Định danh một số loài cây dược liệu bằng chỉ thị DNA mã vạch phục vụ sản xuất sản phẩm chăm sóc sức khỏe hữu cơ sinh học

Hà Bích Hồng[1], Hà Minh Tuân[2], Vũ Thị Ánh[2], Cao Thị Việt Nga[1], Trần Thanh Tùng[3], Nguyễn Thế Hưởng[1*]
[1]*Trường Đại học Lâm nghiệp*
[2]*Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên*
[3]*Quỹ Bảo vệ và Phát triển rừng tỉnh Lâm Đồng*

Identification of some medicinal plants using DNA barcode markers for the production of organic biological health care products

Ha Bich Hong[1], Ha Minh Tuan[2], Vu Thi Anh[2], Cao Thi Viet Nga[1], Tran Thanh Tung[3], Nguyen The Huong[1*]
[1]*Vietnam National University of Forestry*
[2]*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*
[3]*Forest Protection and Development Fund of Lam Dong Province*
**Corresponding author: huongnt@vnuf.edu.vn*

https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.3.2025.012-021

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 20/12/2024
Ngày phản biện: 23/01/2025
Ngày quyết định đăng: 03/03/2025

Từ khóa:
Cây dược liệu, DNA mã vạch, ITS2, rbcL, trnH-psbA.

Keywords:
DNA barcode, ITS2, medicinal plants, rbcL, trnH-psbA.

TÓM TẮT

Cây dược liệu là thành phần thiết yếu trong các sản phẩm chăm sóc sức khỏe tự nhiên và rất được người tiêu dùng ưa chuộng. Tuy nhiên, tình trạng thiếu hụt nguồn cung trong nước dẫn đến việc lưu hành dược liệu không rõ nguồn gốc, kém chất lượng trên thị trường, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến uy tín sản phẩm và thương hiệu. Trước thực trạng này, việc giám định và truy xuất nguồn gốc cây dược liệu trở nên vô cùng quan trọng để đảm bảo chất lượng và tính minh bạch. Nghiên cứu này đã tiến hành giám định ba loài cây dược liệu là Hương nhu trắng, Tía tô và Sả chanh bằng cách sử dụng các chỉ thị DNA mã vạch (rbcL, trnH – psbA và ITS2). Kết quả phân tích tự nucleotide, khi so sánh với cơ sở dử liệu GenBank, cho thấy các mẫu Hương nhu trắng (Ocimum gratissimum), Tía tô (Perilla frutescens) và Sả chanh (Cymbopogon citratus) có mức độ tương đồng từ 99,44% đến 100%. Trình tự nucleotide vùng gen rbcL của ba loài này đã được đăng ký trên GenBank với các mã số lần lượt là PQ120591, PQ120592 và PQ120593; vùng gen trnH-psbA là PQ120594, PQ120595, PQ120596; và vùng gen ITS2 là PQ143346, PQ143347, PQ143348. Nghiên cứu này không chỉ cung cấp cơ sở khoa học để xác định giống cây dược liệu có giá trị kinh tế, mà còn hỗ trợ phát triển vùng chuyên canh bền vững, từ đó đảm bảo nguồn cung chất lượng cao và khả năng truy xuất nguồn gốc cho thị trường.

ABSTRACT

Medicinal plants are key ingredients in natural health care products, highly valued by consumers. However, the shortage of domestic supply often leads to the circulation of medicinal plants with unknown origins and dubious quality, seriously affecting the reputation of products and brands. Given this, the identification and traceability of medicinal plants' origins are crucial for ensuring quality and transparency. This study identified three medicinal plants, namely Lemon basil (Ocimum gratissimum), Perilla (Perilla frutescens) and Lemongrass (Cymbopogon citratus) using DNA barcode markers (rbcL, trnH – psbA and ITS2). The results of nucleotide sequence analysis, compared with the GenBank database, revealed 99.44% to 100% similarity for all samples. The nucleotide sequences for the rbcL gene region of these three species are deposited on GenBank (PQ120591, PQ120592 and PQ120593); trnH-psbA (PQ120594, PQ120595, PQ120596); and ITS2 (PQ143346, PQ143347, PQ143348). This study provides a scientific basis for identifying economically valuable medicinal plant varieties and supports the development of sustainable specialized cultivation areas, ensuring high-quality, traceable supply for the market.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các sản phẩm chăm sóc sức khỏe có nguồn gốc thảo dược rất được người tiêu dùng quan tâm do tỷ lệ mắc các vấn đề sức khỏe ngày càng tăng và sử dụng "sản phẩm dược liệu thiên nhiên" trở thành xu hướng làm đẹp mới được nhiều gia đình yêu thích, đánh giá rất tích cực. Các sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ thảo dược không chứa các thành phần nhân tạo, hương liệu, chất bảo quản nên phù hợp với sinh lý của cơ thể, ít gây tác dụng phụ, thân thiện với môi trường, đảm bảo chăm sóc sắc đẹp đi đôi với phát triển bền vững. Mặt khác, Việt Nam lại là nước có điều kiện tự nhiên thuận lợi để dễ dàng trồng, canh tác và sản xuất nguồn dược liệu đa dạng, có giá trị kinh tế cao. Việt Nam chỉ còn 260 loài cây dược liệu có thể khai thác tự nhiên, trong khi có trên 5000 loài cây dược liệu và nấm có thể dùng làm thuốc đã được tìm thấy [1, 2]. Chính sách quy hoạch 7 vùng sinh thái phát triển dược liệu trên cả nước của ngành y tế đã thúc đẩy việc nuôi trồng và phát triển vùng chuyên canh cây dược liệu trên diện rộng. Do đó, nguồn gốc và chất lượng giống để xây dựng các vùng chuyên canh cây dược liệu là vô cùng quan trọng. Có giống tốt, nguồn gốc rõ ràng và dễ truy xuất nguồn gốc là cơ sở để các vùng trồng chuyên canh cây dược liệu cung cấp những sản phẩm có chất lượng, được kiểm soát ra ngoài thị trường.

