

# NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐOẠN ADN MÃ VẠCH CHO DÂY THÌA CANH (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Nguyễn Văn Việt<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>1</sup>, Đào Thị Thúy Hằng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

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

## TÓM TẮT

Việt Nam là quốc gia có nguồn tài nguyên đa dạng và phong phú với rất nhiều loài động vật, thực vật và nấm có giá trị kinh tế cao. Trước đây, các phương pháp định danh và phân loại thực vật chủ yếu dựa vào hình thái giải phẫu sinh học. Tuy nhiên, việc dựa vào hình thái để phân loại gặp nhiều khó khăn, đặc biệt là tốn kém về mặt thời gian, công sức và kinh phí. Hiện nay, phương pháp định danh loài sử dụng các chỉ thị phân tử ADN được ứng dụng rộng rãi. Trong đó, ADN mã vạch được xem là phương pháp hiện đại và chính xác để định danh các loài sinh vật khi sử dụng những vùng ADN cả ở trong nhân, ty thể và lục lạp thể. Trong nghiên cứu này, phương pháp ADN mã vạch (DNA barcoding) đã được thử nghiệm cho nhận dạng loài Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br). Ba mã vạch ADN được đề xuất cho nghiên cứu thuộc vùng ADN lục lạp và ADN nhân (*psbA-trnH*, *trnL* và *ITS1*). Tỷ lệ thành công cho khuếch đại PCR cho ba đoạn mã vạch là 100%. Tỷ lệ Giải trình tự nucleotide thành công cả hai chiều của sản phẩm PCR là 100% với kích thước lần lượt là 565 bp, 567 bp và 767 bp cho *psbA-trnH*, *trnL* và *ITS1*. Phân tích BLAST và ClustalW2 chỉ ra khả năng phân biệt ở mức độ loài của ba đoạn mã vạch đề xuất là: *psbA-trnH* > *ITS1* > *trnL*. Cuối cùng, sự tổ hợp hai mã vạch *psbA-trnH* và *ITS1* được lựa chọn cho nhận dạng loài Dây thìa canh.

**Từ khóa:** Dây thìa canh, giám định loài, *ITS1*, mã vạch ADN, *psbA-trnH*, *trnL*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia có nguồn tài nguyên đa dạng và phong phú với rất nhiều loài động vật, thực vật và nấm có giá trị kinh tế cao. Trong đó, giới thực vật có tính đa dạng rất cao về loài. Đến nay có 350.000 loài thực vật đã được định dạng. Trước đây, các phương pháp định danh và phân loại thực vật chủ yếu dựa vào hình thái sinh học là chính. Tuy nhiên việc dựa vào hình thái để phân loại gặp nhiều khó khăn như: Các giai đoạn phát triển của thực vật khác nhau, thu mẫu rời rạc hay những mẫu vật không nguyên vẹn dẫn đến những khó khăn nhất định trong công tác phân loại đặc biệt là tốn kém về mặt thời gian, công sức, kinh phí...

DNA barcoding là một phương pháp định danh và giám định loài dựa trên các trình tự ADN ngắn ở những vùng chuẩn hóa của ADN hệ gen (Hebert và cộng sự, 2003). Ở thực vật, việc nghiên cứu truy tìm những vùng ADN hệ gen thích hợp được chứng minh là thách thức hơn so với động vật. Một vài vùng trong bộ gen lục lạp (Ví dụ như: *trnL*, *rpoC1*, *rpoB*, *ycf5*, *psbA-trnH*, *trnL*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*) cũng như vùng đệm trong được sao chép (internal transcribed spacer - ITS) của ADN ribosome nhân đã nổi lên như là ứng viên tốt nhất cho mã vạch ADN thực vật (Chase và cộng sự, 2005; Kress và cộng sự, 2005; Shaw và cộng sự, 2007; Kress và cộng sự, 2007;

Taberlet và cộng sự, 2007; Lahaye và cộng sự, 2008; Ford và cộng sự, 2009; Nguyễn Văn Việt và cộng sự, 2016).

Dây thìa canh là một trong những cây thuốc có giá trị kinh tế cao, sản phẩm từ các bộ phận lá, thân, rễ của Dây thìa canh được dùng trong y dược có tác dụng giảm cholesterol, hạ lipid và đường huyết trong máu; phòng chống xơ vữa động mạch và những tai biến nguy hại do tiểu đường gây ra (Đỗ Tất Lợi, 2012). Tuy nhiên, hiện nay với nhu cầu sử dụng dược liệu có nguồn gốc từ thiên nhiên ngày càng cao thì việc định danh và truy xuất nguồn gốc của dược liệu ngày càng cấp thiết, đặc biệt là những loài cây dược liệu quý, có giá trị sử dụng lớn như Dây thìa canh.

Trong bài báo này, phương pháp ADN mã vạch (DNA barcoding) đã được thử nghiệm cho nhận dạng Dây thìa canh. Ba mã vạch ADN được đề xuất cho nghiên cứu thuộc vùng ADN lục lạp (*trnL* và *psbA-trnH*) và ADN nhân (*ITS1*). Những mã vạch này đã được chứng minh là có khả năng nhận dạng cao giữa các loài và biến thể thấp trong loài (Chen và cộng sự, 2010; Pang và cộng sự, 2012). Mục đích của nghiên cứu này là đưa ra được một mã vạch ADN đặc trưng cho việc nhận dạng loài Thìa canh nêu trên.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Lựa chọn và cách lấy mẫu

Chọn 15 mẫu lá tươi từ 5 cá thể Dây thìa

canh được thu thập tại Trại giam Suối Hai, Ba Vì, Hà Nội. Kí hiệu là TC<sub>1</sub>, TC<sub>2</sub>, TC<sub>3</sub>, TC<sub>4</sub>, TC<sub>5</sub>. Mẫu lá tươi ngay sau đó được cho vào túi Ziplock chứa silicagel và chuyển về phòng thí nghiệm lưu trữ ở -80<sup>0</sup>C cho đến khi ADN được tách chiết. Tất cả các mẫu lá thu thập cho mục đích nghiên cứu đã được định danh cùng các tiêu bản mẫu cây chuẩn hóa.

