

Nghiên cứu mô tả hình thái và xác định mã vạch ADN loài Bọ mắ m tím

Lê Đức Thanh và Lê Văn Minh*

Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh – Viện Dược liệu

TÓM TẮT

Hiệu quả điều trị của dược liệu yêu cầu đúng về chất lượng, đúng về chủng loại nhằm tránh nhầm lẫn và đảm bảo sức khỏe người dùng. Vì vậy, xác định đúng loài cây thuốc là một trong những yếu tố quan trọng trong sử dụng, trong nghiên cứu và bảo tồn. Ở Việt Nam, chi *Pouzolzia* được công bố có 6 loài, tuy nhiên gần đây phát hiện thêm một số loài được cho là thuộc chi này. Bằng phương pháp phân tích hình thái và xác định mã vạch ADN, nghiên cứu này mô tả các đặc điểm về hình thái và cung cấp thêm thông tin về mã vạch ADN của loài Bọ mắ m tím làm cơ sở phục vụ đối chiếu với các loài khác trong chi *Pouzolzia* được phát hiện tại Việt Nam. Đồng thời, kết quả nghiên cứu góp phần hạn chế sự nhầm lẫn trong khai thác và sử dụng các loài thuộc chi này.

Từ khóa: chi *Pouzolzia*, mô tả hình thái, mã vạch, ADN lục lạp, ITS

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ Gai (Urticaceae) là họ thực vật có hoa thuộc lớp Ngọc Lan (Magnoliopsida), ngành Ngọc Lan (Magnoliophyta) với đa dạng các dạng sống như thân thảo, thân bụi và thân gỗ [1]. Hiện trên thế giới, họ này có 45 chi với khoảng 700 loài [1]. Tại Việt Nam, họ Gai có 4 tông (Urticeae, Lecantheae, Boehmerieae, Parietarieae), 21 chi (*Urtica*, *Dendrocnide*, *Girardinia*, *Nanocnide*, *Laportea*, *Procris*, *Elatostema*, *Petelotiella*, *Lecanthus*, *Pilea*, *Meniscogyne*, *Chamabainia*, *Boehmeria*, *Archiboehmeria*, *Pouzolzia*, *Gonostegia*, *Neodistemon*, *Oreocnide*, *Debregeasia*, *Maoutia*, *Parietaria*) với hơn 100 loài [2, 3].

Chi *Pouzolzia* Gaudich thuộc họ Gai (Urticaceae) được thống kê trên thế giới có 35 loài và 15 phân loài [2]. Theo ghi nhận của Phạm Hoàng Hộ có 6 loài thuộc chi *Pouzolzia* phân bố ở Việt Nam, bao gồm: *Pouzolzia auriculata* Wight, *Pouzolzia elegans* Wedd., *Pouzolzia hirta* Blume ex Hassk., *Pouzolzia pentandra* (Roxb.) Benn., *Pouzolzia sanguinea* (Blume) Merr. và *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn. Đặc điểm chi này chủ yếu có dạng thân bụi hoặc bụi nhỏ, thân thảo, không có gai. Lá mọc so le, hiếm khi mọc đối, phiến lá có 3 gân hoặc hơn, mép lá có răng cưa đều hay không đều, hoặc mép nguyên, lá bẹ thường không rụng. Hoa

đơn tính hoặc lưỡng tính, lá bắc nhỏ, bế quả trong đài [4].

Mã vạch ADN là một trong những phương pháp dựa vào những đoạn gen ngắn để dễ dàng, nhanh chóng và chính xác xác định thông tin của một loài. Hiện nay, nhiều cơ sở dữ liệu DNA barcode được xây dựng trên khắp thế giới cho thấy sự phổ biến và tầm quan trọng của việc ứng dụng mã vạch ADN ở các lĩnh vực. Nhiều gen được sử dụng gồm các gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *ycf1*), gen nhân (*ITS*) hoặc gen ty thể (*COI*) [5, 6]. Có nhiều phương pháp để xác định danh tính của một loài thực vật và mỗi phương pháp đều có ưu – nhược điểm riêng. Nhằm đảm bảo tính chính xác các nhà khoa học thường kết hợp phương pháp định danh hình thái và phương pháp phân tử để xác định loài. Sự kết hợp của các phương pháp sẽ giúp thông tin loài được đầy đủ và chuẩn xác hơn.

Cây Bọ mắ m (thuốc dòi) được sử dụng làm thuốc rất phổ biến với tên khoa học là *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn., có tác dụng chính là trị ho, viêm phế quản, viêm phổi. Nó là một trong những loài thuộc Chi *Pouzolzia* được ghi nhận tại Việt Nam. Qua tham khảo một số kết quả

Tác giả liên hệ: TS. Lê Văn Minh

Email: lvminh05@gmail.com

nghiên cứu cho thấy chưa có sự đồng nhất giữa mô tả hình thái và ADN mã vạch một số loài thuộc chi này (dữ liệu chưa công bố). Do đó, nghiên cứu này đã tiến hành mô tả hình thái kết hợp với xác định mã vạch ADN của loài Bộ mấm tím (*Pouzolzia* sp.), với tên thông dụng là “Bộ mấm”, nhằm cung cấp thêm thông tin về loài này phục vụ cho việc sử dụng đúng trong y học cổ truyền. Kết quả nghiên cứu cũng là một cơ sở để phân biệt loài này và các loài trong cùng chi tại Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu cây Bộ mấm (SCPM) thu hái tại Vườn thuốc nam - chùa Phước Thạnh (217/7 ấp 5, xã Xuân Thới Thượng, huyện Hóc Môn, TP.HCM) và mẫu SC được thu hái tại Bà Rịa - Vũng Tàu được lưu trữ tại Phòng Tài nguyên và Phát triển Dược liệu (Trung tâm Sâm và DL TP.HCM). Các mẫu dùng tách ADN được thu hái trong vườn rồi rửa sạch, khử khuẩn bằng cồn 70% và lưu trữ ở -80 °C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp so sánh hình thái

Xác định tên khoa học theo phương pháp so sánh hình thái cổ điển (dựa trên các đặc điểm các bộ phận của cây như cành, lá, hoa, quả, hạt) và sử dụng khóa phân loại trong các bộ thực vật chí hiện

có. Tham chiếu tên khoa học theo các tài liệu tra cứu chuyên ngành: Cây cỏ Việt Nam [7], Từ điển cây thuốc Việt Nam [8], Danh lục cây thuốc Việt Nam [9] và được cập nhật mới theo danh pháp Quốc tế dựa vào website dữ liệu chuyên ngành thực vật như www.worldfloraonline.org, www.efloras.org, <https://powo.science.kew.org>.

