xác định các loài trong họ Araliaceae, nghiên cứu chỉ ra rằng ITS2 là một mã vạch mạnh mẽ để xác định thực Araliaceae [6]. Mặc dù có nhiều ứng dụng mã vạch DNA trong họ Araliaceae và chi *Polyscias* trên thế giới nhưng các nghiên cứu về lĩnh vực này ở Việt Nam chưa nhiều. Hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào chiết xuất và đánh giá hàm lượng axit oleanolic [2], [7] hoặc nuôi cấy mô ở cây đinh lăng lá nhỏ [3]. Những năm gần đây, mới có một số nghiên cứu về trình tự chỉ thị *rbcL* của chi Đinh lăng nhưng chỉ có một số loài nhất định [8], [9] cho thấy việc sử dụng chỉ thị mã vạch chưa phong phú và đa dạng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập năm mẫu Đinh lăng Việt Nam gồm Đinh lăng lá nhỏ, Đinh lăng lá đĩa, Đinh lăng lá răng, Đinh lăng lá to, Đinh lăng lá tròn, từ đó phân tích và đánh giá hai chỉ thị vùng ITS và vùng gen *matK* của các loài này. Các kết quả trong nghiên cứu này sẽ góp phần đóng góp vào các dữ liệu chỉ thị mã vạch của chi *Polyscias* nói riêng và của các cây thuốc ở Việt Nam nói chung, đồng thời cải thiện chất lượng nhận dạng, đánh giá và phân loại các loài này.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Các mẫu Đinh lăng gồm Đinh lăng lá nhỏ (LN), Đinh lăng lá đĩa (LD), Đinh lăng lá răng (LR), Đinh lăng lá to (LTo), Đinh lăng lá tròn (LT) thu thập tại Vườn thực vật - Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các mẫu thu thập được trình bày ở Hình 1.



Đinh lăng lá nhỏ
(*Polyscias fruticosa* -LN)



Đinh lăng lá to
(*Polyscias filicifolia* -LTo)



Đinh lăng lá răng
(*Polyscias serrata* Balf - LR)



Đinh lăng lá tròn
(*Polyscias balfouriana* -LT)



Đinh lăng đĩa
(*Polyscias scutellaria* -LD)

Hình 1. Các mẫu Đinh lăng trong nghiên cứu

2.2. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại và xác định trình tự vùng gen ITS và matK

DNA tổng số từ 05 mẫu được tách chiết bằng phương pháp sử dụng CTAB [10]. Các cặp môi đặc hiệu được thiết kế dựa trên thông tin về trình tự gen ITS và *matK* trên Genbank (Bảng 1).

Phản ứng khuếch đại các đoạn gen ITS và *matK* được tối ưu sử dụng điều kiện như sau: 25 μ l tổng thể tích bao gồm 1 μ l của 20 mM DNA tổng số; 1 μ l của 10 μ M mỗi môi; 12,5 μ l DreamTaq master mix (2X); 10,5 μ l H₂O. Chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ biến tính 95°C/3 phút; 35 chu kỳ (95°C/30 giây; 58°C/30 giây; 72°C/45 giây) và bước tổng hợp cuối cùng 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8%, sau đó được tinh sạch bởi bộ hóa chất GeneJET Gel Extraction Kit (Hãng Thermo Scientific, Mỹ). Trình tự các đoạn DNA được xác định trực tiếp từ sản phẩm PCR trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger, với bộ kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Hãng Applied Biosystems, Mỹ).

Bảng 1. Thông tin cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR dự kiến (bp)
ITS_F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	750bp
ITS_R	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
matK_F	ACCGTACTTTTATGTTTACGAGC	850bp
matK_R	TCCATCTRGAAATMTTRGTTCA	

2.3. Phân tích kết quả

Vùng trình tự ITS và *matK* được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit, trong đó có so sánh với các trình tự tương ứng của các loài cùng chi và cùng họ với các loài Đinh lăng đã được công bố trên GenBank (Bảng 2). Khoảng cách giữa các trình tự khi so sánh theo cặp nucleotide được xác định sử dụng phần mềm MEGAX [11]. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Maximum-Likelihood với giá trị bootstrap là 1000. Thông tin về trình tự ITS và *matK* của các loài này liệt kê ở Bảng 2.

