

Xác định đặc điểm vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* của phân loài Vân sam Phan Xi Păng (*Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* (Q.P. Xiang) Rurhforth) ở Việt Nam

Nguyễn Hùng Mạnh^{1,2}, Lại Thị Thu Hằng³, Nguyễn Thị Hồng Mai¹,
Nguyễn Thị Phương Trang^{1,2*}, Nguyễn Văn Sinh^{1,2}

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Viện Môi trường Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 28/7/2020; ngày chuyển phản biện 3/8/2020; ngày nhận phản biện 4/9/2020; ngày chấp nhận đăng 20/10/2020

Tóm tắt:

Vân sam Phan Xi Păng (*Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* (Q.P. Xiang) Rurhforth) là loài thực vật bản địa thường phân bố ở độ cao từ 2.400 m so với mực nước biển. Đây là loài nằm trong danh lục các loài thực vật nguy cấp cần được bảo vệ và bị cấm khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại. Quần thể Vân sam của Việt Nam tập trung duy nhất ở một vùng núi thuộc đỉnh Phan Xi Păng với đường kính quần thể khoảng 3 km, ở độ cao 2.600-2.950 m, cách xa quần thể Vân sam ở Cang Shan, Trung Quốc khoảng 500 km. Trong nghiên cứu này, nhằm tìm hiểu rõ hơn về sự sai khác di truyền giữa loài Vân sam phân bố ở Phan Xi Păng Việt Nam với loài Vân sam phân bố tại Trung Quốc, các tác giả đã tiến hành đọc trình tự 2 vùng gen lục lạp gồm *rbcL* và *trnH-psbA* và so sánh với loài Vân sam của Trung Quốc. Kết quả cho thấy, phân loài Vân sam Phan Xi Păng của Việt Nam có một vị trí Nucleotide sai khác so với loài *Abies nukiangensis* của Trung Quốc ở vị trí số 455 trên vùng gen *rbcL* và 2 vị trí Nucleotide sai khác trên vùng gen *trnH-psbA* ở vị trí số 332 và 503. Trình tự hai vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* của loài Vân sam Phan Xi Păng của Việt Nam đã được đăng ký lên Ngân hàng gen thế giới (GenBank) với mã số truy cập là MK783132 và MK783131.

Từ khóa: *Abies delavayi*, *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis*, DNA chloroplast, *rbcL*, *trnH-psbA*, Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 1.6

Mở đầu

Chi Vân sam (*Abies*) có khoảng 48 loài, là một trong những chi có số lượng loài lớn nhất so với các chi khác trong họ Thông (*Pinaceae*) [1]. Chi này được ghi nhận và đặt tên bởi nhà khoa học Miller vào năm 1754 [2]. *Abies* phân bố rải rác ở Trung và Bắc Mỹ, châu Âu, Bắc Phi, châu Á (phía nam dãy Himalaya, phía nam Trung Quốc) [3]. Hầu hết các nghiên cứu về chi này trên thế giới đều chỉ ra rằng đây là những loài thực vật ngoài có giá trị kinh tế cao, còn có vai trò quan trọng trong các hệ sinh thái á nhiệt đới, ôn đới, một trong những vùng đầu nguồn đặc biệt nhạy cảm [1-6].

Theo Danh lục đỏ của IUCN (ver. 2013.1) [7] về các loài bị đe dọa toàn cầu, Vân sam Phan Xi Păng (*Abies delavayi* subsp. *fansipanensis*) được xếp vào mức độ đe dọa rất nguy cấp, còn theo Sách đỏ Việt Nam xuất bản năm 2007 thì chúng được xếp ở mức sẽ nguy cấp (VU) [8]. Từ năm 2006 đến nay, Vân sam Phan Xi Păng luôn được xếp vào nhóm IA là nhóm cấm khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại [9, 10].

Phân loài Vân sam ở Việt Nam được ghi nhận và mô tả bởi Frajon và Siba năm 1990 [2] với tên khoa học *Abies delavayi* var. *nukiangensis* auct.non (W.C. Cheng & L.K. Fu) Frajon & Siba, sau đó được nhà khoa học Trung Quốc Q.P. Xiang đặt lại tên khoa học là *Abies fansipanensis* Q.P. Xiang [11]; đến năm 1999, loài này được Rushforth mô tả và đặt lại tên là *Abies delavayi* subsp. *fansipanensi* (Q.P. Xiang) Rushforth. Tuy nhiên, các tác giả này mới chỉ dừng lại ở phương pháp định loại chủ yếu dựa trên quan điểm hình thái mà chưa đi sâu phân tích đặc điểm di truyền của loài. Theo Keith Rushforth [1], về mặt hình thái (màu sắc của nón cái, cụ thể màu sắc của nón cái phân loài Vân sam Phan Xi Păng có màu tím nhạt hơn màu của *A. nukiangensis*), loài này có sự khác biệt với loài Vân sam ở Trung Quốc nên đề loài Vân sam Phan Xi Păng là bậc dưới loài (tức là loài đặc hữu Hoàng Liên). Vấn đề này còn nhiều tranh cãi do chưa có thông tin về đặc điểm di truyền (gen) của loài Vân sam Phan Xi Păng để khẳng định nó là *Abies delavayi* Franch. hay là *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* (Q.P. Xiang) Rushforth [5].

Trong vài năm trở lại đây, phân loại học dựa trên các chi

*Tác giả liên hệ: Email: nprang@gmail.com

Molecular characteristic of *rbcL* and *trnH-psbA* of *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* (Xiang Q.P.) Rurhforth in Vietnam

Hung Manh Nguyen^{1,2}, Thi Thu Hang Lai³,
Thi Hong Mai Nguyen¹, Thi Phuong Trang Nguyen^{1,2*},
Van Sinh Nguyen^{1,2}

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Institute for Agricultural Environment, VAAS

Received 28 July 2020; accepted 20 October 2020

Abstract:

Abies delavayi subsp. *fansipanensis* (Xiang Q.P.) Rurhforth) or *Abies delavayi* var. *nukiangensis* auct. non is a native plant, distributes at altitudes about 2,400 m above sea level. This plant belongs to the Pinaceae family and is listed in endangered, precious and rare species banned from commercial exploitation. The *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* population in Vietnam only concentrates in a mountainous area at the peak of Fansipan with a population diameter of about 3 km at an altitude of 2,600 to 2,950 m, and is about 500 km far from the *Abies delavayi* population in Cang Shan (China). In this study, the author sequenced the region of the *rbcL* and *trnH-psbA* of *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* in Vietnam, compared with the *Abies delavayi* of China to better understand the genetic characteristics of *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* in Vietnam. The results showed that the *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* in Vietnam has a different nucleotide position compared to the Chinese *Abies nukiangensis* at nucleotide no. 455 on the *rbcL* gene region and two other nucleotide positions in the *trnH-psbA* genome at positions 332 and 503. The sequences of the *rbcL* and *trnH-psbA* gene regions of *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis* from Vietnam were registered into the GenBank with the accession number MK783132 and MK783131, respectively.

Keywords: *Abies delavayi*, *Abies delavayi* subsp. *fansipanensis*, DNA chloroplast, *rbcL*, *trnH-psbA*, Vietnam.

Classification number: 1.6

thị phân tử được phát triển mạnh mẽ bởi các phân tích ADN cho phép thực hiện được ngay cả trên các mẫu vật không còn nguyên vẹn, đặc biệt không bị ảnh hưởng bởi bất cứ yếu tố khách quan nào. Hiện nay, phân tích ADN được coi là phương pháp quan trọng, tin cậy trong các nghiên cứu về phân loại học, đặc biệt trong công tác giám định pháp y.