2.2.2. Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN tổng

ADN tổng được tách chiết bằng bộ hóa chất Plant ADN isolation Kit (Norgenbiotek, Canada). Tinh sạch sản phẩm ADN bằng Genomic ADN Purification kit của Fermentas. Tất cả quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.3. Phương pháp nhân gen đích bằng kỹ thuật PCR

Các vùng gen lục lạp (*matK*, *rbcl*, *psbA-trnH*) và vùng gen nhân (*ITS-rADN*) được nhân bản với trình tự nucleotide của các cặp mồi theo Bảng 1. Thành phần mỗi phản ứng PCR gồm: 7 µL H₂O khử ion; 12.5 µL PCR Master mix kit (2X); 1.25 µL mồi xuôi (10 pmol/µL); 1.25 µL mồi ngược (10 pmol/µL); 3 µL ADN (10-20ng). Tổng thể tích phản ứng là 25 µL. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: khởi đầu 94 °C/3 phút; lặp lại 40 chu kỳ khuếch đại gen: 94 °C/45 giây -> 55 °C/45 giây -> 72 °C/45 giây; kết thúc ở 72 °C/10 phút và giữ ở 4 C/∞.

Bảng 1. Danh sách và trình tự nucleotid của các cặp mồi dùng trong nghiên cứu

Tên vùng gen	Trình tự nucleotide của mồi	Kích thước gen đích	Tài liệu tham khảo
<i>matK</i>	5'-TTTGACTGTATCGCACTATG-3'	900 bp	[10]
	5'-ATTTACACG GATTCTTAACG-3'		
<i>rbcl</i>	5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'	700 bp	[11]
	5'-CTTCGGCACAAAATACGAAACGATCTCTCCA-3'		
<i>ITS</i>	5'-CACTGAACCTTATCATTAGAG-3'	700 bp	[10]
	5'-CTTATTGATATGCTTAAACTCAG-3'		
<i>psbA-trnH</i>	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'	400 bp	[12]
	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAAATC-3'		

2.2.4. Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1.5% và tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức). Giải trình tự được Công ty Macroge (Hàn Quốc) thực hiện trên ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied

Biosystems). Phản ứng giải trình tự được thực hiện hai chiều với 4 cặp mồi (*ITS*, *matK*, *rbcl* và *psbA-trnH*), sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 và đọc kết quả trên hệ thống ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự ADN sau khi đọc được hiệu chỉnh để loại bỏ các

vùng tín hiệu nhiều với sự trợ giúp của phần mềm ChromasPro 2.1.6 (Technelysium. Pty Ltd., Tewantin, Australia). Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 [13]. Các vùng không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích. Trình tự nucleotide của mẫu được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng phần mềm BLAST trong NCBI (website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.2.5. Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại sẽ được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa Maximum Likelihood (ML) sử dụng phần mềm Treefinder version March 2011 và phương pháp Bayesian inference (BI) bằng phần mềm MrBayes v3.2.1. Trước khi phân tích ML và BI, dữ liệu trình tự nucleotid sẽ được khảo sát phân bố nucleotid, kiểm tra các giả thuyết và xác định mô hình tiến hóa tối ưu sử dụng bởi phần mềm Kakusan 4.0 dựa trên thông tin Akaie được hiệu chỉnh (corrected AICc - Akaike Information Criterion). Mô hình tiến hóa tốt nhất được chọn cho ML là mô hình đảo chiều thời gian tổng thể với giá trị tham số gamma G (G: 0.2053 trong ML và 0.3284 trong BI). Phần mềm Tracer 1.5 được sử dụng để kiểm tra ước lượng tham số và điểm hội tụ. Xác định bootstrap trong cây ML và Bayesian posterior probabilities (BPP) với 1,000 lần lặp lại. Đánh giá các nút trong cây ML với giá trị bootstrap

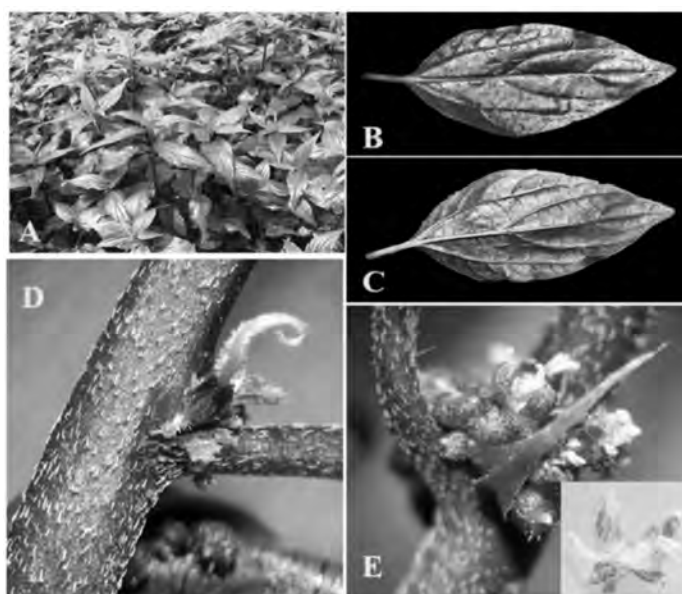
≥ 75% và giá trị BPP ≥ 95% . Khoảng cách di truyền (P) giữa các loài trong chi cũng đã được tính toán bằng Mega 7.0 [14].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân tích, mô tả hình thái loài Bọ mắt tím

Cây thân thảo, cao 30-40 cm, thân có màu nâu đỏ, thiết diện tròn, có lông nhiều, thân non có lông, lá có phiến xoan thuôn dài đầu nhọn đáy tròn, mọc cách, mép nguyên, kích thước dài 3-5 cm, rộng 1-1,5 cm, mặt trên xanh đậm có lông thưa, mặt dưới tím lông nhiều hơn mặt trên, 3 gân chính, 3-4 cặp gân phụ, cuống lá dài 1-1.5 cm, lá kèm hình tam giác dài 1-2 cm. Cụm hoa đực nhỏ tím, lá đài 4 màu đỏ tươi dài 1-1.5 mm, tiểu nhụy 4, hoa cái đài hình elip hoặc hình thoi dài 0.8-1.2 mm bao nhụy cái có vòi nhụy dài màu trắng, bế quả trong đài có lông thưa dài 1.3-1.5 mm (Hình 1). Các đặc điểm thực vật của Bọ mắt tím được miêu tả ở trên cho thấy loài này thuộc chi *Pouzolzia*, họ Gai (Urticaceae).

Dựa trên kết quả miêu tả các đặc điểm về hình thái và so sánh đối chiếu với các tài liệu tra cứu chuyên ngành cho thấy trong các tài liệu vẫn còn thiếu một số dữ liệu và các chỉ tiêu đặc điểm thực tế của loài này chưa tương đồng như miêu tả của các nguồn tài liệu để từ đó có thể kết luận chính xác tên khoa học cho loài Bọ mắt tím. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá về mặt di truyền của loài này so với các loài khác cùng chi để có thêm dữ liệu xác định thông tin loài.

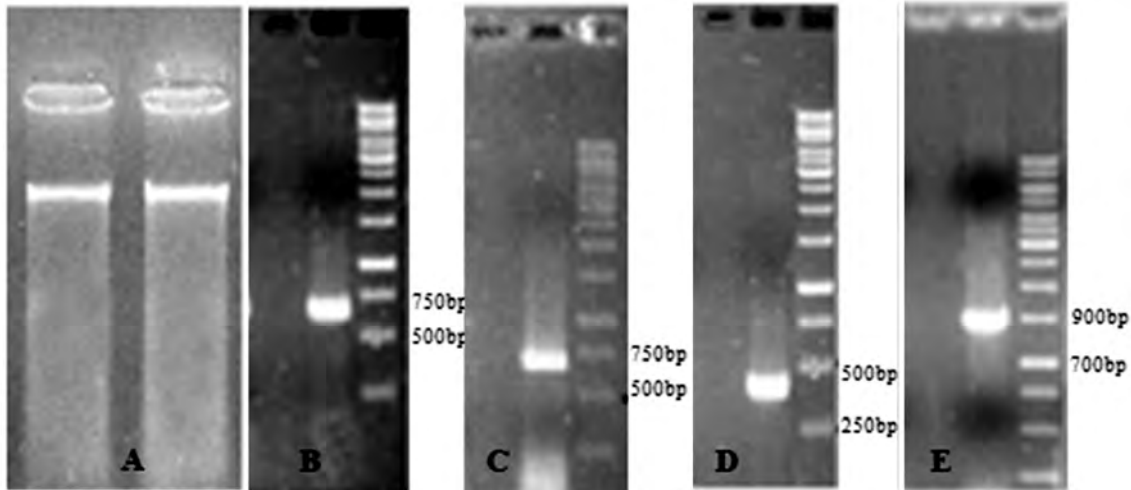


Hình 1. Hình thái loài Bọ mắt tím (*Pouzolzia* sp.). (A) Hình ảnh cây sinh trưởng tự nhiên; (B) và (C) Mặt trên và mặt dưới lá; (D) Hoa cái; (E) Hoa đực

3.2. Kết quả tách chiết ADN tổng và nhân bản trình tự ADN

ADN tổng của 2 mẫu *Pouzolzia* sp. (SC- thân không tím; SCPM – thân tím) đã được tách chiết thành công với chất lượng ADN cao (Hình 2A). Kết quả điện di kiểm tra ADN trên gel agarose 1% cho thấy ADN không bị gãy và tương đối sạch. Kết quả đo OD cho thấy chỉ số OD_{260}/OD_{280} của các mẫu luôn nằm trong khoảng 1.8 đến 2.0. Sau khi tiến hành tinh

sạch ADN tổng số bằng bộ KIT tách chiết ADN (Genomic Purification Kit), 04 vùng gen (*ITS*, *rbcl*, *psbA-trnH*, *matK*) được nhân bản thành công với nhiệt độ gắn mồi là 55°C cho mẫu nghiên cứu (Hình 2B -2E). Kích thước sản phẩm PCR đúng như kích thước theo tài liệu tham khảo. Chất lượng của sản phẩm PCR được thể hiện khi điện di trên gel agarose 1.5% chỉ có một băng duy nhất, sáng đậm, đủ tiêu chuẩn cho giải mã trình tự.



Hình 2. Kết quả điện di ADN trên gel agarose

Mẫu ADN tổng trên gel agarose 1% (A); Sản phẩm PCR các gen *ITS* (B), *rbcl*(C), *psbA-trnH* (D) và *matK* (E) điện di trên gel agarose 1.5%

3.3. Kết quả giải mã trình tự 4 vùng gen ADN barcode

3.3.1. Kết quả xác định trình tự nucleotide vùng ITS-rADN và phân tích di truyền

Trình tự nucleotide được giải trực tiếp hai chiều. Kết quả giải trình tự vùng *ITS* -rDNA cho ảnh điện di đều với các đỉnh huỳnh quang rõ nét, cường độ mạnh và rõ ràng. Sau khi loại bỏ trình tự mồi và các vùng tín hiệu nhiễu, thu được trình tự nucleotid của mẫu SCPM có độ dài là 704 nucleotide (Trình tự 1).

Trình tự 1. Trình tự nucleotide của vùng gen ITS-rADN, gồm 704 bp.

```
>TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
GTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAACCTGCTC
AGCAGAACAACCAGCGAACATGTTTACAAAATATCTC
GACGTGTTTTCGGCCTCTCGGGGCTCGAACTCGCC
GGGCGTCGGGGCCCCTGACAACCAACAACTCGA
GCGCGGAATGCGCAAGGAAATACTCAAGTAGTTCG
ATCGCGACCCGCACGGGGGATGCCCCCTGGCGAGAT
TGCGCTCGTTCGACTGCTTCTAAATCTTAACGACTCTC
GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA
TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG
```

```
CCCGAAGCCGTCAGGTTGAGGGCAGCCTGCCTGG
GCGTCACGCACCGTCGCCCCCTTTACAAACCCGTCT
TTGACGGGGTGTGATGAGGGGGCGGAAAATGGCCT
CCCGTGC GCGCGTCTGCGGTTGGCTTAAAACTGC
GTC ACTGTCTTTGTTTTAGCGGCATTTCGGTGGTTTC
GATCTCTCGGCGCCCCGTCGCGAAGTCAAAGCATCA
GTGGCTCACCTTAAGACCCCAAGGCGCATCGACGA
TCCCGTGC GCGCGCCCTCGACGAGACCCAGGTCAG
GCGGGGCTACCCGCTGAGT.
```

Kiểm tra tính tương đồng (similarity) của trình tự nucleotide trên với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự nucleotide của mẫu SCPM có tương đồng cao 89.96% với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF137920) và có mức độ tương đồng khá thấp với loài *P. mixta* KF137916 (86%), *P. poeppigiana* MH357938 (86%) và *P. argenteonitida* KF137915 (84%). Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Để kiểm chứng thêm, phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại được

sử dụng để xác định tên khoa học cho mẫu trong nghiên cứu.

Phân tích về khoảng cách di truyền (P) của mẫu SC và SCPM với trình tự nucleotide của 5 loài trong cùng chi tham khảo trên Genbank (Bảng 2; Hình 3). Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, các vị trí còn lại sẽ được sử dụng cho phân tích (636 nucleotide). Trong số 193/636 vị trí biến đổi (Variable), vị trí có giá trị mang thông tin (Parsimony informative) chiếm 125/636 vị trí. Khoảng cách di truyền giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo phương pháp p-distance đã chỉ ra

mức độ khác nhau giữa các cặp loài trong chi *Pouzolzia*. Kết quả cho thấy, trong chi *Pouzolzia* khoảng cách di truyền giữa các loài dao động từ 2.8% đến 18.7%. Sự sai khác rất thấp cũng được tìm thấy giữa mẫu SC và loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF137920) là 2.8% và 19 nucleotide; Sai khác 4.7% giữa cặp loại (*Pouzolzia mixta*/*P. argenteonitida*). Mẫu SC sai khác với mẫu SCPM là 11.7% và 75 nucleotide, do đó bước đầu có thể nhận định mẫu hai mẫu này có thể khác loài hoặc khác thức và có quan hệ với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica*.

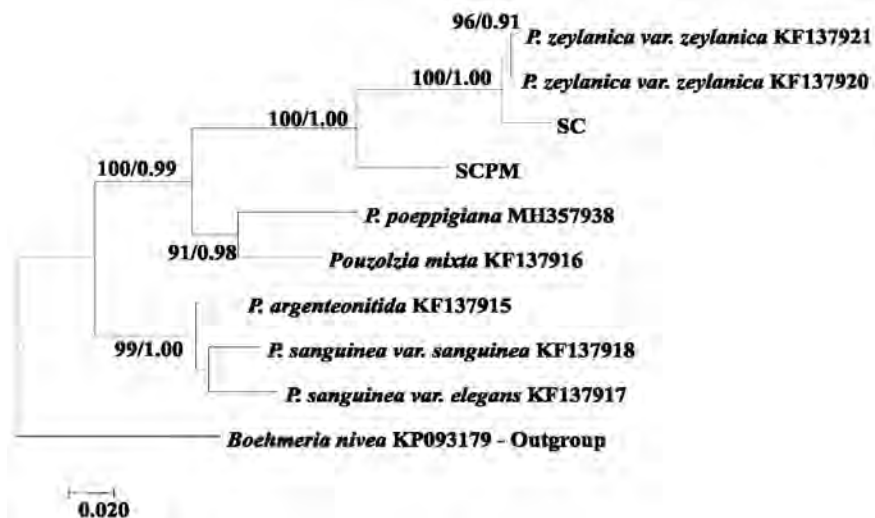
Bảng 2. Khoảng cách di truyền của mẫu nghiên cứu với các loài/thứ trong chi tham khảo từ Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA

Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7
1. SC	-						
2. SCPM	0.117	-					
3. <i>P. poeppigiana</i> MH357938	0.188	0.146	-				
4. <i>P. zeylanica</i> var. <i>zeylanica</i> KF137920	0.028	0.104	0.175	-			
5. <i>P. sanguinea</i> var. <i>sanguinea</i> KF137918	0.196	0.183	0.144	0.188	-		
6. <i>Pouzolzia mixta</i> KF137916	0.175	0.141	0.078	0.161	0.133	-	
7. <i>P. argenteonitida</i> KF137915	0.187	0.175	0.135	0.179	0.047	0.128	-

Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 5 loài thuộc chi *Pouzolzia* đã được xây dựng theo cả 2 phương pháp ML và BI (Hình 3) chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau. Các phân tích ML và BI đã lần lượt tạo ra với thông số (-lnL) = 5914,502 và 2285,56 tương ứng.

Hai mẫu SC, SCPM và loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF137920, KF137921) tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao

(trên 88%) và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap cao (MLBS = 100%, BPP = 100%). Loài lá gai (*Boehmeria nivea* - MF350103) được chọn là loài ngoài nhóm (outgroup). Kết quả nhận định hai mẫu SC, SCPM trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* có chung nguồn gốc với một thứ loài Bộ mắt *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* trên thế giới.



Hình 3. Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ họ hàng của hai mẫu SC và SCPM với các loài/thứ trong cùng chi trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotid vùng gen ITS-rADN.

3.3.2. Giải mã trình tự vùng gen *matK* (*maturase K*)

Trình tự vùng gen *matK* (Trình tự 2) được tiến hành so sánh, kết quả cho thấy trình tự nucleotide của mẫu SCPM có mức tương đồng cao (99%) với trình tự nucleotide của loài Bọ mắ *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF138059; KF138060). Tuy nhiên, có mức độ tương đồng thấp hơn với loài *P. guineensis* KF138055 (96%), *P. sanguinea* var. *elegans* KF138056 (94%) và *P. mixta* JF270899 (96%).

Trình tự 2. Trình tự nucleotid của vùng gen *matK*, gồm 845 bp.

```
>TTCTAATACCCTACCCGATTTCATCTGGAAATCTTAGT
TCAAACCCTTCGTTACTGGGTAAAAGATGCTTCCTCT
TTGTATTTATTAGGTCTTTTTCTTTATGAGTATTCTAGT
TTTAATTGGAATAGTCTTATTATCCAAACAAATTTATA
GCTAAATCTATTTATTTTTTCAAAGTAATCCAAG
ATTTTTTTGTTTCTGTATAATTCTCATCTTTCTGAATA
CGAATCCATCTTACTTTTTCTCCGCAACAAATCTTCTC
ATTTACGATTAACAGCTTTTGGTGTTTTTTTGAGCG
AATTTTTTATATGTAATAAAGCCTCCCGTAGAAG
ACGCCCTTGCTAATGATTTCCGATCAGCCTATGGTTT
CTACAGGATCTGTTTATGCATTATGTTAGATATCAAGG
AAAATCAATTCTGGCTTAAACGAATTCCTCTTTTGA
TAAATAAATGGAAAAAGTTCTTTGTACATTTATGGCA
ATATCATTTTTATGTGTGGTCTCAATCAGGAAGGATGT
ATATAAATCAATTATGCAAGCGTCCCTTGGCTTTTTG
GGTTATCTTTCAAGTATGCGAATAAATCTTTCCGGTGG
TACGGACCCAAATGGCAGAAATTTTCATTTATAACGGA
TAATTCTATGAAGAAGATTGATACATTAATTCCAATGA
```

```
GTCCGCTGATTGGATCGTTGGCTAAAATTAATTTTG
TAATGTATTAGGACATCCCGTTAGTAAGTCGACTTGG
GTCGATTTATCGGATTTTGAGATTATTGATCGATTTGT
GCGTATATGCAGAAATTTTTTCATTATTACAGTGGAT
CCTCAAAAAAAAAAG.
```

Trình tự *matK* của 2 mẫu nghiên cứu được so sánh về khoảng cách di truyền với trình tự nucleotide của 5 loài trong cùng chi tham khảo trên Genbank (Bảng 3). Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, các vị trí còn lại được sử dụng cho phân tích gồm 768 nucleotide. Trong số 55/768 vị trí biến đổi (Variable), vị trí có giá trị mang thông tin (Parsimony informative) chiếm 46/768 vị trí. Khoảng cách di truyền giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo phương pháp p-distance đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài trong chi *Pouzolzia*.

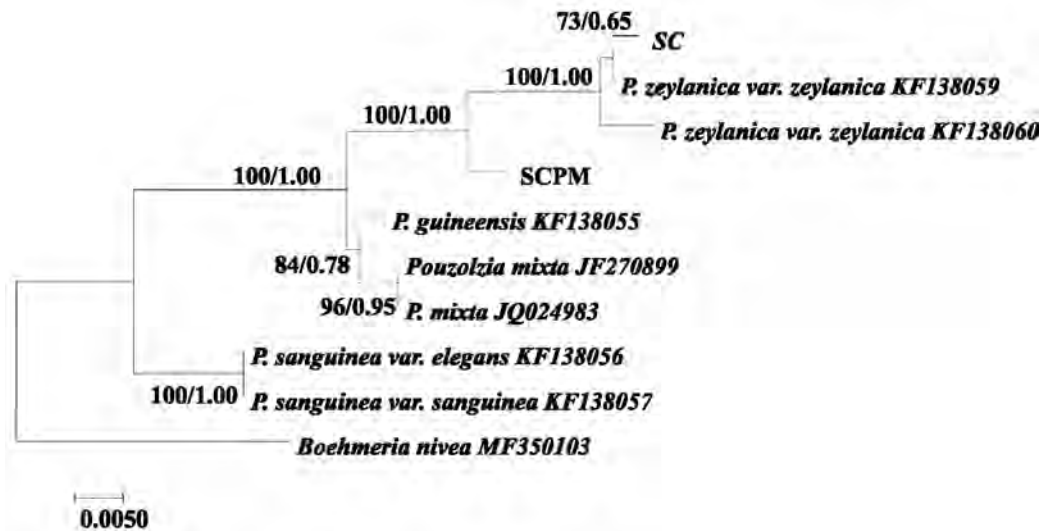
Kết quả cho thấy, trong chi *Pouzolzia* khoảng cách di truyền giữa các loài dao động từ 0% đến 5.8%. Không tìm thấy sự sai khác nào giữa cặp loài *P. sanguinea* var. *elegans* KF138056/*P. sanguinea* var. *sanguinea* KF138057. Sự sai khác rất thấp cũng được tìm thấy giữa mẫu SC và loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF138059) là 0.3% với sai khác là 2 nucleotide, nhận định đây có thể là sự sai khác về mặt địa lý. Mẫu SC sai khác với mẫu SCPM là 2.1% với 16 nucleotide (Bảng 3), nhận định mẫu SCPM có quan hệ xa với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica*.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền của hai mẫu với các loài/thứ từ Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotid vùng gen *matK*

Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7
1. SC	-						
2. SCPM	0.021	-					
3. <i>P. zeylanica</i> var. <i>zeylanica</i> KF138059	0.003	0.018	-				
4. <i>Pouzolzia mixta</i> JF270899	0.034	0.020	0.031	-			
5. <i>P. sanguinea</i> var. <i>elegans</i> KF138056	0.060	0.049	0.058	0.038	-		
6. <i>P. sanguinea</i> var. <i>sanguinea</i> KF138057	0.060	0.049	0.058	0.038	0.000	-	
7. <i>P. guineensis</i> _KF138055	0.033	0.020	0.030	0.007	0.037	0.037	-

Xác định vị trí phân loại của các loài trong chi *Pouzolzia* trên cơ sở vùng gen *matK* cho thấy mối quan hệ di truyền của 5 loài thuộc chi *Pouzolzia* được xây dựng theo cả 2 phương pháp ML (-lnL = 5914,502) và BI (-lnL = 2285,56) trùng khớp với kết quả phân tích về khoảng cách di truyền ở trên (Hình 4). Hai mẫu SC và SCPM và loài *Pouzolzia*

zeylanica var. *zeylanica* (KF138059, KF138060) tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (trên 97%) và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap cao (MLBS = 100%, BPP = 100%). Tuy nhiên, trong nhóm riêng đó, mẫu SCPM tách ra 1 nhánh riêng rẽ so với mẫu SC và loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica*.



Hình 4. Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ họ hàng của mẫu SCPM với các loài/thứ trong cùng chi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*

3.3.3. Giải trình tự vùng gen *rbcl* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit)

Kết quả xác định trình tự nucleotide gen *rbcl* được trình bày ở trình tự 3, với độ dài là 621 nucleotide.

Trình tự 3. Trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcl*, gồm 621 nucleotide.

AAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTTAAAGAT
 TATAAATTGACGTATTACTCCCGAATATGAAACCAA
 GGATACTGATATTTAGCAGCATTTCGAGTAACTCT
 CAACCTGGAGTTCCCCCTGAAGAAGCAGGGGCTGC
 GGTAGCAGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACT
 GTATGGACTGACGGACTTACCAGTCTTGATCGCTACA
 AAGGTAGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGAG
 AAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCCTTA
 GACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTA
 CTCCATTGTGGCAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCT
 GCGCGCTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCTCC
 TGCTTACATTAATAACTTTCCAAGGCCCGCCGATGGT
 ATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGC
 CGGCCCTATTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGG
 GGTTATCCGCTAAGAATTATGGTAGAGCAGTTTATGA
 ATGTCTTCGCGTGGACTTGATTTTACCAAGATGAT
 GAGAACGTGAATTCTCAACCATTTATGCGTTGG.

Kết quả BLAST cho thấy trình tự nucleotide của Mẫu SCPM có tương đồng cao với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF138241- 99%), *P.*

poepigiana (MH358141 - 99.19%) và *P. guineensis* (KF138235 - 99.36%), *P. australis* (KT626767 - 98%), *P. sanguinea* var. *sanguinea* (KF138238 - 98.86%) và *P. argenteonitida* (KF138234). Tuy nhiên, mức độ tương đồng khá thấp với loài *P. guianensis* (MH358139 - 96%).

3.3.3.1. Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi *Pouzolzia*

Trình tự nucleotide của mẫu SCPM được so sánh về khoảng cách di truyền với 10 loài trong cùng chi tham khảo trên Genbank (Bảng 4). Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, các vị trí còn lại được sử dụng cho phân tích (519 nucleotide). Trong số 15/519 vị trí biến đổi, vị trí có giá trị mang thông tin chiếm 9/519 vị trí. Kết quả cho thấy, trong chi *Pouzolzia* khoảng cách di truyền giữa các loài dao động từ 0% đến 1.7%. Không tìm thấy sự sai khác nào giữa cặp loài *P. sanguinea* var. *elegans* KF138056/*P. sanguinea* var. *sanguinea* KF138057; mẫu SC/loài *Pouzolzia zeylanica* (KF496389). Sự sai khác rất thấp cũng được tìm thấy giữa mẫu SC và loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF138241) 0.4% và chỉ sai khác 1 nucleotide, cho thấy đây có thể là sự sai khác về mặt địa lý. Mẫu SC sai khác với mẫu SCPM là 0.8% và 4 nucleotid.

Bảng 4. Khoảng cách di truyền của hai mẫu SC và SCPM với các loài/thứ trong chi lấy từ Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *rbcl*