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

ADN hệ gen được tách chiết theo phương pháp CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) của Sanghai Maroof và cộng sự (1984) với một sự thay đổi nhỏ. Khoảng 100 mg mô lá được nghiền trong cối bằng chày sứ trong 600 ml đệm CTAB (4% CTAB thay vì 2%, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% beta-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl pH 8.0). Mẫu được chuyển vào ống ly tâm 1,5 ml và ủ ở 65<sup>0</sup>C trong bể ổn nhiệt 30 phút, sau đó được chiết xuất cùng với một thể tích chloroform. Các mẫu được ly tâm ở 10.000 vòng/phút, trong 15 phút. Pha trên của dung dịch được chuyển sang ống ly tâm 1,5 ml mới. ADN được kết tủa bằng cách thêm 500 µl isopropanol lạnh và ly tâm ở 10.000

vòng/phút, trong 15 phút. ADN kết tủa sau đó được rửa sạch bằng cồn 70%. Làm khô và hòa tan ADN trong 100 µl đệm TE.

**2.3. Phương pháp khuếch đại PCR và đọc trình tự**

Ba chuỗi ADN mã vạch là *ITS1*, *trnL* và *psbA-trnH* được khuếch đại bằng máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ). Hỗn hợp phản ứng PCR (25µl) gồm: 2,5 µl đệm 10X Taq, 2,0 µl hỗn hợp dNTP (2,0 mM), 1,0 µl cho mỗi cặp mồi (10 µM), 0,5 µl cho 5 U/µl Taq DNA polymerase, 1 µl ADN khuôn (50 ng/µl) và H<sub>2</sub>O cho tổng thể tích đạt là 25 µl. Chu kỳ nhiệt cho PCR: 95<sup>0</sup>C trong 3 phút; (95<sup>0</sup>C: 30 giây, 57<sup>0</sup>C - 62<sup>0</sup>C: 30 giây, 72<sup>0</sup>C: 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72<sup>0</sup>C trong 7 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4<sup>0</sup>C. Sản phẩm PCR được đọc trên gel agarose 1%. Trình tự nucleotide của mồi cho ba vùng ADN được thể hiện ở bảng 1. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Kit của hãng Norgen biotek, Canada. Trình tự nucleotide được đọc trên máy ABI PRISM@3730xl DNA Analyzer (ABI, Foster City, CA, USA).

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

Gen	Kí hiệu mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước theo lý thuyết	Nhiệt độ gắn mồi (°C)
<i>ITS1</i>	P12F	GGGTTCAAACGCTCGCTCGA	700 bp	58
	P12R	AGAATCGGGCGGCTCCGCCG		
<i>psbA-trnH</i>	P10F	GGAAATTATGAGCATTAGTGAATCAC	450 bp	56
	P10R	GCATTACGTTTCATTGCATAAACA		
<i>trnL</i>	P11F	CTTGCACCCCTTCTATCCCCATCTA	570 bp	58
	P11R	TCCGTAGCGTCAACCCGATTTCGA		

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

Trình tự nucleotide của các đoạn ADN mã vạch thu được xử lý bằng các phần mềm Bioedit version 7.2.5, Clustal X 1.83 và công cụ BLAST (Basic local Alignment Search Tool) trên NCBI (National Center for Biotechnology Information) tại địa chỉ website:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

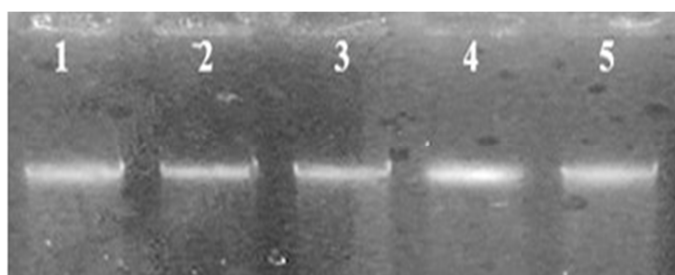
**3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số**

ADN được tách chiết theo phương pháp CTAB của Sanghai Maroof và cộng sự (1984)

đã chứng tỏ là một quy trình có hiệu quả để phân lập ADN thực vật. Cách tiếp cận này là phổ biến đối với chiết xuất ADN từ các loài thực vật có chứa hàm lượng cao polysaccharide, cũng như các hợp chất polyphenol, tannin, flavonoid (Ghaffariyan và cộng sự, 2012). Trong nghiên cứu này, ADN cũng được chiết xuất thành công từ tất cả các mẫu nghiên cứu (Hình 1). Băng ADN thu được tương đối gọn, tập trung phía trên đầu giếng và cũng không xuất hiện vệt sáng trong giếng của bản gel agarose 1%. Những đặc điểm này chứng minh rằng ADN tổng số thu được có kích thước lớn, không lẫn protein, đủ

điều kiện làm ADN khuôn cho nhân bản ba đoạn mã vạch ADN đề xuất, đặc biệt khi tất

cả các đoạn ADN mã vạch này đều nằm ở 2 vùng ADN lục lạp và 1 vùng ADN nhân.



