

# XÁC ĐỊNH ĐOẠN MÃ VẠCH ADN CỦA MỘT SỐ MẪU TRÀ HOA VÀNG TẠI QUẢNG NINH PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI VÀ PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN

Bùi Thị Mai Hương<sup>1\*</sup>, Nguyễn Văn Việt<sup>1</sup>,  
Hà Văn Huân<sup>1</sup>, Lê Thọ Sơn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hồng Gấm<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Hiện nay, ở nước ta đã phát hiện và xác định được khoảng 40 loài Trà hoa vàng, trong đó Trà hoa vàng tại Quảng Ninh có một số đặc trưng riêng so với các loài khác về hình thái và màu sắc hoa. Tuy nhiên, việc xác định loài dựa trên các đặc điểm về hình thái là hết sức khó khăn. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là xác định một số đoạn mã vạch ADN để phục vụ giám định và phân tích đa dạng di truyền loài Trà hoa vàng. Một số mẫu lá Trà hoa vàng đã được thu thập tại huyện Hải Hà và Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh sau đó tiến hành tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá cây Trà hoa vàng. Các đoạn mã vạch ADN (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*) được nhân bản từ ADN tổng số của Trà hoa vàng bằng kỹ thuật PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR chỉ ra rằng các băng ADN thu được có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn ADN dự kiến, sau đó sản phẩm PCR được xác định trình tự nucleotide. Kết quả phân tích trình tự nucleotide đã chỉ ra, đoạn *rbcl* có 599 nucleotide, đoạn *TrnH-psbA* có 510 nucleotide và đoạn *ITS2* có 138 nucleotide. Các trình tự này được xử lý và so sánh với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN tương ứng của các loài Trà hoa vàng khác đã được công bố trên NCBI và DNABank.vn. Cây quan hệ di truyền được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML) và khoảng cách di truyền được xử lý bằng phần mềm Mega X cho thấy, Trà hoa vàng tại huyện Hải Hà và Cô Tô, tỉnh Quảng Ninh có quan hệ di truyền gần nhất với loài Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) với hệ số tương đồng 99,83% của đoạn *rbcl*; 98,63% và 98,43% của đoạn *trnH-psbA*; 89,13% và 89,29% của đoạn *ITS2*. Nghiên cứu đã khuyến nghị sử dụng đoạn *ITS2* và *trnH-psbA* làm mã vạch ADN cho Trà hoa vàng ở Hải Hà và Cô Tô, tỉnh Quảng Ninh. Kết quả này là cơ sở khoa học phục vụ cho công tác bảo tồn, khai thác và phát triển nguồn gen loài cây quý hiếm này.

**Từ khóa:** Đa dạng di truyền, giám định loài, mã vạch ADN, nhân bản gen, Trà hoa vàng.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trà hoa vàng là các loài cây có giá trị kinh tế cao, được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau như: dược phẩm, sản phẩm chức năng, trang trí, cảnh quan,...[8, 11]. Hiện nay, Trà hoa vàng trong tự nhiên đang bị khai thác cạn kiệt. Vì vậy, cần có những nghiên cứu về nguồn gen, đa dạng di truyền, bảo tồn, nhân giống và phát triển loài cây có giá trị cao này. Việc nghiên cứu xác định một số đoạn mã vạch ADN cho loài Trà hoa vàng tại Quảng Ninh phục vụ giám định loài và phân tích đa dạng di truyền là cần thiết và cấp bách cho việc định danh, bảo tồn và phát triển loài Trà hoa vàng bản địa quý của Việt Nam. Phương pháp giám định loài bằng mã vạch ADN (DNA Barcode) được đề xuất vào năm 2003 bởi nhà khoa học người Canada - Paul Hebert nhằm khắc phục những hạn chế của phương pháp

truyền thống là chỉ dựa vào các đặc điểm hình thái [7]. Mã vạch ADN là trình tự nucleotide của một đoạn ADN ngắn đặc trưng cho từng loài, từng giống, thậm chí cho từng cá thể, trong đó có vùng ít bị thay đổi (rất ổn định – bảo thủ) và có vùng dễ thay đổi trong quá trình tiến hóa. Dựa vào mức độ thay đổi trong trình tự ADN này để đánh giá sự sai khác di truyền giữa các sinh vật. Như vậy, mã vạch ADN là một phương pháp định danh mới sử dụng một đoạn ADN đặc trưng nằm trong hệ gen (Genome) ở cả trong nhân hoặc ngoài nhân của sinh vật để xác định sinh vật. Mã vạch ADN là một công cụ mới, rất có hiệu quả cho phân loại, giám định sinh vật gồm cả thực vật, động vật và vi sinh vật. Ở động vật thường sử dụng đoạn gen ở ty thể cytochrome C oxidase (*COI*) [1, 2] để làm mã vạch ADN cho phần lớn các loài. Ở thực vật, thường sử dụng một số đoạn ADN ở lục lạp như: *matK*, *rbcl* [3]; ở trong nhân tế bào như: *ITS*, *ITS2* và các vùng xen *TrnH-psbA*, *psbK-psbI* để làm mã vạch ADN [4, 5, 6, 9, 10].