Từ những vấn đề trên cho thấy việc giám định và truy xuất nguồn gốc các loài cây dược liệu có giá trị kinh tế là rất cần thiết. Ứng dụng khoa học hiện đại trong phân tích DNA để giám định hay định danh, nhận diện các loài đã được công nhận và sẽ trở thành phương tiện hữu ích cho các nhà quản lý, nhà khoa học trong lĩnh vực kiểm tra, giám sát, đánh giá cây dược liệu. Bộ chỉ thị DNA mã vạch cho các loài cây dược liệu sẽ cung cấp nguồn dữ liệu quan trọng về việc sử dụng chỉ thị DNA mã vạch nào để giám định hiệu quả cho từng loài cây dược liệu, cung cấp bộ cơ sở dữ liệu về DNA mã vạch chuẩn của các loài cây dược liệu làm đối chứng. Đồng thời, tạo nền tảng cho các cơ quan quản lý, các nhà khoa học tiếp tục xây dựng và cập nhật thêm những chỉ thị DNA mã vạch mới cho hàng ngàn loài cây dược liệu có giá trị tại Việt Nam.

DNA mã vạch trên đối tượng thực vật đã được công bố tương đối nhiều với các trình tự như *mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A, *ITS*, *ITS*1, *ITS*2, *trn*L-*trn*F... *rbc*L và *trn*H-*psb*A là hai trình tự nằm trong hệ gen lục lạp, trong đó CBOL đã công nhận *rbc*L là một trong những trình tự gen tiềm năng nhất cho các nghiên cứu DNA mã vạch ở thực vật [3]. Tuy nhiên, do khả năng phân biệt loài thấp, nên hầu hết các nhóm đều cho rằng nên sử dụng kết hợp *rbc*L với các với các chỉ thị DNA mã vạch khác, ví dụ như *mat*K là hai locus mã vạch chuẩn cho thực vật [4-6]. Trình tự *trn*H-*psb*A có kích thước trung bình khoảng 450 bp, nhưng thay đổi từ 296 đến 1120 bp, *trn*H-*psb*A được chứng minh là có khả năng xác định loài cao. Trong nhiều nghiên cứu gần đây đã đề xuất việc sử dụng *trn*H-*psb*A như chỉ thị mã vạch độc lập cho thực vật hay kết hợp với *mat*K. CBOL thấy rằng khả năng phân biệt loài của *trn*H-*psb*A là cao nhất (69%) trong số 7 locus được thử nghiệm và do đó đề nghị nó như là chỉ thị mã vạch bổ sung. *trn*H-*psb*A có thể sử dụng trong hệ thống mã vạch ba locus khi hệ thống mã vạch hai locus không cung cấp đầy đủ khả năng phân tích [3] [4] [7]. *ITS* (internal Transcribed Spacer), bao gồm *ITS*1 và *ITS*2, là trình tự xen giữa các trình tự mã hóa ribosome 18S; 5,8S và 28S. Vùng *ITS* của hệ gen nhân được xem là một trong những công cụ hữu ích nhất để đánh giá phát sinh loài ở cả thực vật và động vật vì nó phổ biến trong tự nhiên, kế thừa từ bố mẹ và biến đổi cao do ít hạn chế chức năng. Một số nghiên cứu gần đây ở cây sinh sản hữu tính và cây sinh sản vô tính cho thấy một số mức độ biến đổi số các bản sao của trình tự *ITS*1 và *ITS*2 do nhiều nguyên nhân như lai gần, phân ly, tái tổ hợp, tỷ lệ đột biến cao và hình thành gen giả của các gen chức năng dẫn đến những thay đổi đó. Trên cơ sở này *nr*ADN có thể được sử dụng để phân định chính xác và hiệu quả thực vật trong cùng loài với đặc điểm lịch sử đời sống khác nhau (một năm, lâu năm, trên cạn, dưới nước) và nguồn gốc tiến hóa khác nhau [4] [6] [8].

Chính vì vậy, nghiên cứu này hướng tới việc ứng dụng các chỉ thị DNA mã vạch để giám định

ba loài cây dược liệu phổ biến: Hương nhu trắng (*Ocimum gratissimum*), Tía tô (*Perilla frutescens*) và Sả chanh (*Cymbopogon citratus*) (Hình 1). Kết quả nghiên cứu sẽ không chỉ góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu DNA mã vạch chuẩn mà còn hỗ trợ phát triển các vùng trồng cây dược liệu chuyên canh bền vững tại Việt Nam.