Hình 1. Kết quả điện di ADN tổng số của 5 mẫu Dây thìa canh

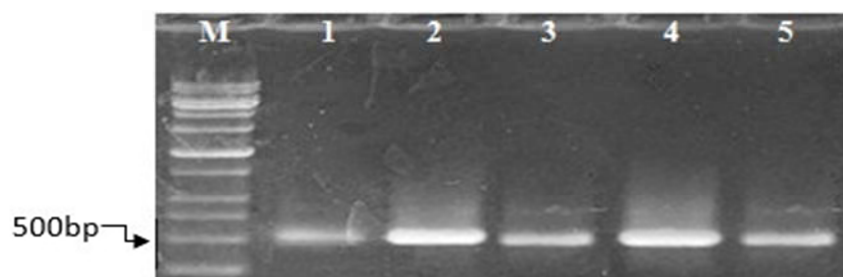
Ghi chú: Giếng từ 1 – 5: mẫu TC<sub>1</sub> – TC<sub>5</sub>

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

Từ 5 mẫu ADN tổng số đã tách được, sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn để tiến hành PCR nhân bản các đoạn ADN. Mẫu ADN tổng số được pha loãng 10 lần (điều chỉnh nồng độ ADN đạt 50 ng/μl). Sau khi điều chỉnh nồng độ ADN phù hợp, tiến hành nhân bản 3 đoạn gen *psbA-trnH*, *trnL* và *ITS1* từ ADN tổng số của 5 mẫu Dây thìa canh bằng phản ứng PCR với các cặp mồi tương ứng lần lượt là: *psbA-trnH*-P10F và *psbA-trnH*-P10R; *trnL*-P11F và *trnL*-P11R; *ITS1*-P12F và *ITS1*-P12R. 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%. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ 5 mẫu Dây thìa canh được thể hiện trên hình 2, 3 và 4.

#### 3.2.1. Kết quả nhân gen *psbA-trnH* bằng kỹ thuật PCR

Đoạn *psbA-trnH* có kích thước trung bình khoảng 450 bp theo lý thuyết, nhưng trên thực tế có thể thay đổi từ 296 - 1120 bp tùy thuộc loài. *psbA-trnH* có khả năng xác định loài cao. Locus *psbA-trnH* đã được khuếch đại thành công ở nhiều thực vật hạt kín và hạt trần. Tuy nhiên, trong nhiều thực vật hạt kín *psbA-trnH* lại có kích thước rất ngắn. Kích thước của gen này khá lớn do có mặt của gen *rps19* hoặc các gen giả nằm giữa cùng gen của hai gen *psbA* và *trnH*. Trong thí nghiệm này, ADN tách chiết được làm khuôn để nhân bản đoạn gen *psbA-trnH* 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. Kích thước khoảng 500 bp, đủ điều kiện để tiến hành xác định trình tự nucleotide.



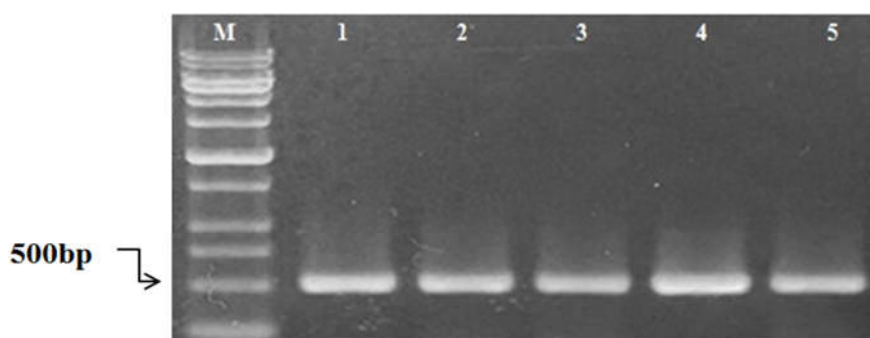
Hình 2. Kết quả nhân đoạn gen *psbA-trnH* từ các mẫu Dây thìa canh bằng mồi P10

Ghi chú: M: marker 1000bp; giếng từ 1 – 5: mẫu TC<sub>1</sub> – TC<sub>5</sub>

#### 3.2.2. Kết quả nhân gen *trnL* bằng kỹ thuật PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, đoạn gen *trnL* khuếch đại thành công ở tất cả các mẫu. Ở các mẫu đều thu được một băng ADN sáng rõ nét, không có băng ADN phụ xuất hiện, kích thước khoảng 500 - 550 bp phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen *trnL* dự kiến nhân bản. Kết quả này một lần

nữa khẳng định chất lượng và kích thước đủ lớn cũng như không lẫn các tạp chất (polysacarit, phenol) gây ảnh hưởng đến nhân dòng PCR, điều đó cho thấy sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *trnL* rất đặc hiệu, có thể sử dụng trực tiếp sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide.



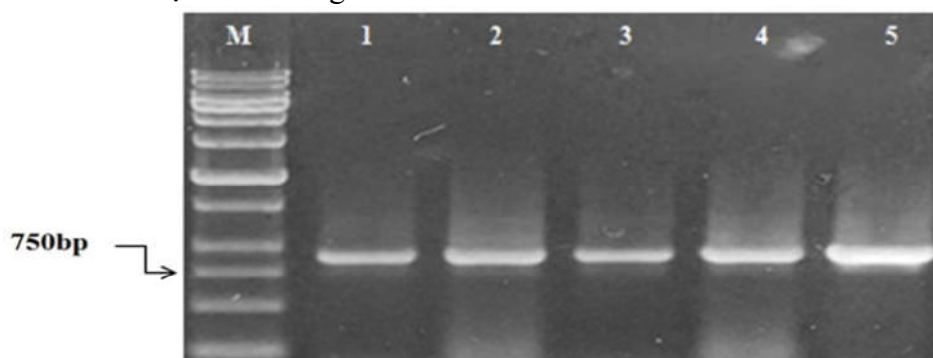
Hình 3. Kết quả nhân đoạn gen *trnL* từ các mẫu Dây thìa canh bằng môi P11

