

BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA MÃ VẠCH *trnH-psbA* TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ MẪU LAN KIM TUYẾN THU THẬP TẠI VIỆT NAM

Hoàng Hải Đăng^{1*}, Ngô Văn Đức¹, Trịnh Thị Hương¹, Hồ Việt Thế¹, Trần Trọng Tuấn²

¹Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Ở Việt Nam, lan kim tuyến được sử dụng làm dược liệu quan trọng để điều trị nhiều bệnh. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức những cây lan này đã dẫn đến sự cạn kiệt dần tài nguyên thiên nhiên của chúng. Do đó, việc áp dụng các chỉ thị phân tử để nhận diện và phân biệt các chủng lan kim tuyến nhằm mục đích bảo tồn các loài lan này là vô cùng cần thiết. Việc sử dụng mã vạch DNA đã nổi lên như một phương pháp có độ tin cậy cao để phân loại thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá hiệu quả của vùng mã vạch DNA *trnH-psbA* trong việc phân biệt chín mẫu lan kim tuyến được thu thập từ tỉnh Quảng Bình và Thành phố Hồ Chí Minh. Những phát hiện này cho thấy sự thay đổi đáng kể trong trình tự DNA của vùng *trnH-psbA* trong số các mẫu lan được thu thập. Những kết quả này nêu bật tiềm năng của mã vạch DNA *trnH-psbA* trong đặc tính di truyền và nhận diện tài nguyên của lan kim tuyến ở Việt Nam.

Từ khóa: Mã vạch DNA, lan kim tuyến, đa dạng di truyền, *trnH-psbA*.

MỞ ĐẦU

Lan kim tuyến là tên gọi được sử dụng để miêu tả những loài hoặc nhóm cây có lá mềm mượt, như được làm từ gấm, với những đường gân đẹp mắt của một số chi trong họ Orchidaceae, cụ thể là *Anoectochilus*, *Dossinia*, *Goodyera*, *Ludisia* (De *et al.*, 2018), phân bố rộng rãi ở các vùng nhiệt đới châu Á, bao gồm Trung Quốc, Ấn Độ, Lào, Indonesia và Việt Nam. Lan kim tuyến là một loại cây thảo dược được sử dụng phổ biến làm thực phẩm bổ sung và y học dân gian ở châu Á (Kuan *et al.*, 2011). Với tác dụng chăm sóc sức khỏe, nó có thể được sử dụng để bảo vệ gan (Fang *et al.*, 2008), giảm mệt mỏi (Ikeuchi *et al.*, 2005), chống oxy hóa (Wang *et al.*, 2005), hạ đường huyết (Ho *et al.*, 2018), giảm huyết áp (Fang *et al.*, 2008), ngăn ngừa loãng xương (Masuda *et al.*, 2008), chống khối u (Tseng *et al.*, 2006) và cải thiện chức năng miễn dịch (Kuan *et al.*, 2011). Tại Việt Nam, lan kim tuyến đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để điều trị nhiều bệnh khác nhau như viêm màng phổi, bệnh tim mạch, tăng huyết áp, sốt, viêm thận, bầm tím và rắn độc cắn (Shao *et al.*, 2014). Ngoài ra, hoa của lan kim tuyến sở hữu một số đặc tính dược lý, bao gồm khả năng chống mệt mỏi, chống oxy hóa, giảm mỡ máu, phòng ngừa ung thư và tác dụng điều hòa miễn dịch. Theo truyền thống, việc phân loại lan kim tuyến thường dựa vào các đặc điểm hình thái như hình dạng lá, màu sắc và cấu trúc gân. Mặc dù phương pháp này mang lại lợi ích về tiết kiệm thời gian và chi phí, nhưng cũng gặp phải một số vấn đề. Ví dụ, các đặc điểm hình thái bên ngoài thường rất giống nhau, sự đa dạng trong hình thái giữa giai đoạn trưởng thành và giai đoạn non, cũng như ảnh hưởng của môi trường và giai đoạn phát triển của cây thường dẫn đến sự không chính xác trong việc nhận dạng. Ngoài ra, việc nhận dạng dựa trên hình thái thường không chính xác nếu mẫu vật bị hỏng hoặc đã được xử lý trước đó. Sử dụng không đúng loại cây hoặc các hợp chất dược liệu khác nhau để chế biến thuốc thảo dược có thể làm giảm hiệu quả của thuốc và có thể gây hại cho người sử dụng (Ho *et al.*, 2021).