Hình 1. Ba loài Hương nhu trắng (A), Tía tô (B) và Sả chanh (C)

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thu thập và lựa chọn những mẫu lá non và bánh tẻ, không bị sâu bệnh của 30 mẫu cây thuộc ba loài dược liệu tại tỉnh Vĩnh Phúc làm vật liệu tách chiết DNA tổng số. Mẫu lá được đựng trong túi nilon kín và đặt trong thùng xốp có chứa đá khô, sau đó được đưa về phòng thí nghiệm ngay trong ngày và bảo quản trong tủ lạnh -20°C cho đến khi tiến hành tách chiết DNA tổng số.

10 mẫu loài Hương nhu trắng, kí hiệu mẫu HN1 đến HN10; 10 mẫu loài Tía tô, kí hiệu mẫu TT1 đến TT10; 10 mẫu loài Sả chanh, kí hiệu SC1 đến SC10. 30 mẫu nghiên cứu do Công ty cổ phần TOPBEST Việt Nam cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu lá của ba loài dược liệu sử dụng innuPREP Plant DNA Kit của hãng Analytik Jena, Đức, các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA tổng số được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang (ScanDrop – Analytik Jena, Đức).

2.2.2. Phương pháp khuếch đại PCR và xác định trình tự nucleotide

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Biomera Tadvance 96S (Analytik Jena, Đức) với thể tích mỗi phản ứng là 20 µl, trong đó chứa các thành phần và nồng độ các chất tham gia phản ứng như sau: 10 µl PCR Master mix 2X, 1 µl mồi xuôi 10 µM và 1 µl mồi ngược 10 µM, 50 ng DNA khuôn, bổ sung H_2O deion tới 20 µl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 35 chu kì lặp lại của ba bước 95°C – 30 giây, 50°C hoặc 52°C (tùy từng cặp mồi) – 30 giây, 72°C – 1 phút; kết thúc tổng hợp ở 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Trình tự cặp mồi sử dụng để nhân bản các trình tự DNA mã vạch được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự và thông tin về cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gen đích	Tên mồi	Trình tự mồi 5' – 3'	Nhiệt độ gắn mồi (^{o}C)	Kích thước đoạn gen (bp)	Tham khảo
*rbc*L	*rbc*L_F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	52	600	[7]
	*rbc*L_R	GTAAAATCAAGTCCACCTCG			
*ITS*2	*ITS2*_F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	50	400	[9]
	*ITS2*_R	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
*trn*H-*psb*A	*trn*H_F	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	50	500	[10]
	*psb*A_R	GTTATGGATGAACGTAATGCTC			

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh bằng máy chụp gel Quantum CX5 (Vilber Lourmat, Pháp).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit innuPREP PCR pure Kit (Analytik Jena, Đức).

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được đóng gói trong ống eppendorf 1,5 ml và gửi đến phòng thí nghiệm 1st BASE ở Malaysia để giải trình tự theo cả hai chiều. Trình tự nucleotide của đoạn DNA được xác định bằng máy giải trình tự tự động theo nguyên lý Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye® Terinator v3.1 Cycle Sequencing.

2.2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit v.7.2.5 [11], Mega7 [12], và công cụ BLAST trên NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Trong nghiên cứu này vật liệu dùng để tách chiết DNA là 30 mẫu lá của 3 loài dược liệu là Hương nhu trắng, Tía tô, Sả chanh, sử dụng bộ kit tách chiết DNA thực vật của hãng Analytik Jena, Đức. Kết quả thu được các mẫu DNA có nồng độ tương đối cao, từ 286 ng/µl đến 812 ng/µl và độ tinh sạch (tỷ số A260/A280) nằm trong khoảng từ 1,87 đến 2,15 (Bảng 2). Kết quả tách chiết DNA tổng số đạt yêu cầu cả về nồng độ và độ tinh sạch, tất cả 30 mẫu nghiên cứu đều có nồng độ DNA tương đối cao, độ tinh sạch nằm trong khoảng giới hạn được cho là sạch (tỷ số A260/A280 = 1,8 đến 2,0 thì mẫu DNA được coi là sạch), điều này cho thấy bộ kit tách chiết DNA tổng số đối với các mẫu dược liệu nghiên cứu là hoàn toàn phù hợp.

Vì các mẫu đều có nồng độ DNA tổng số tương đối cao nên sẽ tiến hành pha loãng đến nồng độ 50 ng/µl và sử dụng 1 µl để thực hiện phản ứng PCR.

Bảng 2. Hàm lượng và chất lượng DNA tổng số tách chiết từ các mẫu dược liệu nghiên cứu

