

Xây dựng đặc điểm vi học và mã vạch ADN phục vụ định danh cây cam thảo Đá Bia

Thái Hồng Đăng^{1,2,3*}, Hoàng Xuân Lâm¹, Bùi Ngọc Duy¹, Huỳnh Kim Quyên¹, Dương Nguyên Xuân Lâm²,
Huỳnh Thị Hồng Phượng⁴, Trần Thị Vân Anh²

¹Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung

²Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

³Khoa Dược, Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh

⁴Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa

Ngày nhận bài 21/7/2020; ngày chuyển phản biện 30/7/2020; ngày nhận phản biện 23/9/2020; ngày chấp nhận đăng 6/10/2020

Tóm tắt:

Cam thảo Đá Bia (CTĐB) *Jasminanthes tuyetanhiiae* T.B. Tran & Rodda, Apocynaceae là loài cây đặc hữu của vùng núi Đá Bia, Tuy Hòa, Phú Yên. Bộ phận thân và rễ của cây có vị ngọt, được các thầy thuốc địa phương sử dụng thay thế cam thảo bắc trong các bài thuốc cổ truyền. Với mục đích phát triển cây thuốc trong tương lai, các tác giả thực hiện nghiên cứu đặc điểm vi học và phân tích trình tự gen ITS, rbcL để làm cơ sở cho việc định danh cây thuốc này. CTĐB có cấu tạo vi phẫu đặc trưng của các cây họ Apocynaceae như ống nhựa mủ thật, libe quanh tủy và cụm tế bào sợi vách cellulose. Trình tự đoạn ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của mẫu lá non CTĐB đã được công bố trên ngân hàng GenBank NCBI với mã MT084410.1 và MT089916, so sánh với trình tự ADN của mẫu đối chứng *Jasminanthes mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T.L có mức độ tương đồng lần lượt là 92,69 và 100%. Đây là lần đầu tiên trình tự gen cây CTĐB được nghiên cứu và công bố, đoạn ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL có tiềm năng làm mã vạch ADN dùng cho định danh CTĐB.

Từ khóa: ADN, cam thảo Đá Bia, ITS, *Jasminanthes tuyetanhiiae*, rbcL, vi học.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Hơn 30 năm trước, đoàn điều tra dược liệu của tỉnh Phú Khánh khi điều tra vùng núi Đá Bia, Đông Hòa, Phú Yên đã phát hiện một loài cây có vị ngọt như dược liệu cam thảo bắc nên đặt tên là CTĐB [1]. Do tác dụng độc đáo nên khi được công bố, CTĐB bị khai thác triệt để, dẫn đến chỉ còn vài cá thể ít ỏi và được đưa vào Sách đỏ Việt Nam năm 2007 với tên CTĐB *Telosma procumbens* (Blanco) Merr. Asclepiadaceae (EN B1+2B) [2]. Tháng 8/2017, nhóm nghiên cứu thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung cùng với các chuyên gia và TS Trần Thế Bách thu được mẫu ra hoa CTĐB, CTĐB được định danh lại và mang danh pháp khoa học mới *Jasminanthes tuyetanhiiae* T.B. Tran & Rodda Apocynaceae, Asclepiadoideae [3].

Định danh chính xác thực vật là bước quan trọng đầu tiên trong nghiên cứu và kiểm nghiệm dược liệu, ngoài các đặc điểm về hình thái, còn cần kết hợp thêm chỉ tiêu về đặc điểm vi học, hóa học. Gần đây, việc áp dụng các phương pháp định danh dựa trên đặc điểm di truyền ngày càng được ứng dụng nhiều để việc định danh thực vật ngày một chính xác hơn. Trên thực vật, mã vạch ADN (DNA barcode) là phương pháp phổ biến nhất dựa trên những đoạn ADN ngắn, kém được bảo tồn, thay đổi nhiều trong tiến hóa nhưng không khác nhau quá mức giữa cá thể trong cùng loài, thường là

trình tự thuộc hệ gen lục lạp như rbcL, psbA-trnH, trnL-trnF, matK... hay các vùng trình tự không phiên mã nằm trong ADN của ribosome (rDNA) như internal transcribed spacer (ITS) [4].