Ghi chú: M: marker 1000bp; giếng từ 1 - 5: mẫu TC<sub>1</sub> - TC<sub>5</sub>

### 3.2.3. Kết quả nhân bản gen *ITS1* bằng kỹ thuật PCR

Kết quả nhân bản gen *ITS1* bằng kỹ thuật PCR với cặp môi đặc hiệu như mô tả ở bảng 1, được thể hiện ở hình 4. Qua hình 4 cho thấy đoạn gen *ITS1* khuếch đại thành công ở tất cả

các mẫu. Các mẫu đều thu được một băng ADN sáng rõ nét, không có băng ADN phụ xuất hiện, kích thước khoảng 700 - 750 bp phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen *ITS1* dự kiến nhân bản.



Hình 4. Kết quả nhân đoạn gen *ITS1* từ các mẫu Dây thìa canh dùng môi P12

Ghi chú: M: marker 1000 bp; giếng từ 1 - 5: mẫu TC<sub>1</sub> - TC<sub>5</sub>

Thành công của khuếch đại PCR cùng xác định được trình tự là một tiêu chí quan trọng để đánh giá tính hữu ích của ADN mã vạch. Trong nghiên cứu này, ba đoạn mã vạch đề xuất *psbA-trnH*, *trnL* và *ITS1* được khuếch đại bằng việc sử dụng các cặp môi phổ quát cùng các thành phần và quy trình PCR được tối ưu hóa cho từng đoạn mã vạch. Tất cả các đoạn ADN mã vạch trên đều được khuếch đại thành công ở tất cả 5 mẫu nghiên cứu (Hình 2, 3 và 4). Tỷ lệ thành công cho khuếch đại PCR cho ba đoạn mã vạch là 100%. Tỷ lệ giải trình tự thành công cả hai chiều sản phẩm PCR đạt được là 100% cho ba đoạn ADN mã vạch. Kết quả này một lần nữa khẳng định số lượng và chất lượng của ADN được tách chiết từ mẫu ban đầu để làm khuôn cho phản ứng nhân dòng gen bằng kỹ thuật PCR rất quan trọng và ảnh hưởng trực tiếp đến thành công của các thí nghiệm phía sau. Cùng với đó, sản phẩm PCR đặc hiệu của cả

ba đoạn mã vạch ở tất cả các mẫu nghiên cứu chứng tỏ sự hiệu quả trong tối ưu hóa thiết kế môi và quy trình PCR.

### 3.3. Phân tích trình tự các đoạn ADN mã vạch với các đoạn môi khác nhau

Với cách lựa chọn 5 mẫu Dây thìa canh cùng ba lần lặp lại ở mỗi mẫu, tổng cộng thu được 15 trình tự nucleotide cho một đoạn ADN mã vạch đề xuất. Chất lượng trình tự nucleotide là cao ở tất cả các mẫu, tỷ lệ đọc thành công là 100%. Các trình tự này sau đó được chỉnh sửa và ghép nối bằng tay và phần mềm Bioedit version 7.2.5. Kết quả trình tự nucleotide phân tích thuộc 3 vùng ADN là 565 bp, 567 bp và 767 bp cho 3 gen *psbA - trnH*, *trnL* và *ITS1* (Bảng 2). Tiếp theo, trình tự nucleotide của từng đoạn mã vạch được so sánh trực tiếp với cùng loại ADN mã vạch ở cùng loài Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre*) hoặc cùng chi *Gymnema* trên cơ sở dữ liệu ADN mã vạch (BOLD-Barcode of Life Data

Systems), Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học Hoa Kỳ (NCBI-National Center for Biotechnology Information) bằng công cụ BLAST (Có sẵn tài địa chỉ website:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và phần mềm ClustalW2 (Có sẵn tại địa chỉ website:<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

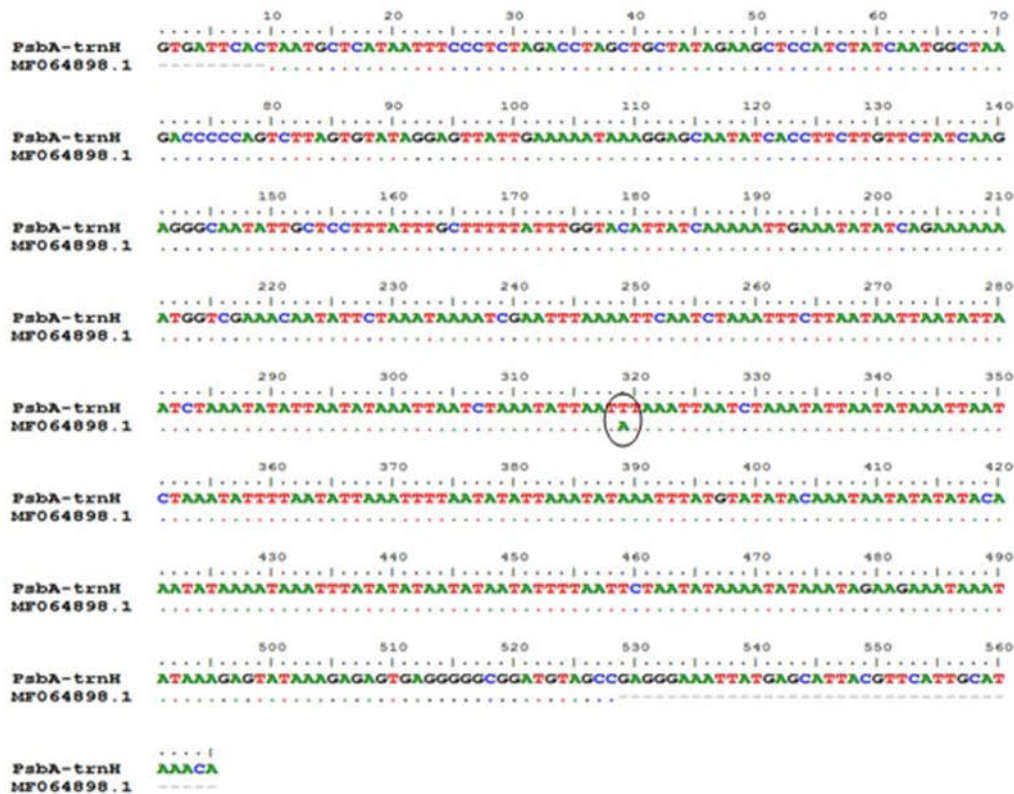
**Bảng 2. Đánh giá ba vùng ADN đề xuất**