<sup>1</sup> Trường Đại học Lâm nghiệp

\*Email: thohuongminh21@gmail.com

Nghiên cứu này, tiến hành lựa chọn ba đoạn trình tự ADN (*rbcL*, *TrnH-psbA* và *ITS2*) để giải trình tự nucleotide phục vụ giám định và phân tích quan hệ di truyền của Trà hoa vàng tại Quảng Ninh. Trong đó, các đoạn *rbcL*, *TrnH-psbA* là ADN nằm ở hệ gen lục lạp và *ITS2* là đoạn ADN nằm ở hệ gen nhân. Các đoạn trình tự này đều có tính đặc trưng cao cho loài, có thể đem lại kết quả khả quan nhằm phân loại, giám định và xác định mối quan hệ di truyền, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả bảo tồn và phát triển loài Trà hoa vàng ở Quảng Ninh nói riêng và ở Việt Nam nói chung.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất**

Đối tượng nghiên cứu: Các mẫu Trà hoa vàng được thu thập tại huyện Hải Hà và Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh. Mẫu thu thập tại Hải Hà với tọa độ 2123'46" vĩ độ Bắc, 10738'52" kinh độ Đông, độ cao 150 - 200 m. Mẫu thu thập tại Cô Tô với tọa độ 2105'18" vĩ độ Bắc, 10754'28" kinh độ Đông, độ cao 30 - 40 m.

Vật liệu nghiên cứu: mẫu lá bánh tẻ của cây Trà hoa vàng. Sau khi thu, mẫu được bảo quản trong túi ni lông có chứa hạt hút ẩm (Silica gel), sau đó đưa về phòng thí nghiệm và được bảo quản ở - 20°C để phục vụ tách chiết ADN tổng số.

Trình tự các cặp mồi *rbcL* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAA AATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C; mồi *TrnH-psbA* (trnP1F: CGCGCATGGTGGATTCA CAATCC; psbP1R: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C; mồi *ITS2* (IsP1F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT; IsP1R: TCCTCCGC TTATTGATATGC) với nhiệt độ gắn mồi 48°C. Hóa chất: Kit tách chiết ADN tổng số (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của Hãng Intron Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit) của Norgen, Canada; hóa chất cho điện di trên gel Agarose: Agarose, ADN marker, Redsafe,...

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Trà hoa vàng theo hướng dẫn sử dụng Kit (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen. Nhân bản đoạn gen *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ITS2* từ các mẫu ADN tổng số bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700,

mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 µl, bao gồm: H<sub>2</sub>O deion (7 µl), 2x PCR Master mix Solution (10 µl), 10 pmol/ µl mỗi xuôi (1,0 µl), 10 pmol/ µl mỗi ngược (1,0 µl) và 50 ng/µl ADN khuôn (1 µl). Chương trình phản ứng PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C: 30 giây, 48 - 52°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 5 phút; 4°C. Nhiệt độ gắn mồi các phản ứng phụ thuộc vào cặp mồi sử dụng. Mỗi phản ứng PCR lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu thí nghiệm. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit (PCR Purification Kit) của hãng Norgen, Canada. Sau khi tinh sạch sản phẩm PCR được gửi cho phòng thí nghiệm 1 st Base ở Malaysia để giải trình tự.

Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như: Bioedit, ADNclub, Biohit, Mega 10,... Trình tự nucleotide của các đoạn ADN *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ITS2* được so sánh với các loài Trà hoa vàng khác ở Việt Nam trên Ngân hàng Gen DNABank.vn để xác định hệ số di truyền và xây dựng cây quan hệ di truyền bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML).

## **3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Trà hoa vàng**

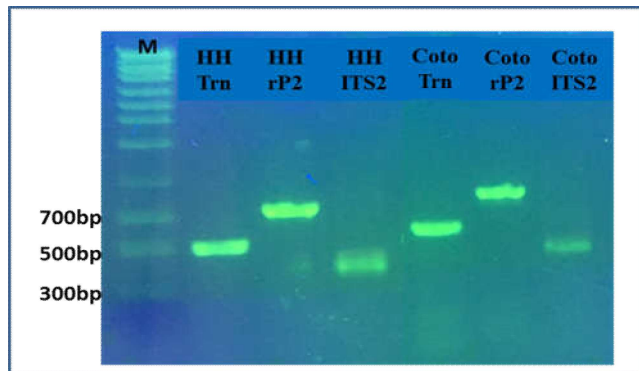
ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Trà hoa vàng bằng Kit tách chiết của hãng Norgen được pha loãng để xác định nồng độ và độ tinh sạch. Kết quả xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch ADN tổng số cho thấy, dung dịch ADN tổng số có nồng độ dao động từ 200 - 300 ng/µl; tỷ số OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> trong khoảng giá trị từ 1,7 - 2,05. Kết quả này khẳng định đã tách chiết được ADN với nồng độ cao và đảm bảo độ tinh sạch. Sản phẩm tách chiết ADN tổng số đảm bảo yêu cầu kỹ thuật làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR.

### **3.2. Kết quả nhân bản các đoạn mã vạch ADN bằng kỹ thuật PCR**

ADN tổng số tách chiết từ các mẫu lá của cây Trà hoa vàng được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *trnH-psbA*, *rbcL* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.

Kết quả PCR sau khi được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 1) cho thấy, xuất hiện băng ADN có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn mã vạch ADN dự kiến. Sản phẩm PCR không

có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR rất đặc hiệu, sau khi tinh sạch có thể sử dụng trực tiếp các sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide.



