

SỬ DỤNG MÃ VẠCH ADN TRONG VIỆC ĐỊNH LOẠI LOÀI HỒNG TRÂU (*CAPPARIS VERSICOLOR* GRIFF.)

Lý Thị Bôn, Nguyễn Thị Mai Linh, Nguyễn Thị Thu Nga, Sỹ Danh Thường
Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

Phân loại học thực vật gắn liền với lịch sử phát triển của toàn bộ tri thức về thực vật của con người, xuất phát từ nhu cầu phân loại và nhận biết thực vật để sử dụng trong đời sống. Tuy nhiên suốt cả chiều dài phát triển qua ba thời kỳ của phân loại học thực vật bao gồm thời kỳ phân loại nhân tạo, thời kỳ phân loại tự nhiên và thời kỳ phân loại tiến hóa, các phương pháp phân loại vẫn chỉ chủ yếu dựa trên các nghiên cứu về đặc điểm hình thái, cấu tạo hoặc sinh lí, sinh thái. Nhược điểm lớn nhất của các phương pháp phân loại này là yêu cầu về mặt thời gian nghiên cứu cũng như sự toàn vẹn của mẫu vật phân loại mới có thể đưa ra kết quả phân loại chính xác nhất.

Nhược điểm này của phân loại học thực vật truyền thống thể hiện rõ ràng nhất trong lĩnh vực y học bởi các dược liệu có nguồn gốc từ thực vật phần lớn chỉ được chế biến từ một bộ phận của các cá thể thực vật. Việc nhận biết chính xác một mẫu dược liệu đã qua sơ chế (cắt lát, phơi khô, nghiền thành bột, ngâm cùng dược liệu khác,...) thuộc loài nào trở nên vô cùng khó khăn. Và nếu có sai sót trong quá trình phân loại dược liệu sẽ gây hậu quả to lớn và vô cùng nghiêm trọng (Vũ Thị Thu Thủy và cs, 2017).

Trong những trường hợp này, một phương pháp phân loại thực vật hiện đại và có tính chính xác cao được áp dụng nhờ sự kết hợp giữa công nghệ gene và đặc điểm thực vật học: mã vạch (AND Barcode).

Mã vạch AND là hệ thống trình tự AND từ những vùng gene đặc trưng của các loài, được sử dụng để định loại các loài một cách chính xác. Không chỉ góp phần phân biệt các loài thực vật có những đặc điểm hình thái tương đồng, Mã vạch AND còn giúp nhận dạng các mẫu vật không nguyên vẹn hoặc chưa phát triển đủ các đặc tính. Ở thực vật, tính đến năm 2009 đã có 8 locus gene được sử dụng làm mã vạch AND bao gồm cả ở hệ gene nhân và hệ gene lục lạp, trong số đó *rpoC1* là locus gene có tính phân loại cao với các mẫu thực vật (Steinke và et al., 2009).

Về *rpoC1*, đây được coi là một trong những vùng gen chuẩn trong xây dựng mã vạch AND để định loại các loài. Hudson G.S. và cs (1988) đã đưa ra được sơ đồ ban đầu vị trí của các gen *rpoB*, *rpoC1* và *rpoC2* trong AND lục lạp cũng như sản phẩm mã hóa của chúng, trong đó *rpoC1* được sử dụng với vai trò là một gen định loại chính, có tính đặc trưng cao trong phân loại loài và phân tích lịch sử phát sinh loài (Lu et al., 2017; Shimada et al., 1990; Zuo et al., 2017; Vijayan K., Tsou C.H., 2010).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả sử dụng trình tự gene *rpoC1* trong việc định loại mẫu Hồng trầu (*Capparis versicolor* Griff.) được thu thập tại Tương Dương, Nghệ An.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Mẫu loài Hồng trầu thu thập tại huyện Tương Dương - Nghệ An, trồng tại vườn thực nghiệm khoa Sinh học – Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên (Kí hiệu mẫu TH3).

2. Tách chiết AND tổng số

Mẫu được tách chiết AND tổng số bằng quy trình CTAB (Vũ Hoài Sơn, 2016). AND tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, trong đệm TAE 1X, ở hiệu điện thế 110V.

3. Nhân gen bằng kỹ thuật PCR

Cặp mồi được sử dụng để nhân bản đoạn gen *rpoC1* bằng kỹ thuật PCR là *rpoC1-F/ rpoC1-R*, có trình tự và thông tin được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1

Trình tự thông tin về cặp mồi *rpoC1-F/ rpoC1-R*

Cặp mồi PCR	Trình tự nucleotide	Kích thước đoạn AND dự kiến
<i>rpoC1-F</i>	5' – GTGGATACACTTCTTGATAATGG – 3'	500bp
<i>rpoC1-R</i>	3' – CCATAAGCATATCTTGAGTTGG – 5'	

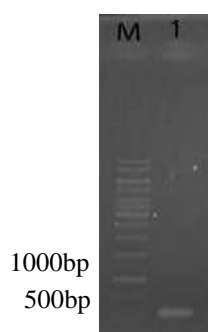
Thành phần hỗn hợp PCR bao gồm: master mix (2X) -7,5 µl, mỗi xuôi (10 pmol/µl) - 0,5 µl, mỗi ngược (10 pmol/µl) - 0,5 µl, AND khuôn (10 ng/µl) - 1µl, H₂O - 5,5 µl, tổng thể tích hỗn hợp PCR là 15 µl. Chu trình nhiệt PCR: 94°C/4 phút; lặp lại 35 chu kỳ với (94°C/30giây, 55°C/40giây, 72°C/40 giây); 72°C/10 phút và giữ ở 10°C.

Trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Trình tự gen được phân tích và so sánh bằng các chương trình BioEdit và AND Star.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả khuếch đại vùng gen *rpoC1* bằng kỹ thuật PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày trên hình 1 cho thấy chỉ xuất hiện một băng sản phẩm PCR đặc hiệu với kích thước tương ứng như dự đoán lý thuyết (khoảng 500bp).

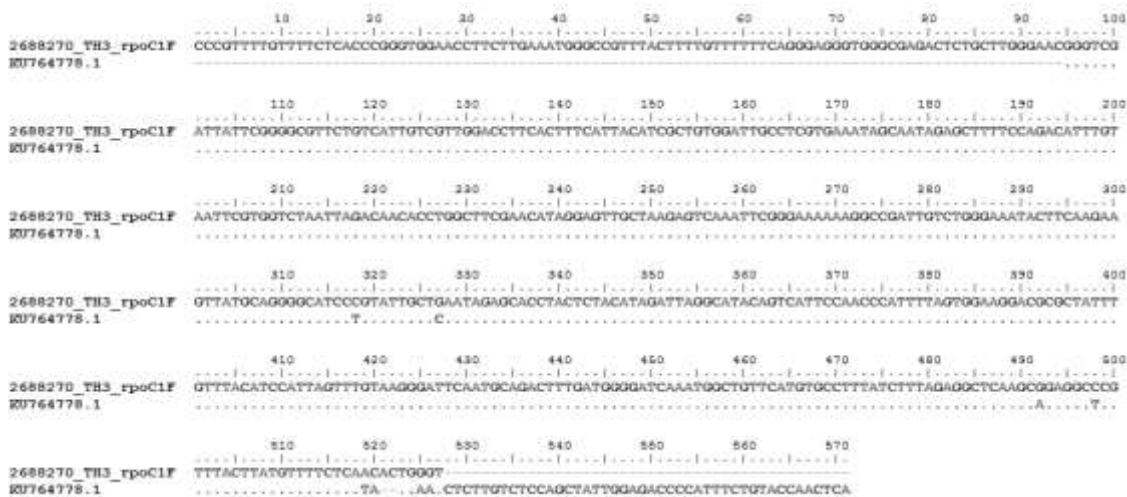


Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rpoC1* của mẫu TH3
M: marker 1kb.

2. Trình tự gen *rpoC1* của mẫu TH3

Kết quả giải trình tự đoạn gen thu được có chiều dài 527 nucleotide, có độ tương đồng cao nhất so với trình tự gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1 (thuộc chi *Capparis*) trên ngân hàng Genbank là 99%. Như vậy có thể khẳng định đoạn gen phân lập được từ mẫu TH3 là gen *rpoC1* và mẫu Hồng trâu TH3 thuộc chi *Capparis*. Mức độ tương đồng giữa gen *rpoC1* phân lập từ

mẫu TH3 với trình tự gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1 trên Genbank được thể hiện trên hình 2.



Hình 2: Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen *rpoC1* mẫu TH3 (2688270_TH3_rpoC1) và trình tự gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1

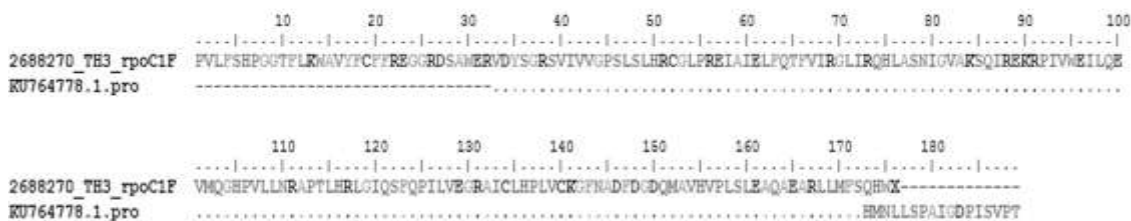
Phân tích và so sánh trình tự nucleotide giữa gen *rpoC1* mẫu TH3 và trình tự gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1 cho thấy có sự sai khác ở 10 vị trí nucleotide là các vị trí 318, 327, 492, 498, 519, 520, 521, 522, 525, 526.

Phân tích trình tự amino acid suy diễn của gen *rpoC1* mẫu TH3 với 175 amino acid. Kết quả được thể hiện trên hình 3.



Hình 3: Trình tự amino acid suy diễn của mẫu TH3

So sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *rpoC1* mẫu TH3 với trình tự amino acid suy diễn của gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1 được thể hiện trên hình 4, cho thấy (sự tương đồng trong trình tự amino acid bắt đầu từ vị trí amino acid thứ 33 (TH3) tương ứng với amino acid số 1 của trình tự gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1) sự sai khác xuất hiện ở 3 vị trí amino acid, đó là 173, 174, 175.



Hình 4: **Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của gen *rpoC1* mẫu TH3 với trình tự amino acid suy diễn của gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1**

3. Sự đa hình trình tự AND của gen *rpoC1*

So sánh trình tự AND vùng gen *rpoC1* của mẫu nghiên cứu TH3 cùng với trình tự AND vùng gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1 (*Capparis cartilaginea*) cho thấy: Tỷ lệ G+C trong vùng gen KU764778.1 là 42,53% còn của mẫu TH3 là 44,78%. Có 10 điểm nucleotide sai khác, chiếm khoảng 1,3% trên toàn bộ trình tự. Có thể thấy sự đa hình trong trình tự là khá cao giữa 2 loài thuộc cùng chi. Vùng nucleotide từ 95 đến 527 của gen *rpoC1* mẫu TH3 là vùng có độ bảo thủ cao, ít biến đổi trong quá trình tiến hóa.

III. KẾT LUẬN

Gen *rpoC1* đã được phân lập thành công từ AND lục lạp bằng kỹ thuật PCR có kích thước 527 nucleotide, mã hóa 175 amino acid.

Trình tự nucleotide của gen *rpoC1* từ mẫu TH3 tương đồng với trình tự nucleotide của gen *rpoC1* mang mã số KU764778.1 trên ngân hàng gen là 99%. Sự sai khác trong trình tự nucleotide xuất hiện ở các vị trí 318, 327, 492, 498, 519, 520, 521, 522, 525, 526. Trình tự acid amin suy diễn xuất hiện sự sai khác ở 3 vị trí 173, 174, 175.

Từ kết quả so sánh và phân tích trình tự AND vùng gen *rpoC1* có thể xác định mẫu nghiên cứu (TH3) thuộc chi *Capparis*, tạm thời xác định thuộc loài *Capparis versicolor* Griff.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong Đề tài mã số 106-NN.03-2015.20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Vũ Hoài Sơn, 2016.** *Xây dựng mã vạch AND của cây Giảo cổ lam (Gynostemma pentaphyllum)*. Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên: 10 – 11.
2. **Vũ Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Thu Nga, Hoàng Phú Hiệp, Chu Hoàng Mậu, 2017.** Sử dụng mã vạch AND trong việc định loại loài cây dược liệu Thất diệp nhất chi hoa ở Việt Nam, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ - ĐH Thái Nguyên*, 161(01): 81 – 87.
3. **Holton T. A., Whitfield P. R., Bottomley W., 1988.** "Spinach chloroplast rpoBC genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase", CSIRO, *Division of Plant Industry*, Canberra City, A.C.T., Australia.
4. **Lu R. S., Li P., Qiu Y. X., 2017.** "The Complete Chloroplast Genomes of Three Cardiocrinum (Liliaceae) Species: Comparative Genomic and Phylogenetic Analyses", *Frontiers Plant Science* 10(7): 2054. (Lu et al., 2017; Shimada et al., 1990; Zuo et al., 2017)
5. **Shimada H., Fukuta M., Ishikawa M., Sugiura M., 1990.** "Rice chloroplast RNA polymerase genes: the absence of an intron in rpoC1 and the presence of an extra sequence in rpoC2", *Molecular and General Genetics MGG*, 221 (3): 395–402.
6. **Zuo L. H., Shang A. Q., Zhang S., Yu X. Y., Ren Y. C., Yang M. S., Wang J. M., 2017.** "The first complete chloroplast genome sequences of Ulmus species by de novo sequencing: Genome comparative and taxonomic position analysis", *PLoS One*. 12(2).

7. **Vijayan K., Tsou C. H.**, (2010), "DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective", *Current Science*, Vol. 99, No. 11 (10 December 2010), pp. 1530-1541. (Vijayan K., Tsou C.H., 2010)

USING DNA BARCODE TO IDENTIFY *CAPPARIS VERSICOLOR* GRIFF.

**Ly Thi Bon, Nguyen Thi Mai Linh,
Nguyen Thi Thu Nga, Sy Danh Thuong**

SUMMARY

In this study, the *RpoC1* gene of *Capparis versicolor* was successfully isolated from chloroplast DNA by PCR reaction with specific rpoC1-F / rpoC1-R primers. The *rpoC1* gene comprises 527 nucleotides in length, encoding 175 amino acids. The nucleotide sequence of the *rpoC1* gene from the TH3 sample is 99% similar to the sequence KU764778 on the Genbank. Nucleotide sequence differences occurred at the positions 318, 327, 492, 498, 519, 520, 521, 522, 525, 526. The sequence of amino acid inference occurred at 3 different positions 173, 174, 175.

The rpoC1 can be identified from the *Capparis* genus, temporarily identified as *Capparis versicolor* Griff. The results of DNA sequence analysis concluded that the *rpoC1* gene could be used to distinguish species of the genus *Capparis*. This study confirms that the rpoC1 gene may help identify the species as a DNA bar codes. In addition, this method can be used for further studies on molecular evolution and gene conservation research of rare medicinal plants.