

XÁC ĐỊNH QUAN HỆ DI TRUYỀN LOÀI *CROTON KONGENSIS* GAGNEP. TẠI THANH HÓA BẰNG CHỈ THỊ DNA BARCODE

Lê Đình Chấn¹, Đỗ Thị Hải¹, Nguyễn Thế Lợi², Nguyễn Văn Tuấn²,
Lê Thị Hải Yến³, Đặng Thị Hồng Phương⁴

TÓM TẮT

Việc sử dụng DNA barcode để xác định mối quan hệ di truyền của các loài sinh vật nói chung, thực vật nói riêng đã và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Đây là kỹ thuật sử dụng một trình tự DNA (khoảng 400 - 1000 bp) như một tiêu chuẩn để nhận dạng và xác định quan hệ chủng loài của các loài sinh vật một cách nhanh chóng và chính xác. Do đó, DNA barcode không chỉ giúp các nhà phân loại học trong công tác phân loại và xác định loài, mà còn nâng cao năng lực kiểm soát, hiểu biết và tận dụng sự đa dạng sinh học. Trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến kết quả phân lập và xác định quan hệ chủng loài của 2 trình tự ITS và Matk DNA của cây Khổ sâm thu tại Thanh Hóa. Trình tự ITS và trình tự Matk có kích thước lần lượt là (676bp) và (656bp). Hai trình tự được xác định là cùng loài *Croton kongensis*, trong đó có trình tự ITS là trình tự đầu tiên được công bố trên gen banks.

Từ khóa: ITS, Matk, Mã vạch DNA, *C. Kongensis*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

DNA barcode là một trong những công cụ hữu ích trong việc xác định quan hệ di truyền của các loài sinh vật, trong đó có loài Khổ sâm (*Croton kongensis*). Khổ sâm được biết đến như là một loài dược liệu quý, có tác dụng hữu hiệu trong việc điều trị các bệnh về tiêu hóa [4][5]; chống oxy hóa, chống viêm, giúp giảm đau, chống dị ứng, làm tăng lưu lượng máu động mạch vành, chống rối loạn nhịp tim, ngăn ngừa thiếu máu cơ tim [6]. Ngoài ra, Khổ sâm còn có tác dụng chống xơ vữa động mạch và hỗ trợ làm hạ lipid máu, loại bỏ đờm trong họng, đồng thời làm giảm triệu chứng hen suyễn [6]. Nước sắc dược liệu của Khổ sâm có tính kháng khuẩn khá mạnh, có khả năng ức chế hoạt động của các chủng vi khuẩn như tụ cầu vàng, liên cầu khuẩn nhóm B, trực khuẩn lỵ, ức chế sự phát triển của một số loại nấm ngoài da... [6]. Tuy nhiên các nghiên cứu về DNA barcode để nhận diện và cung cấp thêm cơ sở dữ liệu khoa học cho loài cây này còn nhiều hạn chế, đặc biệt là ở Việt Nam. Do

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức; Email: ledinhchac@hdu.edu.vn

² Học viên cao học Lớp K14 chuyên ngành Thực vật học, Trường Đại học Hồng Đức

³ Trường THCS Thọ Lâm, Thọ Xuân, tỉnh Thanh Hóa

⁴ Trường Dự bị đại học Dân tộc Sầm Sơn, tỉnh Thanh Hóa

vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu, phân lập 2 trình tự barcode là *ITS* và *Matk*, để tiến hành so sánh và xác định quan hệ di truyền của hai mẫu Khổ sâm thu tại Núi Mơ, huyện Như Xuân và Khe Hạ, huyện Xuân Liên, tỉnh Thanh Hóa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu Khổ sâm thu tại các địa điểm sau:

Khe Hạ, Xuân Liên, Thường Xuân, Thanh Hóa: 19°48'35.52" vĩ độ Bắc; 105°23'42,4" kinh độ Đông;

Núi Mơ, Bãi Trành, Như Xuân, Thanh Hóa: 19°27'56.41" vĩ độ Bắc; 105°027'10.58" kinh độ Đông.