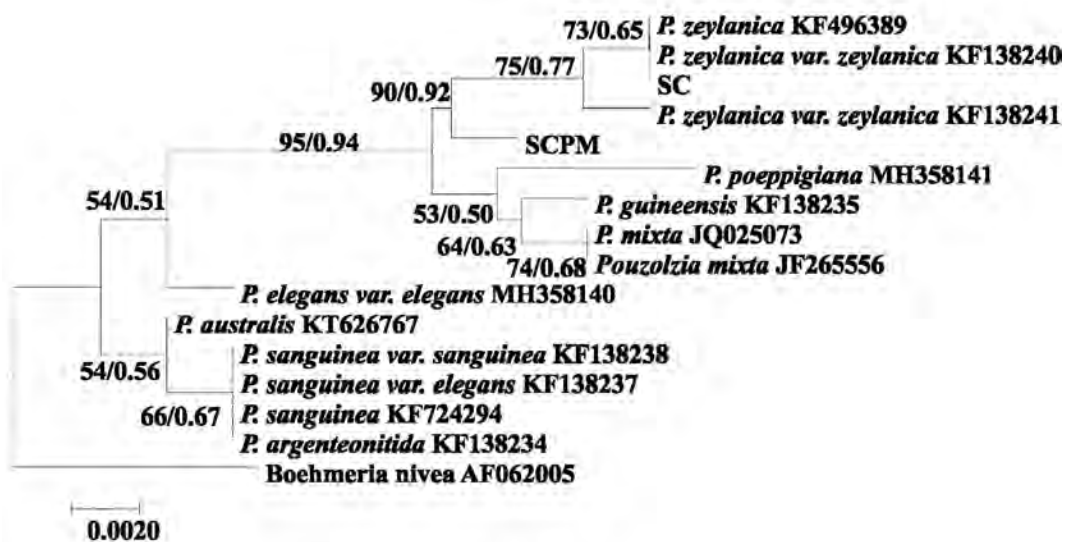
Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. SC	-												
2. SCPM	0.008												

Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
3. <i>P. poeppigiana</i> MH358141	0.010	0.010											
4. <i>P. Elegans</i> var. <i>elegans</i> MH358140	0.015	0.012	0.015										
5. <i>Pouzolzia mixta</i> JF265556	0.010	0.006	0.008	0.013									
6. <i>P. Australis</i> KT626767	0.017	0.013	0.015	0.006	0.013								
7. <i>P. Zeylanica</i> KF496389	0.000	0.008	0.010	0.015	0.010	0.017							
8. <i>P. zeylanica</i> var. <i>zeylanica</i> KF138241	0.004	0.008	0.013	0.015	0.010	0.017	0.004						
9. <i>P. sanguinea</i> var. <i>sanguinea</i> KF138238	0.015	0.012	0.015	0.008	0.012	0.002	0.015	0.015					
10. <i>P. sanguinea</i> var. <i>elegans</i> KF138237	0.015	0.012	0.015	0.008	0.012	0.002	0.015	0.015	0.000				
11. <i>P. sanguinea</i> KF724294	0.015	0.012	0.015	0.008	0.012	0.002	0.015	0.015	0.000	0.000			
12. <i>P. guineensis</i> KF138235	0.010	0.006	0.008	0.013	0.004	0.013	0.010	0.010	0.012	0.012	0.012		
13. <i>P. argenteonitida</i> KF138234	0.015	0.012	0.015	0.008	0.012	0.002	0.015	0.015	0.000	0.000	0.000	0.012	

3.3.3.2. Vị trí phân loại của các loài trong chi *Pouzolzia*

Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 10 loài thuộc chi *Pouzolzia* cho thấy sự thống nhất với kết quả phân tích ở trên (Hình 5). Các phân tích ML và BI cho thông số (-lnL) = 5914,502 và 2285,56. Mẫu SCPM,

SC và loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica* (KF138240, KF138241, KF496389) tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap (MLBS = 90%, BPP = 92%). Tuy nhiên, trong nhóm đó mẫu SCPM tách ra 1 nhánh riêng rẽ.



Hình 5. Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ họ hàng của mẫu SC và SCPM với các loài/thứ trong cùng chi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *rbcl* bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML) và Bayesian inference (BI)

3.3.4. Giải mã trình tự hai mẫu nghiên cứu với vùng gen *psbA-trnH*

Kết quả xác định trình tự nucleotide gen *psbA-trnH* sau khi làm sạch thu được trình tự nucleotide của mẫu SCPM có độ dài 291 nucleotide (Trình tự 4).

Trình tự 4. Trình tự nucleotide của vùng gen *psbA-trnH*, gồm 291 nucleotid.

```
>ATGCTCATAATTTCCCTCTAGACCTAGCTGCTGTAGA
ACTTTCATCTACAAATGGATAATACCTTTCTATTAGTAT
TATATTAGTATTAGTGTATACCATTTTGTGAAAATAAA
GAAGCACTACTAACTTCTTGATATCAAGAAGTTTAG
TAGTGCTTCTTTATTTTCTTAAAGGTTATTGTATTGCT
TTTTTTATCCTTTCCAAAAAATAAACATGAAT
TTTATATTTTCGAAATTCATATATTATAGATATTCAATTT
ATAAATATTTATTTCTTTATAG.
```

Trình tự nucleotide thu được từ mẫu SCPM được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Chưa tìm thấy công bố trong chi *Pouzolzia* về đoạn gen *psbA-trnH* đã được đăng ký trên Genbank. Đây là lần đầu tiên đoạn trình tự vùng gene *psbA-trnH* của mẫu Bộ mấm tím được công bố và đã đăng ký trên Genbank (OK336460.1).

4. BÀN LUẬN

Việc sử dụng dược liệu trong điều trị bệnh đã phổ biến từ lâu đời nay. Tuy nhiên, sử dụng sai loài cây thuốc có thể dẫn đến hiệu quả điều trị kém, thậm chí gây hậu quả nghiêm trọng cho sức khỏe người dùng. Do đó, việc xác định chính xác loài cây thuốc là vô cùng quan trọng. Nghiên cứu hình thái và mã vạch ADN xác định loài cây thuốc là một trong những phương pháp quan trọng trong nghiên cứu dược liệu.