TT	Chỉ tiêu phân tích	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL</i>	<i>ITS1</i>	Các mã số trình tự nucleotide trên GenBank được lựa chọn để so sánh
1	Tỷ lệ PCR thành công (%)	100	100	100	MF064896.1; MF064897.1;
2	Tỷ lệ đọc trình tự thành công (%)	100	100	100	MF064898.1; HE805512.1,
3	Chiều dài trình tự (bp)	565	567	767	HG530575.1, AJ402142.2,
4	Vị trí sai khác	319	201	376	KE953920.1, AJ402137.1,
5	Số nucleotide sai khác	1	1	1	AJ431750.1; MF409652.1,
6	Sự phân biệt mức độ loài (%)	0,18	0,18	0,13	MG730191.1, MG730189.1,
					MG730190.1, MG818139.1,
					MF063778.1, MF063777.1

**3.3.1. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen *psbA-trnH***

Với đoạn mã vạch *psbA-trnH*, hiện chỉ *Gymnema* có 3 trình tự trên NCBI: MF064896.1; MF064897.1; MF064898.1 đều cùng loài *Gymnema sylvestri*, trong đó trình tự có mã số MF064898.1 cho thấy độ tương đồng cao nhất đến hơn 99%. Do đó, để biết

chính xác sự sai khác nằm tại các vị trí nào, bằng phần mềm Bioedit, trình tự nucleotide của *psbA-trnH* từ loài Dây thìa canh được so sánh với cùng loại mã vạch *psbA-trnH* mã số MF064898.1. Điểm bắt đầu so sánh ở vị trí nucleotide thứ 1, kết quả chỉ ra 1 nucleotide sai khác (Bảng 2, hình 5). Trong đó 1 vị trí (Nucleotide thứ 319 thay T bằng A).



**Hình 5. Vị trí nucleotide sai khác so sánh trên vùng *psbA-trnH***

Ghi chú: vị trí sai khác là vị trí khoanh tròn

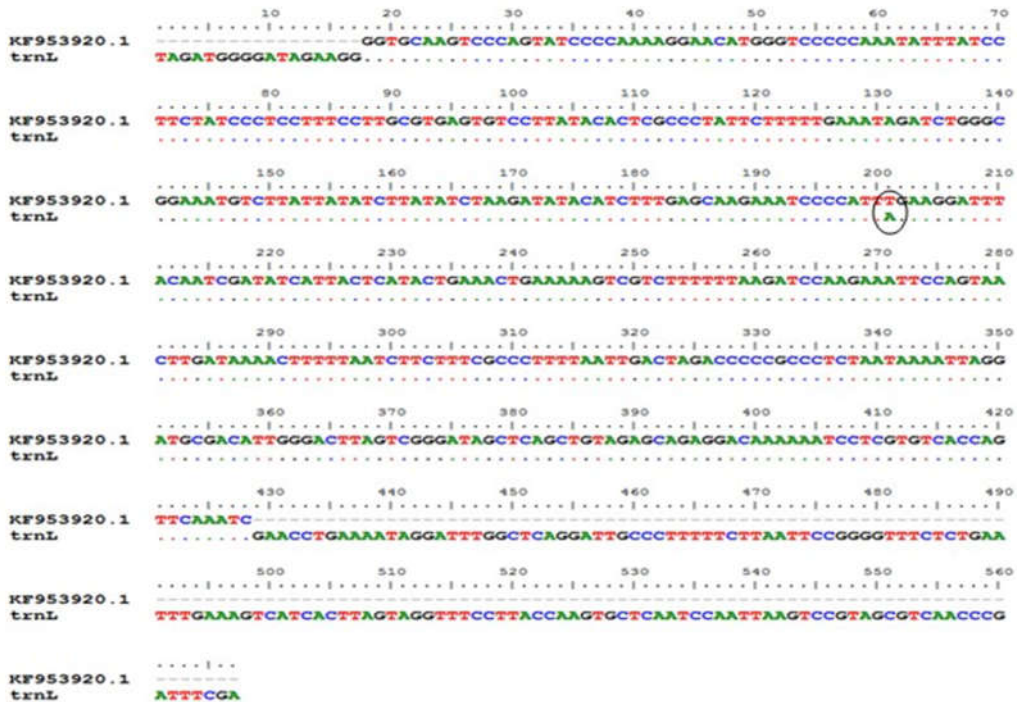
**3.3.2. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen *trnL***

Với đoạn mã vạch *trnL*, có 6 trình tự trên

NCBI: HE805512.1, HG530575.1, AJ402142.2, KE953920.1, AJ402137.1, AJ431750.1. So sánh trình tự nucleotide của

*trnL* của Dây thìa canh được so sánh với mã vạch *trnL* mã số KE953920.1 của 1 loài thuộc chi *Gymnema*, kết quả chỉ ra 1 nucleotide sai

khác (Bảng 2, hình 6), trong đó 1 vị trí (Nucleotide thứ 201 thay T bằng A).