Các cặp mồi đặc hiệu được sử dụng để nhân bản 2 trình tự gen nói trên được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng để nhân bản 2 trình tự tương ứng

Gene	Tên mồi	Trình tự	Kích thước	Tác giả
<i>ITS</i>	ITS1F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	650bp	White et al. 1990 [3]
	ITS4R	TCCTCCGTCTATTGATATGC		White et al. 1990 [3]
<i>Matk</i>	MatK_390f	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	936bp	Cuenoud et al. 2002 [1]
	MatK_1326r	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT		Cuenoud et al. 2002 [1]

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ lá non của các mẫu Khổ sâm, được thực hiện theo phương pháp CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) là chất tẩy rửa không chứa ion có thể kết tủa axit nucleic và polysaccharide).

Phương pháp này được thực hiện theo 6 bước, với việc sử dụng các hóa chất phù hợp trong tách chiết DNA, nhằm thu DNA tổng số.

Phương pháp nhân gen ITS, Matk bằng kỹ thuật PCR

Nhân bản gen ITS, Matk bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu, cụ thể:

Đoạn gen ITS, Matk được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu ITS-1f/ITS-4r và MatK_390f/MatK_1326r với kích thước dự kiến là khoảng 700 nucleotide.

Với chu trình nhiệt và thời gian phản ứng của PCR bao gồm: Biến tính khởi động ở 94°C trong 4 phút; lặp lại 25 chu kỳ (Sambrook et al, 1989 [2]) (biến tính ở 94°C trong 30

giây, gắn mồi ở 55°C trong 40 giây, tổng hợp và kéo dài ở 72°C trong 40 giây); ổn định mẫu và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 10 phút và bảo quản mẫu ở 4°C.

Phản ứng PCR được tiến hành với thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR nhân gen

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	PCR Masster Mix	2X	12,5
2	Mồi xuôi	10 pmol/ml	1
3	Mồi ngược	10 pmol/ml	1
4	DNA khuôn	10ng/μl	1
5	Nước khử ion	-	9,5
Tổng thể tích			25

Phương pháp chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Sau khi chạy điện di, lấy riêng phần gel agarose cho vào hộp chứa dung dịch Ethidium bromide. Nhuộm trong 10 phút, sau đó lấy bản gel ra, ngâm trong nước 2 - 3 phút. Đem vào máy quan sát dưới đèn tử ngoại (UV) và chụp ảnh.

Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Sau khi nhân được gen ITS, Matk; bước tiếp theo cần thu nhận gen ở dạng tinh sạch và không lẫn gel agarose. Quá trình tinh sạch được thực hiện theo Kit GenJET PCR Purification của hãng Thermo Scientific.

Phương pháp xác định trình tự nucleotide của đoạn gen ITS, Matk

Trình tự nucleotide của các đoạn gen được xác định 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. Trình tự gen đó được phân tích, so sánh và lập cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình Bioedit, BLAST, DNASTAR.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Về hình thái