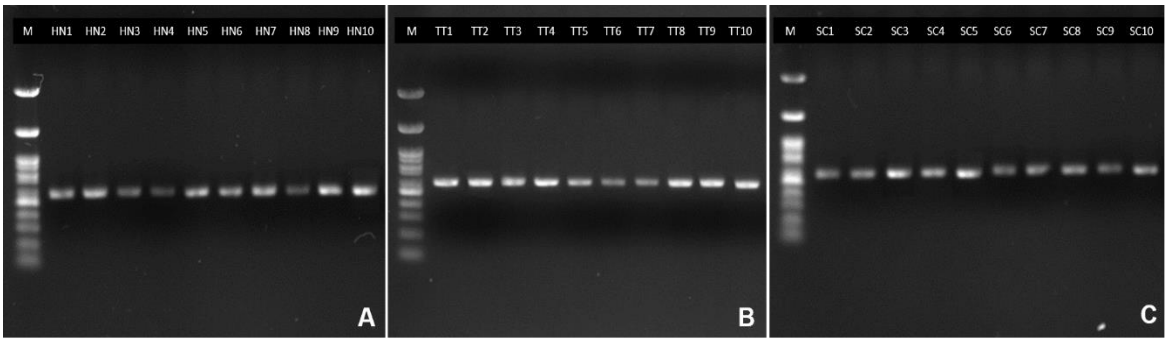
TT	Mẫu	Độ tinh sạch của DNA ($OD_{260nm/280nm}$)	Hàm lượng DNA (ng/µl)
1	HN1	2,00	511
2	HN2	2,05	562
3	HN3	1,96	385
4	HN4	2,15	602
5	HN5	2,03	478
6	HN6	1,87	415
7	HN7	1,98	524
8	HN8	1,94	492
9	HN9	2,00	503
10	HN10	2,14	573
11	TT1	2,10	355
12	TT2	2,04	812
13	TT3	2,00	605
14	TT4	1,89	542
15	TT5	1,93	489
16	TT6	1,97	536
17	TT7	2,05	721
18	TT8	2,00	654
19	TT9	2,14	672
20	TT10	1,95	473
21	SC1	2,00	286

TT	Mẫu	Độ tinh sạch của DNA ($OD_{260nm/280nm}$)	Hàm lượng DNA (ng/µl)
22	SC2	2,00	451
23	SC3	2,03	306
24	SC4	2,00	367
25	SC5	1,99	293
26	SC6	1,93	428
27	SC7	2,05	474
28	SC8	2,00	313
29	SC9	2,01	371
30	SC10	2,00	407

3.2. Kết quả xác định trình tự nucleotide và giám định loài của đoạn gen *rbc*L

3.2.1. Nhân bản trình tự rbcL bằng kỹ thuật PCR

Nhân bản thành công trình tự *rbc*L ở tất cả 30 mẫu của 03 loài cây dược liệu, các băng DNA sáng rõ và chỉ xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng 600 bp (Hình 2). Sản phẩm PCR của 30 mẫu sau đó được tinh sạch và sử dụng cho bước giải trình tự nucleotide tiếp theo.



Hình 2. Kết quả khuếch đại trình tự rbcL của 30 mẫu dược liệu

M: DNA marker 100 bp, (A) 10 mẫu Hương nhu trắng, (B) 10 mẫu Tía tô, (C) 10 mẫu Sả chanh

3.2.2. Giải trình tự nucleotide đoạn gen rbcL và công bố trên GenBank

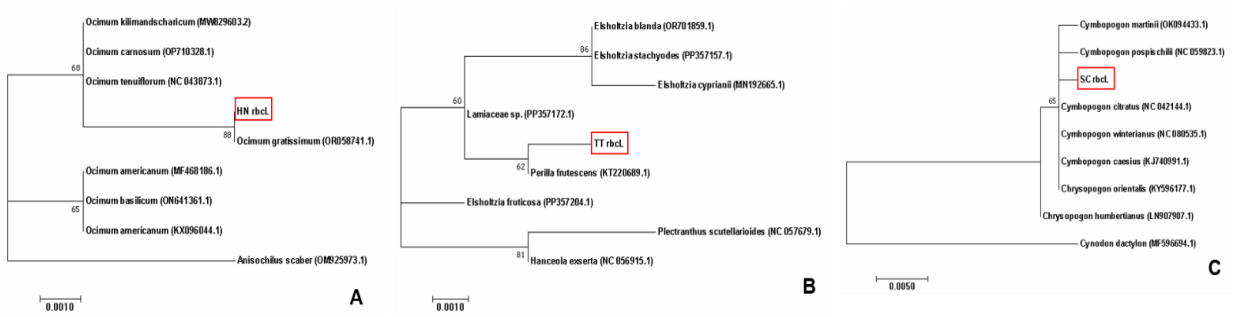
Đoạn gen *rbc*L của 30 mẫu cây dược liệu được giải trình tự nucleotide thành công với kích thước từ 558 bp đến 565 bp. Sau khi sử dụng phần mềm BioEdit để cắt chỉnh các đoạn đầu và cuối của mỗi trình tự do ở hai đầu có chất lượng giải trình tự nucleotide không tốt, toàn bộ 30 trình tự *rbc*L của 30 mẫu dược liệu được so sánh với nhau.

Kết quả so sánh trên phần mềm BioEdit cho thấy, 10 mẫu Hương nhu trắng (HN1-HN10) có trình tự *rbc*L giống nhau 100%, trình tự có kích thước 553 bp và được đăng ký thành công trên GenBank với mã số PQ120591. 10 mẫu Tía tô và 10 mẫu Sả chanh cũng có kết quả so sánh tương tự, 10 mẫu Tía tô có trình tự *rbc*L giống nhau với kích thước 559 bp và mã số GenBank là PQ120592, 10 mẫu Sả chanh có trình tự *rbc*L giống nhau với kích thước 556 bp với mã số GenBank là PQ120593.