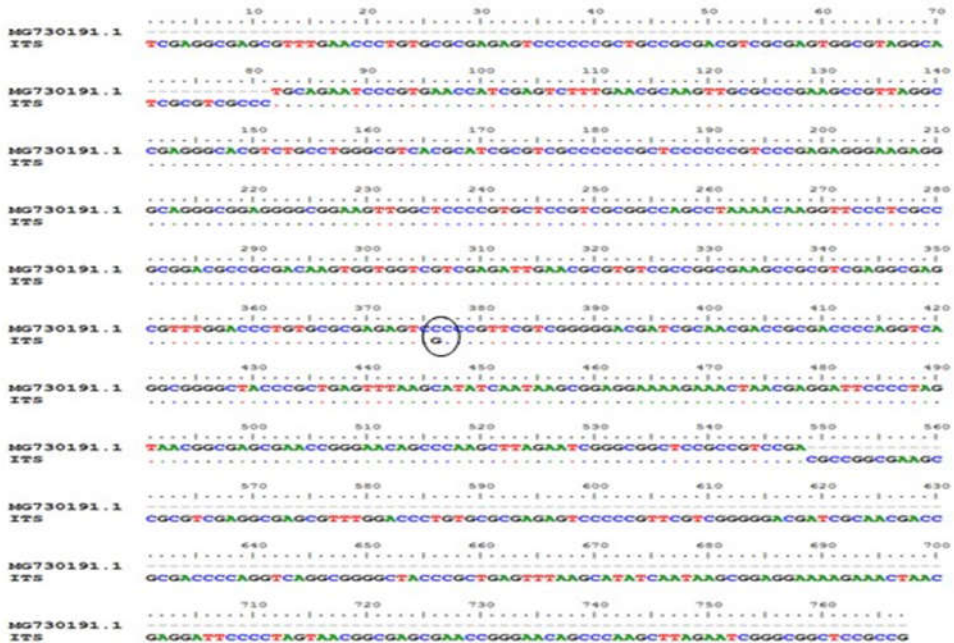
**Hình 6. Vị trí nucleotide sai khác so sánh trên vùng *trnL***

Ghi chú: vị trí sai khác là vị trí khoanh tròn

**3.3.3. Kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen *ITS1***

Cũng như thế, với đoạn mã vạch *ITS1*, có 7 trình tự trên NCBI: MF409652.1, MG730191.1, MG730189.1, MG730190.1, MG818139.1, MF063778.1, MF063777.1. So

sánh trình tự nucleotide của *ITS1* của Dây thìa canh được so sánh với mã vạch *ITS1* mã số MG730191.1 của một loài thuộc chi *Gymnema*, kết quả chỉ ra 1 nucleotide sai khác (Bảng 2, hình 7), trong đó 1 vị trí (Nucleotide thứ 376 thay C bằng G).



**Hình 7. Vị trí nucleotide sai khác so sánh trên vùng *ITS1***

Ghi chú: vị trí sai khác là vị trí khoanh tròn

Như vậy, với ba vùng ADN được lựa chọn là *psbA-trnH*, *trnL* và *ITS1* đại diện cho sự tiến hóa dẫn đến sai khác nucleotide đủ để đảm bảo cho sự phân định loài. Kết quả phân tích từ ba vùng trên đều cho sự khác biệt nucleotide giữa hai hệ gen nghiên cứu là không nhiều nên có thể sử dụng 3 trình tự thuộc ba vùng gen trên làm cơ sở cho giám định loài.

### 3.4. Xây dựng cây phát sinh chủng loại

#### 3.4.1. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự trên đoạn *psbA-trnH*

Dựa vào những kết quả trên, xây dựng cây phát sinh thể hiện mối quan hệ của loài Dây thìa canh nghiên cứu với một số loài thuộc chi *Gymnema* trên ngân hàng gen NCBI. Đối với trình tự gen *psbA-trnH* cây phát sinh được xây dựng với chi *Gymnema* trên ngân hàng gen NCBI có 3 trình tự: MF064898.1; MF064896.1; MF064897.1. Kết quả phân tích cho thấy mã vạch *psbA-trnH* có sự tương đồng đến hơn 99,99% (Bảng 3a) với trình tự có mã số MF064898.1. Mặc dù cả 3 trình tự có mã số MF064898.1; MF064896.1; MF064897.1 đều của loài *Gymnema sylvestre* nhưng do vùng phân bố của loài khá rộng nên tạo ra những khác biệt di truyền nhất định. Trong nghiên cứu này cũng cho thấy trình tự mã vạch *psbA-trnH* của loài *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br có quan hệ họ hàng gần gũi với trình tự có mã số MF064898.1. Từ kết quả hệ số khác biệt di truyền thu được như bảng 3, dùng phần mềm MEGA 6 và phương pháp Neighbor-joining vẽ cây phát sinh chủng loại như hình 8a.

#### 3.4.2. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự trên đoạn *trnL*

Xây dựng cây phát sinh thể hiện mối quan hệ của loài Dây thìa canh nghiên cứu với một số loài thuộc chi *Gymnema* trên ngân hàng gen NCBI. Đối với trình tự gen *trnL* có 6 trình tự: AJ402137.1 (*Gymnema sylvestre*); AJ402142.2 (*Gymnema sylvestre*); AJ431750.1 (*Gymnema inodorum*); HE805512.1 (*Gymnema sylvestre*); HG530575.1 (*Gymnema latifolium*); KF953920.1 (*Gymnema sylvestre*). Cho thấy mã vạch *trnL* có sự tương đồng đến hơn 99%

(Bảng 3b) với mã số KF953920.1 (*Gymnema sylvestre*). Điều này cho thấy hai trình tự này có quan hệ họ hàng rất gần gũi với nhau, và sự sai khác có thể được lý giải là do nguồn gốc xuất xứ của các mẫu nghiên cứu không giống nhau. Từ kết quả hệ số khác biệt di truyền thu được như bảng 3b, dùng phần mềm MEGA 6 và phương pháp Neighbor - Joining vẽ cây phát sinh chủng loại.