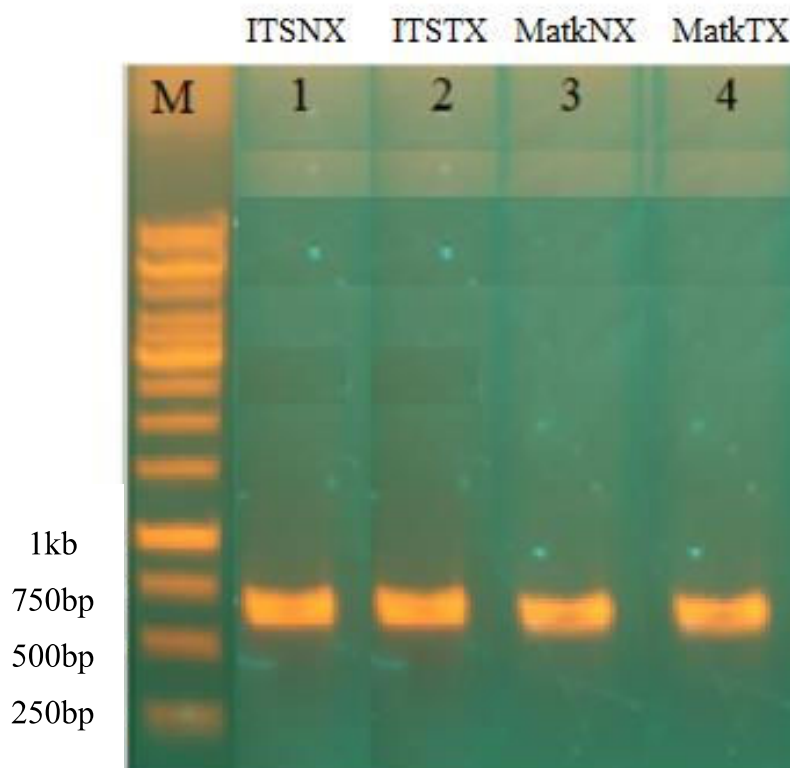
Về hình thái, Khô sâm (*Croton kongensis*) có dạng cây bụi, chiều cao trung bình khoảng 1,4m; lá đơn, hình trái xoan, mọc cách, phần đuôi của phiến lá có dạng thuôn dài, phiến lá dài 11 cm - 15 cm, rộng 3 cm - 4 cm, mặt trên phiến lá màu xanh đậm hơn mặt dưới; gân lá hình xương cá, cuống lá dài 1 cm - 2 cm.

Mùa hoa vào khoảng tháng 2 - 4 hàng năm, cụm hoa thường được mọc ở kẽ lá hay đầu cành, hoa có thể lưỡng tính hoặc đơn tính, về cấu tạo, ở hoa đực có 5 lá dài, 3 vòi nhị, cánh hóa nhỏ, có màu trắng bạc. Quả gồm 3 mảnh vỏ, màu hơi đỏ.

3.2. Kết quả nhân bản trình tự ITS; Matk

Để khẳng định quan hệ di truyền của 2 trình tự gen phân lập được từ mẫu Khổ sâm thu tại Thanh Hóa với các trình tự tương ứng đã được công bố trên genbank, chúng tôi tiến hành phân lập, phân tích, so sánh 2 trình tự DNA Barcode là ITS; Matk của mẫu thu được và so sánh với các trình tự *ITS*; *Matk* đã công bố trên gen bank.

Sau khi thực hiện PCR, sản phẩm PCR sẽ được tiến hành điện di trên gel agarose và được chụp ảnh. Kết quả PCR với các cặp mồi đặc hiệu được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Kết quả PCR 2 mẫu với cặp mồi ITS, MatK

M: Marker; 1: ITS NXTH; 2: ITS TXTH; 3: MatK: NXTH; 4: MatK TXTH

Kết quả trên hình 1 cho thấy, các sản phẩm PCR của 2 trình tự tương ứng của 2 cặp mồi *ITS* F/R; *MatK* F/R đặc hiệu được thể hiện với các kích thước tương đương nhau, và các trình tự *ITS*, *MatK* có kích thước khoảng 650 bp. Kết quả này phù hợp với trình tự các cặp mồi tương ứng, đủ độ tin cậy làm cơ sở cho việc đọc trình tự *ITS*; *Matk* phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Kết quả đọc trình tự 2 đoạn gen ITS; Matk của Khổ sâm

Sau khi điện di, chúng tôi tiến hành đọc trình tự 2 gen *ITS*; *Matk* thu được trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu, kết quả thu được như sau:

Trình tự ITS NXTH

AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTG
CATAGCAGAACGACTCGTGAACAAGTAAGACAACACGTGGGTGACCTCTGGAGCCTT
CGGACGCCATTGCGAACCTAAATGGCTGAGTCGTGTCATGTCCGGCTAGGCTTCGGC
CTGTTTCACATGCACTGCTCAGTCCAACAACCAACCCCGGCGCAAGACGCGCCAAGG
AAAACATAAAATGAAAGAGAAGGCACGTCTGACCGGTCCCGGCTTCGGGATCCCGGA
AAGAACGTTGTCCTCTTTTCTTAAAATAAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC
TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCC
CGGAACCATCGAGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAAGCCGTCAGGCCGAGGGCA
CGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACATCGCTCCCAACCCATTAGGGTGCGGAATATGGC
CTCCCGTGCGATTCCCTCTCGCGGTTGGCCGAAAAGAATGGTCTCGGCTACGGATG
CCGCGACAATCGGTGGTTGTAAGACCCTCGGACACAGTCGCTCGCACTATGCCTTGG
ATAACGAGACCCCTCTGCGTCCTTCGCGGCACGCTCACATCGCGACCCC

Trình tự ITS TXTH

AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTG
CATAGCAGAACGACTCGTGAACAAGTAAGACAACACGTGGGTGACCTCTGGAGCCTT
CGGACGCCATTGCGAACCTAAATGGCTGAGTCGTGTCATGTCCGGCTAGGCTTCGGC
CTGTTTCACATGCACTGCTCAGTCCAACAACCAACCCCGGCGCAAGACGCGCCAAGG
AAAACATAAAATGAAAGAGAAGGCACGTCTGACCGGTCCCGGCTTCGGGATCCCGGA
AAGAACGTTGTCCTCTTTTCTTAAAATAAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC
TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCC
CGGAACCATCGAGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAAGCCGTCAGGCCGAGGGCA
CGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACATCGCTCCCAACCCATTAGGGTGCGGAATATGGC
CTCCCGTGCGATTCCCTCTCGCGGTTGGCCGAAAAGAATGGTCTCGGCTACGGATG
CCGCGACAATCGGTGGTTGTAAGACCCTCGGACACAGTCGCTCGCACTATGCCTTGG
ATAACGAGACCCCTCTGCGTCCTTCGCGGCACGCTCACATCGCGACCCC

Trình tự MatK NXTH

AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTGTCGAAACCTG
CATAGCAGAACGACTCGTGAACAAGTAAGACAACACGTGGGTGACCTCTGGAGCCTT
CGGACGCCATTGCGAACCTAAATGGCTGAGTCGTGTCATGTCCGGCTAGGCTTCGGC
CTGTTTCACATGCACTGCTCAGTCCAACAACCAACCCCGGCGCAAGACGCGCCAAGG
AAAACATAAAATGAAAGAGAAGGCACGTCTGACCGGTCCCGGCTTCGGGATCCCGGA
AAGAACGTTGTCCTCTTTTCTTAAAATAAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC
TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCC
CGGAACCATCGAGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAAGCCGTCAGGCCGAGGGCA
CGTCTGCCTGGGTGTCACGCAACATCGCTCCCAACCCATTAGGGTGCGGAATATGGC
CTCCCGTGCGATTCCCTCTCGCGGTTGGCCGAAAAGAATGGTCTCGGCTACGGATG
CCGCGACAATCGGTGGTTGTAAGACCCTCGGACACAGTCGCTCGCACTATGCCTTGG
ATAACGAGACCCCTCTGCGTCCTTCGCGGCACGCTCACATCGCGACCCC