**Hình 1.** Ảnh điện di kết quả PCR các đoạn gen *trnH-psbA*, *rbcL*, *ITS2* của Trà hoa vàng tại Hải Hà (HH) và Cô Tô (Coto)

### 3.3. Kết quả phân tích trình tự nucleotide các đoạn mã vạch ADN của Trà hoa vàng thu thập tại huyện Hải Hà và Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh

#### 3.3.1. Trình tự ADN đoạn gen *rbcL* của Trà hoa vàng thu thập tại huyện Hải Hà và Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *rbcL* được nhân bản có kích thước 599 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcL* của các mẫu Trà hoa vàng được thu thập tại Hải Hà và Cô Tô có trình tự nucleotide giống nhau 100% và trình tự thu được như sau:

ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGTG  
TTGGATTCAAAGCTGGTGTTAAAGATTACAAATT  
GACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGAT  
ACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCG  
CAACCTGGAGTTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCC  
GCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGG  
ACAACGTGTGGACCGATGGACTTACTAGCCTT  
GATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGAG  
CCCGTTGCTGGAGAAGAAAGTCAATTTATTGCTT  
ATGTAGCGTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGG  
TTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGT  
AATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGCGCTCTA  
CGTCTGGAAGATCTGCGAATCCCTACTGCGTAT  
GTTAAACCTTTCCAAGGACCGCCTCATGGCATC  
CAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTC  
GTCCCCTGTTGGGATGTACTATTAAACCTAAATT  
GGGGTTATCTGCTAAAACTACGGAAGAGCAGT  
TTATGAATGTCTCCGCGGTGGACTTGATTTTAC

Trình tự này được dùng để so sánh với các loài Trà hoa vàng khác ở Việt Nam (DNABank.vn) và trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Do có sự giống nhau về trình tự nucleotide của đoạn *rbcL* giữa các mẫu Trà hoa vàng tại Hải Hà và Cô Tô nên đã chọn đoạn trình tự của Hải Hà làm đại diện để so sánh. Hệ số tương đồng của Trà hoa vàng được lấy ở Hải Hà với các loài Trà khác và được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1.** Tỷ lệ tương đồng di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL*.

| TT | Tên loài                | Mã số      | Tỷ lệ tương đồng (%) |
|----|-------------------------|------------|----------------------|
| 1  | <i>C. chrysantha</i>    | TCC0007    | 99,83                |
| 2  | <i>C. amplexicaulis</i> | TCA0002    | 99,83                |
| 3  | <i>C. petelotii</i>     | TCP0002    | 99,83                |
| 4  | <i>C. tamdaoensis</i>   | TCT0008    | 99,83                |
| 5  | <i>C. hakoda</i>        | TCH0003    | 99,83                |
| 6  | <i>C. crassiphylla</i>  | TCC0002    | 99,83                |
| 7  | <i>C. tienii</i>        | TCT0003    | 99,67                |
| 8  | <i>C. petelotii</i>     | KJ806276.1 | 99,83                |
| 9  | <i>C. japonica</i>      | MK353211.1 | 99,83                |

Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood (ML) để xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của các loài Trà hoa vàng như ở hình 2.



**Hình 2.** Cây quan hệ di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL*

Sử dụng phần mềm Mega X đã xác định được khoảng cách di truyền (*p-distance*) của Trà hoa vàng thu thập tại Hải Hà với các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng 2.

Căn cứ vào cây phát sinh chủng loại và khoảng cách di truyền của các loài cho thấy: Trà hoa vàng tại Hải Hà và Cô Tô có quan hệ gần nhất với loài Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*, *C. tamdaoensis*, *C.*

*petelotii*, *C. hakoda*, *C. crassiphylla*, *C. japonica*, và có quan hệ xa với loài Trà hoa vàng (*Camellia* *C. amplexicaulis*) với khoảng cách di truyền là 0,00167 *tienii*) với khoảng cách di truyền là 0,00335.

**Bảng 2. Khoảng cách di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rcbL***

|                          | <i>Hai Ha</i> | <i>C. tienii</i> | <i>C. tamdaoensis</i> | <i>C. petelotii_ncbi</i> | <i>C. petelotii</i> | <i>C. japonica_ncbi</i> | <i>C. hakoda</i> | <i>C. chrysantha</i> | <i>C. crassiphylla</i> | <i>C. amplexicaulis</i> |
|--------------------------|---------------|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Hai Ha</i>            |               |                  |                       |                          |                     |                         |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. tienii</i>         | 0,00335       |                  |                       |                          |                     |                         |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. tamdaoensis</i>    | 0,00167       | 0,00167          |                       |                          |                     |                         |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. petelotii_ncbi</i> | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               |                          |                     |                         |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. petelotii</i>      | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               | 0,00000                  |                     |                         |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. japonica_ncbi</i>  | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               | 0,00000                  | 0,00000             |                         |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. hakoda</i>         | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               | 0,00000                  | 0,00000             | 0,00000                 |                  |                      |                        |                         |
| <i>C. chrysantha</i>     | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               | 0,00000                  | 0,00000             | 0,00000                 | 0,00000          |                      |                        |                         |
| <i>C. crassiphylla</i>   | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               | 0,00000                  | 0,00000             | 0,00000                 | 0,00000          | 0,00000              |                        |                         |
| <i>C. amplexicaulis</i>  | 0,00167       | 0,00167          | 0,00000               | 0,00000                  | 0,00000             | 0,00000                 | 0,00000          | 0,00000              | 0,00000                |                         |

### 3.3.2. Trình tự ADN đoạn *trnH-psbA* của Trà hoa vàng thu thập tại huyện Hải Hà của tỉnh Quảng Ninh

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn *trnH-psbA* được nhân bản có kích thước 510 bp. Kết quả giải trình tự đoạn *trnH-psbA* của mẫu Trà hoa vàng sau xử lý như sau:

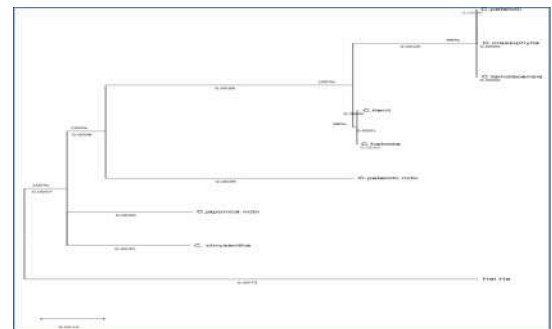
CGCGCATGGTGGATTACAAATCCACTGCCT  
TAATCCACTTGGCTACATCCGCCCTTACTCC  
ACTATTTAAATTATAAAATAAAGAATTCAAATTC  
AACCATTGATGATTATTTCTTTTTTTTTTTATTT  
TTGAGATACAAATAGTAAGCAAAAATTCAAAATT  
TTATCTTTTATTTTAAATGAAAATAACAATTC  
ACAAAGGTATATAAATTCTAAATTAATACATAAC  
AAAAAGACGATACTCAATGATGAACCAACCCAT  
AACCCATAAAAATCCTTTTCTTTTACCCATACG  
AATCTTTTCTTGTAACGAAAAAGGATATGTAA  
AAAAAAAAAAGTAAAGGAACAATAACGCCTTC  
CTGATAGAACAAGAAATTGGTTATTGCTCCTTT  
ACTTTTAAAAACGAGTATACACTAAGACCAAAG  
TCTTATCCATTTGTAGATGGAGCTTCAATAGCA  
GCTAGGTCTAGAGGAAAGTTATGAGCATTACGT  
TCATGCATAAC

Trình tự này được dùng để so sánh với các loài Trà hoa vàng khác ở Việt Nam (DNABank.vn) và trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng được lấy ở Hải Hà với các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng 3.

**Bảng 3. Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng ở Hải Hà với các loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA***

| TT | Tên loài               | Mã số      | Tỷ lệ tương đồng (%) |
|----|------------------------|------------|----------------------|
| 1  | <i>C. chrysantha</i>   | TCC0008    | 98,63                |
| 2  | <i>C. petelotii</i>    | TCP0003    | 98,63                |
| 3  | <i>C. tamdaoensis</i>  | TCT0009    | 97,45                |
| 4  | <i>C. hakoda</i>       | TCH0004    | 97,25                |
| 5  | <i>C. crassiphylla</i> | TCC0003    | 97,45                |
| 6  | <i>C. tienii</i>       | TCT0004    | 97,25                |
| 7  | <i>C. petelotii</i>    | KJ806276.1 | 98,83                |
| 8  | <i>C. japonica</i>     | MK353211.1 | 97,45                |

Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood để xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của các loài Trà hoa vàng như ở hình 3.



**Hình 3. Cây quan hệ di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA***

Sử dụng phần mềm Mega X đã xác định được ở Hải Hà với các loài Trà hoa vàng khác và được thể khoảng cách di truyền (*p-distance*) của Trà hoa vàng hiện ở bảng 4.

**Bảng 4. Khoảng cách di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA***

|                          | <i>Hai Ha</i> | <i>C. tienii</i> | <i>C. tamdaoensis</i> | <i>C. petelotii_ncbi</i> | <i>C. petelotii</i> | <i>C. japonica_ncbi</i> | <i>C. hakoda</i> | <i>C. crassiphylla</i> | <i>C. chrysantha</i> |
|--------------------------|---------------|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Hai Ha</i>            |               |                  |                       |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. tienii</i>         | 0,01208       |                  |                       |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. tamdaoensis</i>    | 0,01410       | 0,00202          |                       |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. petelotii_ncbi</i> | 0,01200       | 0,00807          | 0,00600               |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. petelotii</i>      | 0,01393       | 0,00200          | 0,00000               | 0,00594                  |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. japonica_ncbi</i>  | 0,01008       | 0,00601          | 0,00813               | 0,00605                  | 0,00805             |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. hakoda</i>         | 0,01191       | 0,00000          | 0,00199               | 0,00795                  | 0,00197             | 0,00601                 |                  |                        |                      |
| <i>C. crassiphylla</i>   | 0,01410       | 0,00202          | 0,00000               | 0,00600                  | 0,00000             | 0,00813                 | 0,00199          |                        |                      |
| <i>C. chrysantha</i>     | 0,00994       | 0,00602          | 0,00803               | 0,00598                  | 0,00794             | 0,00402                 | 0,00594          | 0,00803                |                      |

Căn cứ vào cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị *trnH-psbA* và khoảng cách di truyền của các loài cho thấy Trà hoa vàng lấy tại Hải Hà có quan hệ gần nhất với loài Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) với khoảng cách di truyền là 0,00994, hệ số Bootstrap (tần số xuất hiện của một nhóm trên số lần giản đồ được thiết lập nhằm kiểm tra tính chính xác và độ tin cậy cho từng nhánh trong cây tiến hóa) là 100% và có quan hệ xa với loài Trà hoa vàng (*C. tamdaoensis*, *C. crassiphylla*) với khoảng cách di truyền là 0,01410, hệ số Bootstrap là 99%.