Bảng 2. Thông tin loài và trình tự gen được sử dụng trong nghiên cứu

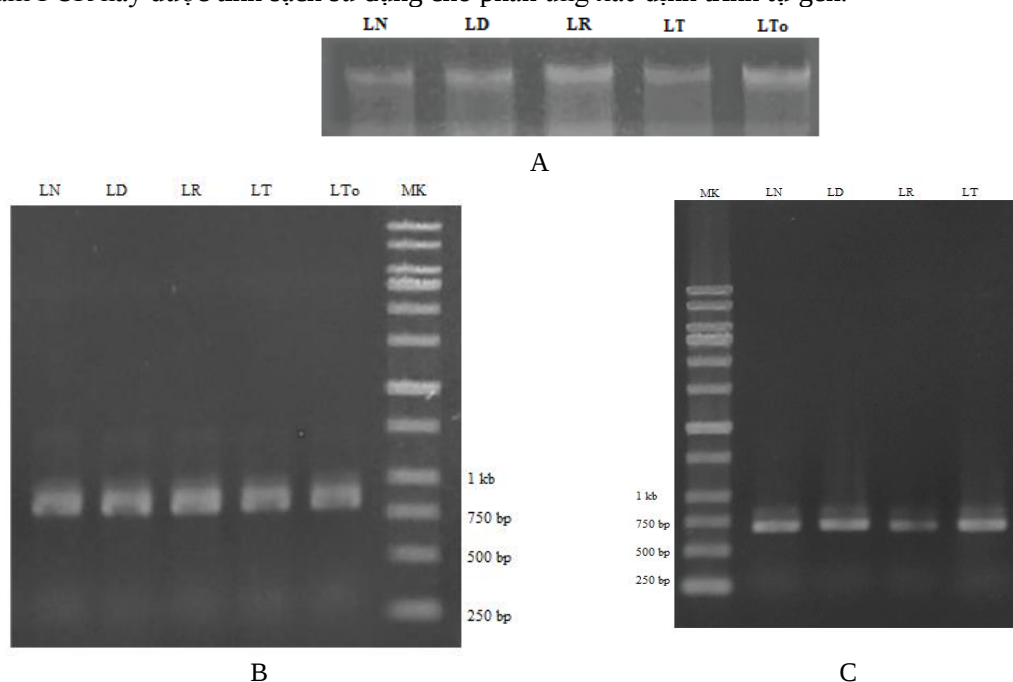
Tên loài	Mã số truy cập GenBank	
	ITS	<i>matK</i>
<i>Polyscias fruticosa</i> (Đinh lăng lá nhỏ)	KX768327.1	KX768333.1

<i>Polyscias balfouriana</i> (Đinh lăng lá tròn)	-	KX783763.1
<i>Polyscias serata</i> Balf (Đinh lăng lá răng)	-	-
<i>Polyscias scutellaria</i> (Đinh lăng lá đĩa)	AF229716.1	-
<i>Polyscias filicifolia</i> (Đinh lăng lá to)	-	-
<i>Polyscias murrayi</i>	GQ267594.1	KM894838.1
<i>Polyscias elegans</i>	AF229698.1	KM894550.1
<i>Polyscias fulva</i>	AF229699.1	JX517735.1
<i>Polyscias guilfoylei</i>	GQ267591.1	-
<i>Polyscias sambucifolia</i>	AF229713.1	-
<i>Polyscias floccosa</i>	-	OL538005.1
<i>Polyscias boivinii</i>	-	OL538004.1
<i>Griselinia carlomunozii</i> (nhóm ngoài ITS)	AJ536579.1	-
<i>Centella asiatica</i> (nhóm ngoài matK)	-	MN886299.1

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả tách DNA tổng số và khuếch đại gen