Trình tự MatK TXTH

GATGTGTTAATACCTTACCCCATCCATGTAGAGAAATTAGTTCAAACCCTTCGCTAT
 TGGCTGAAAGATCCCTCGTCTTTGCATTTATTACGACTCTTTCTTCATGAGTATTGG
 AATAGGAGCAGTCTTTTTATTTCATATTCAAAAGAAATCGATTTTTATTTTTACAAAA
 AGGAATCCAAGATTTTTCTTGTTCCATATAATTCTCATGTATATGAATACGAATCA
 ATCCTCTTTTTCTTCGTAATCAATCCTTTATTTACGATCAACATTTTCTCGAGTC
 CTTCTTGAACGAATTTTTTCTATGGAAAAATAGAACATTTTGCAGAAGTCTTTGCT
 AATGATTTTCAGACTATCCTAGGGTTGGTCAAAGATCCTTTCCTGCATTATGTTAGA
 TATCAAGGAAAATCCATTCTGGCTTCAAAGATGGGCTTCTTCTGATGAAAAAATGG
 AAATATTACCTTGTCAATTTATGTCAATGTCATTTTTATGTGTGGTTTCAACCAAAA
 AAGATCTATATAAGTTCATTACCCAAGCATTCTCTCAACCTTTGGGCTATCTTTCA
 AATGTACAATTAATCCTTTGGTCGTACGAAGTCAAATGCTAGAAAATTCATTTTTA
 ATAGAAAAAGATAATACTATGAAGAATC

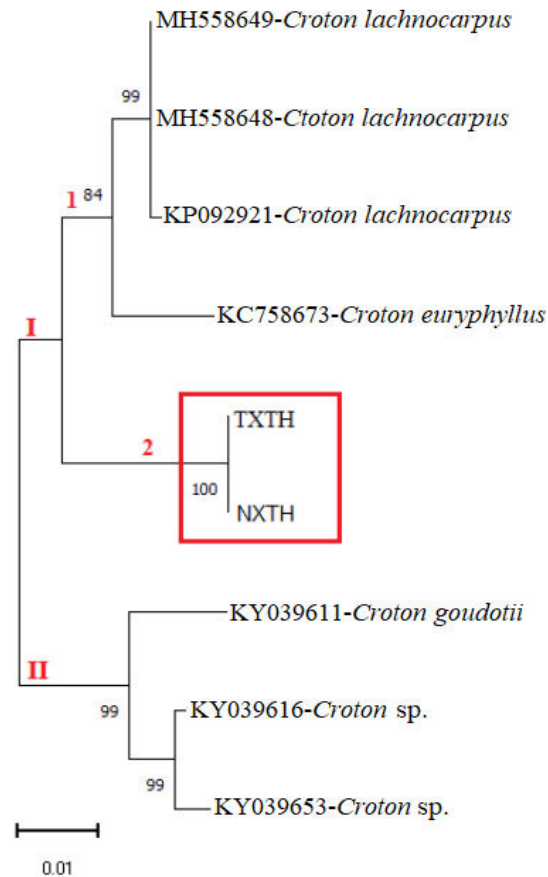
Với 2 trình tự *ITS*; *Matk* thu được từ kết quả phân lập, chúng tôi nhận được trình tự nucleotit của *ITS* là 676 bp và *MatK* là 656bp. Các kết quả này đều phù hợp với các cặp mỗi đặc trưng. Sau đó chúng tôi tiến hành so sánh với trình tự gen *ITS*; *Matk* đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế để làm cơ sở để chúng tôi tiến hành phân tích quan hệ di truyền của các trình tự thu được và các trình tự đã công bố trên gen banks.

