

## XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TRÌNH TỰ ADN MÃ VẠCH PHÙ HỢP PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI RÂU MÈO (*Orthosiphon Aristatus* (Blume.) Miq.)

Hà Bích Hồng<sup>1</sup>, Chu Sỹ Cường<sup>2</sup>, Nguyễn Thế Hưởng<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Việt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>2</sup>Bệnh viện Y học cổ truyền, Bộ Công an

### TÓM TẮT

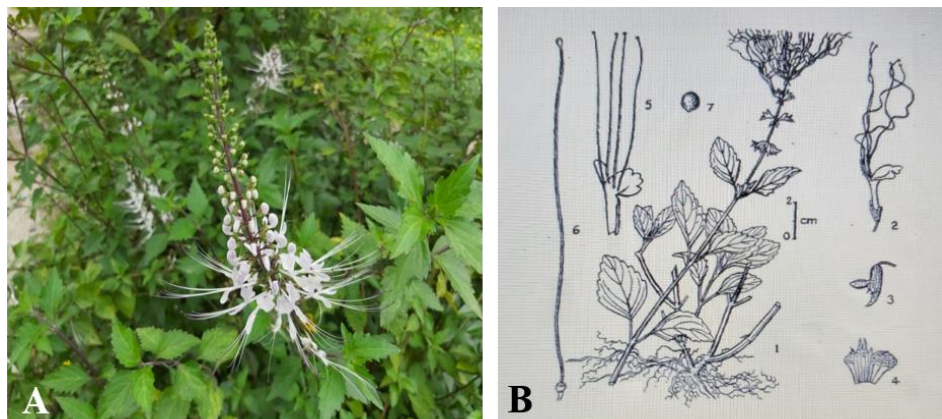
Định danh loài hiện nay ngoài những phương pháp truyền thống như dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa thì phương pháp định danh bằng sinh học phân tử cũng được sử dụng rất hiệu quả. Trong đó, ADN mã vạch là một phương pháp định loại phân tử được sử dụng để hỗ trợ định danh hay giám định các loài động vật và thực vật khó nhận dạng về hình thái hay các mẫu vật đã qua chế biến. Ở thực vật, các trình tự ADN được sử dụng làm mã vạch trong giám định hay phân loại thường là các trình tự nucleotide thuộc hệ gen lục lạp và hệ gen nhân, bao gồm cả vùng mã hóa và vùng không mã hóa. Trong nghiên cứu này, ba vùng ADN mã vạch là *rbcL*, *ITS* và *trnH-psbA* được sử dụng để đánh giá khả năng phân biệt loài Râu mèo (*Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq.). Kết quả nhân bản PCR, giải trình tự nucleotide, phân tích, và so sánh các trình tự ADN mã vạch ở loài Râu mèo với các loài cùng thuộc chi *Orthosiphon* cho thấy vùng gen *ITS* có mức độ tương đồng cao nhất với loài *Orthosiphon aristatus* trên ngân hàng gen quốc tế (100%). Tiếp đến là trình tự nucleotide vùng gen *trnH-psbA* với 99,74% và cuối cùng là *rbcL* với 99,31%. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ phát sinh loài cho thấy mẫu Râu mèo nghiên cứu tương đồng cao nhất với loài *Orthosiphon aristatus*, kết quả này cũng tương tự như kết quả giám định các mẫu Râu mèo dựa trên hình thái. Từ kết quả này cho thấy việc sử dụng các trình tự ADN mã vạch để giám định loài ở cấp độ phân tử là rất hiệu quả, sử dụng riêng rẽ từng trình tự ADN mã vạch hay kết hợp nhiều trình tự đều có khả năng định danh loài. Tuy nhiên, việc sử dụng kết hợp một số trình tự ADN mã vạch với nhau sẽ làm tăng độ tin cậy của kết quả giám định.

**Từ khóa:** *ITS*, mã vạch ADN, Râu mèo, *rbcL*, *trnH-psbA*.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Râu mèo hay còn gọi là Cây Bông Bạc, với danh pháp khoa học là *Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq., chi *Orthosiphon*, họ Bạc hà (Lamiaceae), bộ Hoa môi (Lamiales), lớp Ngọc Lan (Magnoliopsida), ngành Ngọc Lan (Magnoliophyta). Chi *Orthosiphon* có khoảng 40 loài trên thế giới, phân bố rải rác khắp các vùng nhiệt đới Châu Á, Châu Phi và Châu Đại Dương. Vùng nhiệt đới Đông Nam Á được coi là nơi tập trung và có tính đa dạng cao về thành phần loài

của chi, trong đó Việt Nam có 8 loài (Đỗ Huy Bích et al., 2004). Râu mèo là cây thảo, sống lâu năm, cao khoảng 0,3 - 0,5 m hoặc có khi hơn. Thân mảnh cứng, hình vuông, mọc đứng, thường có màu nâu tím, nhẵn hoặc có ít lông, ít phân cành. Lá mọc đối, hình trứng, dài 4 - 6 cm, rộng 2,5 - 4 cm, gốc tròn, đầu nhọn, mép khía răng to, gân lá hơi nổi rõ ở mặt dưới, cuống lá dài 3 - 4 cm (Đỗ Huy Bích et al., 2004; Võ Văn Chi, 2012; Đỗ Tất Lợi, 2012) (Hình 1).