### 3.3.3. Trình tự ADN đoạn *trnH-psbA* của Trà hoa vàng thu thập tại huyện Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn *trnH-psbA* được nhân bản có kích thước 510 bp. Kết quả giải trình tự đoạn *trnH-psbA* của mẫu Trà hoa vàng như sau:

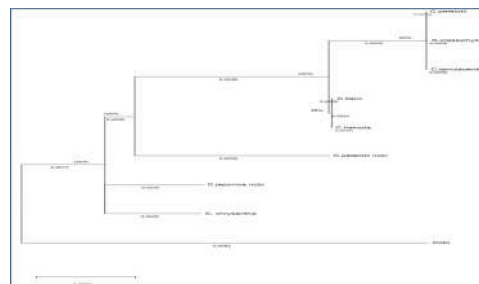
CGCGCATGGTGGATTACAAATCCACTGCCT  
TAATCCACTTGGCTACATCCGCCCTTACTCC  
ACTATTTAAATTATAAAATAAAGAATTCAAATTC  
AACCATTGATGATTATTTCTTTTTTTTTTTATTT  
TTGAGATACAAATAGTAAGCAAAAATTCAAAATT  
TTATCTTTTATTTTAAATGGAAAATAACAATTC  
ACAAAGGTATATAAATTTTAAATTAATACATAAC  
AAAAAGACGATACTCAATGATGAACCAACCCAT  
AACCCATAAAAATCCTTTTCTTTTACCCATACG  
AATCTTTTCTTTGTAACGAAAAAAGGATATGTAA  
AAAAAAGTAAAGGAACAATAACGCCTTC  
CTGATAGAACAAGAAATTGGTTATTGCTCCTTT  
ACTTTTAAACGAGTATACACTAAGACCAAAG  
TCTTATCCATTTGTAGATGGAGCTTCAATAGCA

GCTAGGTCTAGAGGAAAGTTATGAGCATTACGT  
TCATGCATAAC

Trình tự này được dùng để so sánh với các loài Trà hoa vàng khác ở Việt Nam (DNABank.vn) và trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng được lấy ở Cô Tô với các loài Trà hoa vàng khác được thể hiện ở bảng 5.

**Bảng 5. Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng ở Cô Tô với các loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA***

| TT | Tên loài               | Mã số      | Tỷ lệ tương đồng (%) |
|----|------------------------|------------|----------------------|
| 1  | <i>C. chrysantha</i>   | TCC0008    | 98,43                |
| 2  | <i>C. petelotii</i>    | TCP0003    | 98,43                |
| 3  | <i>C. tamdaoensis</i>  | TCT0009    | 97,25                |
| 4  | <i>C. hakoda</i>       | TCH0004    | 98,43                |
| 5  | <i>C. crassiphylla</i> | TCC0003    | 97,25                |
| 6  | <i>C. tienii</i>       | TCT0004    | 97,06                |
| 7  | <i>C. petelotii</i>    | KJ806276.1 | 98,43                |
| 8  | <i>C. japonica</i>     | MK353211.1 | 97,25                |



**Hình 4. Cây quan hệ di truyền của Trà hoa vàng ở Cô Tô với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA***

Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood để xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của một số loài Trà hoa vàng như ở hình 4.

Sử dụng phần mềm Mega X đã xác định được khoảng cách di truyền (*p-distance*) của loài Trà hoa vàng lấy tại Cô Tô với các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng 6.

**Bảng 6. Khoảng cách di truyền của Trà hoa vàng ở Cô Tô với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *trnH-psbA***

|                          | <i>Co To</i> | <i>C. tienii</i> | <i>C. tamdaoensis</i> | <i>C. petelotii_ncbi</i> | <i>C. petelotii</i> | <i>C. japonica_ncbi</i> | <i>C. hakoda</i> | <i>C. crassiphylla</i> | <i>C. chrysantha</i> |
|--------------------------|--------------|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| <i>Co To</i>             |              |                  |                       |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. tienii</i>         | 0,01413      |                  |                       |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. tamdaoensis</i>    | 0,01615      | 0,00202          |                       |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. petelotii_ncbi</i> | 0,01403      | 0,00807          | 0,00600               |                          |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. petelotii</i>      | 0,01596      | 0,00200          | 0,00000               | 0,00594                  |                     |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. japonica_ncbi</i>  | 0,01212      | 0,00602          | 0,00814               | 0,00606                  | 0,00806             |                         |                  |                        |                      |
| <i>C. hakoda</i>         | 0,01393      | 0,00000          | 0,00199               | 0,00796                  | 0,00197             | 0,00602                 |                  |                        |                      |
| <i>C. crassiphylla</i>   | 0,01615      | 0,00202          | 0,00000               | 0,00600                  | 0,00000             | 0,00814                 | 0,00199          |                        |                      |
| <i>C. chrysantha</i>     | 0,01195      | 0,00603          | 0,00804               | 0,00599                  | 0,00794             | 0,00402                 | 0,00594          | 0,00804                |                      |

Căn cứ vào cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị đoạn *trnH-psbA* và khoảng cách di truyền của các loài cho thấy, Trà hoa vàng lấy tại Cô Tô có quan hệ gần nhất với loài Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) với khoảng cách di truyền là 0,01195, hệ số Bootstrap là 100% và có quan hệ xa với loài Trà hoa vàng (*C. tamdaoensis*, *C. crassiphylla*) với khoảng cách di truyền là 0,01615, hệ số Bootstrap là 99%.

