ĐỊNH DANH CÁC MẪU SÂM ĐẤT BẰNG MÃ VẠCH DNA

Nguyễn Kiều Linh[1], Nguyễn Thị Hạnh[2], Nguyễn Thị Ngọc Lan[3], Chu Hoàng Mậu[3*]
[1]Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang, [2]Sở Giáo dục và Đào tạo Thanh Hóa,
[3]Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Cây Sâm đất (*Talinum paniculatum* Gaertn.*)* là loại thảo dược trong danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam. Cây Sâm đất chứa các chất có hoạt tính dược học như phitosterol, saponin, flavonoid, tanin, steroid... được sử dụng trong điều trị, làm hạ cholesterol máu. Khi Sâm đất bị biến dạng hay đã xử lý hoặc qua sơ chế thì dựa vào hình thái học gặp nhiều trở ngại hoặc dễ bị nhầm lẫn, do vậy sử dụng mã vạch DNA làm chỉ thị để định danh loài sẽ chính xác và nhanh chóng có kết quả. Kết quả phân tích đặc điểm hình thái kết hợp với mã vạch DNA *rpoC1* cho phép chúng tôi xác định được các mẫu Sâm đất thu tại thu tại Bỉm Sơn và Quan Hóa, Thanh Hóa thuộc loài *Talinum paniculatum.*

Từ khóa: *chỉ thị rpoC1, cây dược liệu, Sâm đất (Talinum paniculatum), định danh loài, mã vạch DNA*

MỞ ĐẦU

Cây Sâm đất (*Talinum paniculatum* Gaertn*)* còn gọi là đông dương sâm, sâm thảo, giả nhân sâm, thuộc chi *Talinum* thuộc họ Rau sam (Portulacaceae), đây là loại cây thân thảo có giá trị dược liệu cao thuộc trong danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam trong cẩm nang cây thuốc cần được bảo vệ của Nguyễn Tập (2007) [3] với cấp độ là VU A1a,c,d. Sâm đất có các chất như phitosterol, saponin, flavonoid, tanin, steroid và các ion khoáng K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} [4]. Các dược chất trong Sâm đất có tác dụng chống virus gây bệnh herpes, các viêm nhiễm ngoài da, hỗ trợ chữa bệnh parkinson, bệnh tim và làm hạ cholesterol máu, chữa suy nhược ốm yếu...

Hiện nay, việc kiểm nghiệm cây dược liệu chủ yếu sử dụng các phương pháp phân tích hình thái bằng cảm quan hoặc quan sát tiêu bản hiển vi. Tuy nhiên, khi dược liệu bị biến dạng hay đã xử lý hoặc qua sơ chế thì cách nhận biết theo phương pháp hình thái học gặp nhiều trở ngại hoặc dễ bị nhầm lẫn. Theo Paul Hebert (2003) [6] mã vạch DNA là chỉ thị sử dụng cho việc định danh loài. Taberlet và cs (2007) [10] cho rằng, hệ thống mã vạch ADN lý tưởng phải đáp ứng các yêu cầu là:

(i) Đoạn ADN chỉ thị phải đủ độ biến thiên để phân biệt giữa các loài nhưng cũng phải không khác nhau quá mức giữa các cá thể trong cùng loài; (ii) Hệ thống định danh bằng ADN phải được chuẩn hóa, với cùng một vùng ADN có thể được sử dụng cho các nhóm phân loại khác nhau; (iii) Đoạn ADN chỉ thị cần chứa đủ thông tin phát sinh loài để có thể dễ dàng định danh loài vào các nhóm phân loại; (iv) Có khả năng áp dụng với các mẫu vật thô, với vị trí cặp mồi nhân gen có độ bảo thủ cao, dễ dàng thực hiện phản ứng khuếch đại và đọc trình tự ADN. Hiện nay, người ta đã sử dụng một số chỉ thị DNA làm mã vạch để nhận biết các loài thực vật bậc cao như vùng *ITS* thuộc hệ gen nhân, các gen thuộc hệ gen lục lạp như *matK, rpoC1, rpoB*,...[11]. Hệ gen lục lạp của thực vật đã được phát hiện có các gen rpoA, rpoB và rpoC, mã hóa các protein tương ứng với các tiểu đơn vị α, β và β' của RNA polymerase. Gen *rpoC1* cấu trúc vòng kép, bền vững, kích thước trung bình khoảng từ 500 bp đến 600 bp, mã hóa tiểu đơn vị β của RNA polymerase [5], [10]. Lee và cs (2012) [8] đã sử dụng đoạn gen *rpoC1* để xác định cây Sâm Hàn Quốc. Trong công trình này chúng tôi trình bày kết quả sử dụng đoạn gen *rpoC1* làm mã vạch DNA trong xác định loài Sâm đất (*Talinum paniculatum).*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu Sâm đất (*Talinum paniculatum*) thu thập tại Bỉm Sơn và Quan Hóa, Thanh Hóa được sử dụng để phân tích hình thái và mã vạch DNA.