**Hình 1. Hình thái cây Râu mèo**

(A): Hoa Râu mèo; (B): Ảnh vẽ các bộ phận chi tiết của hoa Râu mèo (1: Gốc thân và cành mang hoa; 2: Hoa; 3: Đài; 4: Đài mở với các tuyến; 5: Tràng mở; 6: Nhụy; 7: Quả)

Râu mèo được biết đến như là vị thuốc làm tăng lượng nước tiểu và thúc đẩy sự bài tiết urê, các chlorua và acid uric, có tác dụng tốt đối với các chứng rối loạn đường tiêu hóa, bệnh thấp khớp, đau lưng, đau nhức khớp xương (Đỗ Tất Lợi, 2012). Ngoài ra, Râu mèo còn có tác dụng tốt đối với bệnh xung huyết gan và bệnh đường ruột. Hiệu quả của nó là do tác dụng kết hợp của glycosid với các muối kiềm, các chất giống như tanin của dầu thơm và của một saponin. Hiện nay nhu cầu của con người về nguồn dược liệu trên ngày càng tăng, tuy nhiên loài cây này trong tự nhiên đang bị giảm về số lượng và chất lượng bởi sự khai thác quá mức, cũng như các điều kiện ngày càng bất lợi của môi trường tự nhiên, nên đa số dược liệu nói chung và Râu mèo nói riêng được nhập từ Trung Quốc với nguồn gốc không rõ ràng. Do đó, cần phải giám định nguồn gốc và từ đó có cơ chế quản lý các nguồn dược liệu nhằm đảm bảo an toàn cho người bệnh khi sử dụng thuốc. Phương pháp ADN mã vạch đã trở thành công cụ hữu hiệu cho các nhà khoa học trong việc phân loại, đánh giá đa dạng di truyền và quan hệ di truyền các loài cả động vật và thực vật. Kỹ thuật ADN mã vạch dựa vào việc sử dụng một hay nhiều đoạn ADN có kích thước khoảng từ 400 - 800 bp như là một tiêu chuẩn để nhận dạng các loài một cách nhanh chóng và chính xác. Mỗi đoạn ADN mã vạch có những đặc trưng riêng và có khả năng phân biệt sinh vật ở các mức độ khác nhau: họ, chi, loài hay dưới loài. Các đoạn ADN mã vạch có thể là những đoạn nằm trong hệ gen nhân (18S, 5.8S, 26S, *ITS*...); (Baharum S.N., 2012; Chen S., 2010; Schoch C. L et al., 2012), hệ gen ty thể (*Cytb*, *CO1*...). (Chiou et al., 2007; Doyle. J.L., 1990; Hollingsworth, 2011), hệ gen lục lạp (*matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpo*, *trnL-trnF*, *ycf*...) (Yu J. và cộng sự, 2011; Hollingsworth, 2011). Cho đến nay, chưa có đoạn ADN nào được sử dụng làm mã vạch chung cho tất cả các loài sinh vật, thay vào đó cần lựa chọn những đoạn ADN đặc trưng và việc phối hợp các đoạn mã vạch ADN sẽ đem lại hiệu quả cao hơn. (Park S. U. et al., 2009; Schoch C. L et al., 2012). Tùy vào đối tượng giám định mà các đoạn ADN mã vạch sẽ được sử dụng một cách hợp lý (Chase et al., 2007; Hollingsworth et al., 2011).

*MatK* và *trnH-psbA* được nghiên cứu là hai

chỉ thị ADN mã vạch hữu ích trong việc phân biệt các loài thuộc chi *Labiatae* nhằm góp phần bảo tồn và kiểm soát buôn bán nguồn tài nguyên thực vật có giá trị (Theodoridis et al., 2012). Trình tự ADN mã vạch bao gồm *ITS*, *trnL-trnF*, *rps16*, và *trnL* cũng được sử dụng để phân tích các mối quan hệ hình thái và phát sinh loài giữa mười đơn vị phân loài của chi *Orthosiphon*. Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên phương pháp NJ cho thấy giá trị bootstrap thấp (60%) đối với chỉ thị *ITS* và cao hơn với ba chỉ thị còn lại (86 - 100%). Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng mặc dù khác nhau về mặt hình thái giữa các loài thuộc chi *Orthosiphon* nhưng kết quả phân tích ADN mã vạch là tương tự nhau (Sudarmono et al., 2020).

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Lựa chọn mẫu và cách lấy mẫu

Lá Râu mèo (*Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq) được lựa chọn từ 04 cây Râu mèo tại Trung tâm nghiên cứu và sản xuất thuốc Suối Hai – Ba Vì – Hà Nội của Bệnh viện Y học cổ truyền Bộ Công an. Các mẫu được kí hiệu như sau: RM1, RM2, RM3, RM4.

Yêu cầu về mẫu lá và bảo quản: cắt những lá bánh tẻ, xanh và không bị sâu bệnh. Sau đó bảo quản mẫu lá trong túi nilon có chứa hạt hút ẩm silica gel, vận chuyển về phòng thí nghiệm và tiến hành tách chiết ADN ngay trong ngày.

### 2.2. Phương pháp tách chiết ADN hệ gen

ADN hệ gen được tách chiết theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) của Saghai Maroof và cộng sự (1984) với một sự thay đổi nhỏ. Khoảng 100 mg mô lá được nghiền bằng cối chày sứ trong 600  $\mu$ l đệm CTAB (2% CTAB, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% beta-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl pH 8.0). Mẫu được chuyển vào ống ly tâm 1,5 ml và ủ ở 65°C trong bể ổn nhiệt 30 phút, sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng và được chiết xuất cùng với một thể tích chloroform:isoamylalcohol (tỷ lệ thể tích là 24:1). Các mẫu được ly tâm ở 10.000 vòng/phút, trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Pha trên của dung dịch được chuyển sang ống ly tâm 1,5 ml mới. ADN được kết tủa bằng cách thêm 500  $\mu$ l isopropanol lạnh, để lạnh -20°C trong 1 giờ và ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút ở 4°C, trong 15 phút. ADN tủa sau đó được rửa sạch bằng cồn 70%. Làm khô tủa ADN và hòa

tan ADN trong 100 µl H<sub>2</sub>O deion. Bảo quản mẫu ADN ở nhiệt độ -20°C.

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

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR TC1000-G (Biologix) với thành phần bao gồm: 10µl PCR master mix 2X, 10µM mỗi xuôi và 10µM mỗi ngược, 50ng ADN khuôn, bổ sung H<sub>2</sub>O deion tới 20µl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95°C trong

5 phút; 35 chu kỳ lặp lại của ba bước 95°C – 30 giây, 51°C-60°C (tùy môi) – 30 giây, 72°C – 1 phút; kết thúc tổng hợp ở 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Tên môi, trình tự nucleotide các môi ADN mã vạch và nhiệt độ gắn môi của các môi sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

**Bảng 1. Danh sách và trình tự nucleotide của các cặp môi**

Gen	Kí hiệu môi	Trình tự môi (5'-3')	Ta (°C)	Kích thước đoạn gen (bp)	Tham khảo
<i>ITS</i>	ITS_F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	60	800	Wen and Zimmer, 1996
	ITS_R	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC			
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH-psbA</i> _F	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	51	431	Sang et al., 1997
	<i>trnH-psbA</i> _R	GTTATGCATGAACGTAATGCTC			
<i>rcbL</i>	<i>rcbL</i> _F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	52	599	Kress and Erickson, 2007
	<i>rcbL</i> _R	GTAAAATCAAGTCCACCTCG			

Những sản phẩm PCR sau khi khuếch đại thành công sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit Purification Kit của hãng InTRON – Hàn Quốc.

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự nucleotide theo cả hai chiều xuôi và ngược. Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xác định bằng máy giải trình tự tự động dựa trên nguyên lý của Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

**2.4. Phương pháp phân tích dữ liệu mã vạch ADN (DNA barcode)**

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), Mega7 (Kumar et al., 2015), và các công cụ trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây quan hệ di truyền được xây dựng dựa trên phương pháp Neighbour Joining.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

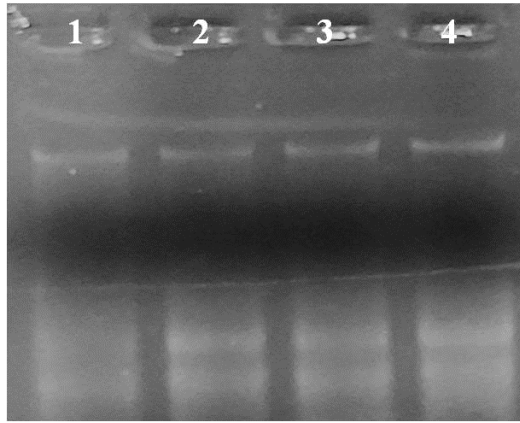
**3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số**

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các

mẫu lá được tách theo phương pháp CTAB của Shagai maroof và cộng sự (1984) có cải tiến cho phù hợp với tách chiết ADN của Râu mèo.

Sau khi tiến hành tách chiết, ADN tổng số được điện di trên gel agarose 1,0% để kiểm tra chất lượng và thu được kết quả như hình 2.

Kết quả điện di cho thấy các băng vạch ADN tổng số sáng nét, chứng tỏ ADN tổng số tách chiết được từ 04 mẫu lá Râu mèo không bị đứt gãy và nồng độ ADN tương đối cao (RM1: 181ng/µl, RM2: 347ng/µl, RM3: 272ng/µl, RM4: 318ng/µl). Độ tinh sạch của ADN tương đối cao (chỉ số A260/A280 dao động từ 1,7 đến 1,98). Mặt khác, trong mẫu ADN tổng số còn chứa một lượng ARN thể hiện ở các băng sáng mờ bên dưới của băng ADN tổng số. Nguyên nhân là do trong quá trình tách chiết, chúng tôi không xử lý RNase nên lượng ARN này vẫn lẫn vào cùng với ADN. Tuy nhiên, với phản ứng PCR thì lượng ARN này không ảnh hưởng đến kết quả nhân bản đặc hiệu.



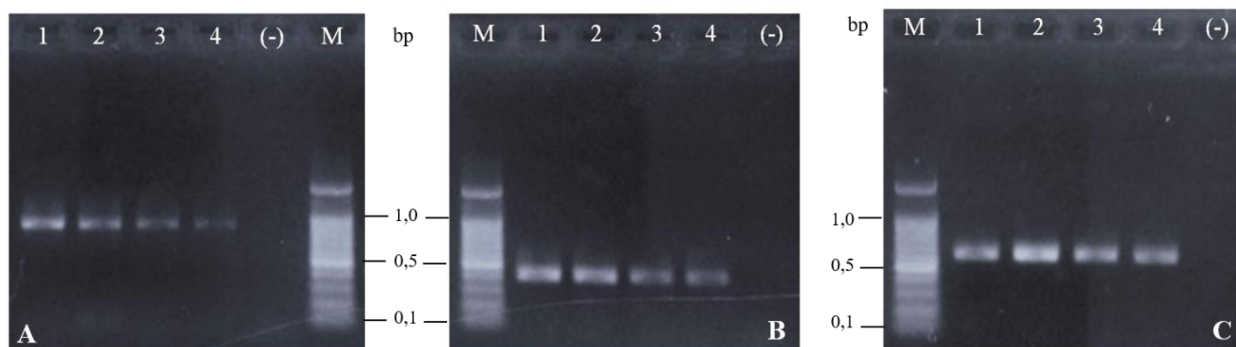
Hình 2. Kết quả điện di ADN tổng số của 4 mẫu Râu mèo RM1, RM2, RM3, RM4

### 3.2. Kết quả nhân gen với các đoạn mã vạch ADN bằng kỹ thuật PCR

Từ 4 mẫu ADN tổng số đã tách được, sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn để tiến hành phản ứng PCR nhân bản các đoạn ADN. Tuy nhiên, kết quả nhân bản cả ba đoạn trình tự ADN mã vạch đều không thành công. Do hàm lượng ADN tách chiết từ mẫu lá Râu mèo tương đối cao, chúng tôi tiến hành pha loãng nồng độ ADN khuôn ra 20 lần và 50 lần rồi tiến hành phản ứng PCR nhân bản các đoạn trình tự ADN mã vạch. Kết quả PCR cho thấy, với mẫu ADN tách từ Râu mèo đã pha loãng ra 50 lần thì phản ứng PCR thành công, ở nồng độ ADN không pha loãng và pha loãng 20 lần thì không cho kết quả PCR. Nguyên nhân có thể là do trong mẫu ADN của Râu mèo còn chứa một số hợp chất thứ cấp gây ức chế hoạt tính của enzyme polymerase và không nhân bản được đoạn gen mục tiêu. Chúng tôi tiến hành tách chiết ADN tổng số của Râu mèo song song với một loài cây được liệu khác, sau đó tiến hành PCR trong cùng điều kiện thì chỉ thấy mẫu của Râu mèo không thành công. Kết quả so sánh này có thể củng cố thêm cho nhận định rằng kết quả PCR không thành công ở Râu mèo là do sự ức chế của một số hợp chất thứ cấp chứ không phải do phương pháp tách chiết ADN. Ở độ pha loãng 50 lần thì kết quả PCR thu được một băng ADN duy nhất với kích thước tương ứng với kích thước dự kiến của mỗi đoạn gen, vì ở độ pha loãng này các hợp chất thứ cấp còn lẫn trong ADN tổng số gần như không còn đủ để gây ức chế enzyme polymerase nữa. Do đó, để thực hiện phản ứng PCR với các cặp mồi nghiên cứu, chúng tôi cần pha loãng ADN tổng số tách chiết được ra 50 lần. Sau khi điều chỉnh nồng độ

ADN phù hợp, tiến hành nhân bản 3 đoạn gen *ITS*, *trnH-psbA*, *rclL* từ 4 mẫu ADN tổng số của Râu mèo bằng phản ứng PCR với các cặp mồi tương ứng lần lượt là: *ITS\_F* và *ITS\_R*; *trnH-psbA\_F* và *trnH-psbA\_R*; *rclL\_F* và *rclL\_R*. Thực hiện phản ứng PCR lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu thí nghiệm. Sản phẩm PCR của tất cả các mẫu thí nghiệm được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,2%.

Qua hình 3A cho thấy kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, đoạn gen *ITS* khuếch đại thành công ở tất cả 04 mẫu Râu mèo. Ở các mẫu đều thu được một băng ADN sáng rõ nét, không có băng ADN phụ xuất hiện, kích thước khoảng 800bp phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen *ITS* dự kiến nhân bản. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy ở lần PCR thứ 2 và thứ 3. Kết quả này một lần nữa khẳng định chất lượng ADN khuôn có thể gây ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng nhân bản của phản ứng PCR, khi yếu tố ức chế được loại bỏ thì sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *ITS* rất đặc hiệu, có thể sử dụng trực tiếp sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide. Tác giả Lê Thanh Hương và cộng sự (2017) cũng sử dụng cặp mồi *ITS\_F/R* có trình tự giống với trình tự cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này nhưng trên một số đối tượng thuộc chi Nhân sâm cho thấy đoạn gen *ITS* ở chi Nhân sâm cũng có kích thước 800bp. Kết quả này tương tự như kết quả nhân bản đoạn *ITS* ở 04 mẫu Râu mèo. Điều này thể hiện rằng kích thước đoạn *ITS* là bảo thủ ở các loài thực vật khác nhau khi cùng sử dụng một cặp mồi để nhân bản. Tuy nhiên kết quả này chỉ giống nhau về kích thước, còn để khẳng định về sự đa dạng của trình tự nucleotide thì cần giải trình tự đoạn gen và phân tích so sánh.



**Hình 3. Kết quả PCR khuếch đại các đoạn ADN mã vạch ở 04 mẫu Râu mèo**

(A) Đoạn gen *ITS*, (B) Đoạn gen *trnH-psbA*, (C) Đoạn gen *rbcL*; các giếng 1, 2, 3, 4 tương ứng với các mẫu RM1, RM2, RM3, RM4; (-) Đối chứng âm (thay ADN khuôn bằng H<sub>2</sub>O); M: ADN marker 100 p

Gen *trnH-psbA* nằm trong lục lạp là một trong những gen để mã hóa các rARN, *trnH-psbA* được đánh giá là có khả năng xác định loài cao. Đoạn *trnH-psbA* có kích thước trung bình khoảng 431bp theo lý thuyết, nhưng trên thực tế có thể thay đổi từ 296 – 1120 bp tùy vào từng loài. Trong thí nghiệm này, ADN tổng số của 04 mẫu Râu mèo được dùng làm khuôn để nhân bản đoạn gen *trnH-psbA* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu với trình tự mồi được nêu ở bảng 1. Kết quả PCR cho thấy đoạn băng sáng rõ và đồng đều, không xuất hiện băng phụ (Hình 3B). Kích thước khoảng 450 bp, đủ điều kiện để tiến hành xác định trình tự nucleotide.

Trong các gen lục lạp thể, *rbcL* là trình tự gen đặc trưng nhất, mã hóa cho các tiểu đơn vị lớn của Rubilose-1,5-biphosphate cacboxylase/oxygenase (RUBISCO), *rbcL* là gen đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phát sinh loài thực vật với hơn 10000 trình tự *rbcL* có sẵn trong ngân hàng gen. Mã vạch *rbcL* bao gồm khu vực 599 ở cuối 5' của gen, nằm từ vị trí số 1 - 599 trong trình tự hệ gen lục lạp hoàn chỉnh của *Arabidopsis thaliana* (Wang et al., 2010). Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, đoạn gen *rbcL* khuếch đại thành công ở tất cả 04 mẫu Râu mèo. Ở các mẫu đều thu được một băng ADN sáng rõ nét, không có băng ADN phụ xuất hiện, kích thước khoảng 550 – 600 bp phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen *rbcL* dự kiến nhân bản (Hình 3C).

Trong nghiên cứu này, ba đoạn mã vạch đề xuất *trnH-psbA*, *rbcL* và *ITS* được khuếch đại bằng việc sử dụng các cặp mồi phổ quát cùng các thành phần và quy trình PCR được tối ưu hóa cho từng đoạn mã vạch. Sản phẩm PCR đặc hiệu của cả ba đoạn ADN mã vạch ở 04 mẫu

Râu mèo nghiên cứu chứng tỏ sự hiệu quả trong tối ưu hóa thiết kế mồi và quy trình PCR.

### 3.3. Phân tích trình tự nucleotide các đoạn ADN mã vạch

Với cách lựa chọn bốn mẫu Râu mèo cùng ba lần lặp lại ở mỗi mẫu, tổng cộng thu được 12 trình tự nucleotide cho một đoạn mã vạch ADN đề xuất. Chất lượng trình tự nucleotide là cao ở tất cả các mẫu, tỷ lệ giải trình tự nucleotide thành công là 100%. Các trình tự này sau đó được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.2.5. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của 3 chỉ thị ADN mã vạch *ITS*, *trnH-psbA* và *rbcL* có kích thước tương ứng là 775 bp, 374 bp và 574 bp.

Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *ITS* có kích thước khoảng 800bp. Tuy nhiên, sau khi giải trình tự nucleotide phân hai đầu của đoạn gen *ITS* có chất lượng giải trình tự không tốt nên chúng tôi chỉ sử dụng đoạn trình tự có kích thước 775bp để phân tích và so sánh. Trình tự nucleotide của đoạn gen *ITS* tương đồng 100% đối với tất cả 04 mẫu Râu mèo nghiên cứu, do đó mẫu RM3 được chọn làm mẫu đại diện cho cả 04 mẫu Râu mèo. Kết quả này cho thấy các mẫu Râu mèo không có sự đa hình về trình tự đoạn gen *ITS*. Đây là kết quả hoàn toàn có thể tin cậy được vì vùng *ITS* được xem là vùng bảo thủ bên trong loài và tương đối bảo thủ giữa các loài. Trình tự nucleotide của đoạn gen *ITS* của mẫu Râu mèo nghiên cứu được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế với mã số MW315930.

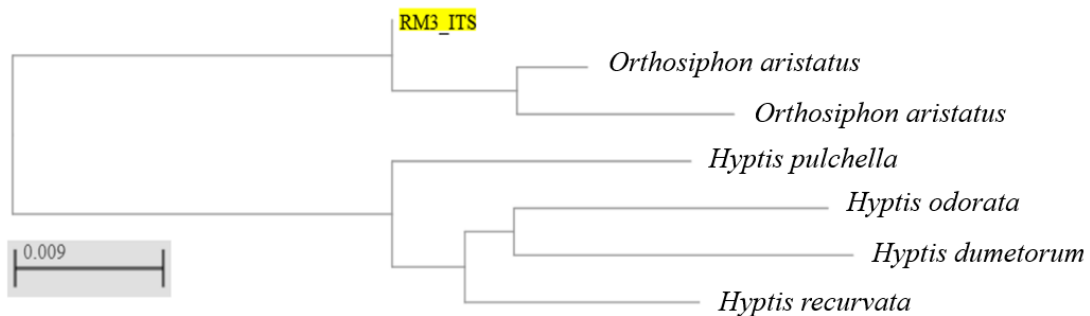
Kết quả xác định trình tự đoạn gen *trnH-psbA* thu được một đoạn có kích thước 374 bp (sau khi đã loại bỏ hai đầu của trình tự do chất

lượng giải trình tự không tốt). Trình tự nucleotide của đoạn gen *trnH-psbA* tương đồng 100% đối với tất cả 04 mẫu Râu mèo nghiên cứu, do đó mẫu RM3 được chọn làm mẫu đại diện cho cả 04 mẫu Râu mèo. Trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA* của Râu mèo được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế với mã số MW789615.

Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *rbcL* có kích thước khoảng 599 bp. Tuy nhiên, sau khi giải trình tự nucleotide, kết quả thu được một đoạn trình tự *rbcL* có kích thước 574 bp. Nguyên nhân là do phần hai đầu của đoạn gen *rbcL* có chất lượng giải trình tự không tốt nên chúng tôi chỉ sử dụng đoạn trình tự có kích thước 574 bp để phân tích và so sánh. Trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL* tương đồng 100% đối với tất cả 04 mẫu Râu mèo nghiên cứu, do đó mẫu RM3 được chọn làm mẫu đại diện cho cả 04 mẫu Râu mèo. Kết quả này cho thấy các mẫu Râu mèo không có sự đa hình về trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL*. Trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL* đặc trưng cho mẫu Râu mèo tại Ba Vì được đăng ký lên ngân hàng gen quốc tế với mã số MW789616.

### 3.4. Xây dựng cây quan hệ di truyền

Sử dụng công cụ BLAST trên NCBI để so



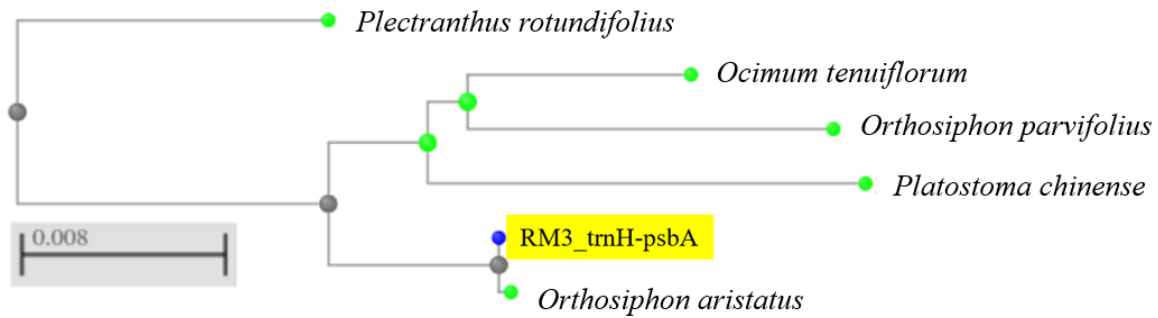
Hình 4. Cây quan hệ di truyền của loài Râu mèo với 06 loài có trình tự *ITS* tương đồng trên ngân hàng gen quốc tế NCBI

So sánh trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của mẫu Râu mèo với các trình tự tương đồng trên ngân hàng gen cho thấy mẫu Râu mèo tương đồng 99,7% với loài Râu mèo có tên khoa học là *Orthosiphon aristatus* và một số loài cùng thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae). Lựa chọn 06 loài có độ tương đồng về trình tự đoạn gen *trnH-psbA* cao nhất với mẫu Râu mèo nghiên cứu, chúng tôi xây dựng cây quan hệ di truyền giữa 07 mẫu như hình 5. Kết quả so sánh trình tự

so sánh trình tự đoạn gen *ITS* của mẫu Râu mèo với các trình tự tương đồng trên ngân hàng gen cho thấy mẫu Râu mèo tương đồng 100% với loài Râu mèo có tên khoa học là *Orthosiphon aristatus* và một số loài cùng thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae). Lựa chọn 06 loài có độ tương đồng về trình tự đoạn gen *ITS* cao nhất với mẫu Râu mèo nghiên cứu, chúng tôi xây dựng cây quan hệ di truyền giữa 07 mẫu như hình 3.

Kết quả so sánh trình tự đoạn gen *ITS* ở mẫu Râu mèo với trình tự đoạn gen *ITS* của loài *O. aristatus* (FJ593403.1) cho thấy mức độ tương đồng đạt 100%. Mẫu Râu mèo nghiên cứu cũng có quan hệ gần với một số loài thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae): *Hyptis pulchella* (JF301473.1), *Hyptis odorata* (JF301517.1), *hyptis dumetorum* (JF301466.1), *Hyptis recurvata* (JF301474.1). Hình 4 thể hiện mối quan hệ di truyền rất gần của mẫu Râu mèo nghiên cứu với loài *Orthosiphon aristatus* trên ngân hàng gen Quốc tế (được nhóm thành một nhóm trên cây quan hệ di truyền với khoảng cách di truyền < 0,009), một nhóm khác gồm 04 loài thuộc họ Bạc hà. Từ kết quả này có thể kết luận mẫu Râu mèo nghiên cứu có tên khoa học là *Orthosiphon aristatus* khi sử dụng chỉ thị ADN mã vạch là đoạn trình tự *ITS*.

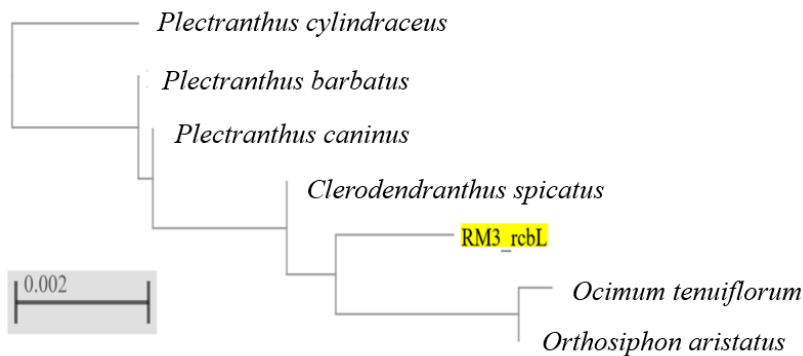
đoạn gen *trnH-psbA* ở mẫu Râu mèo với trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của loài *Orthosiphon aristatus* (LC456393.1) cho thấy mức độ tương đồng đạt 99,7% và sự sai khác chỉ ở 01 nucleotide. Mẫu Râu mèo nghiên cứu cũng có quan hệ gần với một số loài thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae) như sau: *Platostoma chinense* (MT328397.1), *Ocimum tenuiflorum* (MF457806.1), và loài *Plectranthus rotundifolius* (MH043962.1).



**Hình 5. Cây quan hệ di truyền của loài Râu mèo với 05 loài có trình tự *trnH-psbA* tương đồng trên ngân hàng gen quốc tế NCBI**

Trình tự đoạn gen *rbcL* của mẫu Râu mèo được so sánh với các trình tự tương đồng trên ngân hàng gen Quốc tế cho thấy mẫu Râu mèo tương đồng 99,27% với loài Râu mèo có tên khoa học là *Orthosiphon aristatus* và một số loài cùng thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae). 06 loài có độ tương đồng về trình tự đoạn gen *rbcL* cao nhất với mẫu Râu mèo nghiên cứu được lựa chọn để xây dựng cây quan hệ di truyền giữa 07 mẫu như hình 6. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen *rbcL* ở mẫu Râu mèo với trình tự đoạn gen *rbcL* của loài *Orthosiphon aristatus* (LC456392.1) cho thấy mức độ tương đồng đạt 99,27% và có 04 vị trí nucleotide sai khác. Mẫu Râu mèo nghiên cứu cũng có quan hệ gần với

một số loài thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae): *Plectranthus cylindraceus* (MK285269.1), *Plectranthus barbatus* (JQ230987.1), *Plectranthus caninus* (IQ072901.1), *Cleodendranthus spicatus* (FJ513156.1), *Ocimum tenuiflorum* (KF381105.1). Tuy nhiên, khi xây dựng cây quan hệ di truyền dựa trên các trình tự tương đồng trên ngân hàng gen Quốc tế thì mẫu Râu mèo nghiên cứu lại không thể hiện được mối quan hệ gần gũi với trình tự của loài *Orthosiphon aristatus* (LC456392.1). Điều này cho thấy, đối với đoạn trình tự *rbcL* thì hiệu quả giám định loài Râu mèo không chính xác như trình tự *ITS* và *trnH-psbA*.



**Hình 6. Cây quan hệ di truyền của loài Râu mèo với 06 loài có trình tự *rbcL* tương đồng trên ngân hàng gen quốc tế NCBI**

Từ các kết quả so sánh và xây dựng cây quan hệ di truyền của mẫu Râu mèo nghiên cứu dựa trên 03 chỉ thị ADN mã vạch là *ITS*, *trnH-psbA* và *rbcL* có thể khẳng định loài Râu mèo nghiên cứu có tên khoa học chính xác là *Orthosiphon aristatus*. Những đặc điểm về hình thái của các mẫu Râu mèo cũng bước đầu khẳng định đó là loài *Orthosiphon aristatus*, tuy nhiên phương pháp ADN mã vạch dựa trên sự tiến hóa về trình tự nucleotide đã góp phần khẳng định cho kết quả

giám định này. Sử dụng riêng rẽ một trình tự ADN mã vạch có thể chưa đạt được độ chính xác mà có thể kết hợp nhiều trình tự ADN mã vạch với nhau. Việc sử dụng các chỉ thị phân tử để định danh loài nói chung và thực vật nói riêng đã chứng minh có độ tin cậy rất cao và khi được kết hợp với các phương pháp định danh truyền thống thì độ chính xác có thể đạt đến 100%.

**3.5. So sánh hiệu quả giám định loài của ba trình tự ADN mã vạch *ITS*, *trnH-psbA*, và *rbcL***

Thành công của khuếch đại PCR cùng với xác định được trình tự nucleotide là một tiêu chí quan trọng để đánh giá hiệu quả của từng chỉ thị ADN mã vạch trong nghiên cứu giám định loài Râu mèo.

Dựa vào kết quả so sánh trình tự các đoạn gen *ITS*, *trnH-psbA* và *rbcL* của loài Râu mèo nghiên cứu (*Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq.) với trình tự gen của loài *Orthosiphon aristatus* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI, ta lập được bảng so sánh khả năng giám định loài của đoạn trình tự *ITS*, *trnH-psbA* và *rbcL* như bảng 2.

Kết quả phân tích cho thấy khi so sánh trình tự các đoạn gen *ITS*, *trnH-psbA* và *rbcL* của mẫu Râu mèo (*Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq.) với loài *Orthosiphon aristatus* thuộc chi *Orthosiphon* công bố trên ngân hàng gen quốc

tế NCBI, trình tự đoạn gen *ITS* không có điểm sai khác, trình tự đoạn gen *psbA – trnH* có 1 điểm sai khác và trình tự đoạn gen *rbcL* có 4 điểm sai khác. Tỷ lệ sai khác của trình tự *rbcL* là cao nhất (0,69%) do đó khả năng giám định loài của chỉ thị *rbcL* cũng là thấp nhất, tỷ lệ sai khác của trình tự *trnH-psbA* đứng thứ hai (0,26%) cho thấy hiệu quả giám định loài Râu mèo của trình tự này tốt thứ hai, tỷ lệ sai khác của trình tự *ITS* là thấp nhất (0%) đồng nghĩa với khả năng giám định loài tốt nhất. Do đó, hiệu quả giám định loài Râu mèo của các trình tự ADN mã vạch được sắp xếp theo thứ tự sau: *ITS* > *trnH-psbA* > *rbcL*. Như vậy, đối với loài Râu mèo (*Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq.) thì trình tự *ITS* là trình tự ADN mã vạch có khả năng định danh loài tốt nhất trong số 3 trình tự ADN mã vạch sử dụng trong nghiên cứu.

**Bảng 2. Bảng so sánh kết quả giám định loài Râu mèo của các đoạn trình tự ADN mã vạch**

Chỉ tiêu phân tích	<i>ITS</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>
Tỷ lệ PCR thành công (%)	100	100	100
Tỷ lệ đọc trình tự thành công (%)	100	100	100
Chiều dài đoạn trình tự so sánh (bp)	775	374	574
Số nucleotide sai khác	0	1	4
Tỷ lệ sai khác (%)	0	0,26	0,69

#### 4. KẾT LUẬN

- Đã xác định được 03 trình tự ADN mã vạch cho loài Râu mèo là trình tự *rbcL*, *ITS*, và *trnH-psbA*. Các trình tự nucleotide đều được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế với mã số lần lượt như sau: *rbcL* với mã số MW789616, *ITS* với mã số MW315930, *trnH-psbA* với mã số MW789615.

- Đánh giá được hiệu quả giám định loài Râu mèo dựa vào 03 trình tự ADN mã vạch theo thứ tự sau: *ITS* > *trnH-psbA* > *rbcL*

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Trung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004) Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. *NXB Khoa học và kỹ thuật*.
2. Võ Văn Chi (2012) Từ điển Cây thuốc Việt Nam-tập 2. *NXB Y học*
3. Đỗ Tất Lợi (2012) Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. *NXB Y Học*
4. Lê Thanh Hương, Nguyễn Nhật Linh, Bùi Mạnh

Ninh, Hà Hồng Hạnh, Huỳnh Thị Thu Huệ, Nông Văn Hải, Hà Văn Huân, Lê Thị Thu Hiền (2017) Ứng dụng mã vạch DNA hỗ trợ định loại loài một số mẫu Sâm thuộc chi Nhân sâm (*Panax L.*). *Tạp chí Công nghệ sinh học* 15 (1), 63-72.

5. Đặng Uy Nhân (2010) Khảo sát thành phần hóa học lá cây Râu mèo (*Orthosiphon stamneus* Benth) họ Hoa môi (Lamiaceae) được trồng ở miền Trung Việt Nam. Báo cáo nghiệm thu đề tài NCKH- Đại học Quốc gia TP.HCM.

6. Phạm Thị Thúy, Vũ Văn Thông, Vũ Phạm Thảo Vy (2019) Định lượng một số hợp chất trong dược liệu Râu mèo (*Orthosiphon stamneus* Benth) thu hái tại tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và công nghệ - ĐH Thái Nguyên* 1: 194

7. Baharum S.N. (2012) Application of 16s rDNA DNA cytochrome b ribosomal markers in studies of lineage ADN fish populations structure of aquatic species. *Molecular biology reports* 39 (5): 5225-5232.

8. Chase M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M., Berg C.V.D., Madriñán S., Petersen G., Seberg O., Jørgensen T., Cameron K.M., Carine M., Pedersen N., Hedderson T.A.J., Conrad F., Salazar G.A., Richardson J.E., Hollingsworth M.L., Barraclough T.G., Kelly L., Wilkinson M. (2007) A proposal for a st ADN ardised protocol to barcode all ADN plants. *Taxon* 56 (2): 295-299.



9. 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.
10. Chiou S.J., Yen J.H., Fang C.L., Chen H.L., Lin T.Y. (2007) Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta medica* 73 (13): 1421 – 1426.
11. Dong W., Xu C., Li C., Sun J., Zuo Y., Shi S., Cheng T., Guo J., Zhou S. (2015) *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific report*, 12/2/2015.
12. Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
13. Hall T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
14. Hollingsworth M.L., Clark A. (2009) Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* 9 (2): 439-457.
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
16. Kress W.J., Erickson D.L. (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.
17. Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81: 8014–8019.
18. Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84: 1120-1136.
19. Schoch C.L., Seifert K.A. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241- 6246.
20. Wang W., Wu Y., Yan Y., Ermakova M., Kerstetter R. (2010) DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biology* 10: 205
21. Wen J, Zimmer EA (1996) Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 6(2): 167-177
22. Yu, J., Xue J.H., Zhou S.L. (2011) New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution* 49 (3): 176-181.

## DETERMINATION OF SOME ADOPTED BARCODE DNA SEQUENCES FOR IDENTIFICATION OF *Orthosiphon aristatus* (Blume.) Miq.

Ha Bich Hong<sup>1</sup>, Chu Sy Cuong<sup>2</sup>, Nguyen The Huong<sup>1</sup>, Nguyen Van Viet<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Traditional Medicine Hospital, Ministry of Public Security

### SUMMARY

In addition to the traditional methods based on morphology, physiology, and biochemistry, a number of molecular identification methods are also used very effectively in species identification. In which, DNA barcoding is a molecular identification method used to assist in the identification of morphologically difficult species of animals and plants or processed specimens. For plants, the DNA sequences used as barcodes in identification or taxonomy are usually those of the chloroplast genome and the nuclear genome, including the coding regions and the non-coding regions. In this study, three DNA barcode sequences, *rbcL*, *ITS*, and *trnH-psbA*, were used to evaluate the ability to distinguish *Orthosiphon aristatus* species. Results of PCR cloning, nucleotide sequencing, analysis, and comparison of DNA barcode sequences in *Orthosiphon aristatus* with species of the same genus *Orthosiphon* showed that *ITS* had the highest similarity with that of *Orthosiphon aristatus* species on international genbank (100%). Followed by *trnH-psbA* sequence with 99.74% and finally *rbcL* with 99.31%. The tree diagram showing the phylogenetic relationship shows that the *Orthosiphon aristatus* samples most similarly with *Orthosiphon aristatus*, this result is similar to the results of the examination of the *Orthosiphon aristatus* samples based on morphology. The result shows that the use of DNA barcode sequences to identify species at the molecular level is very effective, using each barcode DNA sequence separately or a combination of several sequences is capable of identifying species. However, using a combination of DNA barcode sequences together increases the reliability of the assessment results.

**Keywords:** DNA barcode, *ITS*, *Orthosiphon aristatus*, *rbcL*, *trnH-psbA*.

Ngày nhận bài : 11/3/2021

Ngày phản biện : 22/4/2021

Ngày quyết định đăng : 29/4/2021