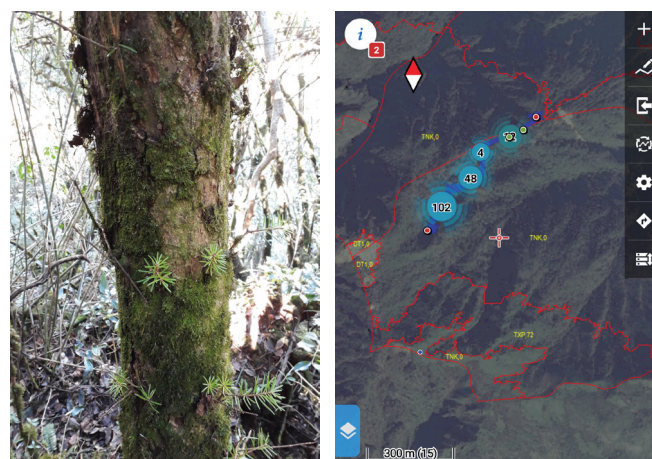
Ở thực vật, với lợi thế là có kích thước nhỏ, số lượng bản sao lớn và di truyền ổn định qua các thế hệ nên các gen trong hệ gen lục lạp thường được sử dụng như những chỉ thị phân tử trong các nghiên cứu về phân loại. Tuy nhiên, với mỗi nhóm thực vật khác nhau thì khả năng phân loại chính xác của các chỉ thị phân tử là khác nhau, do vậy việc sử dụng kết hợp nhiều chỉ thị phân tử đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu. Trong một nghiên cứu về các loài thực vật ở cận đẳng trên Tạp chí PNAS năm 2009, Hiệp hội nghiên cứu mã vạch sự sống (The Consortium for the Barcode of Life - CBOL) đã chứng minh 4 vùng gen mã hoá gồm *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1* và 3 vùng gen không mã hoá trong hệ gen lục lạp là *atpF-atpH*, *trnH-psbA*, *psbK-psbI* là những chỉ thị phân tử hữu hiệu trong các nghiên cứu về phân loại ở thực vật trên cạn, đặc biệt sự kết hợp giữa các vùng gen này sẽ cho kết quả đáng tin cậy cao hơn [12].

Trong nghiên cứu này, để tìm hiểu rõ hơn về sự sai khác ở cấp độ phân tử giữa loài Vân sam phân bố ở Việt Nam với loài Vân sam Trung Quốc, chúng tôi đã thực hiện giải mã trình tự hai vùng gen lục lạp gồm *rbcL* và *trnH-psbA*. Đây là 2 vùng gen mã vạch (barcoding) phổ biến nhất thường được lựa chọn sử dụng trong các nghiên cứu về phân loại/ giám định loài thực vật.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu lá của một cây Vân sam Phan Xi Păng cao 12 m, đường kính 38 cm, được thu tại độ cao 2.636 m (N: 22°18,554', E: 103°46.743), ký hiệu mẫu: A70 (hình 1).



Hình 1. Hình ảnh cây Vân sam Phan Xi Păng được thu mẫu và vị trí tọa độ của mẫu thu (nguồn: Nguyễn Hùng Mạnh, 2019).

Mẫu thu được bảo quản trong silicagen và lưu giữ tại Phòng Hệ thống học phân tử và di truyền bảo tồn, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật để phục vụ cho phân tích ADN.

Phương pháp

Tách chiết ADN tổng số: mẫu lá được tách chiết bằng CTAB theo quy trình của J.J. Doyle và D.J. Doyle (1987) [13] (có cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm). Kiểm tra độ sạch và nồng độ ADN bằng đo quang phổ trên máy NanoDrop One. ADN tổng số sau đó được pha loãng đạt nồng độ 10 ng/μl để dùng cho phản ứng khuếch đại gen (PCR).

Trình tự các cặp mồi dùng cho khuếch đại vùng gen *trnH-psbA* và *rbcL* được tổng hợp dựa theo các kết quả nghiên cứu của Kress và cs (2005) [14] và Hasebe và cs (1994) [15] (bảng 1).

Bảng 1. Thông tin các cặp mồi sử dụng.