3.2.3. Kết quả giám định ba loài dược liệu sử dụng trình tự rbcL

Khi so sánh trình tự đoạn gen *rbc*L của 3 loài dược liệu nghiên cứu lên GenBank thì thấy cả 03 loài đều có mức độ tương đồng cao nhất với các trình tự cùng loài đã có trên GenBank. Loài Hương nhu trắng tương đồng 100% với loài *Ocimum gratissimum* (OR058741.1), Tía tô và Sả chanh có mức độ tương đồng 99,82% với lần lượt hai loài là *Perilla frutescens* (KT220689.1) và *Cymbopogon citratus* (NC_042144.1). Cây

quan hệ di truyền giữa 3 loài dược liệu nghiên cứu với các loài cùng chi trên GenBank cũng thể hiện mối quan hệ rất gần giữa các loài (Hình 3) và điều này khẳng định thêm về kết quả Blast thể hiện ở Bảng 3.



Hình 3. Cây quan hệ di truyền giữa 3 loài dược liệu nghiên cứu với các loài trên GenBank dựa trên trình tự rbcL

Kết quả này cho thấy, chỉ thị *rbc*L đã xác định được loài tương đồng cao nhất dựa trên cơ sở dữ liệu GenBank và cả 3 loài Hương nhu, Tía tô, Sả chanh đều có mức độ tương đồng cao nhất với loài đúng tên khoa học như trong Bảng 3. Một số nghiên cứu định danh các loài dược liệu sử dụng trình tự *rbc*L đã được thực hiện với hiệu quả tương đối cao, như một số loài thuộc chi Sâm (*Panax*) [13, 14], trà hoa vàng [15], Râu mèo [16].

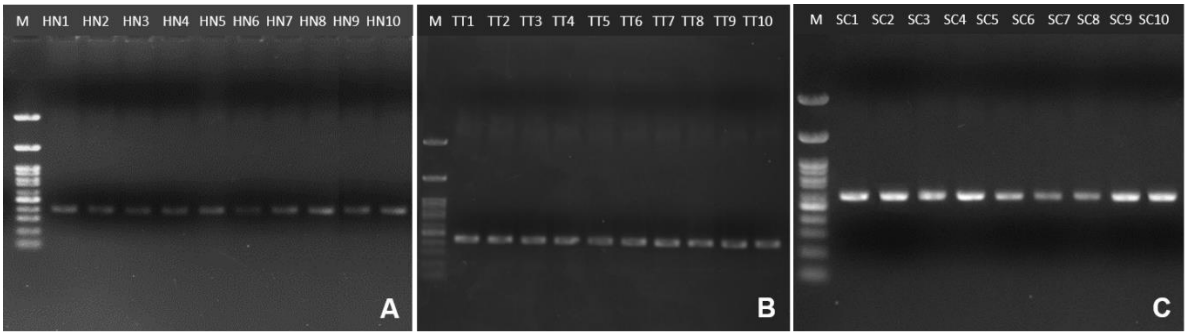
Bảng 3. Kết quả so sánh các mẫu dược liệu nghiên cứu trên cơ sở dữ liệu của GenBank dựa trên trình tự *rbc*L

TT	Kí hiệu mẫu	Tên thông dụng	Tên khoa học	Kích thước đoạn rbcL (bp)	Mã số được đăng ký trên GenBank	Loài tương đồng nhất trên GenBank	
						Tên loài	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	HN1-HN10	Hương nhu trắng	*Ocimum gratissimum*	553	PQ120591	*Ocimum gratissimum* (OR058741.1)	100
2	TT1-TT10	Tía tô	*Perilla frutescens*	559	PQ120592	*Perilla frutescens* (KT220689.1)	99,82
3	SC1-SC10	Sả chanh	*Cymbopogon citratus*	556	PQ120593	*Cymbopogon citratus* (NC_042144.1)	99,82

3.3. Kết quả xác định trình tự nucleotide và giám định loài của đoạn *trn*H-*psb*A

3.3.1. Nhân bản đoạn trnH-psbA của ba loài cây dược liệu

Đoạn *trn*H-*psb*A được nhân bản thành công ở 30 mẫu của 03 loài cây dược liệu nghiên cứu, kích thước đoạn nhân bản khoảng 400 bp đối với các mẫu Hương nhu trắng, 450 bp với các mẫu Tía tô và khoảng 600 bp với các mẫu Sả chanh (Hình 4). Điều này thường quan sát thấy phổ biến là do đoạn spacer *trn*H (đoạn xen giữa không mã hóa) thay đổi kích thước tương đối lớn giữa các loài và các chi khác nhau. Sản phẩm PCR là đặc hiệu thể hiện thành một băng DNA duy nhất ở mỗi mẫu. Các sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch và thực hiện bước giải trình tự nucleotide theo phương pháp tự động dựa trên nguyên lý Sanger.



Hình 4. Kết quả khuếch đại trình tự trnH-psbA của 30 mẫu dược liệu

M: DNA marker 100 bp, (A) 10 mẫu Hương nhu trắng, (B) 10 mẫu Tía tô, (C) 10 mẫu Sả chanh

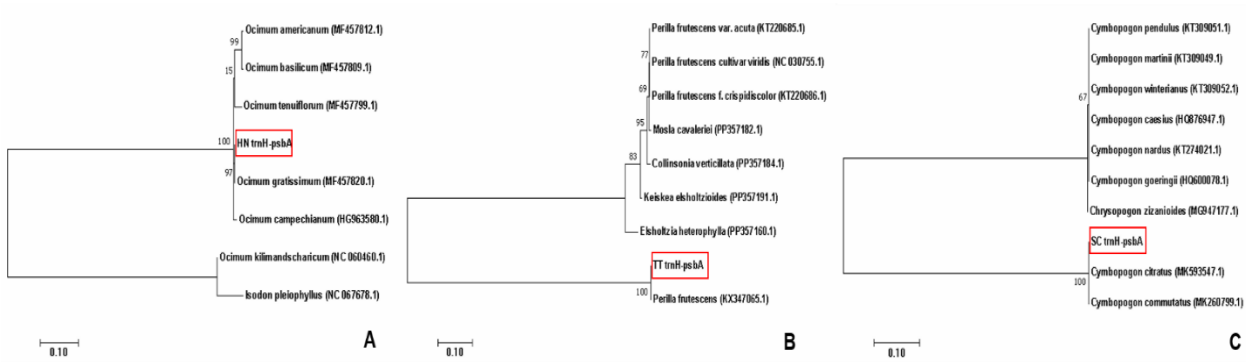
3.3.2. Giải trình tự nucleotide đoạn gen trnH-psbA và công bố trên GenBank

Trình tự *trn*H-*psb*A của 30 mẫu thuộc 3 loài cây dược liệu có kích thước thay đổi tương đối lớn giữa các loài khác nhau. Sau khi xử lý cắt bỏ những đoạn đầu và cuối của trình tự, đoạn *trn*H-*psb*A của 10 mẫu Hương nhu trắng có kích thước 380 bp và tất cả trình tự *trn*H-*psb*A của 10 mẫu này đều giống nhau 100%. Các mẫu Tía tô có kích thước trình tự *trn*H-*psb*A là 428 bp và tất cả 10 mẫu tương đồng nhau 100% về trình tự *trn*H-*psb*A. Tương tự, các mẫu Sả chanh có kích thước đoạn *trn*H-*psb*A là 628 bp và tất cả 10 mẫu đều có trình tự nucleotide giống nhau.

Trình tự *trn*H-*psb*A của 3 loài dược liệu là Hương nhu trắng, Tía tô và Sả chanh đã được đăng ký thành công trên GenBank với các mã số lần lượt là PQ120594, PQ120595 và PQ120596.

3.3.3. Kết quả giám định ba loài cây dược liệu sử dụng trình tự trnH-psbA

Trình tự *trn*H-*psb*A đã định danh được 03 loài dược nghiên cứu với mức độ tương đồng rất cao, đạt 100% với đúng tên loài trên GenBank (Bảng 4). Loài Hương nhu Trắng tương đồng 100% với loài *Ocimum gratissimum* có mã số MF457820.1 trên Genbank, tương tự loài Tía tô và Sả chanh cũng tương đồng 100% với hai loài trên GenBank là *Perilla frutescens* (mã số GenBank: KX347065.1) và *Cymbopogon citratus* (mã số GenBank: MK593547.1). Mối quan hệ gần gũi giữa 3 loài dược liệu nghiên cứu với các loài tương đồng trên GenBank được thể hiện qua sơ đồ hình cây trên Hình 5. Trình tự *trn*H-*psb*A được sử dụng khá phổ biến trong xác định các loài cây dược liệu [13, 15, 16] và thể hiện khả năng phân biệt loài tương đối tốt do chứa đoạn trình tự không mã hóa (intergenic spacer).



Hình 5. Cây quan hệ di truyền giữa 3 loài dược liệu nghiên cứu với các loài trên GenBank dựa trên trình tự trnH-psbA

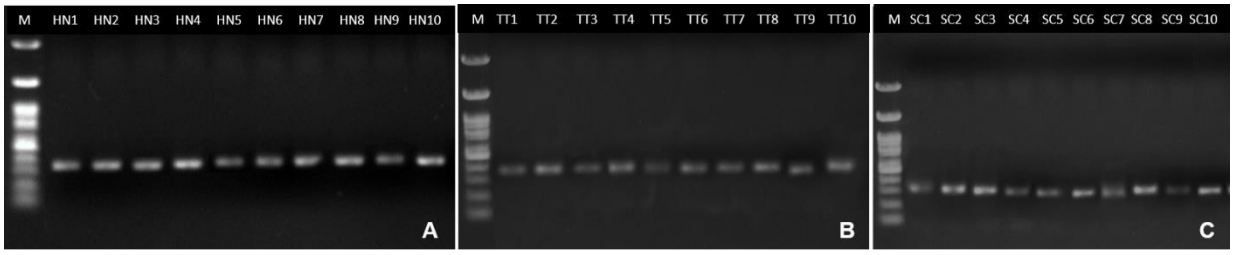
Bảng 4. Kết quả so sánh các mẫu dược liệu nghiên cứu trên cơ sở dữ liệu của GenBank dựa trên trình tự *trn*H-*psb*A

TT	Kí hiệu mẫu	Tên thông dụng	Tên khoa học	Kích thước đoạn trnH-psbA (bp)	Mã số được đăng ký trên GenBank	Loài tương đồng nhất trên GenBank	
						Tên loài	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	HN1-HN10	Hương nhu trắng	*Ocimum gratissimum*	380	PQ120594	*Ocimum gratissimum* (MF457820.1)	100
2	TT1-TT10	Tía tô	*Perilla frutescens*	428	PQ120595	*Perilla frutescens* (KX347065.1)	100
3	SC1-SC10	Sả chanh	*Cymbopogon citratus*	628	PQ120596	*Cymbopogon citratus* (MK593547.1)	100

3.4. Kết quả xác định trình tự nucleotide và giám định loài của đoạn *ITS*2

3.4.1. Nhân bản đoạn ITS2 của ba loài cây dược liệu

Trình tự *ITS*2 được nhân bản thành công ở 30 mẫu thuộc 3 loài cây dược liệu với kích thước khoảng 400 bp. Sản phẩm PCR là đặc hiệu, chỉ xuất hiện một băng DNA duy nhất đối với từng mẫu (Hình 6).



