

DOI: <https://doi.org/10.59294/HIUJS.KHD.2026.003>

ĐỊNH DANH PHÂN TỬ LOÀI ĐẬU BIẾC (*Clitoria ternatea* L.) TẠI TỈNH CÀ MAU BẰNG MÃ VẠCH DNA

Nguyễn Lê Tuyết Dung*, Lâm Thị Ngọc Giàu, Nguyễn Hồng Nhung
Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) là loài thực vật thuộc họ Fabaceae có giá trị trong lĩnh vực dược liệu và thực phẩm nhờ chứa nhiều hợp chất sinh học. Việc định danh chính xác loài có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu và khai thác nguồn nguyên liệu dược liệu. **Mục tiêu:** Định danh phân tử, đánh giá tính ổn định di truyền của loài Đậu biếc thu hái tại ba vùng sinh thái đặc trưng (nước ngọt, nước lợ và nước mặn) tại tỉnh Cà Mau. **Phương pháp nghiên cứu:** Mẫu cây được thu tại ba vùng sinh thái gồm nước ngọt, nước lợ và nước mặn. DNA tổng số được ly trích từ lá non bằng phương pháp CTAB, khuếch đại đoạn gen lục lạp *rbcL* bằng PCR và giải trình tự theo phương pháp Sanger. Trình tự thu được được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST. **Kết quả:** DNA tổng số thu được có chất lượng tốt và phản ứng PCR khuếch đại thành công đoạn gen *rbcL* khoảng 600 bp. Phân tích BLAST cho thấy các trình tự có độ tương đồng 100% với loài *Clitoria ternatea* trên GenBank. **Kết luận:** Gen *rbcL* là marker phân tử hiệu quả trong việc hỗ trợ định danh loài *Clitoria ternatea* tại các vùng sinh thái khác nhau ở tỉnh Cà Mau.

Từ khóa: *Clitoria ternatea* L., mã vạch DNA, gen *rbcL*

MOLECULAR IDENTIFICATION OF BUTTERFLY PEA (*Clitoria ternatea* L.) IN CA MAU PROVINCE USING DNA BARCODING

Nguyen Le Tuyen Dung, Lam Thi Ngoc Giau, Nguyen Hong Nhung

ABSTRACT

Background: Butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) is a plant species belonging to the Fabaceae family with significant value in medicinal and food applications due to its various bioactive compounds. Accurate species identification is important for research and the sustainable utilization of plant resources. **Objective:** To perform molecular identification and assess the genetic stability of *Clitoria ternatea* collected from three representative ecological zones (freshwater, brackish water, and saltwater) in Ca Mau province. **Methods:** Plant samples were collected from three ecological zones including freshwater, brackish water, and saltwater. Total genomic DNA was extracted from young leaves using the CTAB method. The chloroplast *rbcL* gene was amplified by PCR and sequenced using the Sanger method. The obtained sequences were compared with reference sequences in the GenBank database using the BLAST tool. **Results:** High-quality genomic DNA was successfully extracted, and PCR amplification produced an *rbcL* fragment of approximately 600 bp. BLAST analysis showed that the obtained sequences shared 100% similarity with *Clitoria ternatea* sequences available in GenBank. **Conclusion:** The *rbcL* gene is an effective molecular marker for supporting the identification of *Clitoria ternatea* from different ecological zones in Ca Mau province.

Keywords: *Clitoria ternatea* L., DNA barcoding, gen *rbcL*

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Lê Tuyết Dung, Email: tuyetdungcdytl@gmail.com
(Ngày nhận bài: 19/3/2026; Ngày nhận bản sửa: 13/4/2026; Ngày duyệt đăng: 05/5/2026)

1. ĐẬU VẤN ĐỀ

Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) thuộc họ Đậu (Fabaceae) là loài cây thân leo có nguồn gốc từ khu vực Đông Nam Á và hiện phân bố rộng rãi ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới. Tại Việt Nam, loài cây này được trồng phổ biến trong vườn nhà, hàng rào hoặc được khai thác làm dược liệu và thực phẩm tự nhiên nhờ màu sắc đặc trưng của hoa và các hoạt tính sinh học có giá trị. Các bộ phận của cây như rễ, lá, hạt và hoa đã được sử dụng trong y học dân gian với nhiều công dụng như tăng cường trí nhớ, giảm lo âu, hỗ trợ an thần, lợi tiểu và điều trị một số bệnh lý khác [1]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy hoa Đậu biếc chứa các hợp chất sinh học quan trọng như anthocyanin, flavonoid, saponin và tannin, góp phần tạo nên các tác dụng sinh học như kháng khuẩn, kháng viêm và chống oxy hóa [2].

Trong những năm gần đây, Đậu biếc ngày càng được quan tâm nghiên cứu và khai thác trong các lĩnh vực thực phẩm chức năng, dược liệu và mỹ phẩm tự nhiên. Nhiều nghiên cứu đã tiến hành mô tả đặc điểm hình thái và giải phẫu thực vật của loài này nhằm phục vụ cho việc nhận diện và đánh giá giá trị dược liệu [3 - 5]. Tuy nhiên, các phương pháp định danh truyền thống dựa trên đặc điểm hình thái đôi khi có thể bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường hoặc sự biến đổi hình thái trong quần thể, dẫn đến khả năng nhầm lẫn giữa các loài có quan hệ gần. Chính vì thế, sự phát triển của sinh học phân tử đã cung cấp các công cụ hữu hiệu hỗ trợ định danh loài, trong đó kỹ thuật mã vạch DNA (DNA barcoding) được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phân loại và nhận diện thực vật. Trong số các marker phân tử được sử dụng, vùng gen lục lạp *rbcL* được xem là một chỉ thị phổ biến nhờ tính bảo tồn cao, khả năng khuếch đại ổn định và thuận lợi cho việc so sánh với cơ sở dữ liệu quốc tế như GenBank [6, 7].

Tỉnh Cà Mau có hệ sinh thái đa dạng với các vùng sinh thái đặc trưng gồm vùng nước ngọt, nước lợ và nước mặn. Điều kiện sinh thái khác nhau có thể ảnh hưởng đến đặc điểm hình thái cũng như tính ổn định di truyền của các loài thực vật. Tuy nhiên, các nghiên cứu ứng dụng mã vạch DNA nhằm xác định loài Đậu biếc tại các vùng sinh thái khác nhau ở địa phương vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm định danh phân tử loài Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) thu thập tại các vùng sinh thái khác nhau ở tỉnh Cà Mau bằng phương pháp mã vạch DNA sử dụng gen *rbcL*, đồng thời bước đầu đánh giá tính ổn định di truyền của loài trong điều kiện sinh thái đặc thù (nước ngọt, nước lợ và nước mặn), góp phần bổ sung dữ liệu phân tử phục vụ nhận diện và khai thác nguồn tài nguyên thực vật tại địa phương.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Mẫu cây Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) được thu hái tại các vùng sinh thái khác nhau trên địa bàn tỉnh Cà Mau, bao gồm vùng sinh thái nước ngọt, vùng sinh thái nước lợ và vùng sinh thái nước mặn. Mỗi mẫu thu thập bao gồm các bộ phận của cây như thân, lá, hoa và quả nhằm phục vụ cho việc khảo sát đặc điểm hình thái và phân tích sinh học phân tử.



Hình 1. Loài Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) thu hái tại các vùng sinh thái ở tỉnh Cà Mau
Ghi chú: 1. Phường Bạc Liêu (ngọt); 2. Xã Đông Hải (mặn); 3. Xã Giá Rai (lợ)

Sau khi thu hái, các mẫu thực vật được làm sạch, ghi nhận các đặc điểm hình thái ban đầu và phân loại theo từng khu vực sinh thái.

Bảng 1. Ký hiệu mã hóa các mẫu thu hái tại 3 vùng sinh thái

STT	Địa điểm	Ký hiệu
1	Phường Bạc Liêu	BL-0401
2	Xã Đông Hải	DH-0402
3	Xã Giá Rai	GR-0403

Một phần mẫu lá non được bảo quản trong túi zip có chứa silica gel nhằm duy trì chất lượng DNA phục vụ cho quá trình ly trích và phân tích mã vạch DNA. Phần mẫu còn lại được ép tiêu bản và lưu trữ tại Khoa Dược, Trường Cao đẳng Y tế Bạc Liêu để phục vụ cho việc đối chiếu mẫu.

Tên khoa học của mẫu nghiên cứu được giám định tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh dựa trên các đặc điểm hình thái thực vật và so sánh với các tài liệu chuyên ngành. Kết quả giám định xác định loài nghiên cứu là *Clitoria ternatea* L. thuộc họ Đậu (Fabaceae).

2.2. Dung môi và hóa chất thí nghiệm

Hóa chất ly trích DNA gồm CTAB Buffer (2% CTAB, 100 mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl), β -mercaptoethanol, chloroform: Isoamyl alcohol (24:1), enzyme rNase, isopropanol, cồn ethanol (70%).

Hóa chất PCR và điện di gồm PCR Mỹ (NEXpro, Korea), agarose tinh khiết, thuốc nhuộm DNA (Safe view), dung dịch TBE 1X, giấy parafilm, loading dye 6x, ladder 100 bp, TE 1X, nước tinh sạch (nước cất 2 lần và đã qua thanh trùng ở 121°C trong 20 phút).

Bảng 2. Trình tự cặp mồi *rbcL* sử dụng trong phản ứng PCR

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Tm (°C)	Tác giả
<i>RbcL.F</i>	ATGTCACCACAAACAGACTAAAGC	60	Levin và cộng sự, 2003 [6] Fazekas và cộng sự, 2008 [7]
<i>RbcL.R</i>	GTAAAATCAAGTCCACCRCG		

(Ghi chú: Tm, nhiệt độ gắn mồi)

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Máy PCR Perkin Elmer PE 9700 (Hoa Kỳ), hệ thống chụp hình gel Bio-Rad UV 2000 (Hoa Kỳ), máy ly tâm Eppendorf Centrifuge 5417C (Đức), máy ly tâm chân không Concentrator 5031 (Đức), máy ủ cách thủy GFL 1083 (Đức), bộ điện di một chiều Embi-Tec (Hoa Kỳ), bộ micropipette Bio-Rad P10, P20, P200, P1000 (Hoa Kỳ), các loại ống tube dùng để trích mẫu DNA (SSIbio_1210-00) và tube thực hiện phản ứng PCR (Gunster Biotech -MB_P02).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Ly trích DNA

DNA tổng số được ly trích từ mẫu lá non của cây Đậu biếc theo phương pháp CTAB cải tiến của Doyle và Doyle [8]. Sau khi ly trích, DNA được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TBE 1X, chạy điện di ở thế 85V trong vòng 30 phút. Sau điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm DNA và quan sát dưới hệ thống soi gel UV để đánh giá mức độ nguyên vẹn của DNA.

Phản ứng PCR được thực hiện nhằm khuếch đại đoạn gen lục lạp *rbcL* sử dụng cặp mồi đặc hiệu *rbcL.F* và *rbcL.R*. Thành phần phản ứng PCR được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: Giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 60°C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72°C trong 30 giây. Sau chu kỳ khuếch đại, phản ứng được kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút và sản

phẩm PCR được bảo quản ở 10°C trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2% nhằm xác định kích thước đoạn khuếch đại. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Các mẫu DNA tinh sạch được gửi đến Trường Đại học Cần Thơ giải trình tự bằng phương pháp Sanger [9].

2.4.2. Giải trình tự gen và phân tích dữ liệu

Giải trình tự gen được thực hiện bằng máy giải trình tự tự động dựa trên nguyên lý dideoxy của phương pháp Sanger. Trước khi giải trình tự, sản phẩm PCR được tinh sạch nhằm loại bỏ các tạp chất và môi dư.

Quy trình giải trình tự bao gồm các bước: tinh sạch sản phẩm PCR, thực hiện phản ứng gắn huỳnh quang (cycle sequencing), tinh sạch sản phẩm sau phản ứng, biến tính DNA và chạy giải trình tự trên máy tự động.

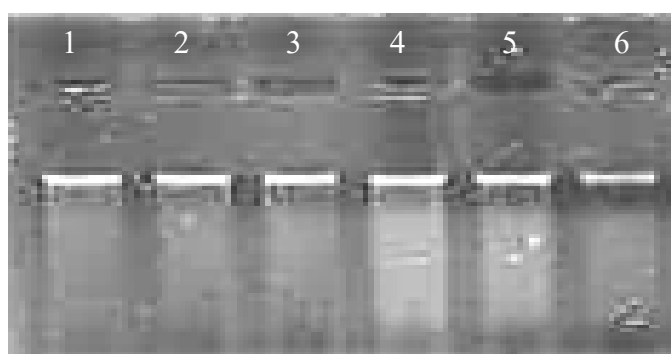
Các trình tự thu được được lưu trữ dưới dạng FASTA và chỉnh sửa bằng phần mềm BioEdit phiên bản 7.0.5. Sau khi hiệu chỉnh, các trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên hệ thống của National Center for Biotechnology Information (NCBI) nhằm xác định mức độ tương đồng và hỗ trợ định danh loài.

Khối lượng phân tử của các băng DNA trong gel điện di được ước lượng bằng phần mềm GelAnalyzer dựa trên thang chuẩn DNA ladder 100 bp.

Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng phần mềm MEGA 12 theo phương pháp Maximum Likelihood, với mô hình tiến hóa Tamura 3-parameter để xây dựng cây phát sinh chủng loài [10].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ly trích DNA tổng số từ mẫu lá của cây Đậu biếc thu thập tại ba vùng sinh thái khác nhau
DNA tổng số được ly trích từ lá non của các mẫu Đậu biếc thu thập tại ba vùng sinh thái khác nhau bằng phương pháp CTAB. Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy các mẫu DNA xuất hiện dưới dạng băng rõ nét, ít bị phân mảnh và hầu như không ghi nhận sự nhiễm tạp đáng kể. Điều này chứng tỏ phương pháp ly trích được áp dụng trong nghiên cứu cho hiệu quả tốt, đảm bảo chất lượng DNA phục vụ cho các bước phân tích tiếp theo (Hình 2).



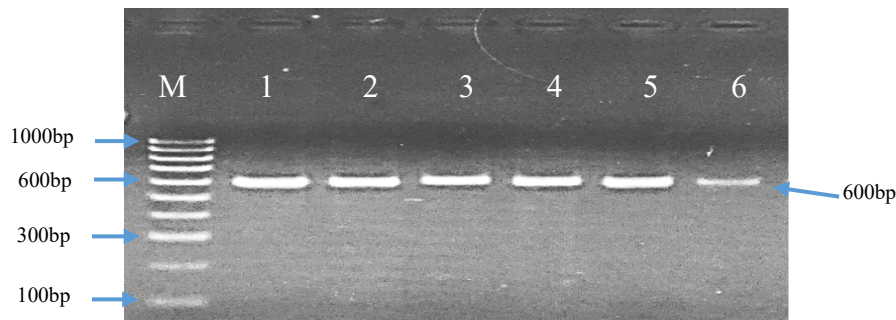
Hình 2. Phổ điện di DNA trên gel Agarose 1%

Ghi chú: Giếng 1,2: Mẫu BL-0401, giếng 3,4 mẫu: GR-0403, giếng 5,6 mẫu DH-0402

3.2. Giải trình tự gen và phân tích dữ liệu các mẫu thu thập

3.2.1. Kết quả khuếch đại gen *rbcL* bằng PCR

Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho vùng gen lục lạp *rbcL* đã khuếch đại thành công đoạn gen mục tiêu ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Kết quả điện di trên gel agarose 2% cho thấy sản phẩm PCR xuất hiện dưới dạng băng đơn, rõ ràng với kích thước xấp xỉ 600 bp, phù hợp với kích thước dự kiến của vùng gen *rbcL* thường được sử dụng trong nghiên cứu mã vạch DNA thực vật (Hình 3).



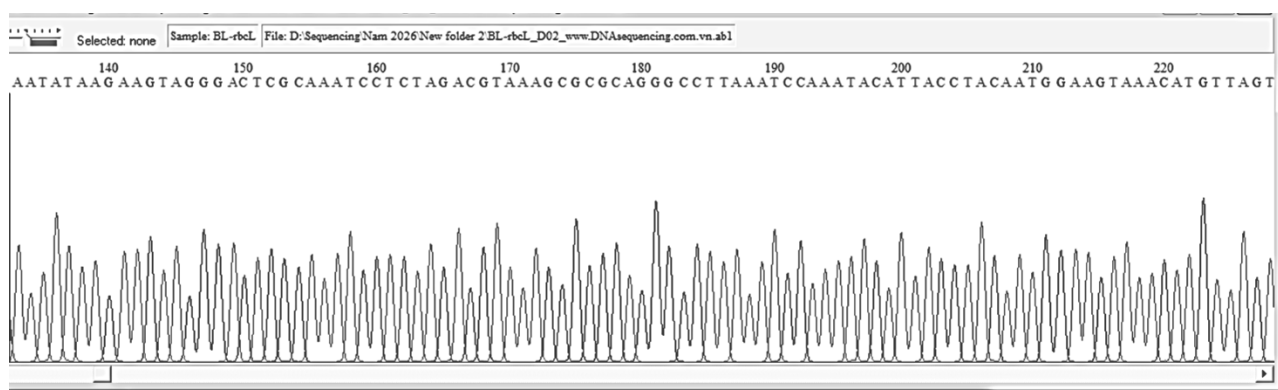
Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%
Ghi chú: M: Ladder 100bp, giếng 1,2: Mẫu BL-0401, giếng 3,4 mẫu: GR-0403, giếng 5,6: mẫu DH-0402

3.2.2. Kết quả giải trình tự gen

Mẫu BL-0401, trình tự nucleotide được giải trực tiếp hai chiều. Kết quả giải trình tự cho ảnh điện di đồ với các đỉnh huỳnh quang rõ nét và tín hiệu ổn định. Sau khi loại bỏ trình tự môi và các vùng tín hiệu nhiễu, thu được trình tự nucleotide của vùng gen *rbcL* của mẫu BL-0401 có độ dài 565 bp (Trình tự 1), (Hình 4).

Trình tự 1. Trình tự nucleotide của vùng gen *rbcL* của mẫu BL-0401

```
>CTCAAGGTCTACNTAATTCTTAGCGGATAATCCCAATTTAGGTTTAATAGTACATCCC
AATAGAGGACGGCCATACTTATTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATGCCATGAGGCCG
ACCTTGGAAGTTTTAATATAAGAAGTAGGGACTCGCAAATCCTCTAGACGTAAAGCG
CGCAGGGCCTTAAATCCAAATACATTACCTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAG
AACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAAGGATAAGCTACATAAGCAATATATTGATTTTCTTCG
CCAGCAACGGGTTTCGATGTGATAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGCC
CATCGGTCCACACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCAGCAGCTACCGCAGCACC
TGCTTCTTCAGGCGGA ACTCCAGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAAGATATCA
GTATCCTTGGTTTCATACTCAGGAGTATAATAAGTTAATTTATAATCTTTAACACCAGC
TTTGAACCCAACACTTGCTTTAGTCTCTGTGGGGGGGGGAAATAA
```



Hình 4. Tín hiệu trình tự gen *rbcL* mẫu BL-0401

Mẫu DH-0402 sau khi xử lý loại bỏ trình tự môi và các vùng tín hiệu nhiễu, thu được trình tự nucleotide của vùng gen *rbcL* của mẫu DH-0402 có độ dài 565 bp (Trình tự 2).

Trình tự 2. Trình tự nucleotide của vùng gen *rbcL* của mẫu DH-0402

```
>TGTTGTTTACTAATTCTTAGCGGATNAATCCCAATTTAGGTTTAATAGTACATCCCAAT
```

AGAGGACGGCCATACTTATTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATGCCATGAGGCGGACC
 TTGGAAGTTTTAATATAAGAAGTAGGGACTCGCAAATCCTCTAGACGTAAAGCGCGC
 AGGGCCTTAAATCCAAATACATTACCTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGAAC
 CTTCTTCAAAAAGGTCTAAAGGATAAGCTACATAAGCAATATATTGATTTTCTTCGCCA
 GCAACGGGTTCGATGTGATAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGCCCAT
 CGGTCCACACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCAGCAGCTACCGCAGCACCTGC
 TTCTTCAGGCGGAAGTCCAGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAAGATATCAGTA
 TCCTTGTTTTACTACTCAGGAGTATAATAAGTTAATTTATAATCTTTAACACCAGCTTTG
 AACCAACACTTGCTTTAGTCTCTGTTGTGGGNTGACATAA

Mẫu GR-0403 sau khi xử lý loại bỏ trình tự môi và các vùng tín hiệu nhiễu, thu được trình tự nucleotide của vùng gen *rbcL* của mẫu GR-0403 có độ dài 565 bp (Trình tự 3).

Trình tự 3. Trình tự nucleotide của vùng gen *rbcL* của mẫu GR-0403

>CCCAAGGTCTACCTAATTCTTAGGCGGATAATCCCAATTTAGGTTTAATAGTACATCC
 CAATAGAGGACGGCCATACTTATTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATGCCATGAGGCG
 GACCTTGAAAGTTTTAATATAAGAAGTAGGGACTCGCAAATCCTCTAGACGTAAAGC
 GCGCAGGGCCTTAAATCCAAATACATTACCTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACA
 GAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAAGGATAAGCTACATAAGCAATATATTGATTTTCTTC
 GCCAGCAACGGGTTCGATGTGATAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGC
 CCATCGGTCCACACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCAGCAGCTACCGCAGCAC
 CTGCTTCTTCAGGCGGAAGTCCAGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAAGATATC
 AGTATCCTTGTTTTACTACTCAGGAGTATAATAAGTTAATTTATAATCTTTAACACCAG
 CTTTGAACCAACACTTGCTTTAGTCTCTGTGGGGNGT

3.2.3. Kết quả so sánh trình tự bằng công cụ BLAST

Kiểm tra tính tương đồng của các trình tự nucleotide trên với các trình tự sẵn có trên ngân hàng GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả so sánh trình tự nucleotide vùng gen lục lạp *rbcL* của các mẫu nghiên cứu với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST cho thấy tất cả các mẫu đều có mức độ tương đồng cao nhất (100%) với các trình tự thuộc loài *Clitoria ternatea* đã được công bố trước đó. Cụ thể, mẫu BL-0401 và GR-0403 có mức độ tương đồng hoàn toàn với các mẫu *Clitoria ternatea* mang mã số truy cập PQ469843.1, trong khi mẫu và DH-0402 cũng cho kết quả tương đồng 100% với mẫu *Clitoria ternatea* mang mã số truy cập PQ469844.1 trên GenBank. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