Trong 8 loài thuộc chi *Jasminanthes*, chỉ có dữ liệu gen của loài *J. mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T. Li đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI, bao gồm các gen trnL-trnF, matK, matR, AtpB, rbcL, ITS1-5.8S rARN-ITS2, G3pdh [5, 6]. Nhằm mục đích bảo tồn và phát triển một loại dược liệu quý, nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu về đặc điểm vi học thực vật và giải trình tự gen ITS, rbcL, phục vụ cho việc định danh cây thuốc, làm tiền đề cho các nghiên cứu về hóa học và tác dụng dược lý.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây *Jasminanthes tuyetanhiiae* mọc tự nhiên được thu hái từ hệ sinh thái núi Đá Bia, Đông Hòa, Phú Yên vào tháng 8/2017, được định danh về mặt hình thái dựa trên công bố của TS Trần Thế Bách [3], lưu mẫu tại Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung, Tuy Hòa, Phú Yên (hình 1). Các bộ phận rễ, thân, lá làm vật liệu khảo sát đặc điểm vi phẫu và vi học. Mẫu lá non làm vật liệu phân tích mã vạch ADN.

*Tác giả liên hệ: Email: th.dang@hutech.edu.vn

Plant anatomy and the DNA barcode for identification of Cam Thao Da Bia

Hong Dang Thai^{1,2,3*}, Xuan Lam Hoang¹, Ngoc Duy Bui¹,
Kim Quyen Huynh¹, Nguyen Xuan Lam Duong²,
Thi Hong Phuong Huynh⁴, Thi Van Anh Tran²

¹Middle Viet Nam Research and Manufacturing Medicinal Herb Centre

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

³Faculty of Pharmacy, Ho Chi Minh city University of Technology

⁴Phu Sa Biochem

Received 21 July 2020; accepted 6 October 2020

Abstract:

Cam Thao Da Bia (CTDB) *Jasminanthes tuyetanhiiae* T.B. Tran & Rodda, Apocynaceae is an endemic plant of the Da Bia mountainous region in Phu Yen province. The stems and roots of this plant with sweet taste are used as a substitution for licorice in traditional medicine. With the aim of developing this plant, the plant anatomy characteristics and the sequence of ITS and rbcL genes were analysed for establishing a method of identification of this medicinal plant. CTDB has the plant anatomy characteristics of the Apocynaceae family such as non-articulated laticifer, internal phloem, and a bunch of cellulose wall sclerenchyma fibers. The sequence of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 and rbcL of CTDB young leaves were submitted in GenBank with code MT084410.1 and MT089916, respectively, in comparison with those of *Jasminanthes mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T. L., the similarity were 92.69 and 100%, respectively. This is the first time the gene sequence of this plant has been presented. The section ITS1-5.8S rRNA-ITS2 and rbcL offer great potential for establishing the DNA barcode to identify CTDB.

Keywords: Cam Thao Da Bia, DNA, ITS, *Jasminanthes tuyetanhiiae*, plant anatomy characteristics, rbcL.

Classification number: 3.4



Hình 1: Mẫu CTDB được trồng tại Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung.

Hóa chất

Javel 50%, acid acetic 1%, lục iod 0,1%, dung dịch carmin 1%, glycerin 30%, đệm 2X CTAB, cloroform: isoamyl alcohol (24:1), dung dịch TAE 1X, PCR buffer (10X), EZ PCR mix (khô), nước DEPC, agarose, PHUSA loading buffer, loading dye 6x, ladder 1 kb plus, ADN marker, kit tinh sạch PCR purification kit (Jena Bioscience, Đức), ethanol 70%, ethanol 96%, các cặp mồi ITS (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG/ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC) [7] và rbcL (rbcL_F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC/rbcL_R: GAAACGGTCTCTCCAACGCAT) [8].

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát đặc điểm vi phẫu: cắt ngang rễ, thân, cuống lá và lá thành các lát mỏng, nhuộm bằng son phen và lục iod. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm vi phẫu qua kính hiển vi quang học.

Khảo sát đặc điểm vi học: rễ, thân, lá được phơi khô, nghiền mịn và làm tiêu bản bột. Quan sát, mô tả và chụp ảnh các đặc điểm qua kính hiển vi.