Sản phẩm DNA tổng số sau khi tách chiết và tinh chế được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose nồng độ 0,8%. Sau khi điện di, các mẫu DNA thu được có chất lượng tốt, trên giếng điện di chỉ xuất hiện một băng DNA có trọng lượng phân tử cao, sắc nét, đảm bảo chất lượng cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% cho thấy đã xuất hiện băng DNA với kích thước khoảng 800 bp ứng với gen *matK* của 5 loài Đinh lăng nghiên cứu (Hình 2B) và 750 bp ứng với vùng ITS của 4 loài Đinh lăng nghiên cứu (Hình 2C). Các sản phẩm PCR này được tinh sạch sử dụng cho phản ứng xác định trình tự gen.



Hình 2. Kết quả điện di DNA tổng số (A) và sản phẩm PCR nhân gen *matK* (B), vùng ITS (C) trên gel agarose
 Chú thích: LN: mẫu Đinh lăng lá nhỏ, LD: mẫu Đinh lăng lá đĩa, LR: mẫu Đinh lăng lá răng, LT: mẫu Đinh lăng lá tròn, LTo: mẫu Đinh lăng lá to, MK: Marker 1kb

3.2. Kết quả phân tích trình tự

Kết quả giải trình tự cho thấy vùng ITS và gen *matK* có kích thước lần lượt là 630bp và 710bp. Trên GenBank, trình tự gen *matK* của loài Đinh lăng lá nhỏ có mã số KX768333.1 và ITS với mã số KX768327.1, khi BLAST trình tự mẫu Đinh lăng lá nhỏ nghiên cứu cho thấy độ tương

đồng với trình tự trên NCBI là 100% đối với *matK* và độ tương đồng của ITS là 98,85% với 6 điểm đa hình trên độ dài 630bp được so sánh. Trong trường hợp của Đinh lăng lá tròn, độ tương đồng của trình tự *matK* cũng là 100% với mã số KX783763.1; tuy nhiên ở loài này chưa có mã số trình tự ITS nên chưa khảo sát được độ tương đồng khi BLAST. Với mẫu Đinh lăng lá răng cũng hoàn toàn chưa có trình tự đoạn *matK* và ITS trên GenBank, tương tự như vậy với mẫu Đinh lăng lá to. Mẫu Đinh lăng lá đĩa có độ tương đồng trình tự ITS trên độ dài 630bp được so sánh với trình tự mã số AF229716.1 của loài này trên NCBI là 96,46%, có 23 điểm đa hình.

Kết quả so sánh trình tự ITS giữa các mẫu thu thập và các loài cùng chi Đinh lăng cho thấy, hầu hết các điểm đa hình đều nằm ở vùng không mã hóa ITS1 và ITS2; các vùng mã hóa có tính bảo thủ cao hơn, chỉ có một vài đa hình cá thể, chẳng hạn đa hình của Đinh lăng lá nhỏ, Đinh lăng lá đĩa, Đinh lăng lá răng và Đinh lăng lá tròn là chèn TGCA vị trí 36-39; thay thế C > T vị trí 94; A > T vị trí 121; G > A vị trí 125; A > C vị trí 133; A > G vị trí 157; C > T vị trí 168; T > C vị trí 413; A > G vị trí 473, v.v. Đối với riêng Đinh lăng lá nhỏ vị trí 49/105/150 là C/T/T còn các loài khác là T/C/C. Ngược lại, trình tự *matK* có tính bảo thủ cao, do vậy khi so sánh 5 loài trong nghiên cứu không ghi nhận sự đa hình trong trình tự này. Khi so với các loài cùng chi, đã thể hiện 1 số đa hình đặc trưng cho 1 vài loài trong chi, như vị trí 256 một số loài là T, trong khi số khác là G, vị trí 353 các loài lá nhỏ, lá to, lá đĩa, lá răng, lá tròn là T số khác là C và vị trí 633 các loài lá nhỏ, lá to, lá đĩa, lá răng, lá tròn là T số khác là A. Ngoài ra, có một số đa hình mang tính cá thể trên toàn bộ đoạn trình tự 710 nucleotide đã phân tích.