Tên vùng gen	Mồi xuôi	Mồi ngược	Nhiệt độ bắt cặp mồi	Chiều dài vùng gen	Tham khảo
<i>trnH-psbA</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	50	600	[12]
<i>rbcL</i>	TCTAGCACACGAA AGTCGAAGT	CTTCGGCACAAAA TACGAAACG ATCT CTCCA	56	700	[15]

Nhân bản vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* bằng phản ứng PCR: phản ứng nhân gen được thực hiện trong tổng thể tích là 50 μl với các thành phần gồm: 32 μl H₂O, 5 μl đệm, 5 μl dNTP, 3 μl mồi xuôi F (30 pM), 3 μl mồi ngược R (30 pM), 1 μl ADN tổng số, 1 μl enzyme Taq polymerase. Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy PCR system 9700 với các chu kỳ gồm: biến tính ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ lặp lại với mỗi chu kỳ cụ thể như sau: biến tính ở 95°C 30 giây; bắt cặp ở 50°C (đối với gen *trnH-psbA*) và 56°C (đối với gen *rbcL*) trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút, cuối cùng kết thúc phản ứng ở 72°C trong 5 phút để kết thúc phản ứng và bảo quản mẫu ở 4°C.

Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (có chứa gel red), soi gel trên đèn chiếu ánh sáng UV.

Giải mã trình tự gen và xử lý số liệu: sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Sephadex G50 (Sigma). Phản ứng giải mã trình tự nucleotide được thực hiện với bộ kit BigDye terminator v3.1 trên máy đọc trình tự ABI 3100 Avant genetic analyzer (Applied Biosystems).

Sử dụng công cụ BLAST để kiểm tra tính chính xác của vùng gen được khuếch đại bằng cách xác định các trình tự tương đồng với trình tự này trong cơ sở dữ liệu trên GenBank.

Kết quả sau đó được so sánh với trình tự của một số loài *Abies* khác trên GenBank (bảng 2). Loài Thông kim tiền (*Pseudolarix amabilis* - MH749294.1) được sử dụng làm loài ngoài nhóm.

Bảng 2. Danh sách các loài trên GenBank được dùng để so sánh.

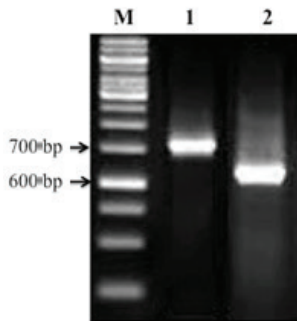
TT	Danh sách	GenBank Code	
		<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
1	<i>Abies delavayi</i>	JF940551.1	JN043652.2
2	<i>Abies squamata</i>	JF940610.1	JN043711.2
3	<i>Abies nukiangensis</i>	JF940536.1	JN043711.2
4	<i>Abies forrestii</i>	JF940579.1	
5	<i>Abies holophylla</i>	JQ512508.1	JQ512263.1
6	<i>Abies densa</i>	JF940556.1	
7	<i>Abies spectabilis</i>	MF786477.1	HQ833523.1
8	<i>Abies firma</i>	JQ512506.1	
9	<i>Abies veichii</i>	JN935621.1	
10	<i>Abies pinsapo</i>	FR831932.1	
11	<i>Abies recurvata</i>	HQ833560.1	HQ833516.1
12	<i>Abies alba</i>	FR832521.2	FR832521.2
13	<i>Abies nephrolepis</i>	JF940596.1	
14	<i>Abies homolepis</i>	AB015648.1	
15	<i>Abies cilicica</i>	MH069637.1	
16	<i>Abies balsamea</i>	JN935605.1	
17	<i>Abies bracteata</i>	AB029647.1	
18	<i>Abies magnifica</i>	EU331927.1	
19	<i>Abies hidalgensis</i>	EU269028.1	
20	<i>Abies grandis</i>	AB029646.1	
21	<i>Abies fabri</i>		JN043666.2
22	<i>Abies fargesii</i>		JN043671.2
23	<i>Abies beshanzuensis</i>		JN043643.2
24	<i>Abies ferreana</i>		JN043675.2
25	<i>Abies nebrodensis</i>		FR832517.2
26	<i>Abies fanjingshanensis</i>		JN043641.2
27	<i>Abies chensiensis</i>		JN043646.2

Phần mềm ClustalW [16], GenDoc và MEGA5.2 [17] được dùng để phân tích dẫn liệu, bằng khoảng cách di truyền được thiết lập theo phương pháp tối giản (Maximum Parsimony), mức độ khác biệt di truyền được tính toán theo mô hình Kimura hai tham số. Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap) trong cây ML (MLBS) và BI (BPP). Ngoài ra, các nút trong cây ML được đánh giá với giá trị bootstrap 75% trở lên và các nút có BPP 95% trở lên có ý nghĩa trong phân tích BI. Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi được tính toán bằng Mega 7.0.