Hình 6. Kết quả khuếch đại trình tự ITS2 của 30 mẫu dược liệu

M: DNA marker 100 bp, (A) 10 mẫu Hương nhu trắng, (B) 10 mẫu Tía tô, (C) 10 mẫu Sả chanh

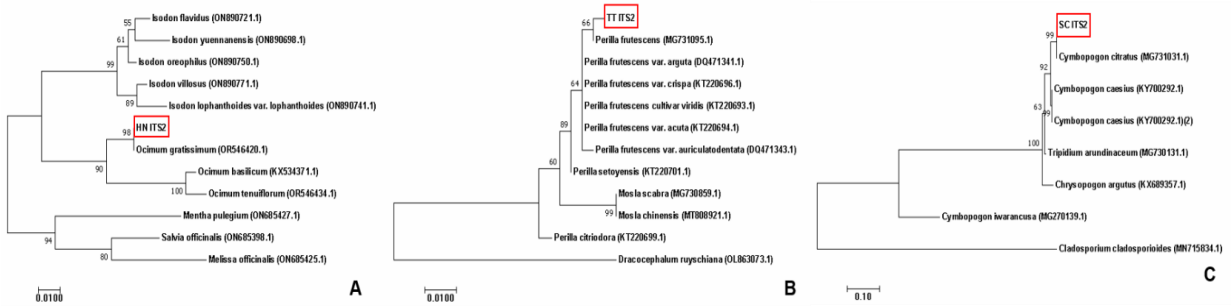
3.4.2. Giải trình tự nucleotide đoạn gen ITS2 và công bố trên GenBank

Kết quả giải trình tự nucleotide các đoạn *ITS*2 của 3 loài dược liệu cho thấy kích thước ở mỗi loài khác nhau là có khác nhau. Ở loài Hương nhu trắng, 10 mẫu có trình tự *ITS*2 giống nhau và sau khi xử lý thì trình tự có kích thước 474 bp, được đăng ký thành công trên GenBank với mã số PQ143346. 10 mẫu của loài Tía tô cũng tương đồng nhau 100% về trình tự nucleotide và có kích thước đoạn *ITS*2 là 359bp, mã số đăng ký trên GenBank là PQ143347. Loài Sả chanh có kích thước đoạn *ITS*2 là 471bp và tất cả 10 mẫu Sả chanh đều giống nhau về trình tự *ITS*2 với mã số đăng ký trên GenBank là PQ143348.

3.4.3. Kết quả giám định ba loài cây dược liệu sử dụng trình tự ITS2

Khi BLAST các trình tự *ITS*2 của 3 loài dược liệu trên GenBank thì thấy cả 3 loài đều được định danh đúng tên với tỷ lệ tương đồng rất cao, loài Hương nhu trắng tương đồng 100% với loài *Ocimum gratissimum* có mã số OR546420.1 trên GenBank, loài Tía tô tương đồng cao nhất (99,44%) với loài *Perilla frutescens* (mã số GenBank: MG731095.1) và loài Sả chanh tương đồng cao nhất với loài *Cymbopogon citratus* có mã số MG731031.1 (tỷ lệ tương đồng 99,77%). Sự tương đồng di truyền giữa 3 loài dược liệu nghiên cứu với một

số loài cùng chi (hoặc cùng họ) trên GenBank được thể hiện trong Hình 7. Trình tự *ITS* nói chung và *ITS*2 nói riêng được sử dụng rất hiệu quả trong xác định loài [17-19]. Đối với một số loài dược liệu như Sâm, Đinh lăng, Ba kích, Gừng đen, Nghệ đen [20] và rất nhiều loài dược liệu khác [21] trình tự *ITS*2 thể hiện khả năng phân biệt loài tốt, có thể sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài ở cả cấp độ loài và chi.



Hình 7. Cây quan hệ di truyền giữa 3 loài dược liệu nghiên cứu với các loài trên GenBank dựa trên trình tự ITS2

Bảng 5. Kết quả so sánh các mẫu dược liệu nghiên cứu trên cơ sở dữ liệu của GenBank dựa trên trình tự *ITS*2

TT	Kí hiệu mẫu	Tên thông dụng	Tên khoa học	Kích thước đoạn ITS2 (bp)	Mã số được đăng ký trên GenBank	Loài tương đồng nhất trên GenBank	
						Tên loài	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	HN1-HN10	Hương nhu trắng	*Ocimum gratissimum*	474	PQ143346	*Ocimum gratissimum (OR546420.1)*	100
2	TT1-TT10	Tía tô	*Perilla frutescens*	359	PQ143347	*Perilla frutescens (MG731095.1)*	99,44
3	SC1-SC10	Sả chanh	*Cymbopogon citratus*	471	PQ143348	*Cymbopogon citratus (MG731031.1)*	99,77

4. KẾT LUẬN

- Phân lập và giải trình tự nucleotide thành công 03 đoạn trình tự DNA mã vạch là *rbc*L, *trn*H-*psb*A, và *ITS*2 của 30 mẫu thuộc 3 loài dược liệu Hương nhu trắng, Tía tô và Sả chanh. Cả 3 chỉ thị DNA mã vạch đều khẳng định các mẫu.