### 3.3.4. Trình tự ADN đoạn *ITS2* của Trà hoa vàng thu thập tại Hải Hà, Quảng Ninh

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn *ITS2* được nhân bản có kích thước 138 bp. Kết quả giải trình tự đoạn *ITS2* của mẫu Trà hoa vàng sau xử lý như sau:

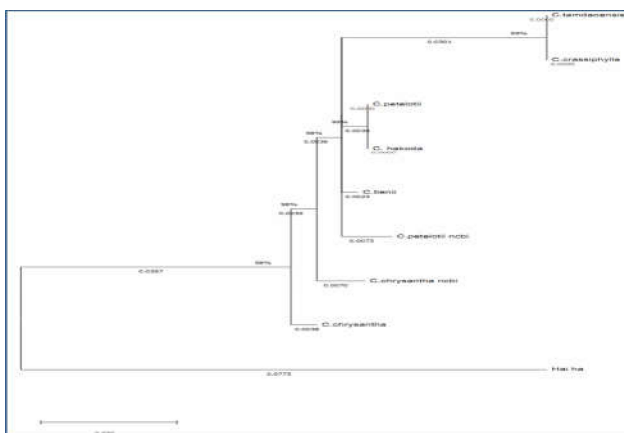
CGCGCGCACGCGGTTGGCCTAAAAATGAG  
TCCCCGCGACAGACGACGCGTCGCGACGAGTG  
GTGGTTGACAACTGTTGTGTGCGCTCGTGCGC  
GTCCAAGTCATCGCGGGAGGTCTGTTGTGACCC  
TATCGCGCC

Trình tự này được dùng để so sánh với các loài Trà hoa vàng khác ở Việt Nam (DNABank.vn) và trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng được lấy ở Hải Hà với các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng 7.

Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood để xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của các loài trà như ở hình 5.

**Bảng 7. Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng ở Hải Hà với các loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *ITS2***

| TT | Tên loài               | Mã số    | Tỷ lệ tương đồng (%) |
|----|------------------------|----------|----------------------|
| 1  | <i>C. chrysantha</i>   | TCC0008  | 89,13                |
| 2  | <i>C. petelotii</i>    | TCP0003  | 88,41                |
| 3  | <i>C. tamdaoensis</i>  | TCT0009  | 86,96                |
| 4  | <i>C. hakoda</i>       | TCH0004  | 88,41                |
| 5  | <i>C. crassiphylla</i> | TCC0003  | 88,41                |
| 6  | <i>C. tienii</i>       | TCT0004  | 88,41                |
| 7  | <i>C. chrysantha</i>   | FJ432140 | 88,41                |
| 8  | <i>C. petelotii</i>    | KU669160 | 88,49                |



**Hình 5. Cây quan hệ di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *ITS2***

Bằng phần mềm Mega X để tính khoảng cách các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng di truyền (*p-distance*) của loài trà lấy tại Hải Hà với 8.

**Bảng 8. Khoảng cách di truyền của Trà hoa vàng ở Hải Hà với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *ITS2***

|                           | <i>Hai Ha</i> | <i>C. tienii</i> | <i>C. tamdaoensis</i> | <i>C. petelotii_ncbi</i> | <i>C. petelotii</i> | <i>C. chrysantha_ncbi</i> | <i>C. chrysantha</i> | <i>C. crassiphylla</i> | <i>C. hakoda</i> |
|---------------------------|---------------|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|------------------------|------------------|
| <i>Hai Ha</i>             |               |                  |                       |                          |                     |                           |                      |                        |                  |
| <i>C. tienii</i>          | 0,12851       |                  |                       |                          |                     |                           |                      |                        |                  |
| <i>C. tamdaoensis</i>     | 0,14817       | 0,02986          |                       |                          |                     |                           |                      |                        |                  |
| <i>C. petelotii_ncbi</i>  | 0,11995       | 0,00728          | 0,02232               |                          |                     |                           |                      |                        |                  |
| <i>C. petelotii</i>       | 0,12851       | 0,00000          | 0,02986               | 0,00728                  |                     |                           |                      |                        |                  |
| <i>C. chrysantha_ncbi</i> | 0,12928       | 0,00734          | 0,02253               | 0,01475                  | 0,00734             |                           |                      |                        |                  |
| <i>C. chrysantha</i>      | 0,11939       | 0,00720          | 0,03765               | 0,01468                  | 0,00720             | 0,00734                   |                      |                        |                  |
| <i>C. crassiphylla</i>    | 0,14817       | 0,02986          | 0,00000               | 0,02232                  | 0,02986             | 0,02253                   | 0,03765              |                        |                  |
| <i>C. hakoda</i>          | 0,12851       | 0,00000          | 0,02986               | 0,00728                  | 0,00000             | 0,00734                   | 0,00720              | 0,02986                |                  |

Căn cứ vào cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị đoạn *ITS2* và khoảng cách di truyền của các loài cho thấy Trà hoa vàng lấy tại Hải Hà có quan hệ gần nhất với loài Trà hoa vàng (*Camellia chrysantha*) với khoảng cách di truyền là 0,11939, hệ số Bootstrap là 98% và có quan hệ xa với loài Trà hoa vàng (*C. tamdaoensis*, *C. crassiphylla*) với khoảng cách di truyền là 0,14817, hệ số Bootstrap là 99%.