Phân tích mã vạch ADN: tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá tươi CTDB theo phương pháp sử dụng CTAB của J.J. Doyle và J.L. Doyle [9]. Kiểm tra mẫu ADN tách chiết được bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) trên máy Nanodrop ở bước sóng 260 và 280 nm, đồng thời điện di kiểm tra trên thạch agarose 0,8% để xác định độ tinh sạch.

PCR được tiến hành để khuếch đại 2 vùng gen ITS1-ITS4 và rbcL_F-rbcL_R với dung tích 50 µl, các thành phần tham gia phản ứng gồm 2 µl ADN tách chiết, PCR

buffer 1X, EZ PCR mix (khô), 0,2 μ M mỗi xuôi, 0,2 μ M mỗi ngược và nước DEPC.

Chu trình nhiệt như sau: 95°C (3 phút), 35 chu kỳ [(95°C (30s), 59°C (30s), 72°C (45s), hoàn chỉnh ở 72°C (5 phút) và giữ sản phẩm ở 25°C (2 phút)]. Sau khi hoàn thành chương trình chạy, sản phẩm PCR được bổ sung thuốc nhuộm rồi tiến hành điện di kiểm tra trên thạch agarose 2%.

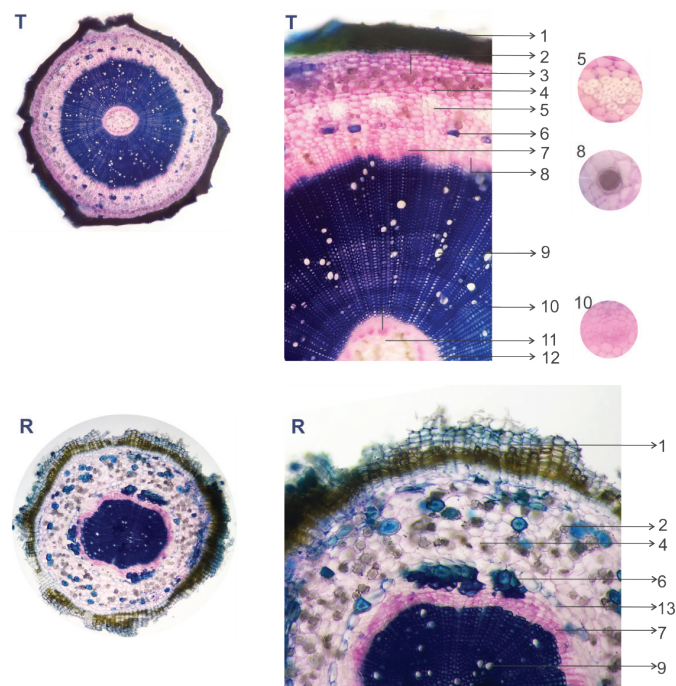
Những mẫu đúng kích thước được thu hồi bằng kit tinh sạch PCR purification kit (Jena Bioscience, Đức), thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất: giải trình tự hai chiều sản phẩm PCR bằng phương pháp Sanger [10] trên hệ thống máy ABI 3130 (Applied Biosystems, Mỹ). Các trình tự sau khi thu nhận được lắp ráp và Blast so sánh với ngân hàng gen NCBI, xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm Mega X.

Kết quả

Đặc điểm vi phẫu

Đặc điểm vi phẫu của thân: vi phẫu gần hình tròn, vùng vỏ chiếm 1/3 bán kính. Bần (T1) gồm các lớp tế bào hình chữ nhật, vách tằm bần và hơi uốn lượn, xếp thành dãy xuyên tâm, bên dưới là vài lớp mô dày góc (T3). Mô mềm vỏ (T4) tế bào hình bầu dục vách cellulose, kích thước không đều. Trong mô mềm vỏ rải rác có các tế bào mô cứng (T6), các bó sợi vách cellulose dày (T5) xếp thành một vòng không liên tục. Libe 1 xếp thành từng cụm, libe 2 (T7) gồm vài lớp tế bào hình đa giác hay chữ nhật, vách cellulose xếp thành dãy xuyên tâm, rải rác trong vùng libe có ống nhựa mù thật (T8). Gỗ 2 (T9) dày gấp 19-20 lần libe 2; mạch gỗ 2 tế bào hình đa giác, xếp lộn xộn hoặc thành dãy; mô mềm gỗ 2 hình đa giác, vách tằm gỗ, xếp thành dãy xuyên tâm. Tia tủy gồm 2-8 dãy tế bào. Bó gỗ 1 (T12) phân bố không đều, mỗi bó gồm 1-3 mạch gỗ hình đa giác; mô mềm gỗ 1 hình đa giác, vách cellulose, xếp lộn xộn. Libe quanh tủy (T10) xếp thành cụm to hay nhỏ, có cấu tạo giống libe 1. Mô mềm tủy đạo, tế bào hình gần tròn, vách cellulose, xếp lộn xộn. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai (T2) có khá nhiều trong mô mềm vỏ, trụ bì và mô mềm tủy (hình 2).