Trong những năm gần đây, sự phát triển của các chỉ thị phân tử (RAPD, AFLP, SSR, ISSR, mã vạch DNA, ...) mà các nghiên cứu về định danh loài, đánh giá phân loại và đa dạng di truyền được phân tích một cách khách quan, tăng độ chính xác và được sử dụng phổ biến. Hai dấu hiệu mã vạch DNA thường được đề xuất cho thực vật là ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) và maturase K (*matK*). Tuy nhiên, khả năng phân biệt của các dấu hiệu này có thể khác nhau giữa các loài thực vật (Ahmed *et al.*, 2020). Vào năm 2012, Pang và đồng tác giả đã giới thiệu vùng *trnH-psbA* như một mã vạch bổ sung để nhận dạng thực vật (Pang *et al.*, 2012). Mã vạch DNA đặc biệt này rất khác nhau giữa các vùng plastid và có thể dễ dàng khuếch đại thông qua phản ứng PCR ở nhiều loại thực vật trên đất liền (Ralitsa *et al.*, 2020). Vùng *trnH-psbA* đem lại hiệu quả cao trong việc xác định các loài thực vật khác nhau, bao gồm lúa mạch đen (Skuzza *et al.*, 2019), hạt hạnh nhân và hạt mơ (Uncu *et al.*, 2020) và thực vật họ Poaceae, Panicoideae, Paspaleae (Delfini *et al.*, 2023). Dựa trên thành công này, nghiên cứu hiện tại được tiến hành nhằm đánh giá hiệu quả của mã vạch *trnH-psbA* trong việc phân biệt các loại lan kim tuyến khác nhau. Những phát hiện của nghiên cứu này có khả năng góp phần vào việc sử dụng các dấu hiệu mã vạch này để xác định chính xác các loài lan kim tuyến cụ thể. Điều này có thể hỗ trợ các nỗ lực liên quan đến nhân giống, bảo tồn và nghiên cứu về tính đa dạng của các loài cây thuốc có giá trị.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chín mẫu lan kim tuyến được thu thập từ núi Trường Sơn thuộc tỉnh Quảng Bình (QB) và Thành phố Hồ Chí Minh (TP. HCM) được sử dụng trong nghiên cứu này (Bảng 1). Hình thái lá của chín mẫu này được thể hiện ở (Hình 1).

Bảng 1. Danh sách chín mẫu lan kim tuyến được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu mẫu	Nơi thu thập	Đặc điểm
1	HCM-1	Trung tâm thí nghiệm thực hành Trường Đại học Công Thương TP. HCM	Mẫu nuôi cấy mô
2	HCM-2	Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP. HCM	Mẫu nuôi cấy mô
3	HCM-4	Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP. HCM	Mẫu nuôi cấy mô
4	HCM-5	Viện Sinh học Nhiệt đới	Mẫu nuôi cấy mô
5	HCM-6	Viện Sinh học Nhiệt đới	Mẫu nuôi cấy mô
6	QB-4	Núi Trường Sơn thuộc tỉnh Quảng Bình	Mẫu cây tươi và lá
7	QB-5	Núi Trường Sơn thuộc tỉnh Quảng Bình	Mẫu cây tươi và lá
8	QB-6	Núi Trường Sơn thuộc tỉnh Quảng Bình	Mẫu cây tươi và lá
9	QB-8	Núi Trường Sơn thuộc tỉnh Quảng Bình	Mẫu cây tươi và lá

Trình tự mỗi được sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày ở (Bảng 2).

Bảng 2. Trình tự mỗi khuếch đại vùng *trnH-psbA*

Tên mỗi	Độ dài mỗi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Tài liệu tham khảo
<i>trnH-psbA-F</i>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	910-950 bp	(Costion <i>et al.</i> , 2011)
<i>trnH-psbA-R</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC		