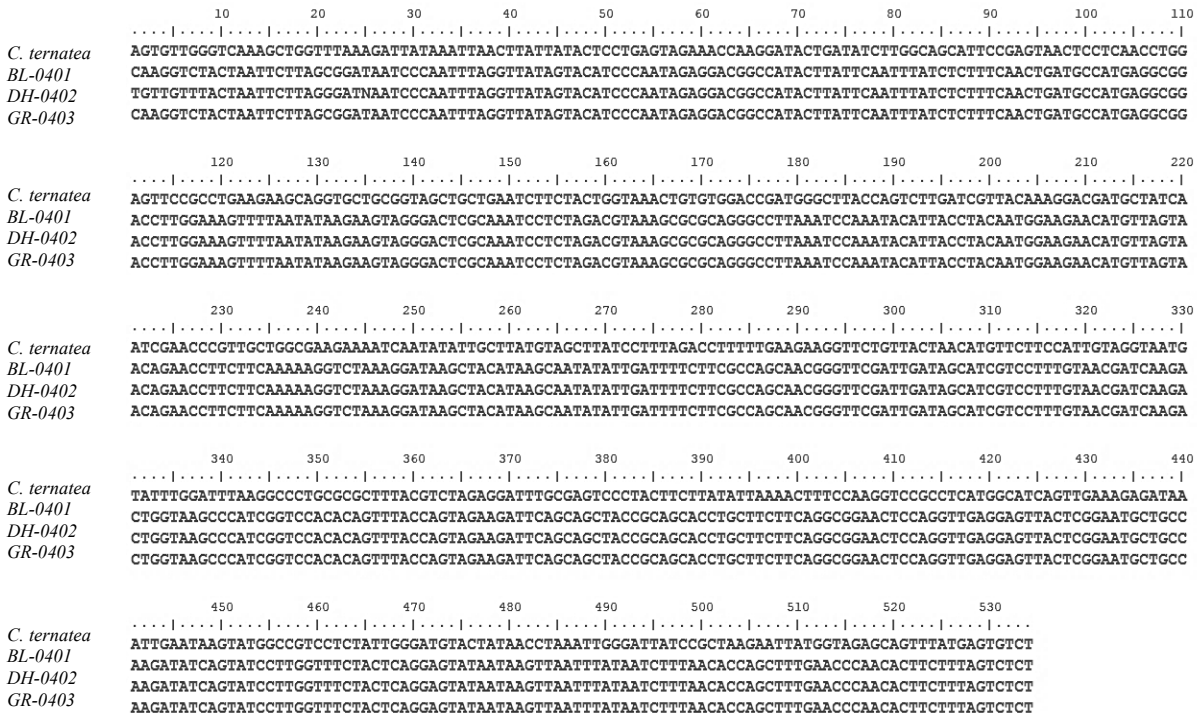
Bảng 3. Mức độ tương đồng của mẫu khi BLAST trên NCBI

Mẫu	Kết quả BLAST với cơ sở dữ liệu trong NCBI			
	Loài tương đồng	Mã số	% đồng nhất	Tác giả
BL-0401	<i>Clitoria ternatea</i> isolate Ct_SB1	PQ469843.1	100	Panigrahi, J., Panda, A.K., Gupta, K., Barik, D. and Soren, G.K. 2024
DH-0402	<i>Clitoria ternatea</i> isolate Ct_Sw3	PQ469844.1	100	Panigrahi, J., Panda, A.K., Gupta, K., Barik, D. and Soren, G.K. 2024
GR-0403	<i>Clitoria ternatea</i> isolate Ct_SB1	PQ469843.1	100	Panigrahi, J., Panda, A.K., Gupta, K., Barik, D. and Soren, G.K., 2024

3.2.4. Kết quả so sánh trình tự giữa các mẫu nghiên cứu

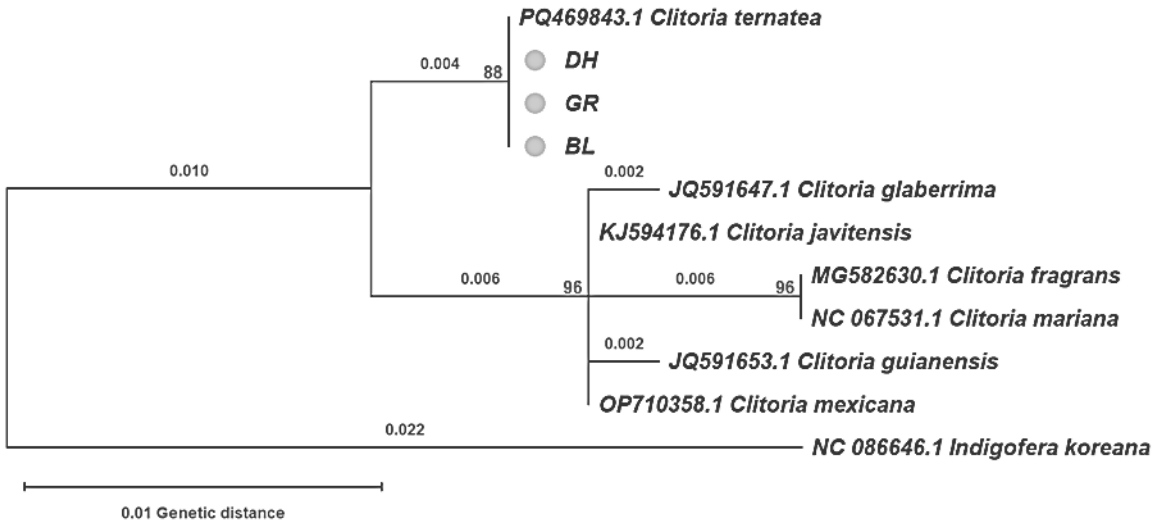
Kết quả so sánh giống hàng (Hình 5) nhận thấy mẫu BL-0401, DH-0402, GR-0403 tại các vị trí

nucleotide từ 10pb đến 530pb có mức tương đồng cao với mẫu chứng.