Nghiên cứu này đã mô tả chi tiết hình thái và cấu trúc hoa, đồng thời phân tích trình tự các vùng gen *ITS*, *matK*, *rbcL* và *psbA-trnH*. Kết quả phân tích về khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh loài cho thấy hai mẫu SCPM và SC có mối quan hệ gần với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica*. Thông tin về các đoạn mã vạch của loài *Pouzolzia*

zeylanica ít được phân tích chi tiết trước đây. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần làm rõ và cung cấp thông tin về hình thái và 04 mã vạch ADN của loài Bộ mấm tím trong chi *Pouzolzia* được phát hiện tại Việt Nam. Bên cạnh những đóng góp chính thì nghiên cứu này còn có một số hạn chế cần được tiếp tục làm rõ trong thời gian tới như: Chưa thu được đủ mẫu các loài trong chi này ở Việt Nam để có thể so sánh và nghiên cứu đầy đủ thông tin hơn về mối quan hệ di truyền giữa các loài này; Chưa có các đối chứng mã vạch ADN với 06 loài khác trong cùng chi ở Việt Nam; Chưa đánh giá được hàm lượng hoạt chất của các loài nên chưa thể khẳng định giá trị về mặt dược học của chúng.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã mô tả về hình thái của loài Bộ mấm tím, đồng thời thành công trong việc giải trình tự vùng gen nhân (*ITS-rADN*), gen lục lạp (*matK*, *rbcL* và *psbA-trnH*) của mẫu SCPM. Các kết quả cho thấy mẫu Bộ mấm không tím và mẫu Bộ mấm tím nằm cùng nhóm với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica*, trong đó Bộ mấm không tím có sự tương đồng cao về mặt di truyền với loài *Pouzolzia zeylanica* var. *zeylanica*, nhưng mẫu Bộ mấm tím phân nhánh riêng biệt. Bên cạnh đó, lần đầu công bố và đăng ký trình tự vùng gen *psbA-trnH* của loài Bộ mấm tím trên Genbank. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp bộ thông tin cả về mô tả hình thái và trình tự 04 gen barcode của loài Bộ mấm tím cho việc so sánh tham chiếu với các loài trong cùng chi *Pouzolzia* ở Việt Nam. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu còn góp phần trong việc nhận diện đúng loài Bộ mấm sử dụng trong Y học cổ truyền, hạn chế các nhầm lẫn hoặc cố ý thay thế giả mạo.

LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn sự hỗ trợ và góp ý chỉnh sửa của TS. Đỗ Hoàng Đăng Khoa – Viện Kỹ Thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Heywood V. H., *Flowering Plants of the World*. London: Oxford University Press, 1978.
 [2] D. T. Hoàn, "Xây dựng khóa định loại các chi của họ Gai (Urticaceae Juss.) ở Việt Nam," in *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4*, Hà Nội, 2011, pp. 115-117.

[3] Wilmot-Dear C.M. and Friis I., "The New World species of *Boehmeria* and *Pouzolzia*. (Urticaceae, tribus Boehmerieae). A taxonomic revision," *Opera Bot*, vol. 129, pp. 1-103, 1996.

[4] Kravtsova T. I., Friis I. and Wilmot-Dear C. M., "Morphology and Anatomy of Fruits in *Pouzolzia*

(Urticaceae) in Relation to Taxonomy," *Kew Bulletin*, vol. 58, no. 2, pp. 297-327, 2003, doi: <https://doi.org/10.2307/4120618>

[5] Shuang Zhu, Qiaozhen Liu, Simin Qiu, Jiangpeng Dai and Xiaoxia Gao, "DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances," *Chinese Medicine*, vol. 17, no. 112, 2022.

[6] Natasha de Vere, Tim CG Rich, Sarah A Trinder and Charlotte Long, "DNA barcoding for plants," *Methods Mol Biol*, vol. 1245, pp. 101-118, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_8.

[7] P. H. Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*. TP. Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Trẻ Tp. Hồ Chí Minh, 2000.

[8] V. V. Chi, *Từ Điển cây thuốc Việt Nam*. Hà Nội: Nhà Xuất bản Y học, 2013.

[9] Viện Dược liệu, *Danh lục cây thuốc Việt Nam*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2016.

[10] P. K. Long *et al.*, "Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự

nucleotide vùng matK và ITS-rDNA," *Tạp Chí Công nghệ sinh học*, vol. 12, no. 2, pp. 327-337, 2014.

[11] Hasebe M., Omori T., Nakazawa M., Sano T., Kato M., and Iwatsuki K., "*rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 91, no. 12, pp. 5730-4, Jun 7 1994, doi: 10.1073/pnas.91.12.5730.

[12] Y. Zuo, Z. Chen, K. Kondo, T. Funamoto, J. Wen and S. Zhou, "DNA barcoding of *Panax* species," *Planta Med*, vol. 77, no. 2, pp. 182-7, 2011, doi: 10.1055/s-0030-1250166.

[13] Hall TA, "BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT," *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, pp. 95-98, 1999.

[14] Vũ Đình Duy *et al.*, "Sử dụng vùng ITS-rDNA và gen Matk để xác định loài sâm thuộc Chi sâm (*Panax*) ở vùng núi Phu Xai Lai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An," *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, vol. 18, no. 1, pp. 75-85, 2020, doi: <https://doi.org/10.15625/1811-4989/18/1/15267>

Morphological characteristics and DNA barcoding of *Pouzolzia* sp.

Le Duc Thanh and Le Van Minh

ABSTRACT

Effective treatment with medicinal plants requires both quality assurance and accurate identification to prevent complications and protect patient well-being. Therefore, identifying the correct species of medicinal plants is one of the important factors for their use, research, and conservation. Six species of the genus Pouzolzia have been reported in Vietnam. However, some species which were assumed to belong to this genus have recently been discovered. This study used morphological analysis and DNA barcoding to reveal the morphological characteristics and provide more information on Pouzolzia sp. These data were used as a reference for comparison with other species of Pouzolzia in Vietnam. It is recommended to exercise caution to prevent misidentification when using or exploiting species from this genus.

Keywords: *Pouzolzia* genus, morphological characteristics, barcode, chloroplast ADN, ITS

Received: 01/07/2024

Revised: 21/09/2024

Accepted for publication: 22/09/2024