

SỬ DỤNG MÃ VẠCH *matK* ĐỂ NHẬN DIỆN MẪU THỎ NHÂN SÂM (*TALINUM PANICULATUM*) THU TẠI MỘT SỐ ĐỊA PHƯƠNG PHÍA BẮC VIỆT NAM

Vũ Thị Như Trang², Chu Hoàng Mậu^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Cây Thỏ nhân sâm là thảo dược chứa các hợp chất thứ cấp như phytosterol, saponin, flavonoid, tanin, steroid có hoạt tính kháng virus, kháng khuẩn, chống viêm, kích thích tăng tiết sữa ở phụ nữ, hỗ trợ cho bệnh Parkinson, bệnh tim và làm giảm lượng cholesterol trong máu. Ở Việt Nam, Thỏ nhân sâm là loài cây dược liệu gặp ở nhiều địa phương. Tuy nhiên, các mẫu Thỏ nhân sâm ở những địa phương này thuộc cùng một loài hay khác loài, đặc biệt rất khó xác định khi cây ở giai đoạn chưa ra hoa hoặc nguyên liệu đã được chế biến một phần hay hoàn toàn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nhận diện mẫu cây Thỏ nhân sâm thu tại một số địa phương phía Bắc Việt Nam bằng mã vạch *matK*. Đoạn gen *matK* được phân lập từ cây Thỏ nhân sâm có kích thước 808 bp. Dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* và bằng phần mềm BLAST trong NCBI, các mẫu Thỏ nhân sâm thu tại năm địa phương: huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang; thành phố Thái Nguyên; huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên; thị xã Sơn Tây, Hà Nội và huyện Hoàn Bồ, tỉnh Quảng Ninh thuộc cùng một loài *T. paniculatum*.

Từ khóa: Cây dược liệu, đoạn gen *matK*, mã vạch DNA, Thỏ nhân sâm, *T. paniculatum*

MỞ ĐẦU

Cây Thỏ nhân sâm (*T. paniculatum*) có chứa các hợp chất thứ cấp như flavonoid, phytosterol, saponin, tanin, steroid [2] có tác dụng chống viêm, kích thích tăng tiết sữa ở phụ nữ cho con bú và có khả năng chữa bệnh viêm loét [13]. Steroid saponin là thành phần được tìm thấy trong rễ cây Thỏ nhân sâm có tác dụng phòng và chữa bệnh xơ vữa động mạch, đồng thời còn là nguyên liệu để tổng hợp nên hormone sinh dục. Rễ củ của Thỏ nhân sâm có thành phần hóa học chính tương tự như củ Nhân sâm Hàn Quốc [16]. Thỏ nhân sâm là loại thảo dược mọc tự nhiên khắp nơi trên thế giới [13] và ở Việt Nam, Thỏ nhân sâm vừa là cây trồng tự nhiên, vừa là cây trồng để làm thuốc. Cây gặp nhiều ở các tỉnh: Hà Giang, Tuyên Quang, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Hòa Bình, Bắc Giang, Lạng Sơn, Cao Bằng... Trước đây, để xác định được loại thảo dược đang dùng là cây Thỏ nhân sâm thì chủ yếu dựa vào phương pháp hình thái so sánh, dựa vào khóa phân loại. Tuy nhiên, phương pháp này gặp rất nhiều

khó khăn khi cần xác định những mẫu cây đang trong giai đoạn chưa ra hoa, hoặc khó nhận biết khi mẫu vật có nhiều điểm tương đồng với các loài cùng chi hoặc mẫu cây đã được chế biến một phần hay ở dạng bột [9].