Hình 5. Kết quả so sánh trình tự gen *rbcL* của 3 mẫu trong nghiên cứu với loài *C. ternatea*

Kết quả xây dựng cây phát sinh loài: Giản đồ phát sinh chủng loại được dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood từ trình tự gen *rbcL* (Hình 6) cho thấy ba mẫu BL-0401 (BL), DH-0402 (DH), và GR-0403 (GR) tạo thành một nhánh đơn ngành và gom cụm trực tiếp với trình tự tham chiếu PQ469843.1 *Clitoria ternatea*, với giá trị bootstrap 88.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loài của ba mẫu thực vật BL-0401, DH-0402, GR-0403 dựa trên trình tự gen *rbcL*

4. BÀN LUẬN

Việc xác định chính xác loài thực vật có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu, bảo tồn và khai thác nguồn tài nguyên dược liệu. Trong nghiên cứu này, phương pháp mã vạch DNA (DNA barcoding) dựa trên trình tự vùng gen lục lạp *rbcL* đã được sử dụng nhằm xác nhận loài Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.) thu thập tại các vùng sinh thái khác nhau ở tỉnh Cà Mau. Việc ứng dụng kỹ thuật sinh

học phân tử giúp tăng độ tin cậy trong định danh loài thông qua so sánh trình tự DNA với các dữ liệu tham chiếu trong cơ sở dữ liệu GenBank.

Kết quả ly trích DNA tổng số từ lá non của cây Đậu biếc cho thấy các mẫu thu được DNA có chất lượng tốt, thể hiện qua các băng DNA rõ ràng trên gel agarose và không có dấu hiệu đứt gãy đáng kể. Điều này chứng tỏ phương pháp ly trích DNA bằng CTAB được áp dụng trong nghiên cứu có hiệu quả trong việc thu nhận DNA từ mô thực vật. Phương pháp này đã được Doyle đề xuất và hiện được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học phân tử thực vật nhờ khả năng thu nhận DNA có độ tinh sạch và ổn định cao [8].

Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *rbcL* đã khuếch đại thành công đoạn gen mục tiêu với kích thước khoảng 600 bp ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Kích thước này phù hợp với kích thước đặc trưng của vùng gen *rbcL* thường được sử dụng trong các nghiên cứu DNA barcoding ở thực vật. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy gen lục lạp *rbcL* có khả năng khuếch đại ổn định ở nhiều nhóm thực vật và thường được sử dụng làm chỉ thị phân tử trong các nghiên cứu phân loại và nhận diện loài [6,7].

Kết quả giải trình tự và phân tích BLAST cho thấy các trình tự thu được từ ba mẫu nghiên cứu đều có mức độ tương đồng 100% với các trình tự của loài *Clitoria ternatea* đã được công bố trong cơ sở dữ liệu GenBank. Điều này khẳng định rằng các mẫu thu thập tại ba vùng sinh thái khác nhau ở tỉnh Cà Mau đều thuộc cùng một loài là *Clitoria ternatea*. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Dhall và cộng sự khi sử dụng các marker lục lạp như *rbcL* để xác nhận và định danh loài thực vật bằng phương pháp DNA barcoding [11].

Kết quả so sánh trình tự giữa các mẫu nghiên cứu cho thấy không ghi nhận sự khác biệt đáng kể về vùng gen *rbcL* giữa các mẫu Đậu biếc thu thập tại các vùng sinh thái khác nhau. Một số sai khác nucleotide đơn lẻ được ghi nhận rải rác trên trình tự, cụ thể tại các vị trí nucleotide số 21, 23 và 24, mẫu DH-0402 có sự thay thế base so với hai mẫu còn lại. Tuy nhiên, mức độ biến dị này rất thấp và không ảnh hưởng đến kết quả định danh loài. Các sai khác này có thể phản ánh biến dị di truyền tự nhiên trong nội bộ loài hoặc sai số kỹ thuật trong quá trình giải trình tự, do vùng gen *rbcL* có tính bảo tồn cao.