* *Tel: 0913 383289, Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn*

Xác định cây Sâm đất (*Talinum paniculatum*) theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [2] và Nguyễn Tiến Bân (2013) [1]. DNA tổng số tách từ lá non cây Sâm đất theo phương pháp của Saghai-Maroof (1984) [9]. Khuếch đại đoạn gen *rpoC1* từ DNA bằng PCR với cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R* được tổng hợp theo Kress et al. (2005) [7]; trình tự nucleotide của cặp mồi là:

rpoC1-F:

5' GTGGATACACTTCTTGATAATGG 3'

rpoC1-R:

5' TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC 3'.

Kích thước của đoạn gen *rpoC1* dự kiến là 600 bp.

Chu trình nhiệt của PCR là 94° trong 1 phút, lặp lại 40 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 53°C trong 40 giây và tổng hợp ở 72°C trong 40 giây; sau 40 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút, lưu giữ ở 4°C (Kress et al., 2005) [7]. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 1,0% và được tinh sạch bởi bộ Kit QIAquick Gel Extraction.

Trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* 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 nucleotide của đoạn gen *rpoC1* được phân tích, so sánh và lập cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình BLAST, BioEdit, ADNstar.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

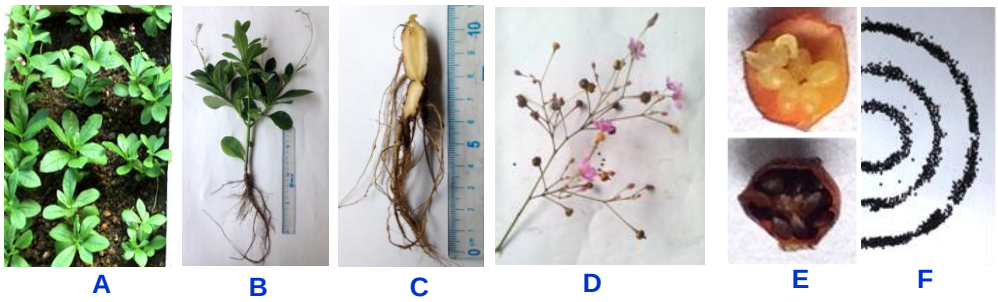
Đặc điểm hình thái của cây Sâm đất

Mẫu Sâm đất thu tại Bỉm Sơn và Quan Hóa, tỉnh Thanh Hóa đem gieo trồng để phân tích đặc điểm hình thái của thân, rễ, lá, hoa, quả và hạt (Hình 1).

Cây Sâm đất là dạng thân thảo, mọc đứng, cao khoảng 30-50 cm, tùy theo giai đoạn phát triển, môi trường và dinh dưỡng; thân màu xanh, nhẵn, phân nhánh nhiều ở dưới. Lá mọc so le, phiến lá bầu dục hoặc hình trái xoan thuôn hay trứng ngược; không lông, không lá bẹ, phiến lá dày, hơi mập, bóng cả 2 mặt, mép lá hầu như lượn sóng. Hoa của cây có 5 cánh màu tím đỏ nhạt, có 2 lá đài, có hơn 10 nhị; bầu nhụy hình cầu. Quả sâm đất nhỏ, khi chín có màu xám tro. Hạt sâm đất rất nhỏ, màu đen, hơi dẹt. Rễ củ hình trụ mang nhiều rễ con, bề ngoài màu nâu đen. Lúc mới đào bên trong củ màu hồng trắng, phơi khô chuyển màu đen, hình dáng củ gần giống hình người, giống củ Nhân sâm. Củ sâm đất dài khoảng 3-6 cm, rễ có vị ngọt, cay. Dựa trên đặc điểm hình thái, theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [2] và Nguyễn Tiến Bân (2013) [1] các mẫu thu được tại Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa) là cây Sâm đất (*Talinum paniculatum).*