Từ kết quả so sánh trình tự, khoảng cách tiến hóa giữa các mẫu trong nghiên cứu này được tính bằng phương pháp p-distance. Đối với chỉ thị ITS (Bảng 3A), có sự phân hóa về khoảng cách di truyền giữa các loài, ngoại trừ Đinh lăng lá đĩa và Đinh lăng lá tròn. Số liệu cho thấy mẫu Đinh lăng lá răng có quan hệ gần hơn với 2 mẫu Đinh lăng lá đĩa và Đinh lăng lá tròn, khoảng cách chỉ là 0,00332. Trong khi đó, mẫu Đinh lăng lá nhỏ có khoảng cách tiến hóa lớn hơn, lần lượt là 0,01493, 0,01493 và 0,01824 (tương ứng với Đinh lăng lá đĩa, Đinh lăng lá tròn và Đinh lăng lá răng). Ngược lại với sự phân hóa trong khoảng cách dựa trên ITS, vùng gen *matK* (Bảng 3B) cho thấy tính bảo thủ rất cao khi không có sự khác biệt nào giữa nội bộ các loài quan tâm. Để có được cái nhìn rộng hơn về khả năng phân loại của các chỉ thị này đối với chi *Polyscias*, chúng tôi tiếp tục so sánh khoảng cách di truyền giữa các mẫu nghiên cứu và các trình tự cùng chi đã thu thập từ GenBank.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu Đinh lăng nghiên cứu dựa trên vùng ITS (A) và gen *matK* (B) bằng phần mềm MEGAX

A) ITS				B) <i>matK</i>				
	LN	LD	LT	LR	LN	LD	LR	LT
LN					LN			
D	0,01493				LD	0		
LT	0,01493	0			LR	0	0	
LR	0,01824	0,00332	0,00332		LT	0	0	0
					LTo	0	0	0

Ở chỉ thị ITS, khoảng cách di truyền có sự biến động lớn giữa các loài trong chi Đinh lăng (Bảng 4A). Các mẫu Đinh lăng lá đĩa, Đinh lăng lá răng và Đinh lăng lá tròn có quan hệ gần gũi nhất với loài *P. scutellaria* (0,003-0,005), tiếp theo đó là *P. guilfoylei* (0,011-0,015) và *P. fruticosa* (0,016-0,019). Với mẫu Đinh lăng lá nhỏ, quan hệ di truyền dựa trên khoảng cách của mẫu này gần gũi hơn cả với *P. guilfoylei* (0,005), tiếp theo là *P. fruticosa* (0,01161) và *P. scutellaria* (0,01858). Khoảng cách di truyền của các mẫu nghiên cứu với những loài còn lại tương đối lớn, khoảng 0,05; 0,07; 0,09 và 0,1 lần lượt với *P. murrayi*, *P. elegans*, *P. sambucifolia* và *P. fulva*. Điều này gợi ý rằng chỉ thị ITS khá phù hợp để đánh giá quan hệ di truyền giữa các loài trong chi *Polyscias*.

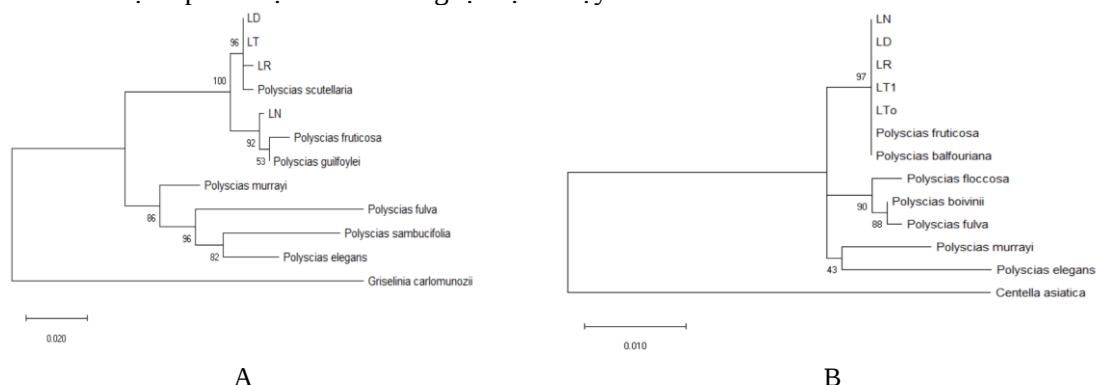
Khác với vùng ITS, ở gen *matK* do không có sự khác biệt về trình tự ở các mẫu thu thập nên khoảng cách đối với các trình tự GenBank của các mẫu này không có sự khác biệt (Bảng 4B).