Kết quả xây dựng cây phát sinh loài cho thấy mức độ tương đồng trình tự cao và là bằng chứng phân tử đáng tin cậy để định danh cả ba mẫu thuộc loài *C. ternatea*. Nhánh chứa ba mẫu nghiên cứu tách biệt rõ với các loài khác trong chi *Clitoria* như *C. glaberrima*, *C. javidensis*, *C. fragrans*, *C. mariana*, *C. guianensis* và *C. mexicana*, trong khi *Indigofera koreana* nằm ở vị trí ngoại nhóm với khoảng cách di truyền lớn hơn, phản ánh cấu trúc cây phù hợp về mặt phát sinh loài. Kết quả này phù hợp với nhận định rằng *rbcL* là một marker lục lạp có tính bảo tồn cao, khả năng khuếch đại và bảo tồn trình tự tốt, rất hữu ích cho nhận diện thực vật ở mức chi và sàng lọc ban đầu ở mức loài, mặc dù độ phân giải đối với các taxon gần nhau đôi khi còn hạn chế [12]. Đáng chú ý, nghiên cứu trên chính *Clitoria ternatea* cũng cho thấy vùng *rbcL* có giá trị trong xác thực nguồn mẫu và phân biệt cultivar khi được kết hợp với phân tích biến dị trình tự, qua đó củng cố ý nghĩa của kết quả trong nghiên cứu mã vạch DNA ở nhóm vật liệu này [11].

Vì vậy, từ góc độ mã vạch DNA, dữ liệu hiện tại đủ mạnh để khẳng định ba mẫu BL-0401, DH-0402 và GR-0403 thuộc *C. ternatea*. Tuy nhiên, để tăng độ tin cậy phân giải nội loài hoặc phân biệt các dòng gần nhau, nên kết hợp thêm các marker như *matK*, ITS2 hoặc *trnH-psbA* trong các phân tích tiếp theo [12, 13].

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy các mẫu Đậu biếc thu thập tại ba vùng sinh thái khác nhau ở tỉnh Cà Mau có mức độ tương đồng 100% với loài *Clitoria ternatea* đã được công bố trước đó.

Đồng thời, nghiên cứu cũng cho thấy gen *rbcL* là marker phân tử phù hợp cho định danh loài và phản ánh tính ổn định di truyền của nguồn mẫu tại khu vực nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho việc nhận diện, bảo tồn và định hướng khai thác

nguồn dược liệu Đậu biếc tại địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V. V. Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản Y học, pp. 883-885, 2012.
- [2] M. R. Arya, S. Beevy, and M. Dan, "Pharmacological and phytochemical studies on *Clitoria ternatea* L.- A review," *International Journal of Botany Studies*, vol. 7, no. 1, pp. 462-471, 2022.
- [3] L. H. H. Ha, N. T. Nhut, N. T. H. Yen, T. H. Q. Huy, N. T. Dat, N. P. T. Nha, et al., "Đặc điểm thực vật của cây Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae)," *Journal of Science and Technology - Binh Duong University*, vol. 6, no. 1, 2023.
- [4] L.T. N. Giau, N. T. T. Thuy, and H.A. Duy, "Đặc điểm thực vật học và tác dụng kháng oxy hóa *in vitro* của hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae) tại Bạc Liêu," *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*, vol. 11, no. 2, pp. 98-105, 2022.
- [5] N.Q. Thang, P.T. Trang, L.T. Ngoan, P. T. T. Binh, H. T. N. Y, T. T. T. Anh, et al., "Bước đầu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae) được thu hái tại Cần Thơ," *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*, no. 39, 2021.
- [6] R. A. Levin, W. L. Wagner, P. C. Hoch, M. Nepokroeff, J. C. Pires, E. A. Zimmer, and K. J. Sytsma, "Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data," *American Journal of Botany*, vol. 90, no. 1, pp. 107-115, 2003, doi: 10.3732/ajb.90.1.107.
- [7] A. J. Fazekas, K. S. Burgess, P. R. Kesanakurti, S. W. Graham, S. G. Newmaster, B. C. Husband, D. M. Percy, M. Hajibabaei, and S. C. H. Barrett, "Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, Art. no. e2802, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002802.
- [8] J. J. Doyle and J. L. Doyle, "Isolation of plant DNA from fresh tissue," *Focus*, vol. 12, pp. 13-15, 1990.
- [9] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467, 1977, doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- [10] S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski, M. Sanderford, S. Sharma, and K. Tamura, "Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive and green computing," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 41, no. 12, Art. no. msae263, 2024, doi: 10.1093/molbev/msae263.
- [11] S. Dhall, A. Subhadarshinee, and L. Acharya, "DNA barcode based cultivar authentication in *Clitoria ternatea* L. using *rpoB* and *rbcL* conserved regions," *Plant Science Today*, vol. 12, no. 2, pp. 1-9, 2025, doi: 10.14719/pst.4403.
- [12] S. Nath, J. T. VanSlambrouck, and J. W. Yao, "DNA barcoding of terrestrial invasive plant species in Southwest Michigan," *Plant Direct*, vol. 8, no. 6, Art. no. e615, 2024, doi: 10.1002/pld3.615.
- [13] L. H. Tnah, S. L. Lee, C. T. Lee, K. K. S. Ng, C. H. Ng, and N. Zawiah, "DNA barcode identification of cultivated and wild tropical fruit species," *3 Biotech*, vol. 14, no. 1, Art. no. 7, 2024, doi: 10.1007/s13205-023-03848-w.