Từ giữa những năm 1990, với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học hiện đại, phân loại học phân tử ở thực vật dựa trên một số đoạn DNA bảo thủ trong hệ gen nhân hay hệ gen lục lạp cho phép nhận diện ở mức độ chính xác cao, đặc biệt đối với các loài có quan hệ gần gũi, khắc phục được hạn chế của phương pháp hình thái so sánh [11]. Việc lựa chọn các gen hoặc các đoạn DNA khác nhau hoặc các sản phẩm khác nhau của hệ gen để định danh loài phụ thuộc vào mục đích hoặc đối tượng nghiên cứu [7]. Một trong những mã vạch DNA đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong việc nhận dạng cây dược liệu đó là đoạn gen *Maturase K (matK)* trong hệ gen lục lạp. Gen này được sử dụng chủ yếu để định danh ở cấp độ loài [6]. Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng gen *matK* để định danh một số loài như loài cỏ biển [6], bạch tật lê (*Tribulus terrestris*), *Aerva javanica*, *Haplophyllum robustum*, *Tribulus*

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

pentandrus, *Tamarix aucherana*...[5]. Đối với cây Thổ nhân sâm hệ gen lục lạp có kích thước là 156929 bp đã được giải mã [12], tuy nhiên việc sử dụng mã vạch gen *matK* còn ít được công bố, đặc biệt ở Việt Nam chưa tìm thấy công bố nào sử dụng mã vạch gen *matK* để định danh cây Thổ nhân sâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và giải trình tự đoạn gen *matK* và nhận diện mẫu cây Thổ nhân sâm thu tại một số địa phương thuộc tỉnh Thái Nguyên, Hà Nội, Bắc Giang, Quảng Ninh làm cơ sở để sử dụng mẫu Thổ nhân sâm cho các thí nghiệm phân tích sinh học phân tử tiếp theo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hạt và mẫu cây Thổ nhân sâm được thu từ năm địa phương, đó là huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang (BG); thành phố Thái Nguyên (TN1); huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên (TN2); thị xã Sơn Tây, Hà Nội (HT); huyện Hoàn Bô, tỉnh Quảng Ninh (QN). Tiến hành thu ở mỗi địa phương 5 cây Thổ nhân sâm non và thu hạt của 5 cây Thổ nhân sâm khác đem trồng tại vườn Thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

Nhận diện các mẫu Thổ nhân sâm bằng các đặc điểm hình thái theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [8] và Nguyễn Tiến Bản (2013) [1] và tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178>.

DNA tổng số được tách chiết từ lá bằng phương pháp CTAB theo Shanghai-Marooof và cs (1984) [14], điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8% và bằng quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm.

Cặp mồi *matK-F/matK-R* của PCR nhân bản đoạn gen *matK* được tổng hợp theo Kress và đtg (2005) [9] có trình tự nucleotide là:

matK-F: 5' ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC 3';

matK-R: 5' CTCCTCTGTAAAGAATTC 3'

Đoạn gen *matK* khuếch đại dự kiến có kích thước hơn 800 bp. Chu trình nhiệt của PCR

với cặp mồi *matK-F/matK-R* là 95° trong 2 phút, lặp lại 35 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 52°C trong 30 giây và tổng hợp ở 72°C trong 45 giây; sau 35 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút, lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Sau đó sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Kit QiAquick Gel Extraction (Qiagen, Đức). Sản phẩm này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp hai chiều (mỗi xuôi và mỗi ngược) bằng máy phân tích trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, Mỹ) theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye terminator cyclor v3.1. Trình tự nucleotide được so sánh với các trình tự đã có trên GenBank bằng phần mềm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trong NCBI. Trình tự DNA sau khi đọc được hiệu chỉnh với sự trợ giúp của phần mềm Bioedit v7.0.5.2.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp Neighbor-Joining nhờ phần mềm Mega 7 [10].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân bản, giải trình tự và xác định đoạn gen *matK*

DNA tổng số được tách chiết từ lá non của 5 mẫu Thổ nhân sâm được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi *matK-F/matK-R*. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy ở cả năm lần chạy chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng hơn 800 bp tương ứng với kích thước dự kiến của đoạn gen *matK* (Hình 1).

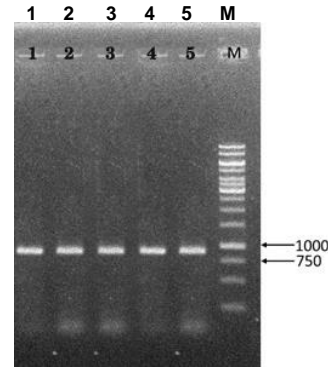
Kết quả giải trình tự nucleotide thu được đoạn DNA của cả 5 mẫu Thổ nhân sâm có kích thước 808 nucleotide.

Bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn DNA phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*matK-TN1*, *matK-TN2*, *matK-BG*, *matK-HT*, *matK-QN*) là đoạn gen *matK* của loài *T. paniculatum* (Hình 2). Hình 2 cho thấy trình

tự đoạn gen *matK* phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*matK-TN1*, *matK-TN2*, *matK-BG*, *matK-HT*, *matK-QN*) có tỷ lệ tương đồng 99% với 3 trình tự gen *matK* cùng loài *T. Paniculatum*, mang mã số AY015274 [4], KY952520 [15], GQ434150 [3] trên GenBank, kết quả này đã cho thấy trình tự nucleotide phân lập được là đoạn gen *matK* của loài *T. Paniculatum*. Đồng thời, trình tự đoạn gen *matK* phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu tương đồng 97% với trình tự gen *matK* của loài *Talinum fruticosum* cùng chi *Talinum*, mang mã số KJ380907 trên GenBank. Kết hợp phân loại dựa trên đặc điểm hình thái theo Khóa phân loại, đối chiếu những mô tả của Phạm Hoàng Hộ (1999) [8], Nguyễn Tiến Bản (2013) [1] và tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178>, những dữ liệu phân tử của gen *matK* đã xác định được 5 mẫu Thổ nhân sâm thuộc cùng một loài *T. Paniculatum*.

So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm (*T. Paniculatum*) với đoạn gen *matK* của loài *T.*

Paniculatum mang mã số AY015274 thấy có 12 điểm sai khác, đó là các vị trí 33, 34, 35, 37, 38, 39, 88, 243, 398, 475, 726, 768. Tất cả những vị trí sai khác đều là sự thay thế nucleotide (Hình 3).



Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *matK*

M: Thang DNA 1kb; **1:** Mẫu Thổ nhân sâm thu ở huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang (BG); **2:** Mẫu Thổ nhân sâm thu ở thành phố Thái Nguyên (TN1); **3:** Mẫu Thổ nhân sâm thu ở huyện Đại từ, tỉnh Thái Nguyên (TN2); **4:** Mẫu Thổ nhân sâm thu ở thị xã Sơn Tây, Hà Nội (HT); **5:** Mẫu Thổ nhân sâm thu ở huyện Hoàn Bồ, tỉnh Quảng Ninh (QN).