Trình tự gen *matK* có độ bảo thủ cao, điều này thể hiện ở khoảng cách di truyền thấp hơn hẳn khi so sánh với chỉ thị vùng nhân, cũng như một số loài không ghi nhận sự đa hình nào (*P. fruticosa* và *P. balfouriana*). Đối với các loài còn lại, khoảng cách di truyền được ghi nhận từ khoảng 0,01-0,02 cho thấy tỉ lệ đa hình tương đối thấp. Do vậy, khó để sử dụng chỉ thị *matK* một cách độc lập khi so sánh mối quan hệ giữa các loài trong chi *Polyscias*, tuy nhiên có thể sử dụng kết hợp chỉ thị *matK* với chỉ thị khác như ITS trong nghiên cứu này.

Bảng 4. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu nghiên cứu và một số loài trong chi Đinh lăng dựa trên vùng gen ITS (A) và gen *matK* (B) bằng phần mềm MEGAX

A) ITS						
Mẫu so sánh	Mẫu thu thập	LD	LN	LR	LT	
	<i>Polyscias scutellaria</i>	0,00338	0,01858	0,00507	0,00338	
	<i>Polyscias guilfoylei</i>	0,01167	0,00500	0,01500	0,01167	
	<i>Polyscias fruticosa</i>	0,01658	0,01161	0,01990	0,01658	
	<i>Polyscias murrayi</i>	0,05193	0,05695	0,05528	0,05193	
	<i>Polyscias elegans</i>	0,07023	0,06856	0,07358	0,07023	
	<i>Polyscias sambucifolia</i>	0,08784	0,09291	0,09122	0,08784	
	<i>Polyscias fulva</i>	0,09278	0,09966	0,09107	0,09278	
	<i>Griselinia carlomunozii</i>	0,13043	0,13233	0,13233	0,12898	
B) matK						
Mẫu so sánh	Mẫu thu thập	LD	LN	LR	LT	LTo
	<i>Polyscias fruticosa</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
	<i>Polyscias balfouriana</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
	<i>Polyscias boivinii</i>	0,01020	0,01020	0,01020	0,01020	0,01020
	<i>Polyscias fulva</i>	0,01166	0,01166	0,01166	0,01166	0,01166
	<i>Polyscias floccosa</i>	0,01166	0,01166	0,01166	0,01166	0,01166
	<i>Polyscias murrayi</i>	0,01458	0,01458	0,01458	0,01458	0,01458
	<i>Polyscias elegans</i>	0,01895	0,01895	0,01895	0,01895	0,01895
	<i>Centella asiatica</i>	0,06706	0,06706	0,06706	0,06706	0,06706

Cây phát sinh chủng loại và mối quan hệ phát sinh loài dựa trên so sánh với các trình tự thuộc chi Đinh lăng trên Genbank (Hình 3) cho thấy, những trình tự nghiên cứu đã phân nhánh giữa các loài cùng chi so với loài khác chi. Những trình tự loài Đinh lăng nghiên cứu đều nằm trong cùng 1 nhóm, thể hiện mối quan hệ chặt chẽ của chúng. Như vậy, có thể thấy rằng 2 chỉ thị này và đặc biệt chỉ thị ITS khá rõ ràng trong việc phân loại các loài cùng chi. Ngoài ra, việc sử dụng đồng thời 2 chỉ thị để phân loại loài sẽ mang lại độ tin cậy cao hơn.