Đặc điểm vi phẫu rễ: vi phẫu gần tròn, vùng vỏ chiếm 1/2 bán kính. Từ ngoài vào trong có bần (R1) gồm các lớp tế bào hình chữ nhật, vách tằm bần hơi uốn lượn và xếp dãy xuyên tâm. Mô mềm vỏ (R4) tế bào hình bầu dục vách cellulose, kích thước không đều. Nội bì đai caspary (R13) rõ. Trụ bì gồm vài lớp tế bào hình đa giác, hóa mô cứng (R6) xếp thành cụm hoặc riêng lẻ. Libe 2 (R7) tạo thành vòng quanh gỗ 2 chiếm tâm (R9); mạch gỗ 2 hình đa giác, xếp lộn xộn; mô mềm gỗ 2 tế bào hình đa giác, vách tằm chất gỗ, xếp xuyên tâm. Tia tủy 3-5 dãy tế bào đa giác. Tế bào mô cứng và tinh thể calci oxalat hình cầu gai (R2) khá nhiều trong mô mềm vỏ (hình 2).



Hình 2. Vi phẫu thân (T) và rễ (R) CTĐB.

(1): bần; (2): tinh thể calci oxalat cầu gai; (3): mô dày; (4): mô mềm vỏ; (5): cụm sợi vách cellulose; (6): tế bào mô cứng; (7): libe 2; (8): ống nhựa mù; (9): gỗ 2; (10): libe quanh tủy; (11): mô mềm tủy; (12): gỗ 1; (13): nội bì đai caspary.

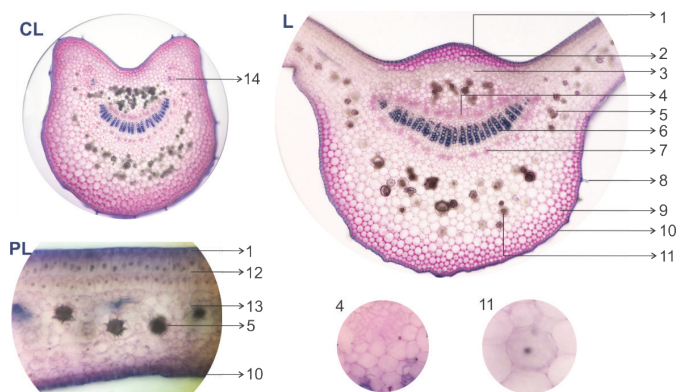
Đặc điểm vi phẫu lá:

Gân giữa: bề dày vùng gân giữa gấp 3 lần vùng phiến lá. Mặt dưới lõm nhiều hơn mặt trên. Biểu bì trên (L1) và biểu bì dưới (L10) có hình dạng và kích thước giống nhau, 1 lớp tế bào hình chữ nhật nằm hay hình đa giác, vách cellulose; lớp cutin dày và hơi nhấp nhô. Lông che chở (L8) đa bào một dãy gồm 4-8 tế bào, nằm rải rác ở lớp biểu bì dưới. Mô dày góc trên (L2) và mô dày góc dưới (L9) tế bào hình gần tròn, xếp lộn xộn. Mô mềm (L3) tế bào hình tròn hoặc đa giác, vách cellulose mỏng. Ống nhựa mù thật (L11) rải rác trong mô mềm. Hệ thống dẫn hình vòng cung với gỗ 1 (L6) ở trên, libe 1 (L7) ở dưới và trên gỗ có libe quanh tủy (L4). Mạch gỗ 1 hình đa giác; mô mềm gỗ 1 vách cellulose, xếp thành 1-2 (đôi khi 5) dãy xen kẽ mạch gỗ. Libe 1 và libe quanh tủy vách cellulose kích thước nhỏ, xếp lộn xộn thành cụm. Tinh thể calci oxalat (L5) hình cầu gai rải rác trong mô mềm (hình 3).