So sánh của trình tự gen *trnL* của một số loài có trình tự tương đồng trên ngân hàng gen NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST, chúng tôi đã thiết lập được cây phát sinh chủng loại nhờ NCBI (Ngân hàng gen). So sánh trình tự mã gen của *trnL* của Dây thìa canh có mã gen *trnL* có độ tương đồng cao 99,27% với mã vạch KF953920.1 (Hình 8b).

#### 3.4.3. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự trên đoạn *ITS1*

Xây dựng cây phát sinh thể hiện mối quan hệ di truyền của loài Dây thìa canh nghiên cứu với một số loài thuộc chi *Gymnema* trên ngân hàng gen NCBI. Đối với trình tự gen *ITS1* cây phát sinh được xây dựng với chi *Gymnema* trên ngân hàng gen NCBI có 7 trình tự: MG730190.1; MF063778.1; MG730189.1; MF409652.1; MG818139.1; MF063777.1; MG730191.1 đều của loài *Gymnema sylvestre*. Qua đây có thể thấy rằng *ITS1* là một vùng có sự biến thiên nucleotide rất lớn và đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc đánh giá mối quan hệ phát sinh giữa các loài thực vật. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy mã vạch *ITS1* có sự tương đồng đến 100% với trình tự có mã số MG818139.1 (Bảng 3c).

Từ kết quả hệ số khác biệt di truyền thu được như bảng 3c, dùng phần mềm MEGA 6 và phương pháp Neighbor - Joining xây dựng cây phát sinh chủng loại. Tiếp tục so sánh trình tự gen *ITS1* của một số loài có trình tự tương đồng trên ngân hàng gen NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST, chúng tôi đã thiết lập được cây phát sinh chủng loại nhờ NCBI (Ngân hàng gen). So sánh trình tự mã gen *ITS1* của Dây thìa canh với mã vạch MF409652.1 có độ tương đồng đến 99,97% (Hình 8c).

Bảng 3. Hệ số khác biệt di truyền của đoạn *psbA-trnH*, *trnL*, *ITS1*

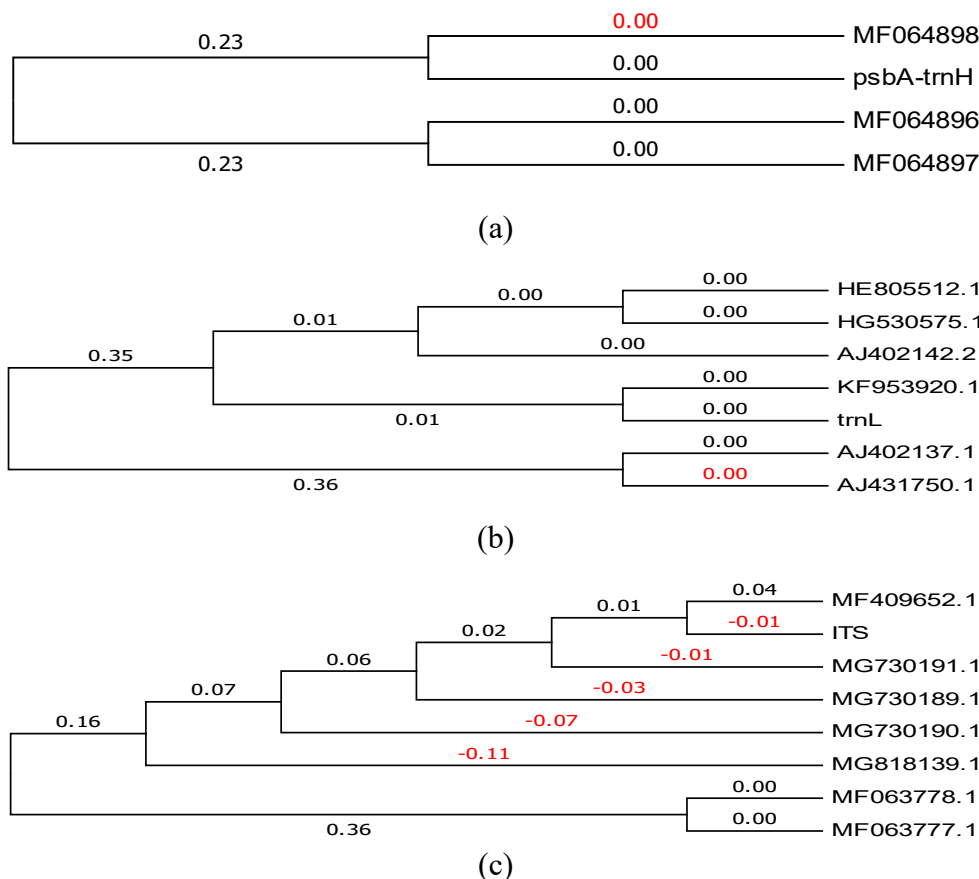
	1	2	3	4
1. <i>psbA-trnH</i>				
2. MF064898	0.003			
3. MF064896	0.467	0.462		
4. MF064897	0.467	0.462	0.000	