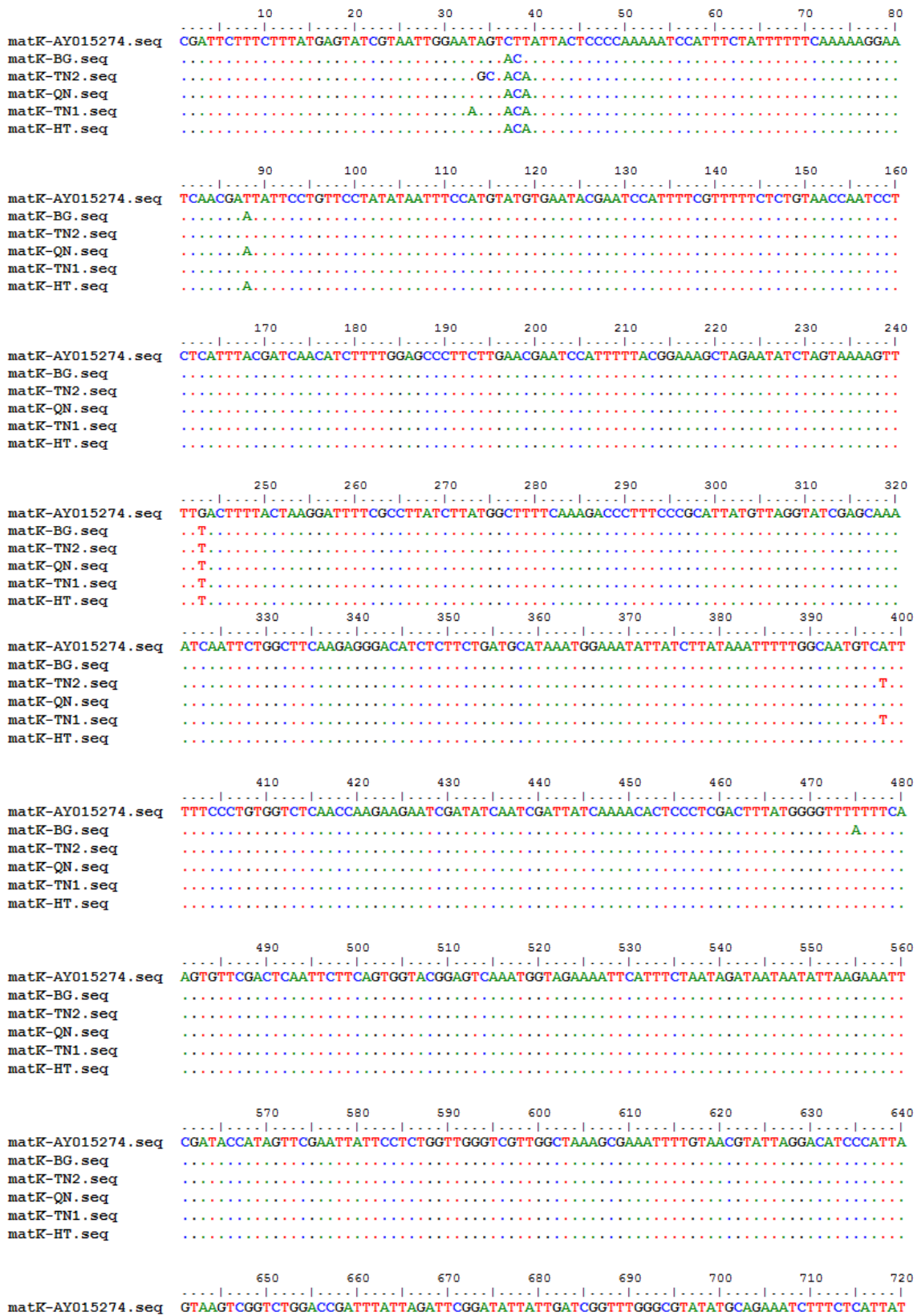
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Talinum paniculatum</i> tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence, and maturase K (matK) gene, complete cds: c	1454	1454	97%	0.0	99%	AY015274.1
<input type="checkbox"/> <i>Talinum paniculatum</i> voucher Michael J. Moore 1789 (QC) maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	1351	1351	90%	0.0	99%	KY952520.1
<input type="checkbox"/> <i>Talinum paniculatum</i> voucher PS0876MT02 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	1299	1299	86%	0.0	99%	GQ434150.1
<input type="checkbox"/> <i>Talinum fruticosum</i> maturase K (matK) gene, complete cds: chloroplast	1327	1327	97%	0.0	96%	DQ855844.1
<input type="checkbox"/> <i>Talinum fruticosum</i> voucher LCH42 maturase K (matK) gene, partial cds: chloroplast	1330	1330	96%	0.0	97%	KJ380907.1

Hình 2. Kết quả xác định đoạn gen *matK* của các mẫu Thổ nhân sâm bằng BLAST trong NCBI

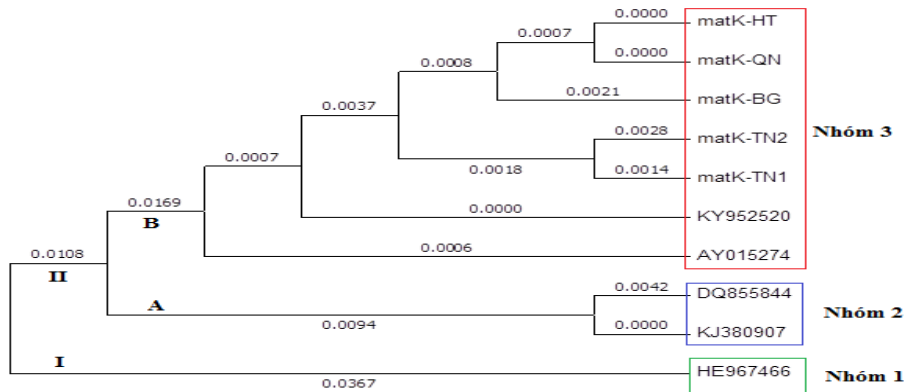
Mối quan hệ di truyền giữa mẫu Thổ nhân sâm dựa trên trình tự đoạn gen *matK*