### 3.3.5. Trình tự ADN đoạn gen *ITS2* của Trà hoa vàng thu thập tại Cô Tô, Quảng Ninh

**Bảng 9. Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng ở Cô Tô với các loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *ITS2***

| TT | Tên loài               | Mã số    | Tỷ lệ tương đồng (%) |
|----|------------------------|----------|----------------------|
| 1  | <i>C. chrysantha</i>   | TCC0008  | 89,29                |
| 2  | <i>C. petelotii</i>    | TCP0003  | 88,57                |
| 3  | <i>C. tamdaoensis</i>  | TCT0009  | 86,96                |
| 4  | <i>C. hakoda</i>       | TCH0004  | 88,57                |
| 5  | <i>C. crassiphylla</i> | TCC0003  | 86,96                |
| 6  | <i>C. tienii</i>       | TCT0004  | 88,57                |
| 7  | <i>C. chrysantha</i>   | FJ432140 | 88,41                |
| 8  | <i>C. petelotii</i>    | KU669160 | 88,49                |

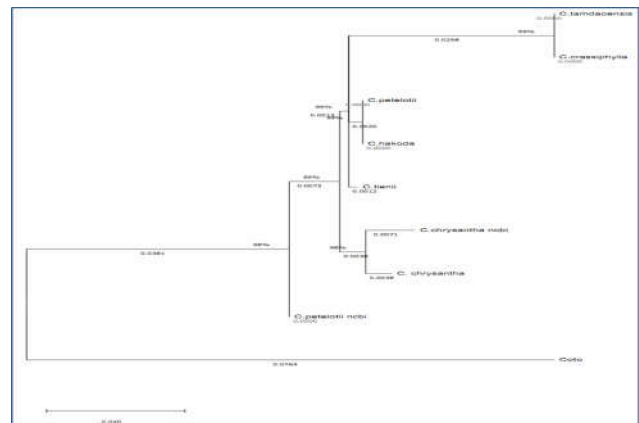
Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn *ITS2* được nhân bản có kích thước 138 bp. Kết quả giải trình tự đoạn *ITS2* của mẫu Trà hoa vàng sau xử lý như sau:

GCGCCCGCGCGCGGTTGGCCTAAAAATGAG  
TCCCCCGTGACAGACGACGCGTCGCGACGAGTG

GTGGTTGACAAACCGTTGTGTCGCGTCGCGCGC  
GTCCAAGTCATCGCGGGAGGTCTGTTGTGACCC  
TATCGCGCCGC

Trình tự này được dùng để so sánh với các loài Trà hoa vàng khác ở Việt Nam (DNABank.vn) và trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Tỷ lệ tương đồng của Trà hoa vàng được lấy ở Cô Tô với các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng 9.

Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood để xây dựng cây phát sinh chủng loại tìm ra mối quan hệ của các loài Trà hoa vàng như ở hình 6.



**Hình 6. Cây quan hệ di truyền của Trà hoa vàng ở Cô Tô với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *ITS2***

Bằng phần mềm Mega X tính được khoảng cách di truyền (*p-distance*) của loài Trà hoa vàng lấy tại Cô Tô với các loài Trà hoa vàng khác và được thể hiện ở bảng 10.

**Bảng 10. Khoảng cách di truyền của Trà hoa vàng ở Cô Tô với một số loài Trà hoa vàng khác dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn *ITS2***

|                           | <i>Co To</i> | <i>C. tienii</i> | <i>C. tamdaoensis</i> | <i>C. petelotii_ ncbi</i> | <i>C. petelotii</i> | <i>C. hakoda</i> | <i>C. chrysanth_ ncbi</i> | <i>C. crassiphylla</i> | <i>C. chrysanth</i> |
|---------------------------|--------------|------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|------------------|---------------------------|------------------------|---------------------|
| <i>Co To</i>              |              |                  |                       |                           |                     |                  |                           |                        |                     |
| <i>C. tienii</i>          | 0,12638      |                  |                       |                           |                     |                  |                           |                        |                     |
| <i>C. tamdaoensis</i>     | 0,16428      | 0,02959          |                       |                           |                     |                  |                           |                        |                     |
| <i>C. petelotii_ ncbi</i> | 0,11981      | 0,00728          | 0,02222               |                           |                     |                  |                           |                        |                     |
| <i>C. petelotii</i>       | 0,12638      | 0,00000          | 0,02959               | 0,00728                   |                     |                  |                           |                        |                     |
| <i>C. hakoda</i>          | 0,12638      | 0,00000          | 0,02959               | 0,00728                   | 0,00000             |                  |                           |                        |                     |
| <i>C. chrysanth_ ncbi</i> | 0,12931      | 0,00733          | 0,02239               | 0,01473                   | 0,00733             | 0,00733          |                           |                        |                     |
| <i>C. crassiphylla</i>    | 0,16428      | 0,02959          | 0,00000               | 0,02222                   | 0,02959             | 0,02959          | 0,02239                   |                        |                     |
| <i>C. chrysanth</i>       | 0,11775      | 0,00718          | 0,03720               | 0,01464                   | 0,00718             | 0,00718          | 0,00733                   | 0,03720                |                     |

Căn cứ vào cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị đoạn *ITS2* và khoảng cách di truyền của các loài cho thấy, Trà hoa vàng lấy tại Cô Tô có quan hệ gần nhất với loài Trà hoa vàng (*Camellia chrysanth*) với khoảng cách di truyền là 0,11775, hệ số Bootstrap là 98% và có quan hệ xa với loài Trà hoa vàng (*C. tamdaoensis*, *C. crassiphylla*) với khoảng cách di truyền là 0,16428, hệ số Bootstrap là 99%.