Cuống lá: vi phẫu có dạng hình bầu dục với mặt trên lõm chia 2 thùy. Cấu tạo tương tự gân giữa, dưới mỗi thùy phía trên cung libe gỗ có bó dẫn phụ cấu tạo như cung libe gỗ chính (hình 3).

Phiến lá: biểu bì trên (PL1) và biểu bì dưới (PL10) có cấu tạo giống nhau, gồm 1 lớp tế bào hình chữ nhật nằm hay đa giác; lớp cutin hơi dày và nhấp nhô; lỗ khí tập trung ở

biểu bì dưới. Mô mềm giậu (PL12) gồm 2 lớp tế bào nằm so le nhau. Mô mềm khuyết (PL13) có bề dày gấp 2 lần bề dày mô mềm giậu, tế bào hình dạng thay đổi; rải rác có các bó gân phụ bị cắt ngang hay cắt xéo, bó cắt ngang có ít mạch gỗ ở trên và libe ở dưới. Tinh thể calci oxalat (PL5) hình cầu gai rải rác trong mô mềm khuyết (hình 3).



Hình 3. Vi phẫu lá (L), cuống lá (CL) và phiến lá (PL).

(1): biểu bì trên; (2): mô dày trên; (3): mô mềm; (4): libe quanh tủy; (5): tinh thể calci oxalat cầu gai; (6): gỗ 1; (7): libe 1; (8): lông che chở; (9): mô dày dưới; (10): biểu bì dưới; (11): ống nhựa mủ; (12): mô mềm giậu; (13): mô mềm khuyết.

Đặc điểm vi học

Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10X, 40X (hình 4), bột được liệu có những đặc điểm sau:

Bột rễ: màu vàng nâu, không mùi, vị ngọt. Thành phần gồm mảnh bản (F1), mảnh mô mềm chứa hạt tinh bột (F2), sợi (F3), tế bào mô cứng (F4), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (F5), hạt tinh bột (F6) hình cầu hay hình chuông, có thể có tế hình vệt dài hoặc không.



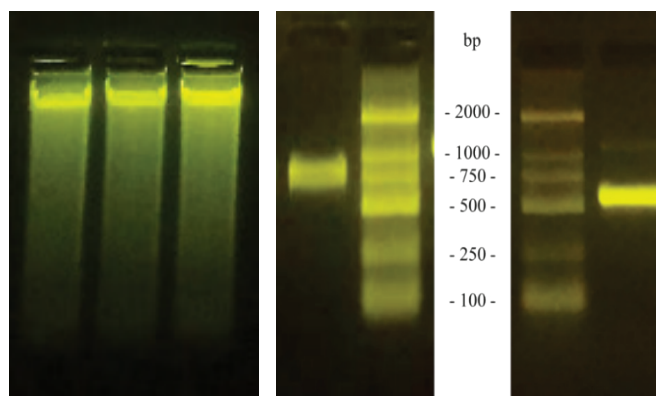
Hình 4. Cấu trúc bột rễ (F1-6), thân (G1-6) và lá (H1-5).

Bột thân: màu vàng nâu, nhiều xơ, không mùi, vị ngọt. Thành phần gồm mảnh bản (G1), sợi (G2), tế bào mô cứng (G3), mảnh mạch điểm (G4), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (G5), hạt tinh bột (G6) hình cầu hay hình chuông, có thể có tế phân nhánh hoặc không.

Bột lá: màu xanh, không mùi, vị hơi đắng. Thành phần gồm mảnh biểu bì trên (H1), mảnh biểu bì dưới (H2) mang nhiều lỗ khí kiểu hỗn bào, biểu bì mang lông che chở (H3), lông che chở đa bào một dãy (H4), tinh thể calci oxalat hình cầu gai (H5).