Hình 3. Biểu đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Maximum likelihood dựa vào vùng ITS (A) và gen *matK* (B)

Như vậy, cây phân loại dựa trên chỉ thị ITS đã phân biệt rất tốt các loài chi Đinh lăng với các loài khác. Vì tính thuận tiện khi ứng dụng do có kích thước ngắn và dễ dàng nhân lên bằng phản ứng PCR nên các vùng ITS được sử dụng rộng rãi trong phân tích hệ thống tiến hóa và phân loại ở cả nấm, thực vật một lá mầm hay hai lá mầm [12]-[14]. Kết quả này cho thấy đã sử dụng chỉ thị ITS khá phù hợp trong việc đánh giá chung vì chỉ thị này được cho là rất hiệu quả trong việc đánh giá mối quan hệ phát sinh giữa các loài trong các nghiên cứu về mã vạch phân tử ở thực vật chẳng hạn như các loài tầm bóp (*Physalis*) họ Cà (*Solanaceae*) [15]. Hay chỉ thị ITS cũng đã dùng để phân biệt rất rõ loài Sâm Ngọc Linh với Sâm Vũ Diệp và sâm khác [16]. Hơn thế, toàn bộ vùng ITS và 5.8S còn có thể dùng phân loại cũng như xây dựng cây tiến hóa và phát sinh loài khi số lượng mẫu đủ lớn khoảng trên 100 mẫu, chỉ thị *matK* cũng được sử dụng hết sức hiệu quả trong nghiên cứu này [17].

Đến nay, các chỉ thị DNA vẫn được sử dụng rất hiệu quả trong việc xác định các loài thực vật, nhóm lan (*Orchids*) gần đây cũng được đánh giá với 5 chỉ thị ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* trong nghiên cứu của Raskoti và cộng sự (2021). Nghiên cứu đã sử dụng 431 trình tự phân tích và tích hợp cùng với trên 6000 trình tự từ cơ sở dữ liệu, cho thấy ITS vẫn hiệu quả nhất, hoặc sự kết hợp giữa ITS và *matK* cũng cho độ chính xác càng cao [18]. Sự kết hợp chỉ thị DNA ở bèo tấm là rất quan trọng vì nhóm thực vật này có rất nhiều loài khác nhau nhưng đặc điểm hình thái nhận dạng rất khó vì rất nhỏ và giống nhau. Nghiên cứu của Al-Dakhil và cộng sự (2021) đã nhận dạng các loại bèo tấm phổ biến ở Ara Saudi gồm *L. punctata*, *L. perpusilla*, *S. polyryza*, *L. gibba*, *L. minor*, *L. punctata* Saudi và được xác định với các chỉ thị lục lạp là *trnH-psbA*, *matK* và *atpF-atpH* [19]. Như vậy, những chỉ thị DNA barcode vẫn giữ nguyên tầm quan trọng trong nghiên cứu đa dạng di truyền và cùng song hành với những phương pháp truyền thống và hiện đại khác.