#### 4. KẾT LUẬN

Đã nhân bản thành công các đoạn *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* từ ADN tổng số của các mẫu Trà hoa vàng được thu thập tại huyện Hải Hà và Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xác định trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN cho thấy, đoạn *rbcl* có kích thước là 599 bp, đoạn *TrnH-psbA* có 510 bp và đoạn *ITS2* có 138 bp. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*) của Trà hoa vàng tại Quảng Ninh với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của một số loài Trà hoa vàng khác trên DNABank.vn đã chỉ ra: Trà hoa vàng ở Hải Hà và Cô Tô, Quảng Ninh có quan hệ gần nhất với loài *Camellia chrysanth* với các tỷ lệ tương đồng 99,83% (đoạn *rbcl*); 98,63% và 98,43% (đoạn *trnH-psbA*); 89,13% và 89,29% (đoạn *ITS2*). Như vậy, đoạn *ITS2* và *trnH-psbA* có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *rbcl* nên có thể sử dụng đoạn *ITS2* và *trnH-psbA* để định danh loài Trà hoa vàng ở huyện Hải Hà và Cô Tô của tỉnh Quảng Ninh.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này đã được sự trợ giúp về vật liệu, hóa chất và học thuật từ đề tài NAFOSTED mã số 106.06-2019.27 do TS. Lê Thọ Sơn, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

làm chủ nhiệm. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của TS. Lê Thọ Sơn đã tạo điều kiện để đề tài được hoàn thiện.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anders R. (2012). ADN barcoding as a tool for the identification of unknown plant material: A case study on medicinal roots traded in the medina of Marrakech. M. SC thesis, Uppsala University CBOL ABS Brochure.
- Alvarez I. W. J. F. (2003). Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and Evolution* 29: 417 - 434.
- Aron J. F, Kevin S. B, Prasad R. K, Kevin S. Burgess, Prasad R. Kesanakurti, Sean W. Graham, Steven G. Newmaster, Brian C. Husband, Diana M. Percy, Mehrdad Hajibabaei, Spencer C. H. Barrett. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*. 3 (7): e2802.
- Chase M. W, Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J. M., Kesanakurthi R. P., Haider N., Savolainen V. (2005). Land plants and DNA barcodes: Short - term and long - term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360:1889 - 1895.
- Chen S. Y. H, Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao X., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Leon C. (2010). Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcodes for identifying medicinal plant species. *Plos one* 5: e8613.
- Ford C. S, Ayres K. L, Toomey N., Haider N., Stahl J. V. A., Kelly L. J., Wikström N., Hollingsworth P. M., Duff R. J., Hoot S. B., Cowan R. S., Chase M. W., Wilkinson M. J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on DNA

- plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 159 (1): 1 - 11.
7. Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Waard (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313 - 321.
8. Ho CT, Lin JK, Shahidi F (2008). Tea and tea products: chemistry and health-promoting properties [nutraceutical science and technology]. Boca Raton, FL: CRC Press.
9. Kress J. W, Wurdack K. J, Zimmer E. A, Weigt L. A, Janzen D. H. (2005). Use of ADN barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (23): 8369 - 8374.
10. Von Cräutlein M. Pietiläinen M., Korpelainen H., Rikkinen J. (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and conservation* 20: 373 - 389.
11. Yang C. S, Landau J. M (2000). Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr* 2000, 130: 240.

## THE SCREENING AND IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCES FOR *Camellia* sp. AT QUANG NINH TO IDENTIFY PLANT SPECIES

Bui Thi Mai Huong<sup>1</sup>, Nguyen Van Viet<sup>1</sup>,

Ha Van Huan<sup>1</sup>, Le Tho Son<sup>1</sup>, Nguyen Thi Hong Gam<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vietnam National University of Forestry

### Summary

*Camellia* sp. is a species of high economic value with ornamental plant and medicinal plant. Nowadays, these species are being exploited quite a lot. *Camellia* sp. at Quang Ninh have special flower shape and special flower colours compared to another areas. However, it is very hard for the farmer in identifying this species by observation. Therefore, this study aimed to develop a new method using DNA barcode fragments to identify *Camellia* sp. The total genomic DNA was extracted from leaf tissue of *Camellia* sp.. The DNA barcodes (*rbcl*, *TrnH-psbA* and *ITS2*) were amplified from total DNA of *Camellia* sp. by PCR technique. The PCR results indicated that all DNA bands have the size similar to the theoretical size of *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*. Results nucleotide sequencing of PCR product samples showed that the size of the isolated *rbcl* fragment is 599 nucleotide, *trnH-psbA* fragment is 510 nucleotide and *ITS2* fragment is 138 nucleotide. These sequences were analysed by Maximum Likelihood (ML) methods and Mega X, NCBI we found that: *Camellia* sp. is *Camellia chrysantha* with percent identity 99.83% of *rbcl*, 98.63% and 98.43% of *TrnH-psbA* gene fragment and 89.13% and 89.29% of *ITS2* gene fragment for *Camellia* sp. at Hai Ha and Co To, respectively. It is the best for using *TrnH-psbA* and *ITS2* molecular marker as DNA barcode to identify *Camellia chrysantha* in Vietnam. These results are the scientific basis for the conservation, exploitation and development of the genetic resources of this species.

**Keywords:** *Camellia chrysantha*, DNA barcoding, Identify species, polymerase chain reaction.

**Người phản biện:** TS. Trần Hồ Quang

**Ngày nhận bài:** 26/11/2021

**Ngày thông qua phản biện:** 28/12/2021

**Ngày duyệt đăng:** 4/01/2022