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp ly trích DNA tổng số

Trong nghiên cứu này, mẫu lan kim tuyến thu thập được rửa sạch, bảo quản ở -80°C. Quy trình trích ly DNA tổng số lan kim tuyến được tham khảo dựa trên nghiên cứu của Asif và đồng tác giả (2005): nghiền 300 mg mẫu lá tươi trong nitor lỏng, bổ sung 800 µL đệm ly trích CTAB 3% (100 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, 20 mM EDTA, 3% CTAB, 1% PVP) và 60 µL SDS 10%, ủ trong bể ổn nhiệt (Digital Water Bath, Hàn Quốc) ở 65°C trong 60 phút sau đó ly tâm 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C. Dịch nổi thu nhận được bổ sung cùng thể tích hỗn hợp Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1), ly tâm 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C và thu dịch nổi. Mẫu DNA được bổ sung cùng thể tích hỗn hợp Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1), ly tâm ở 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C và thu dịch nổi. Dịch nổi được kết tủa bằng Isopropanol với tỉ lệ 1:1, đảo nhẹ và ly tâm 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C và thu tủa. Rửa tủa 2 lần bằng EtOH 76%, ly tâm ở 13.000 rpm trong 15 phút và để khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó được tái huyền phù trong 50 µL nước khử ion (Canada). Mẫu được đánh giá chất lượng tinh sạch bằng phương pháp đo quang phổ (UV-Vis 6600) ở bước sóng 260 nm với 280 nm và xác định bằng phương pháp điện di ngang trên gel agarose 1,5% trong 100 ml TAE 1X (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Dung dịch DNA được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho phản ứng PCR.

PCR khuếch đại vùng trình tự *trnH-psbA*

Các DNA mục tiêu được khuếch đại với thành phần phản ứng PCR bao gồm: 12 µL 2X Mytaq Mix (Bioline, Anh), 2 µL mỗi (2 pmol/µL), 2 µL DNA template (50 ng/µL) và 6 µL nước khử ion (Canada). Bên cạnh đó, các mẫu DNA được khuếch đại bằng thiết bị luân nhiệt PCR Thermal Cycler Block (Thermo Fisher Scientific Oy, Mỹ) với các điều kiện cho phản ứng PCR như sau: biến tính ban đầu 95°C trong 2 phút, sau đó 35 chu kỳ với 30 giây 95°C, 30 giây 53,8°C, 1 phút ở 72°C, và cuối cùng 72°C trong 1 phút để hoàn thành các phản ứng. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng ISOLATE II PCR và Gel Kit (Bioline, UK). Sản phẩm PCR được xác định bằng phương pháp điện di ngang trên gel agarose 1,2 % trong 100 ml TAE 1X (Thermo Fisher Scientific Oy, Mỹ). Sản phẩm sau đó được gửi giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch Vụ Và Thương Mại Nam Khoa (Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam).

Phương pháp xử lý số liệu

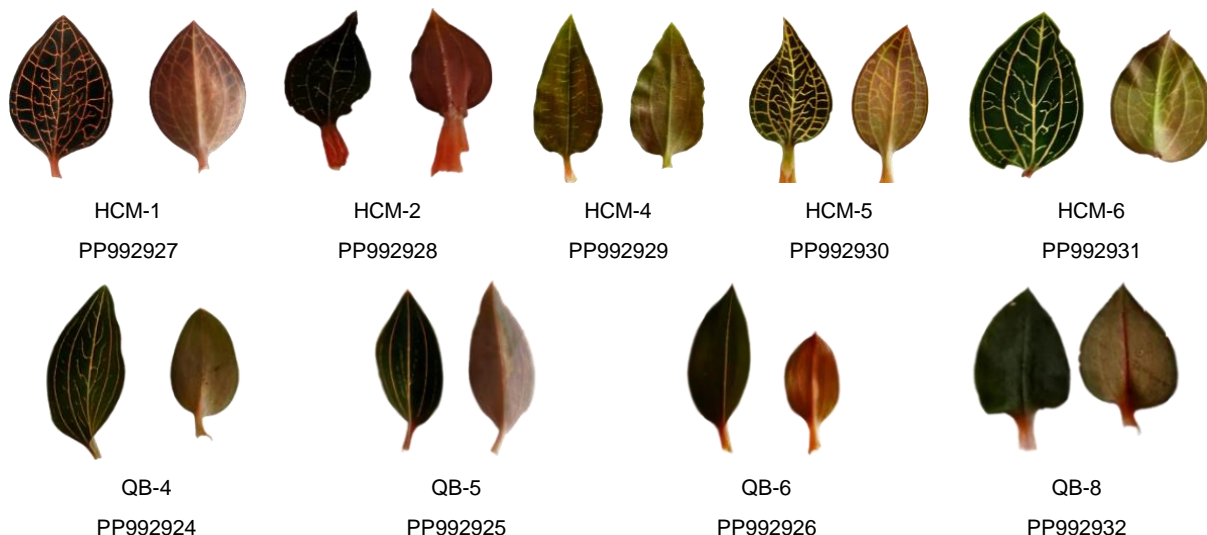
Sau khi sản phẩm giải trình tự được kiểm tra bằng tín hiệu peak thông qua phần mềm FinchTV, các trình tự sẽ được đưa lên cơ sở dữ liệu Genbank của NCBI (National Center for Biotechnology Information). Các trình tự sẽ được so sánh và phân tích bằng công cụ BLAST của NCBI. Mức độ khác biệt giữa các trình tự sẽ được đánh giá bằng công cụ p-distance trên phần mềm MEGA-X. Để đánh giá mức độ phù hợp của mô hình, các trình tự sẽ được phân tích bằng công cụ "Find best DNA/protein Models (ML)" trong phần mềm MEGA-X. Các thông số tỉ lệ