	1	2	3	4	5	6	7
1. AJ402137.1							
2. AJ402142.2	0.725						
3. AJ431750.1	0.002	0.721					
4. HE805512.1	0.732	0.002	0.727				
5. HG530575.1	0.732	0.002	0.727	0.000			
6. KF953920.1	0.726	0.028	0.722	0.026	0.026		
7. <i>trnL</i>	0.726	0.028	0.722	0.026	0.026	0.000	

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. MG730190.1								
2. MF063778.1	0.410							
3. MG730189.1	0.003	0.524						
4. MF409652.1	0.029	1.010	0.030					
5. MG818139.1	0.000	0.410	0.003	0.029				
6. MF063777.1	0.410	0.000	0.524	1.010	0.410			
7. MG730191.1	0.005	0.614	0.003	0.030	0.005	0.614		
8. <i>ITS</i>	0.005	0.614	0.003	0.030	0.005	0.614	0.000	



Hình 8. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự trên đoạn *psbA-trnH*, *trnL*, *ITS1*

Ghi chú: Các số thể hiện sự sai khác di truyền giữa hai loài trong cùng nhánh

Tóm lại, với kết quả phân tích BLAST và ClustalW2 nêu trên, khả năng phân biệt ở mức độ loài của ba đoạn mã vạch đề xuất là: *psbA-trnH* > *ITS1* > *trnL*. Trong đó, hai mã vạch *psbA-trnH* và *ITS1* cho kết quả với sự khác biệt rất nhỏ. Kết quả này trùng hợp với khuyến cáo của CBOL (2009) khi cho rằng chỉ sử dụng hai mã vạch ADN cho nhận biết thực vật bậc cao là *psbA-trnH* và *ITS1*.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, ADN tổng số đã được tách chiết thành công với một sự thay đổi nhỏ trong nồng độ CTAB (4% thay vì 2%). Ba đoạn mã vạch CBOL đề xuất được sử

dụng trong nghiên cứu đã được khuếch đại và đọc trình tự thành công. Thêm nữa, tiềm năng nhận biết ở mức độ loài của mã vạch *psbA-trnH* và *ITS1* là cao hơn *trnL* dựa trên phân tích BLAST và ClustalW2. Do đó, sự tổ hợp hai mã vạch *psbA-trnH* và *ITS1* là phù hợp để nhận biết loài. Đây thìa canh (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (2012). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học.
2. CBoL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 12794-12797.
3. Chase M.W, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell



J.M, Kesanakurthi R.P (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Phil Trans Roy Soc B*, 360: 1889-1895.

4. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X (2010). Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*. 5:e8613.

5. Ford C. S, Ayres K. L, Toomey N, Haider N, Alphen S. J (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Bot J Linn Soc* 159: 1-11.

6. Hebert, P. D, Cywinska A, Ball S. L (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Bio*, 270: 313-321.

7. Kress W. J, Erickson D. L (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *trnL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.

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

9. Nguyễn Văn Việt, Sounthone Douangmala, Phạm Quang Chung, Trần Việt Hà (2016). Thử nghiệm ba vùng AND lục lạp tiềm năng (*matK*, *trnL* và *psbA-trnH*) cho nhận dạng loài Gõ đỏ (*Azelia xylocarpa* (Kurz) Craib). *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 11: 94-98.

10. Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 2923-2928.

11. Pang X, Liu C, Shi L, Liu R, Liang D, Li H, Cherny S. S, Chen S (2012). Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A metaanalysis. *PLoS One*. 7:e48833.

12. Ghaffariyan S, Mohammadi S.A and Aharizad S (2012). DNA isolation protocol for the medicinal plant lemon balm (*Melissa officinalis*). *Genetics and Molecular Research*, 11 (2): 1049-1057.

13. Saghai Maroof 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.

14. Shaw J, Lickey E. B, Schilling E. E, Small R. L (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot*, 94: 275-288.

15. Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C (2007). Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucl Acids Res* 35: e17.

16. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

17. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

## STUDY ON DNA BARCODES FOR IDENTIFICATION OF *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br SPECIES

Nguyen Van Viet<sup>1</sup>, Nguyen Thi Huyen<sup>1</sup>, Dao Thi Thuy Hang<sup>2</sup>

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

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

### SUMMARY

Vietnam is a country of diverse and abundant resources with many high economic value animals, plants and mushrooms species. Previously, the methods of identification and classification of plants were mainly based on the morphology and anatomy. However, it is difficult to rely on morphology to classify, especially costly in terms of time, effort and funding. Currently, the method of species identification using DNA molecular markers is widely used. In particular, DNA barcoding is considered a modern and accurate method for identifying organisms, using DNA regions both in the nucleus, in mitochondria and in chloroplasts. In plants, identification of suitable DNA barcode regions has proven to be more challenging than animals. In this study, the DNA barcoding was approached for identification of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br species derived from Suoi Hai, Ba Vi, Ha Noi. Three DNA barcodes (*psbA-trnH*, *trnL* và *ITS1*) proposed in this study belong to chloroplast DNA and nucleus DNA. The success rates for PCR amplification for these loci were 100%. The success rate for bidirectional sequencing of PCR products was 100% for all three loci with length 565 bp, 567 bp và 767 bp for *psbA-trnH*, *trnL* and *ITS1*, respectively BLAST and ClustalW2 analysis indicated the species-specific discriminatory ability of the three proposed bar codes: *psbA-trnH* > *ITS1* > *trnL*. Finally, a combination of *psbA-trnH* and *ITS1* barcodes is proposed as a valuable DNA marker for *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br identification.

**Keywords:** DNA barcode, *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br, identification, *ITS1*, *psbA-trnH*, *trnL*.

Ngày nhận bài : 08/9/2019

Ngày phản biện : 26/11/2019

Ngày quyết định đăng : 05/12/2019