3.4. Kết quả phân tích trình tự *ITS*

Sau khi thu được trình tự *ITS*, chúng tôi tiến hành phân tích, so sánh và xác định quan hệ di truyền của trình tự *ITS* thu được và các trình tự *ITS* đã được công bố trên gen bank [8]. Kết quả được trình bày ở bảng 3 và cho thấy, các trình tự *ITS* phân lập được từ hai mẫu cây Khổ sâm tại Như Xuân, Thanh Hóa và Xuân Liên, Thanh Hóa là không có sự khác nhau và có độ sai khác là 1,35%; 1,37% và 1,42% so với trình tự *ITS* của loài *Croton lachnocarpus* mang mã số MH558649; MH588648 do Zhang, D. công bố năm 2021 tại Trung Quốc và mã số KP092921 của tác giả Liu, J., và cộng sự công bố năm 2015 tại Trung Quốc; sự sai khác này là 1,54% so với trình tự *ITS* của loài *Croton euryphyllus*, mang mã số KC758673 do tác giả Long, X., at all công bố năm 2013 tại Trung Quốc; 2,00%; 2,14% so với trình tự *ITS* của loài *Croton sp.* mang mã số KY039616 và KY039653; 2,13% so với trình tự *ITS* loài *Croton goudotii* mã số KY039611 đều được công bố bởi tác giả Haber, E.A., và cộng sự năm 2017 tại Mỹ. Như vậy, về quan hệ di truyền của trình tự *ITS* chúng tôi thu được và các trình tự *ITS* đã công bố trên gen bank có quan hệ cùng chi *Croton* nhưng khác loài. Điều này cho thấy độ tin cậy khi sử dụng DNA Barcode trong việc xác định quan hệ di truyền của trình tự *ITS* thu được với các trình tự *ITS* đã công bố trên gen banks; mỗi quan hệ di truyền này còn được thể hiện trên hình 2.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự ITS thu được với các trình tự ITS đã công bố trên gen bank bằng phần mềm MEGA XI

ITS										
	TXTH	NXTH	Croton_lachnocarpus-MH558649	Croton_lachnocarpus-KP092921	Croton_lachnocarpus-lachnocarpus-MH558648	Croton_sp.-KY039616	Croton_sp.-KY039653	Croton_goudotii-KY039611	Croton_euryphyllus-KC758673	
TXTH										
NXTH	0.0000									
Croton_lachnocarpus-MH558649	0.0135	0.0135								
Croton_lachnocarpus-KP092921	0.0142	0.0142	0.0006							
Croton_lachnocarpus-MH558648	0.0137	0.0137	0.0000	0.0006						
Croton_sp.-KY039616	0.0200	0.0200	0.0148	0.0155	0.0150					
Croton_sp.-KY039653	0.0214	0.0214	0.0169	0.0176	0.0171	0.0026				
Croton_goudotii-KY039611	0.0213	0.0213	0.0175	0.0182	0.0178	0.0085	0.0099			
Croton_euryphyllus-KC758673	0.0154	0.0154	0.0081	0.0088	0.0081	0.0205	0.0212	0.0219		



Hình 2. Kết quả so sánh trình tự *ITS* thu được với trình tự *ITS* đã công bố trên gen bank

Kết quả trên hình 2 cho thấy, trên sơ đồ cây phát sinh có hai nhánh, nhánh I và nhánh II, trong đó, nhánh I có hai nhóm, tại nhóm 2 cho thấy hai trình tự *ITS* chúng tôi thu được tại Như Xuân và Thường Xuân Thanh Hóa có quan hệ di truyền cùng loài và khác loài với các trình tự *ITS* đã được công bố trên gen banks. Trong khi đó, tại nhóm 1 biểu thị quan hệ cùng loài *Croton lachnocarpus* của 03 trình tự *ITS* mang mã số là MH558648; MH 558649; KP092921. Tại nhánh II, các trình tự *ITS* mang mã số KY039616; KY039653 có quan hệ di truyền cùng loài *Croton sp.* và khác loài với trình tự *ITS* mang mã số KY039611. Điều này, cho thấy, mặc dù sự khác nhau về trình tự *ITS* khi so sánh là không quá lớn, tuy nhiên trên sơ đồ cây phát sinh đã khẳng định được vai trò và độ tin cậy cao của việc sử dụng DNA Barcode để xác định quan hệ chủng loại. Để khẳng định độ tin cậy của việc sử dụng DNA Barcode trong việc xác định quan hệ di truyền, chúng tôi tiếp tục phân tích trình tự *MatK*.

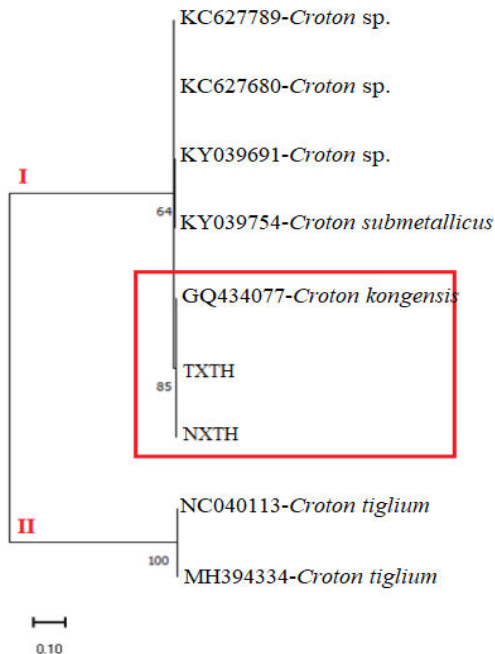
3.5. Kết quả phân tích trình tự *Matk*

Sau khi phân tích trình tự *ITS*, chúng tôi tiếp tục tiến hành phân tích, so sánh và xác định quan hệ di truyền của trình tự *MatK* thu được và trình tự *MatK* đã được công bố trên gen bank [8], kết quả được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự *MatK* thu được với các trình tự *MatK* đã công bố trên gen bank bằng phần mềm MEGA XI

MatK									
	TXTH	NXTH	GQ434077- Croton_ kongensis	NC040113- Croton_ tiglium	MH394334- Croton_ tiglium	KC627789 - Croton_sp.	KC627680- Croton_sp.	KY039691- Croton_ dangyuanus	KY039754- Croton_ submetallicus
TXTH									
NXTH	0.0000								
GQ434077- Croton_ kongensis	0.0047	0.0047							
NC040113- Croton_ tiglium	0.7339	0.7339	0.7359						
MH394334 -Croton_ tiglium	0.7339	0.7339	0.7359	0.0000					
KC627789- Croton_sp.	0.0059	0.0059	0.0082	0.7259	0.7259				
KC627680- Croton_sp.	0.0059	0.0059	0.0082	0.7259	0.7259	0.0000			
KY039691- Croton_ dangyuanus	0.0083	0.0083	0.0106	0.7316	0.7316	0.0047	0.0047		
KY039754- Croton_ submetallicus	0.0095	0.0095	0.0118	0.7329	0.7329	0.0035	0.0035	0.0035	

Kết quả bảng 4, cho thấy, hai trình tự *MatK* của chúng tôi phân lập được từ mẫu cây Khổ sâm tại Như Xuân, Thanh Hóa và Xuân Liên, Thanh Hóa là không có sự khác nhau và cả hai trình tự này có độ sai khác không đáng kể (0,47%) so với trình tự *MatK* của loài *Croton_kongensis* mang mã số GQ434077 do Chen, S., và cộng sự công bố năm 2016 tại Trung Quốc; đồng thời có sự sai khác tương đối lớn so với các trình tự *MatK* của loài *Croton_tiglium* mang mã số NC040113 và MH 394334 đã công bố trên gen bank. Để khẳng định quan hệ di truyền của các trình tự này, chúng tôi sử dụng phần mềm MEGA XI để thiết lập sơ đồ cây phát sinh chủng loài. Kết quả được thể hiện tại hình 3.



Hình 3. Kết quả so sánh trình tự *MatK* thu được với trình tự *MatK* đã công bố trên gen bank

Kết quả tại hình 3 cho thấy, sơ đồ cây phát sinh chủng loài có hai nhánh I và II, tại nhánh I thể hiện quan hệ di truyền của các trình tự *MatK* là khá đa dạng, trong đó hai trình tự *MatK* chúng tôi thu được có quan hệ di truyền cùng loài và cùng loài *Croton kongensis* với trình tự *MatK* mang mã số GQ434077 và khác loài với các trình tự *MatK* mang các mã số KC627789; KC627680; KY039691; KY039754, trong khi đó, tại nhánh II các trình tự *MatK* mang mã số NC040113 và MH394334 có quan hệ cùng loài *Croton tiglium*.