4. Kết luận

Hai vùng trình tự ITS và *matK* của các loài đinh lăng gồm Đinh lăng lá nhỏ, Đinh lăng lá to, Đinh lăng lá tròn, Đinh lăng lá răng và Đinh lăng lá đĩa đã được nhân đặc hiệu và được phân tích trên độ dài 630bp và 710bp. Trong đó, trình tự ITS lần đầu tiên được xác định ở Đinh lăng lá tròn, lá răng và lá to; trình tự *matK* lần đầu tiên được xác định ở Đinh lăng lá răng và lá to. Cả hai trình tự đều có các điểm đa hình, tuy nhiên qua phân tích cho thấy trình tự ITS có tính đa hình cao hơn giữa các mẫu nghiên cứu, các thông số về khoảng cách di truyền cũng được tính toán giữa các mẫu cho thấy sự phân biệt giữa các loài với chỉ thị ITS rõ ràng hơn *matK*.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành dưới sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở của Viện Nghiên cứu hệ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] V. C. Vo, *Dictionary of Medicinal Plants in Vietnam*. Medical Publishing House, Ha Noi, vol. 1, pp. 937-938, 2012.
- [2] V. N. Trinh, C. K. Nguyen, M. T. Bui, T. M. T. Pham, H. H. Nguyen, and V. B. Huynh, "Evaluation of acid oleanolic content and genetic diversity of (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) accessions collected in Vietnam," *The Journal of Agriculture and Development*, vol.2, pp. 46-54, 2020.
- [3] T. N. T. To, P. Y. Truong, T. A. Ton, T. T. Hoang, T. M. N. Ha, and T. N. Duong, "Somatic embryogenesis of (*Polyscias fruticosa* L. Harms) via culturing ex vitro leaf explant," *The Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 3, pp. 497-506, 2020.
- [4] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Biological Sciences*, vol. 270, no. 1512, pp. 313-321, 2003.
- [5] G. M. Plunkett, P. P. Lowry II, and N. V. Vu, "Phylogenetic Relationships among *Polyscias* (Araliaceae) and Close Relatives from the Western Indian Ocean Basin," *International Journal of Plant Sciences*, vol. 165, no. 5, pp. 861-873, 2004.

-
- [6] Z. Liu, X. Zeng, D. Yang, G. Chu, Z. Yuan, and S. Chen, "Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae," *Gene*, vol. 499, no. 1, pp. 76-80, 2012.
- [7] T. P. T. Nguyen, T. B. T. Vo, and M. D. Nguyen, "Quantitative determination of oleanolic acid in *Polyscias Fruticosa* (L.) Harms - Araliaceae by HPLC," *Ho Chi Minh Journal of Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 593-597, 2011.
- [8] V. N. Trinh, C. K. Nguyen, M. T. Bui, H. H. Nguyen, T. M. T. Pham, and V. B. Huynh, "DNA Barcode analysis of *Polyscias* samples collection in Vietnam," *The Journal of Agriculture and Development*, vol. 2, pp. 25-34, 2019.
- [9] V. M. Do, V. D. Thieu, T. B. Vu, and C. L. Tran, "Sequence-based classification of *Polyscias guilfoylei* (Cogn.&Marche) Bail. by using RCBL gene," *Journal of scientific research and economic development of Tay Do University*, vol.8, pp. 157-166, 2020.
- [10] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, vol. 12, pp. 13-15, 1990.
- [11] 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, no. 6, pp. 1547-1549, 2018.
- [12] O. Seberg and G. Petersen, "How many loci does it take to DNA barcode a crocus?" *PloS one*, vol. 4, no. 2, p. 4598, 2009.
- [13] M. W. Chase, N. Salamin, M. Wilkinson, J. M. Dunwell, R. P. Kesanakurthi, N. Haidar, and V. Savolainen, "Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals," *Biological Sciences*, vol. 360, no. 1462, pp. 1889-1895, 2005.
- [14] W. J. Kress, K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D. H. Janzen, "Use of DNA barcodes to identify flowering plants," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 8369-8374, 2005.
- [15] S. Feng, M. Jiang, Y. Shi, K. Jiao, C. Shen, J. Lu, Q. Ying, and H. Wang, "Application of the Ribosomal DNA ITS2 Region of *Physalis* (Solanaceae): DNA Barcoding and Phylogenetic Study," *Plant Sci*, vol. 7, p. 1047, 2016.
- [16] 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.," *Viet Nam Journal of Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 63-72, 2017.
- [17] S. Chen, H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, and L. Shi, "Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species," *Plos one*, vol. 5, no. 1, p. 8613, 2010.
- [18] B. B. Raskoti and R. Ale, "DNA barcoding of medicinal orchids in Asia," *Scientific Reports*, vol. 11, p. 23651, 2021.
- [19] M. Al-Dakhil, S. Alghamdi, H. Migdadi, and A. A. M. Afzal, "Morphological characterization and DNA barcoding of Duckweed species in Saudi Arabia," *Plants Basel*, vol. 10, no. 11, p. 2438, 2021.