- Giám định được 3 loài dược liệu là Hương nhu trắng có tên khoa học là *Ocimum gratissimum,* các mẫu Tía tô có tên khoa học là *Perilla frutescens* và các mẫu Sả chanh có tên khoa học là *Cymbopogon citratus* sử dụng 03 trình tự DNA mã vạch là *rbc*L, *trn*H-*psb*A, *ITS*2;

- Đã đăng ký thành công các trình tự DNA mã vạch của 3 loài Hương nhu trắng, Tía tô và Sả chanh lên Ngân hàng gen quốc tế; trình tự *rbc*L của 3 loài lần lượt có mã số PQ120591, PQ120592 và PQ120593; trình tự *trn*H-*psb*A của 3 loài dược liệu có mã số PQ120594, PQ120595, PQ120596; trình tự *ITS*2 của 3 loài có mã số lần lượt là PQ143346, PQ143347, PQ143348.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Đỗ Tất Lợi (2004). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. 638-640.

[2]. Phạm Hoàng Hộ (2021). Cây cỏ Việt Nam-Quyển I.

[3]. CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. 12794-12797. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

[4]. K Vijayan & CH Tsou (2010). DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. Current science: 1530-1541.

[5]. Wenqin Wang, Yongrui Wu, Yiheng Yan, Marina Ermakova, Randall Kerstetter & Joachim (2010). DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. BMC Plant Biology Messing. 10: 1-11.

[6]. Hui Yao, Jingyuan Song, Chang Liu, Kun Luo, Jianping Han, Ying Li, Xiaohui Pang, Hongxi Xu, Yingjie Zhu & Peigen Xiao (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PloS one 5(10): e13102.

[7]. W John Kress & David L Erickson (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. PLoS one. 2(6): e508.

[8]. Yonghua Li, Jinlan Ruan, Shilin Chen, Jingyuan Song, Kun Luo, Dong Lu & Hui Yao (2010). Authentication of Taxillus chinensis using DNA barcoding technique. J Med Plants Res. 4(24): 2706-2709.

[9]. Thomas J White, Thomas Bruns, SJWT Lee, John Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods & applications .18(1): 315-322.

[10]. Tao Sang, Daniel J Crawford & Tod F Stuessy (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). American journal of Botany. 84(8): 1120-1136.

[11]. Tom A Hall (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. Oxford. 95-98.

[12]. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology & evolution. 33(7): 1870-1874.

[13]. Nguyen Nhat Linh, Bui Manh Minh, Ha Hong Hanh, Huynh Thi Thu Hue, Nong Van Hai & Ha Van Huan (2017). Application of DNA barcodes in identification of ginseng samples in the genus Panax L. Vietnam Journal of Biotechnology 15(1): 63-72.

[14]. Nguyen Thi Phuong Trang & Nguyen Thi Hong Mai (2017). rbcL and rpoL gene sequences of Panax vietnamensis var. fuscidiscus and Panax vietnamensis, the background for identification and comparison. Academia Journal of Biology. 39(1): 80-85.

[15]. Hà Văn Huân & Nguyễn Văn Phong (2015). Xác định đoạn mã vạch ADN cho Trà hoa vàng Tam Đảo (Camellia tamdaoensis Ninh et Hakoda): Loài cây đặc hữu của Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT. 5: 123-130.

[16]. Hà Bích Hồng, Chu Sỹ Cường, Nguyễn Văn Việt & Nguyễn Thế Hưởng (2021). Xác định một số trình tự ADN mã vạch phù hợp phục vụ giám định loài Râu Mèo (Orthosiphon Aristatus (Blume) Miq.). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 2: 12-20

[17]. Huynh Thi Thu Hue, Nguyen Thi Bich Ngoc, Dao Quang Ha, Le Thi Thu Hien & Nguyen Xuan Canh (2022). Analysis of DNA barcode region ITS and MatK in some Polyscias plants of Vietnam. TNU Journal of Science & Technology. 227(5): 318-325.

[18]. Vũ Đình Duy, Trần Thị Việt Thanh, Phan Kế Lộc, Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Thị, Thanh Hương, Nguyễn Thị Hiên & Phan Kế Long (2020). Sử dụng vùng gen ITS-rDNA và matK để xác định loài Sâm thuộc chi Sâm (*Panax*) ở vùng núi Phu Xai Lai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 18(1): 75-85.

[19]. Vũ Quang Nam, Vũ Đình Duy, Vũ Thị Thu Hiền & Lưu Thị Phương (2021). Sử dụng DNA mã vạch vùng gen nhân (ITS-rDNA) định danh loài hoa Trứng Gà Yên Tử (Magnolia sp.). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 2: 42-48.

[20]. Nguyễn Tiến Dũng, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Đức Huy, Trịnh Ngọc Ái & Nguyễn Phi Hùng (2024). Ứng dụng chỉ thị mã vạch DNA-ITS2 để định danh một số mẫu dược liệu. Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 66(1): 24-28.

[21]. Shilin Chen, Hui Yao, Jianping Han, Chang Liu, Jingyuan Song, Linchun Shi, Yingjie Zhu, Xinye Ma, Ting Gao & Xiaohui Pang (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS one. 5(1): e8613.