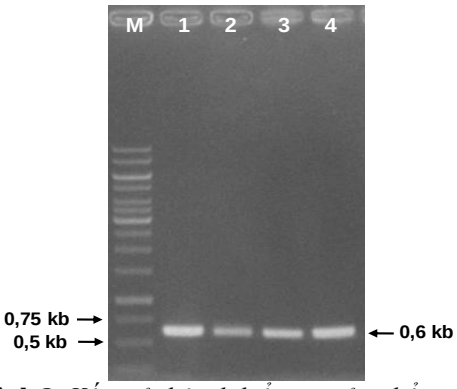
Đặc điểm mã vạch DNA lục lạp với chỉ thị *rpoC1* phân lập từ cây Sâm đất

DNA tổng số tách chiết từ mẫu lá cây sâm đất theo phương pháp CTAB và được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm. DNA tổng số thu được đảm bảo chất lượng cho việc thực hiện PCR khuếch đại đoạn gen đích. Kết quả nhân bản đoạn gen *rpoC1* bằng PCR với cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R* thu được băng DNA có kích thước ước tính khoảng 0,6 kb (Hình 2).



Hình 1. *Hình thái cây Sâm đất*

A, B: Cây Sâm đất 60 ngày tuổi kể từ khi gieo hạt; C: Củ cắt dọc; D: Cành mang hoa; E: Quả; F: Hạt



Hình 2. *Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm nhân bản đoạn gen rpoC1 từ cây Sâm đất. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1, 2: Đoạn gen rpoC1 nhân bản từ mẫu Sâm đất Bỉm Sơn; 3, 4: Đoạn gen rpoC1 nhân bản từ mẫu sâm đất Quan Hóa*

Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được đoạn gen *rpoC1* có kích thước 595 bp. Phân tích bằng phần mềm BLAST trong NCBI cho kết quả đoạn gen *rpoC1* phân lập từ Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa, Việt Nam) có tỉ lệ tương đồng là 99% so với trình tự đoạn gen *rpoC1* mang mã số GQ436061 trên GenBank [5] (Hình 3). Kết quả xác định trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* và so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* của cây Sâm đất (*Talinum paniculatum)* mang mã số GQ436061 được trình bày ở hình 4. Kết quả phân tích cho thấy, đoạn gen *rpoC1* có kích thước 595 bp, trong khi đoạn gen *rpoC1* mang mã số GQ436061 có 517 bp, thiếu đoạn ở phía đầu 5' gồm 78 bp. Hình 4 còn cung cấp thông tin về sự sai khác giữa các trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* với 15 vị trí nucleotide sai khác giữa các trình tự đoạn gen *rpoC1*.

Nếu lấy trình tự đoạn gen *rpoC1* mang mã số GQ436061 trên GenBank làm trình tự tham chiếu thì đột biến thêm nucleotide loại G ở vị trí 439 của đoạn gen *rpoC1* phân lập từ mẫu Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa, Việt Nam) và xuất hiện 14 đột biến thay thế nucleotide ở các vị trí 81, 83, 84, 87, 310, 311, 312, 542, 552, 553, 559, 581, 582, 583. Như vậy có thể kết luận rằng, trình tự nucleotide của đoạn DNA phân lập từ mẫu Sâm đất Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa, Việt Nam) là đoạn gen *rpoC1* của loài cây sâm đất (*Talinum paniculatum)*. Các trình tự gen đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế mang mã số LT853588.1 và LT853589.1.

Mối quan hệ giữa các mẫu sâm đất (*Talinum paniculatum*)

Kết quả phân tích bằng phần mềm DNAstar dựa trên trình tự đoạn gen *rpoC1* phân lập từ các mẫu Sâm đất thu tại Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa) và các trình tự đoạn gen *rpoC1* công bố trên GenBank [12] được trình bày hình 5.

Sequences producing significant alignments:

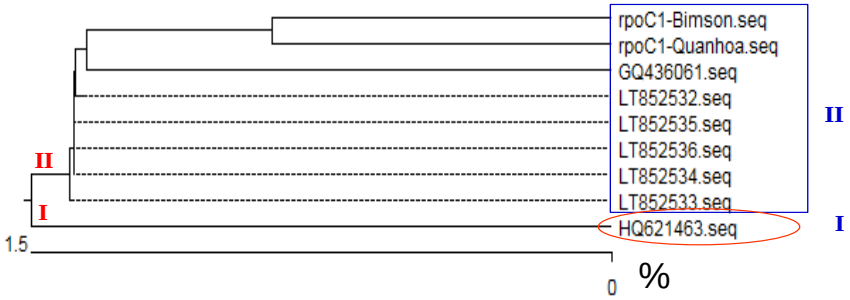
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Talinum paniculatum chloroplast rpoC1 gene for RNA polymerase C, isolate Quanhoa	1099	1099	100%	0.0	100%	LT853588.1
Talinum paniculatum chloroplast rpoC1 gene for RNA polymerase C, isolate Bimson	1044	1044	100%	0.0	98%	LT853589.1
Talinum paniculatum voucher PS0876MT02 RNA polymerase C (rpoC1) gene, partial cds; chloroplast	911	911	85%	0.0	99%	GQ436061.1