Phân tích mã vạch ADN

Chiết tách và khuếch đại đoạn gen bằng kỹ thuật PCR thu được đoạn tinh sạch ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của CTĐB (hình 5, 6), thành phần bốn loại nucleotide của mẫu nghiên cứu được trình bày ở bảng 1. Chi tiết về trình tự đoạn gen ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của CTĐB đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI với mã tương ứng là MT084410.1 và MT089916.



Hình 5. ADN tổng số **Hình 6. Kết quả PCR môi ITS1-ITS4**
trên agarose 0,8%. (trái) và môi rbcL_F-rbcL_R (phải).

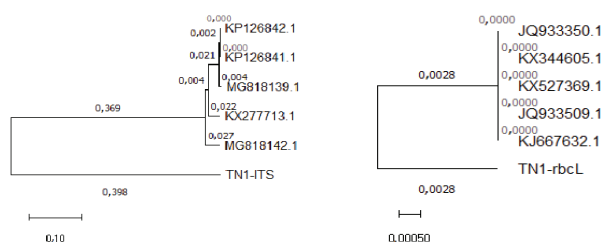
Bảng 1. Thành phần bốn loại nucleotide của mẫu CTĐB.

Mẫu	Tỷ lệ %						Tổng số nucleotide
	A	T	G	C	GC	AT	
TN1-ITS	13,7	19,1	34,1	33,1	67,2	32,8	577
TN1-rbcL	27,2	28,6	22,3	21,9	44,2	55,8	538

Bảng 2 trình bày kết quả BLAST có tỷ lệ bao phủ (%) / mức độ tương đồng (%) cao nhất của đoạn ITS và rbcL, tất cả đều thuộc họ Apocynaceae trong đó có loài cùng chi *J. mucronata* với kết quả lần lượt là (100/92,69) và (99/100). Cây phát sinh loài (hình 7) được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood.

Bảng 2. Kết quả BLAST đoạn gen ITS và rbcL của CTĐB.

Mẫu	Tên khoa học	Tỷ lệ bao phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Mã truy cập
TN1-ITS	<i>Jasminanthes mucronata</i> isolate L	100	92,69	MG818142.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate I	100	91,82	MG818139.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate SBB-1363	99	91,46	KX277713.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate GS7	95	92,17	KP126842.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate GS6	95	92,17	KP126841.1
TN1-rbcL	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate SBB-1307	99	100	KX344605.1
	<i>Jasminanthes mucronata</i>	99	100	KX527369.1
	<i>Gymnema sylvestre</i> isolate SBB-1256	99	100	KJ667632.1
	<i>Treutlera</i> sp. CHSL-2012	99	100	JQ933509.1
	<i>Gymnema sylvestre</i>	99	100	JQ933350.1



Hình 7. Cây phát sinh loài của gen ITS (trái) và rbcL (phải).

Bàn luận

Thân cây CTĐB có cấu tạo vi phẫu đặc trưng của các cây họ Apocynaceae như ống nhựa mủ thật [11], libe quanh tủy [12] và cụm tế bào sợi vách cellulose [13]; trong khi ở lá và cuống lá có ống nhựa mủ, libe quanh tủy. Ống nhựa mủ xuất hiện rải rác trong vùng libe ở thân, vùng mô mềm ở cuống lá và gân giữa nhưng số lượng không nhiều. Trên thực tế khi cắt ngang cuống lá, lá và thân cây cũng không thấy nhựa mủ chảy ra nhiều như một số cây khác cùng họ (dây thia canh, thiên lý).

Bộ phận mà người dân địa phương hay sử dụng gọi là “dây CTĐB” được phân tích vi học, kết quả cho thấy đây chính là bộ phận thân và rễ CTĐB, những đoạn thân đã hóa gỗ khi gặp điều kiện thuận lợi (đất, không khí ẩm ướt) có thể sinh ra rễ mới.

Kết quả BLAST cho thấy CTĐB có đoạn rbcL có mức độ tương đồng cao 100% so với các cây trong phân họ thiên lý Asclepiadoideae, vì vậy đoạn gen này có tính bảo tồn cao; đoạn ITS cũng cho kết quả tương tự nhưng mức độ tương đồng cao nhất ở cây cùng chi là *J. mucronata* (GenBank-MG818142.1) chỉ là 92,69%. Cây phát sinh loài xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood cho thấy gen ITS và rbcL nằm ở nhóm riêng so với các loài khác, điều này giúp khẳng định sự khác biệt về gen ITS và rbcL của CTĐB so với các loài khác trong phân họ, có thể sử dụng đoạn ITS

và rbcL làm mã vạch ADN để định danh CTĐB.