Kết quả và thảo luận

Tách chiết DNA tổng số: ADN tổng số của mẫu nghiên cứu được tách chiết thành công với kết quả đo OD260/OD280 = 1,81, chứng tỏ hàm lượng DNA thu được có độ tinh khiết cao.

Nhân bản gen bằng PCR: kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy, các mẫu PCR lên vạch có kích thước 600 và 700 bp tương ứng với kích thước gen *trnH-psbA* và *rbcL* như dự kiến (hình 2).



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%. Lane M: ADN ladder 1 kb; Lane 1: sản phẩm PCR gen *rbcL*; Lane 2: sản phẩm PCR gen *trnH-psbA*.

Sản phẩm PCR được thực hiện đọc trình tự 2 chiều. Kết quả giải trình tự hai chiều nhận được của mỗi đoạn gen sau đó được ghép nối với nhau để thu về một trình tự duy nhất bằng phần mềm Chromas Pro. Trình tự thu được sau hiệu chỉnh ở định dạng file fasta (.fas) được kiểm tra bằng công cụ BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) để so sánh với các trình tự sẵn có trên GenBank. Kết quả phân tích trình tự trên phần mềm Chromas Pro cho thấy đã giải mã tốt được đoạn gen có chiều dài 700 bp cho vùng gen *rbcL* và đoạn gen dài 600 bp cho gen *trnH-psbA*.

Kết quả phân tích lần lượt 2 vùng gen này bằng phần mềm ClustalW và so sánh với các loài *Abies* khác (bảng 2) cho thấy, đoạn gen *rbcL* dài 700 bp của phân loài Vân sam Phan

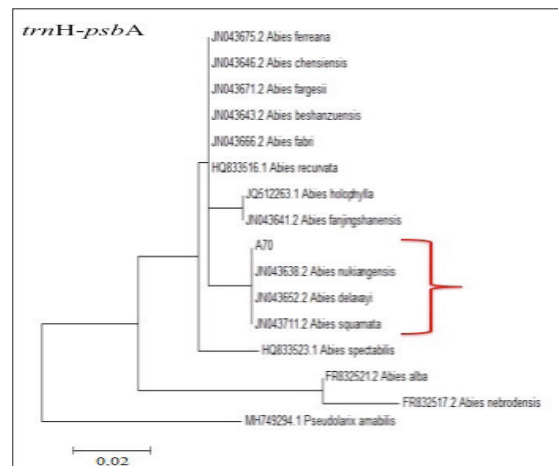
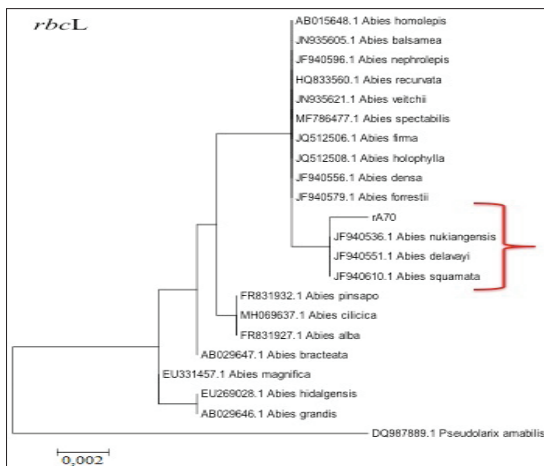
Xi Păng thu tại Việt Nam mã hoá được cho 226 acid amin, trong đó tỷ lệ Guanine (G) chiếm 23,9%, Thymine (T) chiếm 28,5%, Adenine (A) chiếm 27% và Cytosine (C) chiếm 20,6%. Phát hiện một vị trí Nucleotide sai khác ở vị trí số 455(T->G) so với mẫu *Abies nukiangensis* của Trung Quốc.

Đối với đoạn gen *trnH-psbA* dài 600 bp của phân loài Vân sam Phan Xi Păng thu tại Việt Nam, sau khi hiệu chỉnh và cắt ghép, một đoạn gen dài 568 bp được thu nhận và dùng để phân tích. Kết quả phân tích cho thấy, đoạn gen *trnH-psbA* dài 568 bp đã mã hoá cho 176 acid amin, trong đó tỷ lệ G, T, A và C lần lượt là 21, 31,7, 28,3 và 19%. Phát hiện được 2 Nucleotide sai khác ở vị trí số 332 và 503 (C->A) so với mẫu *A. nukiangensis* của Trung Quốc (hình 3). Tuy nhiên, cả 2 vị trí Nucleotide sai khác này đều không mang ý nghĩa Parsimony.

<i>rbcL</i>		<i>trnH-psbA</i>	
	22466)		113334 45)
	519512)		238453795 80)
	477592)		9088912375 53)
#xA70	GGCGAA	[
#JF940536.1_Abies_nukiangensis	...T..	#A70	CCCTGGCCAC GC
#JF940551.1_Abies_delavayi	...T..	#JN043638.2_Abies_nukiangensisA...A
#JF940579.1_Abies_forrestii	C..T..	#JN043652.2_Abies_delavayiA...A
#JF940610.1_Abies_squamata	...T..	#JN043711.2_Abies_squamataA...A
#JF940556.1_Abies_densa	C..T..	#JQ512263.1_Abies_holophyllaC.A...T.A
#JQ512508.1_Abies_holophylla	C..T..	#HQ833516.1_Abies_recurvataC.A...A
#JQ512506.1_Abies_firma	C..T..	#HQ833523.1_Abies_spectabilisC.A.T...A
#MF786477.1_Abies_spectabilis	C..T..	#JN043666.2_Abies_fabriC.A...A
#JN935621.1_Abies_veitchii	C..T..	#JN043643.2_Abies_beshanzuensisC.A...A
#FR831932.1_Abies_pinsapo	CC.T.C	#JN043671.2_Abies_fargesiiC.A...A
#HQ833560.1_Abies_recurvata	C..T..	#JN043675.2_Abies_ferreaanaC.A...A
#JF940596.1_Abies_nephrolepis	C..T..	#FR832521.2_Abies_alba	...T.CT.A.G.A.
#AB015648.1_Abies_homolepis	C..T..	#FR832517.2_Abies_nebrodensis	TTT.CT.A.G.A.
#MH069637.1_Abies_cilicica	CC.T.C	#JN043641.2_Abies_fanjingshanensisC.A...T.A
#JN935605.1_Abies_balsamea	C..T..	#JN043646.2_Abies_chensiensis	...GC.A...A
#AB029647.1_Abies_bracteata	CC.T.T		
#FR831927.1_Abies_alba	CC.T.C		
#EU331457.1_Abies_magnifica	CC.TCT		
#EU269028.1_Abies_hidalgensis	CC.TCT		
#AB029646.1_Abies_grandis	CC.TCT		

Hình 3. Vị trí các Nucleotide sai khác trên vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA*.

Kết quả phân tích quan hệ di truyền cho thấy, mẫu nghiên cứu có mối quan hệ gần gũi nhất với nhóm gồm *A. delavayi*, *A. nukiangensis* và *A. Squamata* (hình 4). Trong đó, mẫu nghiên cứu có khoảng cách di truyền so với *A. nukiangensis* và *A. delavayi* đều là 0,001, khoảng cách di truyền so với *A. squamata* là 0,014.



Hình 4. Sơ đồ quan hệ di truyền của mẫu nghiên cứu (A70) với một số loài Vân sam khác dựa trên phân tích trình tự gen *rbcL* và *trnH-psbA*.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã giải mã thành công trình tự 2 vùng gen lục lạp gồm *rbcL* và *trnH-psbA* của mẫu phân loài Vân sam Phan Xi Păng thu tại Việt Nam. Kết quả so sánh trình tự vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* với mẫu *A. nukiangensis* thu tại Trung Quốc cho thấy, mẫu phân loài Vân sam Phan Xi Păng có một vị trí Nucleotide sai khác trên trình tự vùng gen *rbcL* và 2 vị trí Nucleotide sai khác trên trình tự vùng gen *trnH-psbA*. Về mặt hình thái, theo nghiên cứu của Keith Rushforth thì loài này có sự khác biệt với *A. nukiangensis* ở màu sắc của nón, cụ thể là nón của Vân sam Phan Xi Păng có màu tím nhạt hơn.

Các nghiên cứu về Vân sam từ trước đến nay đều cho rằng phân loài Vân sam tại đỉnh Phan Xi Păng chính là loài Vân sam *A. nukiangensis* của Trung Quốc. Việc phát hiện ra 3 vị trí Nucleotide sai khác trên 2 vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* của mẫu Vân sam thu tại Phan Xi Păng có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định lại vị trí phân loại của phân loài Vân sam ở đây. Tuy nhiên, để khẳng định các Nucleotide sai khác trên vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* là các sai khác mang ý nghĩa di truyền hay chỉ là các sai khác do khoảng cách địa lý thì cần tiến hành phân tích và so sánh đặc điểm di truyền trên số lượng mẫu thu nhiều hơn.

Trình tự hai vùng gen *rbcL* và *trnH-psbA* của phân loài Vân sam Phan Xi Păng ở Việt Nam đã được đăng ký lên GenBank với mã số truy cập lần lượt là MK783132 và MK783131.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện thông qua đề tài cấp Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam (mã số VAST04.04/20-21). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Q.P. Xiang, et al. (2009), "Phylogeny of *Abies* (*Pinaceae*) inferred from nrITS sequence data", *Taxon*, **58**(1), pp.141-152.

[2] A. Farjon (1990), "*Pinaceae*: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein", *Edinburgh Journal of Botany*, **50**, pp.121-122.

[3] S.A. Semerikova, V.L. Semerikov (2014), "Molecular phylogenetic analysis of the genus *Abies* (*Pinaceae*) based on the

nucleotide sequence of chloroplast DNA", *Russian Journal of Genetics*, **50**, pp.12-25.

[4] <http://www.conifers.org/pi/Abies.php>.

[5] Nguyễn Tiến Hiệp và cs (2004), *Hiện trạng bảo tồn các loài Thông Việt Nam*, Báo cáo dự án Fauna and Flora International Vietnam Programme.

[6] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942214002234>.

[7] IUCN (2013), *Red List of Threatened Species*, World Conservation Press.

[8] Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam (Phần thực vật)*, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.

[9] Chính phủ (2006), *Nghị định số 32/2006/NĐ-CP ngày 30/3/2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý hiếm*.

[10] Chính phủ (2019), *Nghị định 06/2019/NĐ-CP ngày 22/1/2019 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp*.

[11] Q.P. Xiang (1997), "*Abies fansipanensis* - A new species of the genus *Abies* from Vietnam", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, **35**(4), pp.356-359.

[12] CBOL Plant Working Group (2009), "A DNA barcode for land plants", *PNAS*, **106**(31), pp.12794-12797.

[13] J.J. Doyle, D.J. Doyle (1987), "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochemistry Bulletin*, **19**, pp.11-15.

[14] J.W. Kress, et al. (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, pp.8369-8374.

[15] M. Hasebe, et al. (1994), "*rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns", *PNAS*, **91**(12), pp.5730-5734.

[16] J.D. Thompson, et al. (1994), "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Research*, **22**, pp.4673-4680.

[17] K. Tamura, et al. (2011), "MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method", *Molecular Biology and Evolution*, **28**, pp.2731-2739.