Kết quả xác định mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen *matK* phân lập từ các mẫu nghiên cứu và các trình tự đoạn gen *matK* mang mã số AY015274, KY952520 cùng loài *T. paniculatum*; KJ380907, DQ855844 (*T. fruticosum*) cùng chi *Talinum* và trình tự đoạn gen *matK* cùng họ Rau sam của loài *Portulaca oleracea* có mã số HE967466 được thể hiện ở hình 4.

Sơ đồ hình cây ở hình 4 cho thấy, các đối tượng nghiên cứu phân bố trên 2 nhánh lớn, nhánh I có 1 trình tự đoạn gen *matK* của loài *P. oleracea*, khác chi nhưng cùng họ Rau sam (Portulacaceae) với 9 mẫu phân bố ở nhánh II. Nhánh II có 9 trình tự gen *matK* của các loài thuộc cùng chi *Talinum*. Khoảng cách di truyền giữa hai chi *Talinum* và *Portulaca* là 3,67%. Nhánh II lại chia thành 2 nhánh phụ A và B. Nhánh A có 2 trình tự đoạn gen *matK* mang mã số KJ380907 và DQ855844 của loài *T. fruticosum* và nhánh B có 7 trình tự đoạn gen *matK* cùng loài *T. paniculatum*. Khoảng cách di truyền giữa hai loài *T. paniculatum* và *T. fruticosum* cùng chi là 2,59%.



Hình 3. Trình tự nucleotide của đoạn gen matK phân lập từ năm mẫu Thổ nhân sâm (BG, TN2, QN, TN1, HT) và trình tự nucleotide của đoạn gen matK mang mã số AY015274 của loài *T. Paniculatum* trên GenBank



Hình 4. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *matK*

matK-HT, *matK-TN1*, *matK-TN2*, *matK-BG*, *matK-QN* là trình tự đoạn gen *matK* của 5 mẫu nghiên cứu; *AY015274*, *KY952520* là trình tự đoạn gen *matK* của loài *T. paniculatum*; *KJ380907*, *DQ855844* là trình tự gen *matK* của loài *T. fruticosum*; *HE967466* là trình tự gen *matK* của loài *P. Oleracea*

KẾT LUẬN

Đoạn DNA phân lập từ năm mẫu Thổ nhân sâm có kích thước 808 bp là đoạn gen *matK* trong hệ gen lục lạp của loài *T. paniculatum*. Dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *matK*, bằng BLAST trong NCBI kết hợp với phương pháp hình thái so sánh đã xác định các mẫu Thổ nhân sâm thu tại năm địa phương: Huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang; thành phố Thái Nguyên; huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên; thị xã Sơn Tây, Hà Nội và huyện Hoàn Bô, tỉnh Quảng Ninh thuộc cùng một loài *T. paniculatum*.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ một phần kinh phí của đề tài cấp Đại học Thái Nguyên (mã số ĐH2017-TN05-04) và sử dụng trang thiết bị của Phòng DNA ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tiến Bản (2013), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb Trẻ Thành phố Hồ Chí Minh, Hồ Chí Minh.
3. Catthareeya T., Papirom P., Chanlun S., Kupittayanant S. (2013), “*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gertn: A medicinal plant with potential estrogenic activity in ovariectomized rats”, *Int. J. Pharm. Sci.*, 5, pp. 478–485.
4. 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., Leon C. (2010), “Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species”, *PLoS One*, 5(1), e8613.
5. Edwards E. J., Nyffeler R., Donoghue M. J. (2005), “Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (*Cactaceae*) paraphyly for the transition to the cactus life form”, *Am. J. Bot.*, 92(7), pp. 1177-1188.
6. Enan M. R. , Palakkott A. R., Ksiksi T. S. (2017), “DNA barcoding of selected UAE medicinal plant species: a comparative assessment of herbarium and fresh samples”, *Physiol Mol. Biol. Plants*, 23(1), pp. 221–227.
7. Group C. P. W., Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., Bank V. D. M., Chase M. W., Cowan R. S., Erickson D. L. (2009), “A DNA barcode for land plants”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, pp. 12794–12797.
8. Hebert P. D. N., Alina C., Shelley L. B., Jeremy R. (2003), “Biological identifications through DNA barcodes”, *Proc. R. Soc. Lon. B*, 270, pp. 313-321.
9. 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.
10. Kumar S., Stecher G., Tasma K. (2016), “MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets”, *Molecular Biology and Evolution*, 33, pp.1870-1874.
11. Ledford H. (2008), “Botanical identities: DNA barcoding for plants comes a step closer”, *Nature*, 451, pp. 616.
12. Liu X., Li Y., Yang H., Zhou B. (2018), “Chloroplast genome of the folk medicine and vegetable plant *T. paniculatum* (Jacq.) Gaertn.:

gene organization, comparative and phylogenetic analysis”, *Molecules*, 23, E857.

13. Petprai D., Chanprasert C., Chanvanij N. (1996), *The herb in Thailand*, War Veterans Organization of Thailand, Bangkok, Thailand.

14. Shaghai-Marooof 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.

15. Smith S. A., Brown J. W., Yang Y., Bruenn R., Drummond C. P., Brockington S. F., Walker J. F., Last N., Douglas N. A., Moore M. J. (2018), “Disparity, diversity, and duplications in the Caryophyllales”, *New Phytol.*, 217(2), pp. 836-854.

16. Yulia, Wientarsih I., Razief N. (2005), *Study of phytochemistry of Java ginseng compare to Korean ginseng, Development of animal health and production for improving the sustainability of livestock farming in the integrated agriculture system*, German institute for tropical and subtropical agriculture, Indonesia, pp. 45-49.

SUMMARY

USE OF *MATK* DNA BARCODE FOR IDENTIFICATION OF JEWELS OF OPAR (*TALINUM PANICULATUM*) SAMPLES COLLECTED AT SOME LOCALITIES IN THE NORTHERN OF VIETNAM

Vũ Thị Như Trang^{1,2}, Chu Hoàng Mau^{1*}

¹University of Education - TNU

²University of Medicine and Pharmacy - TNU

Jewels of Opar (*T. paniculatum*) is a medicinal plant which contains secondary compounds such as phytosterols, saponins, flavonoids, tannins, steroids with antiviral activity, antibacterial, anti-inflammatory, stimulating lactation in women. Jewels of Opar plants can also be used as a supporting medicine for Parkinson’s disease and heart disease and for lowering blood cholesterol. In Vietnam, Jewels of Opar is a medicinal plant species found in many localities. However, the Jewels of Opar plant samples in these localities are of the same species or other species? and especially difficult to determine in the stage where plants have not yet flowers or the raw materials have been completely or partially processed. So, based on what basis would it be possible to identify Jewels of Opar plant samples collected from localities are *T. paniculatum* species? In this study, we presented the results of identification of the Jewels of Opar plant samples collected from some localities in Northern of Vietnam by *matK* barcode. Nucleotide sequences of *matK* gene fragment isolated from the Jewels of Opar plant samples are 808 bp in length. Based on the nucleotide sequence of the *matK* gene fragment and using the basic local alignment search tool (BLAST) in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the Jewels of Opar samples were collected in Tan Yen district, Bac Giang province; in Thai Nguyen city, Thai Nguyen province; in Dai Tu district, Thai Nguyen province; in Son Tay town, Hanoi and in Hoanh Bo district, Quang Ninh province were determined to belong to *T. paniculatum* species, *Talinum* genus, Portulacaceae family.

Keyword: DNA barcode, Jewels of Opar, *matK* gene, medicinal plant, *T. paniculatum*.

Ngày nhận bài: 29/6/2018; **Ngày phản biện:** 09/7/2018; **Ngày duyệt đăng:** 31/7/2018

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