Các vùng ADN tiềm năng được sử dụng làm mã vạch phải phù hợp với một số tiêu chí chính: tính phổ biến (dễ khuếch đại và giải trình tự), chất lượng trình tự và khả năng xác định loài (đoạn gen có nhiều thay đổi đặc trưng cho các loài, nhưng không khác nhau quá mức giữa cá thể trong cùng loài). Consortium for the Barcode of Life (CBOL) đánh giá rbcL là đoạn gen đặc trưng tốt nhất, mặc dù không phải là vùng thay đổi nhất, được sử dụng thường xuyên trong các tổ hợp để phân biệt loài [14], tổ hợp này bao gồm một vùng ADN bảo tồn về mặt phát sinh loài (rbcL) với một hoặc nhiều vùng thay đổi nhanh [15].

Trong một nghiên cứu đánh giá về tiềm năng của các loại mã vạch ADN trong việc định danh các loài thuộc họ Apocynaceae, đoạn ITS2 thuộc vùng ITS đã xác định thành công ở mức độ loài và chỉ với tỷ lệ tương ứng là 91 và 98%, tỷ lệ này ở psbA-trnH là 40 và 36% [16]. Việc lựa chọn những đoạn ADN đặc trưng để làm mã vạch và việc phối hợp giữa các đoạn mã vạch ADN là rất cần thiết và đem lại hiệu quả cao, một số tổ hợp khác được BOLD khuyến cáo như rpoC1+rpoB+matK hay rpoC1+matK+trnH-psbA; rbcL+trnH và atpF-H+psbK-I+matK để tăng hiệu quả giám định loài [17, 18].

CBOL đã đề xuất rbcL+matK là phối hợp chuẩn để định danh các loài thực vật [14], tuy nhiên kết quả sàng lọc của P. Mishra và cộng sự cho thấy cần phải bổ sung thêm vùng xen giữa không mã hóa psbA-trnH của hệ gen lục lạp và các vùng thuộc hệ gen nhân (ITS và ITS2). Cụ thể với tổ hợp rbcL+matK+ITS cho kết quả phân biệt 100% các loài thuộc chi *Decalepis* (Apocynaceae) [18].

Đoạn trình tự ITS1-5.8S rARN-ITS2 (mã truy cập MT084410.1) và rbcL (mã truy cập MT089916) được đăng tải lên ngân hàng gen NCBI. Còn các đoạn gen tiềm năng khác cần được giải mã như trnL-trnF, matK, matR, AtpB, G3pdh để xây dựng cơ sở dữ liệu ADN cho CTĐB, phục vụ cho công tác kiểm nghiệm, nghiên cứu, trồng trọt và bảo tồn được liệu.

Kết luận

Đề tài đã quan sát và mô tả đặc điểm vi phẫu, bột được liệu của rễ, thân và lá CTĐB, làm căn cứ để xây dựng chỉ tiêu vi học trong tiêu chuẩn nguyên liệu dược liệu CTĐB. Đoạn gen ITS1-5.8S rARN-ITS2 và rbcL của mẫu lá non CTĐB thu hái ở núi Đá Bia, tỉnh Phú Yên được phân tích và giải trình tự công bố trên ngân hàng gen NCBI với code là MT084410.1 và MT089916, so sánh với ADN của mẫu đối chứng *Jasminanthes mucronata* (Blanco) W.D. Stevens & P.T. Li được công bố trên ngân hàng gen cho thấy mẫu có độ tương đồng lần lượt là 92,69 và 100%. Như vậy đoạn ITS và rbcL có tiềm năng để sử dụng làm mã vạch ADN trong định

danh CTĐB. Tuy nhiên để xây dựng cơ sở dữ liệu ADN đầy đủ cho CTĐB, các đoạn gen trnL-trnF, matK, matR, AtpB, G3pdh cần được giải mã thêm.

Kết quả nghiên cứu góp phần trong việc định danh CTĐB, làm tiền đề cho các nghiên cứu về hóa thực vật và tác dụng sinh học của cây. Đây là lần đầu tiên trình tự gen cây CTĐB, một loài đặc hữu của Việt Nam được nghiên cứu và công bố, góp phần vào việc bảo tồn nguồn gen và khai thác phát triển các cây thuốc dân gian có giá trị.

TÀI LIỆU KHAM KHẢO

- [1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006), “Phần 1 - Dược liệu”, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 1, tr.331-332.
- [2] Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), “Phần II - thực vật”, *Sách đỏ Việt Nam*, tr.14.
- [3] The Bach Tran, Xuan Lam Hoang, Ngoc Duy Bui, Thu Ha Bui, Eum Sangmi, Hong Quang Bui, Van Hai Do, Maxim Nuraliev, Andrey Kuznetsov, Svetlana Kuznetova, Michele Rodda (2018), “*Jasminanthes tuyetanhiiae* (Apocynaceae, Asclepiadoideae), a new species from Vietnam, and *J. pilosa* new for Vietnam”, *Annales Botanici Fennici*, **55**(1-3), pp.163-169.
- [4] P. Mishra, A. Kumar, A. Nagireddy, D.N. Mani, A.K. Shukla, R. Tiwari, V. Sundaresan (2016), “DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market”, *Plant Biotechnol J.*, **14**(1), pp.8-21.
- [5] Z. Chen, T. Yang, L. Lin, et al. (2016), “Tree of life for the genera of Chinese vascular plants”, *Journal of Systematics and Evolution*, **54**(4), pp.277-306.
- [6] H.B. Tsai (2018), *Molecular phylogenetic analysis of Asclepiadoideae (Apocynaceae s. l.) in Taiwan*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG818142.1>.
- [7] T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor (1990), “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, **18**(1), pp.315-322.
- [8] A. Fazekas, K. Burgess, P. Kesanakurti, S. Graham, S. Newmaster, B. Husband, D. Percy, M. Hajibabaei, S. Barrett (2008), “Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well”, *PLOS ONE*, **3**(7), p.e2802.
- [9] J.J. Doyle and J.L. Doyle (1987), “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue”, *Phytochemical Bulletin*, **19**(1), pp.11-15.
- [10] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson (1977), “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**(12), pp.5463-5467.
- [11] M.A. El-Fiki, A.M. El-Taher, A.G. EL-Gendy, M.I. Lila (2019), “Morphological and anatomical studies on some taxa of family Apocynaceae”, *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, **44**(1), pp.136-147.
- [12] C.E.J. Botha, R.F. Evert, R.D. Walmsley (1975), “Observations of the penetration of the phloem in leaves of *Nerium oleander* (Linn.) by stylets of the aphid, *Aphis nerii* (B. de. F.)”, *Protoplasma*, **86**(4), pp.309-319.
- [13] L.C. Baratto, M.R. Duarte, C. Santos (2010), “Pharmacobotanic characterization of young stems and stem barks of *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. Apocynaceae”, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **46**(3), pp.555-561.
- [14] D. Selvaraj, R.K. Sarma, D. Shanmughanandhan, R. Srinivasan S. Ramalingam (2014), “Evaluation of DNA barcode candidates for the discrimination of the large plant family Apocynaceae”, *Plant Systematics and Evolution*, **301**, pp.1263-1273, DOI: 10.1007/s00606-014-1149-y.
- [15] W.J. Kress, D.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), p.e508, DOI: 10.1371/journal.pone.0000508.
- [16] C. Costion, A. Ford, H. Cross, D. Crayn, M. Harrington, A. Lowe (2011), “Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras”, *PLOS ONE*, **6**(11), p.e26841, DOI: 10.1371/journal.pone.0026841.
- [17] CBOL Plant Working Group (2009), “A DNA barcode for land plants”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (31), pp.12794-12797, DOI: 10.1073/pnas.0905845106.
- [18] P. Mishra, A. Kumar, G. Sivaraman, A.K. Shukla, R. Kaliamoorthy, A. Slater, S. Velusamy (2017), “Character-based DNA barcoding for authentication and conservation of IUCN Red listed threatened species of genus *Decalepis* (Apocynaceae)”, *Sci. Rep.*, **7**(1), p.14910, DOI: 10.1038/s41598-017-14887-8.