đồng vị và hoán vị sẽ được tính toán dựa trên mô hình phù hợp từ phần mềm trước khi xây dựng cây phát sinh loài. Phân tích tỷ lệ thay thế (%) của nucleotide trong vùng mã vạch *trnH - psbA* của chín mẫu lan kim tuyến theo mô hình Tamura 3-parameter. Cây phát sinh loài sẽ được xây dựng bằng phương pháp UPGMA. Trong phân tích phát sinh loài, hai trình tự từ hai chi khác nhau trong họ Orchidaceae, MN331616.1 thuộc loài *Cattleya forbesii* và KX298661.1 thuộc loài *Vanda pumila*, sẽ được sử dụng như nhóm ngoài (outgroup). Cách sử dụng nhóm ngoài trong việc xây dựng lại cây phát sinh loài sẽ được mô tả và đánh giá theo các tiêu chí phân tích. Bằng việc xem xét các trạng thái, đặc điểm và mối quan hệ của các nhóm ngoài, chúng ta có thể ước lượng các trạng thái tổ tiên của nhóm nghiên cứu với nhóm ngoài, người ta có thể xác định các đặc điểm chung và phân biệt giữa các đặc điểm dẫn đến sự hiểu biết sâu hơn về mối quan hệ phát sinh và tiến hóa giữa các thành viên trong nhóm nghiên cứu (Maddison *et al.*, 1984).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thu thập mẫu lan kim tuyến

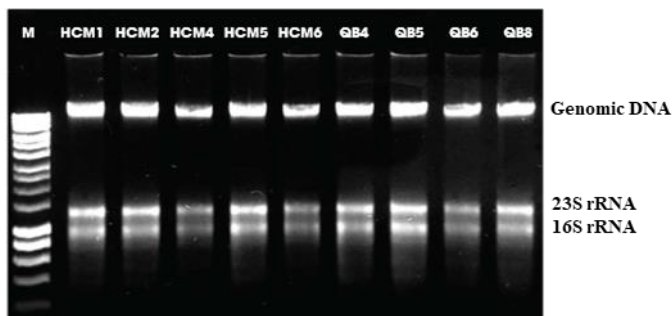
Tổng cộng có chín mẫu lan kim tuyến đã được thu thập, trong đó có bốn mẫu được thu thập từ tỉnh Quảng Bình và năm mẫu được thu thập từ Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu cây này đã thể hiện sự đa dạng đáng kể về hình dạng lá, như được mô tả trong hình 1. Tuy nhiên, trong mỗi nhóm mẫu không có kiểu gân đặc biệt nào được xác định. Những phát hiện này càng làm nổi bật thêm tính không đáng tin cậy của việc nhận dạng hình thái trong việc phân biệt các loài lan kim tuyến. Các trình tự sau khi loại bỏ các đoạn tín hiệu nhiễu và đã được đăng lên cơ sở dữ liệu Genbank NCBI với các mã số được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Hình thái lá của chín mẫu lan kim tuyến được sử dụng trong nghiên cứu này

Kết quả ly trích DNA

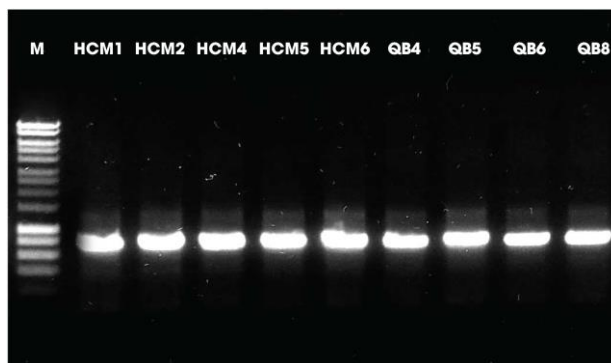
Khi xem xét kết quả ly trích DNA tổng số được thể hiện trong hình 2, chúng ta có thể thấy xuất hiện các băng vạch DNA và RNA sáng và rõ nét. Trong đó, các băng vạch DNA sắc nét có thể nhìn thấy kèm theo hai băng vạch rRNA 23S và 16S. Nguyên nhân có thể là do quá trình tách chiết DNA không đảm bảo loại bỏ hoàn toàn enzyme RNase, gây tổn động RNA trong mẫu. Bên cạnh đó, trên miệng giếng của gel, chúng ta cũng có thể thấy xuất hiện các dải sáng khác, có thể là do sự hiện diện của protein. Nhìn chung, kết quả này cho thấy một số hiện tượng không mong muốn trong quá trình ly trích DNA tổng số. Việc đánh giá và cải thiện phương pháp tách chiết là cần thiết để đảm bảo kết quả chính xác và đáng tin cậy trong nghiên cứu.



Hình 2. Kết quả điện di DNA tổng số chín mẫu lan kim tuyến

Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự *trnH-psbA*

Sau khi thu thập DNA tổng số từ các mẫu lan kim tuyến, DNA này đã được khuếch đại bằng cặp mồi được mô tả trong Bảng 2, sử dụng nhiệt độ bất cặp mồi phù hợp cho phản ứng PCR. Kết quả quan sát cho thấy rằng các mẫu lan kim tuyến đã thể hiện các dải DNA mục tiêu rõ ràng, có kích thước tương đương với dự kiến là 910-950bp, so với thang chuẩn HyperLadder™ 1kb được sử dụng trong nghiên cứu, do hãng Bionline thuộc Meridian cung cấp. Điều này cho thấy rằng quá trình PCR đã thành công trong việc khuếch đại và tạo ra sản phẩm mong muốn. Đáng chú ý, không có bất kỳ sản phẩm phụ nào được quan sát, bao gồm cả primer dimer, các sản phẩm không mong muốn được tạo ra khi cặp mồi tự bất cặp với nhau trong quá trình PCR.



Hình 3. Sản phẩm PCR khuếch đại trình tự *trnH-psbA* của chín mẫu lan kim tuyến

Kết quả đánh giá đa dạng di truyền lan kim tuyến

Sau khi được kiểm tra và điều chỉnh bằng phần mềm FinchTV, kết quả giải trình tự DNA của vùng *trnH-psbA* đã được sử dụng để xác định thông qua công cụ NCBI BLAST. Kết quả cho thấy rằng đối với nhóm mẫu thu thập ở Thành phố Hồ Chí Minh bao gồm HCM-1, HCM-4, HCM-5, chúng tương đồng 100% với các loài *Anoectochilus roxburghii*, *Anoectochilus zhejiangensis*, *Anoectochilus chapaensis* và *Anoectochilus emeiensis*. Mẫu HCM-2 tương đồng 100% với loài *Anoectochilus formosanus* và mẫu HCM-6 tương đồng cao nhất là 99,39% với loài *Anoectochilus burmannicus*. Đối với nhóm mẫu thu thập ở tỉnh Quảng Bình bao gồm QB-1, QB-5, QB-6, hệ số tương đồng dao động từ 99,57-100% với loài *Ludisia discolor*. Mẫu QB-8 có hệ số tương đồng 99,6% với loài *Cheirostylis chinensis*. Phân tích trình tự cho thấy sự khác biệt giữa các vùng *trnH-psbA* nằm trong khoảng từ 0,000 đến 0,061 (Xem Bảng 3).

Bảng 3. Khoảng cách di truyền của chín mẫu lan kim tuyến trong nghiên cứu

	HCM-1	HCM-2	HCM-4	HCM-5	HCM-6	QB-4	QB-5	QB-6	QB-8
HCM-1	0,000								
HCM-2	0,005	0,000							
HCM-4	0,000	0,005	0,000						
HCM-5	0,000	0,005	0,000	0,000					
HCM-6	0,002	0,008	0,002	0,002	0,000				
QB-4	0,009	0,011	0,011	0,009	0,011	0,000			
QB-5	0,009	0,010	0,010	0,009	0,010	0,000	0,000		
QB-6	0,013	0,015	0,016	0,013	0,016	0,004	0,004	0,000	
QB-8	0,039	0,041	0,044	0,039	0,036	0,057	0,047	0,061	0,000

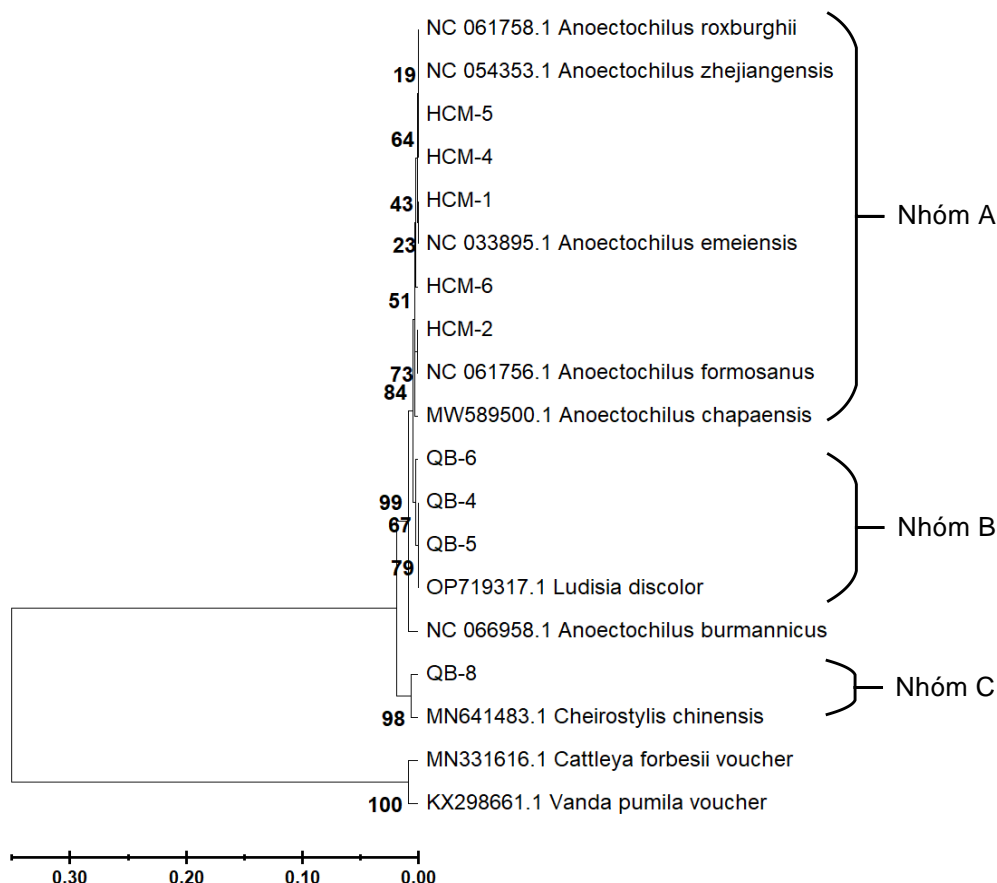
Kết quả được trình bày trong nghiên cứu này cho thấy sự thay thế của các nucleotide khác nhau trong vùng mã vạch DNA, như được mô tả trong bảng 4. Đặc biệt, các sự thay thế dị hoán giữa các phân tử purine và pyrimidine đã được quan sát, nhằm hiểu rõ hơn về mô hình tiến hóa của các loại cây thảo dược này. Về mặt lý thuyết, theo Tamura và đồng tác giả (1992, 1993) có 4 loại đồng hoán ($A \leftrightarrow G$ và $C \leftrightarrow T$) và 8 loại dị hoán (giữa purine và pyrimidine). Tỷ lệ dự kiến của đồng hoán và dị hoán là 0,5. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tỷ lệ đồng hoán chỉ đạt 41,47%, mức thấp hơn đáng kể so với tỷ lệ dị hoán là 58,53%. Thông thường đột biến đồng hoán được xác định là hình thức phổ biến nhất gây ra sự biến đổi và đa dạng hóa giữa các cá thể và nó đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiến hóa của các loài. Mô hình này cũng cung cấp thông tin quan trọng để phân tích và phân loại trong việc xây dựng cây phát sinh loài.

Bảng 4. Phân tích tỷ lệ thay thế (%) của nucleotide trong vùng mã vạch *trnH-psbA* của chín mẫu lan kim tuyến

Nitrogenous bases	A	T	C	G
A	-	9,85	4,78	6,77
T	9,85	-	6,77	4,78
C	9,85	13,96	-	4,78
G	13,96	9,85	4,78	-

Mô hình và tỉ lệ thay thế được ước tính theo mô hình Tamura 3-parameter với tỷ lệ thay thế chuyển tiếp khác nhau và tỷ lệ thay thế chuyển đổi được thể hiện bằng chữ in đậm

Áp dụng phương pháp UPGMA, các mẫu lấy từ Thành phố Hồ Chí Minh (Tp. HCM) và tỉnh Quảng Bình (QB) được phân thành ba nhóm phân biệt rõ ràng, thể hiện giá trị bootstrap cao (Hình 4). Nhóm A bao gồm 5 trình tự (HCM-1, HCM-2, HCM-4, HCM-5, HCM-6) tương đồng đồng cao với các loài *Anoectochilus roxburghii* (NC 061758.1), *Anoectochilus zhejiangensis* (NC 054353.1), *Anoectochilus chapaensis* (MW589500.1), *Anoectochilus formosanus* (NC 061756.1) và *Anoectochilus emeiensis* (NC 033895.1). Trong nhóm B, ba mẫu QB-4, QB-5, QB-6 cho thấy mức độ tương đồng cao với loài *Ludisia discolor* (OP719317.1). Trong nhóm C, có một mẫu QB-8 cho thấy mức độ tương đồng cao với loài *Cheirostylis chinensis* (MN641483.1). Ngoài ra, nhóm outgroup (MN331616.1 và KX298661.1) từ các loài khác nhau đã hình thành nên một nhánh riêng biệt, càng khẳng định độ tin cậy của phân tích phát sinh gene. Điều này phù hợp với nghiên cứu trước đây được thực hiện trên họ Combretaceae với chi *Ficus*, cũng chỉ ra rằng dấu hiệu mã vạch *trnH-psbA* vượt trội hơn các dấu hiệu mã vạch *rbcl* và *matK* (Li *et al.*, 2012; Gere *et al.*, 2013). Ngoài ra, kết quả của các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng trên các loài thực vật khác nhau, khả năng nhận diện trên vùng trình tự *trnH-psbA* tương đối cao như lúa mạch đen (Skuzza *et al.*, 2019), hạt hạnh nhân và hạt mơ (Uncu *et al.*, 2020) và thực vật họ Poaceae, Panicoideae, Paspaleae (Delfini *et al.*, 2023). Mã vạch *trnH-psbA* trước đây cũng được coi là một locus có tiềm năng cao vì nó chứa trình tự ngắn tạo điều kiện thuận lợi cho việc khuếch đại và trình tự đơn giản hơn. Kết quả chính từ nghiên cứu này có thể là tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn để điều tra nhiều hơn về lợi ích của *trnH-psbA* trong việc phân biệt các loài lan kim tuyến ở Việt Nam.



Hình 4. Cây phát sinh loài của chín mẫu lan kim tuyến sử dụng trình tự *trnH-psbA*

KẾT LUẬN

Nhóm nghiên cứu đã thu thập chín mẫu lan kim tuyến ở Thành phố Hồ Chí Minh và tỉnh Quảng Bình. Khuếch đại thành công và giải mã được trình tự vùng *trnH-psbA* của chín mẫu lan kim tuyến và phân tích trình tự thu được cho thấy khoảng cách di truyền giữa chín mẫu lan kim tuyến thu thập được ở mức thấp từ 0,000 đến 0,061. Kết quả chính từ nghiên cứu này có thể là tiềm năng cho nghiên cứu sâu hơn để điều tra lợi ích của *trnH-psbA* trong việc phân biệt và phân loại khác nhau.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh và Viện Sinh học Nhiệt đới đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện dự án.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed EB, Carmen A, Sameer Q, Ahmed E (2020). Molecular identification and phylogenetic placement of *Rosa arabica* Crép (Rosaceae), a critically endangered plant species. *Life*, 10(12), 335.
- Asif MJ, Cannon CH (2005). DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Mol Biol Rep*, 23(2), 185-192.
- Costion C, Ford A, Cross H, Crayn D, Harrington M, Lowe A (2011). Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. *PLoS ONE*, 6(11), e26841.
- De LC, Pathak P (2018). Conservation, management and utilization of orchid genetic resources. *TOSI*, 32, 81-91.
- Delfini C, Acosta JM, Aliscioni S., Souza VC, Zuloaga FO (2023). Phylogenetic Relationships in the Group Caespitosa of *Paspalum* L (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae). *Diversity* 2023, 15, 134.
- Fang HL, Wu, JB, Lin, WL, Ho, HY, Lin, WC (2008). Further studies on the hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(3), 291-296.
- Gere J, Yessoufou K, Daru BH, Mankga LT, Maurin O, van der Bank M (2013). Incorporating *trnH-psbA* to the core DNA barcodes improves significantly species discrimination within southern African Combretaceae. *ZooKeys*, (365), 129.
- Ho VT, Tran TKP, Vu TTT, Widiarsih S (2021). Comparison of *matK* and *rbcL* DNA barcodes for genetic classification of jewel orchid accessions in Vietnam. *JGEB*, 19(1), 93.
- Ho Y, Chen YF, Wang LH, Hsu KY, Chin YT, Yang YCS, Lin SJ (2018). Inhibitory effect of *Anoectochilus formosanus* extract on hyperglycemia-related PD-L1 expression and cancer proliferation. *Front Pharmacol*, 9, 807.
- Ikeuchi M, Yamaguchi K, Nishimura T, Yazawa K (2005). Effects of *Anoectochilus formosanus* on endurance capacity in mice. *J Nutr Sci Vitaminol*, 51(1), 40-44.
- Kuan YC, Wu TJ, Kuo CY, Hsu JC, Chang WY, Sheu F (2011). Molecular cloning of a new immunomodulatory protein from *Anoectochilus formosanus* which induces B cell IgM secretion through a T-independent mechanism. *PLoS one*, 6(6), e21004.
- Li HQ, Chen JY, Wang S, Xiong SZ (2012). Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China. *Mol Ecol Resour*, 12(5), 783-790.
- Maddison WP, Donoghue MJ, Maddison, DR (1984). Outgroup analysis and parsimony. *Sys Biol*, 33(1), 83-103.
- Masuda K, Ikeuchi M, Koyama T, Yamaguchi K, Woo JT, Nishimura T, Yazawa K (2008). Suppressive effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteoclast formation *in vitro* and bone resorption *in vivo*. *JBMM*, 26, 123-129.
- Pang X, Liu C, Shi L, Liu R, Liang D, Li H, ...Chen S (2012). Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PLoS One*, 7(11), e48833.
- Ralitsa B, Katerina S, Radostina SG, Maya I (2020). A preliminary assessment of *trnH-psbA* as DNA barcode for botanical identification of polyfloral honey samples and comparison with *rbcL* marker. *Bulg J Agric*, 26(1), 238-242.
- Skuza L, Szućko I, Filip E, Adamczyk A (2019). DNA barcoding in selected species and subspecies of Rye (*Secale*) using three chloroplast loci (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*). *Not Bot Horti Agrobo*, 47(1), 54-62.
- Shao Q, Deng Y, Liu H, Zhang A, Huang Y, Xu G, Li M (2014). Essential oils extraction from *Anoectochilus roxburghii* using supercritical carbon dioxide and their antioxidant activity. *Ind Crop Prod*, 60, 104-112.
- Tamura K (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol Biol Evol*, 9(4), 678-687.
- Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *MBE*, 10(3), 512-526.
- Tseng CC, Shang HF, Wang LF, Su B, Hsu CC, Kao HY, Cheng KT (2006). Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Phytomed*, 13(5), 366-370.
- Uncu AO (2020). A *trnH-psbA* barcode genotyping assay for the detection of common apricot (*Prunus armeniaca* L.) adulteration in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *CyTA - J Food*, 18(1), 187-194.
- Wang LF, Lin CM, Shih CM, Chen HJ, Su B, Tseng CC, ... Cheng KT (2005). Prevention of cellular oxidative damage by an aqueous extract of *Anoectochilus formosanus*. *Ann N Y Acad Sci*, 1042(1), 379-386.

INITIALLY ASSESS THE EFFECTIVENESS OF *trnH-psbA* BARCODE IN IDENTIFYING GENETIC DIVERSITY OF NINE JEWEL ORCHID SPECIES COLLECTED VIETNAM

Hai Dang Hoang^{1*}, Van Duc Ngo¹, Thi Huong Trinh¹, Viet The Ho¹, Trong Tuan Tran²,

¹*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

²*Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Jewel orchids are used as important medicinal herbs to treat many diseases in Vietnam. However, overexploitation of these orchids has led to the gradual depletion of their natural resources. Therefore, it is extremely necessary to apply molecular markers to identify and differentiate the jewel orchid strains to preserve these orchid species. The use of DNA barcoding has emerged as a highly reliable method for classifying plants. In this study, we evaluated the effectiveness of the *trnH-psbA* DNA barcoding region in distinguishing nine jewel orchid accessions collected from Quang Binh province and Ho Chi Minh City. These findings revealed significant variations in the DNA sequence of the *trnH-psbA* region among the orchid samples collected. These results highlight the potential of *trnH-psbA* DNA barcoding in genetic characterization and resource identification of jewel orchids in Vietnam.

Keywords: DNA barcode, jewel orchids, phylogenetic analysis, *trnH-psbA*.

* Author for correspondence: Tel: 0967921920; Email: Hoanghaidang09011996@gmail.com