Từ các kết quả phân tích quan hệ di truyền của 2 trình tự *ITS; Matk* thu được từ mẫu cây Khổ sâm tại Như Xuân, Thường Xuân, Thanh Hóa với các trình tự *ITS; Matk* đã công bố trên gen bank cho thấy khi sử dụng DNA Barcode trong việc xác định quan hệ di truyền để xác định quan hệ chủng loại luôn có độ chính xác và độ tin cậy cao. Điều này giúp các nhà phân loại học có thêm cơ sở khoa học khi xác định quan hệ chủng loài và sắp xếp các nhóm sinh vật một cách phù hợp trong việc xây dựng cây phát sinh chủng loài, đặc biệt là việc nhận dạng các loài đồng hình hoặc các loài sinh vật quý hiếm.

4. KẾT LUẬN

Các trình tự *ITS*; *Matk* của loài Khổ sâm thu tại Như Xuân, Thanh Hóa và Thường Xuân, Thanh Hóa có quan hệ di truyền cùng loài và là loài *Croton kingensis*.

Kích thước các trình tự *ITS* và *Matk* của loài Khổ sâm thu được tại Như Xuân, Thanh Hóa và Thường Xuân, Thanh Hóa lần lượt là 676bp; 656bp.

Trình tự *ITS* của loài Khổ sâm *Croton kingensis* được chúng tôi công bố lần đầu tiên trên gen bank với mã số là ON508043 và OP037805

Các trình tự *ITS*; *Matk* của loài Khổ sâm thu tại Như Xuân, Thanh Hóa đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế lần lượt mang các mã số ON508043 và ON512847; các trình tự *ITS* và *Matk* của loài Khổ sâm thu được tại Thường Xuân, Thanh Hóa công bố trên gen ngân hàng gen quốc tế lần lượt mang mã số là OP037805 và OP037806

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cuenoud P, Savolainen V, Chatrou LW, et al. (2002), Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *MatK* DNA sequences, *American Journal of Botany*, 89: 132-144.
- [2] Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), *Cold Spring Harbor, NY*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [3] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990), *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds), Academic Press, New York, USA: 315-322.
- [4] Ytevietnam.edu.vn (2018), *Khổ sâm cho lá - Vị thuốc chữa bệnh đường tiêu hóa*, <https://ytevietnam.edu.vn/kho-sam-cho-la-vi-thuoc-chua-benh-duong-tieu-hoa.html/>
- [5] Omega3.vn, *Tác dụng của lá Khổ sâm chữa viêm đại tràng*, đi ngoài thần kỳ, <https://omega3.vn/la-kho-sam.html>
- [6] Trung tâm nghiên cứu và nuôi trồng Dược liệu Quốc gia, *Khổ sâm*, <https://www.thuocdantoc.org/duoc-lieu/kho-sam>.
- [7] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

IDENTIFYING GENETIC RELATIONSHIPS OF *CROTON KONGENSIS* GAGNEP. FROM THANH HOA BY USING THE DNA BARCODE

**Le Dinh Chac, Do Thi Hai, Nguyen The Loi, Nguyen Van Tuan,
Le Thi Hai Yen, Dang Thi Hong Phuong**

ABSTRACT

The use of DNA barcoding techniques to determine the genetic relationships of organisms in general and plants in particular has been applied by many scientists. These

techniques use a DNA sequence (about 400-1000 bp) as a standard to identify quickly and accurately the phylogenetic relationships of organisms. Therefore, DNA barcodes not only help taxonomists in taxonomy and identification of species, but also improve their capacity to control, understand and utilize biodiversity. In this study, we present the results of isolating and determining the species relationship of two DNA barcode sequences of species Croton kongensis collected in Thanh Hoa. The sequences we isolated were ITS (676bp); Matk (656bp). These two sequences were identified as the same species Croton kongensis, of which the ITS sequence was the first published on the gene banks.

Keywords: *ITS, Matk, DNA barcoding, C.kongensis.*

* Ngày nộp bài: 5/10/2022; Ngày gửi phản biện: 10/10/2022; Ngày duyệt đăng: 27/10/2022