Hình 3. *Kết quả phân tích sự tương đồng bằng BLAST trong NCBI giữa trình tự rpoC1 của các mẫu Sâm đất Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hoá, Việt Nam) với trình tự của rpoC1 mang mã số GQ436061 trên GenBank*

```
                    10        20        30        40        50        60
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    ------------------------------------------------------------
rpoC1-Bimson CTTGATAATGGAATCCGCGGACAACCGATGAGGGACGGTCATAATAAAGTTTACAAGTCA
rpoC1-Quanhoa CTTGATAATGGCATTCGCGCACAACCGATGAGGGACGGTCATAATAAAGTTTACAAGTCA

                    70        80        90       100       110       120
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    ------------------GGCAAAGAGGGAAGATTTCGTGAGACTTTACTTGGTAAACGT
rpoC1-Bimson TTTTCAGATGTAATTGAA..T.....A.................................
rpoC1-Quanhoa TTTTCAGATGTAATTGAA..T.GC..A................................

                   130       140       150       160       170       180
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    GTCGATTATTCCGGTCGTTCCGTCATTGTTGTAGGCCCTTCACTTTCATTACATCGATGT
rpoC1-Bimson ............................................................
rpoC1-Quanhoa ...........................................................

                   190       200       210       220       230       240
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    GGATTGCCTCGTGAAATTGCAATAGAGCTCTTCCAGACATTTGTAATTCGTGGTCTAATT
rpoC1-Bimson ............................................................
rpoC1-Quanhoa ...........................................................

                   250       260       270       280       290       300
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    AGACAACATCTTGCTTCGAACATAGGAGTTGCTAAGAGTCAAATTCGGGAAAAAGAACCG
rpoC1-Bimson ............................................................
rpoC1-Quanhoa ...........................................................

                   310       320       330       340       350       360
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    ATTGTATGGAAAATACTTCAGGAAGTTATGCAGGGGCATCCTGTATTGTTAAATAGAGCA
rpoC1-Bimson .........TGC.................................................
rpoC1-Quanhoa .........TGC................................................

                   370       380       390       400       410       420
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    CCTACTCTGCATAGATTAGGCATACAGGCATTCCAACCCATTTTAGTGGAAGGGCGCGCT
rpoC1-Bimson ............................................................
rpoC1-Quanhoa ...........................................................

                   430       440       450       460       470       480
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    ATTTGTTTACATCCATTA-TTTGTAAGGGATTCAATGCAGACTTTGATGGGGATCAAATG
rpoC1-Bimson ...................G.........................................
rpoC1-Quanhoa ..................G.........................................

                   490       500       510       520       530       540
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    GCTGTTCATGTACCTTTATCTTTGGAGGCTCAAGCGGAGGCTCGTTTACTTATGTTTTCT
rpoC1-Bimson ............................................................
rpoC1-Quanhoa ...........................................................

                   550       560       570       580       590
            ----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
GQ436061    CATATGAATCTTTTGTCTCCAGCTATTGGGGATCCCATTTCCGTACCAACTCAAG
rpoC1-Bimson .G.........AA.....A......................ATC............
rpoC1-Quanhoa .G.........................................C............
```

Hình 4. *Trình tự nucleotide của đoạn gen rpoC1 phân lập từ hai mẫu sâm đất thu tại Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa, Việt Nam) và trình tự đoạn gen rpoC1 mang mã số GQ436061 trên GenBank*



Hình 5. *Sơ đồ cây phân loại dựa trên trình tự các nucleotide của đoạn gen rpoC1*

Trên hình 5, loài *Portulaca oleracea* thuộc chi *Portulaca* cùng họ Rau Sam mang mã số HQ621463 trên GenBank phân bố trên một nhánh (nhánh I), còn lại 8 trình tự gen *rpoC1* cùng loài Sâm đất (*Talinum paniculatum)* phân bố ở nhánh II. Khoảng cách di truyền giữa loài *Talinum paniculatum* thuộc chi *Talinum* và chi *Portulaca* trong họ Rau Sam (Portulacaceae) là 1,5%.

KẾT LUẬN

Cây Sâm đất là dạng thảo mộc, thân mọc thẳng, phân cành nhiều. Lá so le, hình trứng ngược, gân lá lượn sóng, không có lá bẹ, phiến lá dày. Hoa có 2 lá đài và 5 cánh hoa màu tím nhạt, có hơn 10 nhị, bầu nhụy hình cầu. Quả nhỏ, khi chín màu xám tro. Hạt nhỏ, hơi dẹt, màu đen. Củ Sâm đất hình trụ, nhiều rễ nhỏ và có vị ngọt và hơi cay. Đoạn gen *rpoC1* phân lập từ cây Sâm đất thu tại Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hóa, Việt Nam) có kích thước là 595 bp. Dựa trên đặc điểm hình thái và kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* bằng BLAST trong NCBI, các mẫu Sâm đất thu thập tại Bỉm Sơn và Quan Hóa (Thanh Hoá, Việt Nam) được xác định thuộc loài *Talinum paniculatum*, chi *Talinum*, họ Portulacaceae.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tiến Bân (2013), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, Nxb Nông Nghiệp, Hà Nội.

2. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản trẻ Thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh.

3. Nguyễn Tập (2007), *Cẩm nang cây thuốc cần bảo vệ ở Việt Nam*, Nxb Mạng lưới lâm sản ngoài gỗ Việt Nam, Hà Nội.

4. Catthareeya Thanamool (2012), *Effects of talinum paniculatum (jacq.) gaertn. extracts on reproductive functions in female rat*, A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biomedical Sciences Suranaree University of Technology Academic.

5. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y. and Leon C. (2016), *Talinum paniculatum voucher PS0876MT02 RNA polymerase C (rpoC1) gene, partial cds; chloroplast*, GenBank: GQ436061.1

6. Hebert P. D. N., Alina C., Shelley L. B., Jeremy R. (2003), Biological identifications through DNA barcodes., *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270, pp. 313–321.

7. Kress J. W., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Wei L. A., Janzen D. H. (2005), Use of DNA barcodes to identify flowering plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, pp. 8369-8374.

8. Kwang-Ho Lee, Ki-Rok Kwon, Won-Mo Kang, Eun-Mi Jeon and Jun-Hyeog Jang (2012), "Identification and Analysis of the Chloroplast rpoC1 Gene Differentially Expressed in Wild Ginseng", *J. Pharmacopuncture*, 2012 Jun; 15(2), pp. 20–23. doi: 10.3831/KPI.2012.15.2.020

9. Shaghai-Maroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. (1984), "Ribosomal DNAsepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics", *Proc. Natl. Acad Sci*., 81, pp. 8014–8019.

10. Taberlet P., Eric C., François P., Ludovic G., Christian M., Alice V., Thierry V., Gérard C., Christian B., and Eske W. (2007), "Power and limitations of the chloroplast *trn*L (UAA) intron for plant DNA barcoding", *Nucleic. Acids Res.*, 35(3), e14; doi: 10.1093/nar/gkl938.

11. Yong H. L., Jinlan R., Shilin C., Jingyuan S., Kun L., Dong L. and Hui Y. (2010), "Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique", *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), pp. 2706-2709.

12. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/

SUMMARY

IDENTIFICATION OF JEWELS OF OPAR SAMPLES BY DNA BARCODE

Nguyen Kieu Linh[1], Nguyen Thi Hanh[2], Nguyen Thi Ngoc Lan[3], Chu Hoang Mau[3*]
[1]Tan Trao University, Tuyen Quang,
[2]Thanh Hoa Department of Education and Training,
[3]TNU-University of Education

Jewels of Opar (*Talinum paniculatum*) is a herbaceous plant in the Red List of Vietnam medicinal plants containing pharmaceutically active substances such as phitosterol, saponin, flavonoid, tannin, steroids, lowers cholesterol. When the Jewels of Opar plants are deformed or have been processed samples or preliminary processing, so if it is only relies on morphological characteristics then that are either obstructed or easily mistaken. Therefore, using DNA barcodes as markers to identify the species will be accurate and quick results. The analytic results of morphological characteristics in combination with *rpoC1* DNA barcode allow us to identify Jewels of Opar samples collected at Bim Son and Quan Hoa (Thanh Hoa) are a species of *Talinum paniculatum.*

Từ khóa: *rpoC1 marker, Medicinal plants, Talinum paniculatum, species identification, DNA barcode*

Ngày nhận bài: 08/9/2017; Ngày phản biện: 15/9/2017; Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

[*] *Tel: 0913 383289, Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn*