

SỬ DỤNG CHỈ THỊ DNA BARCODE ĐỊNH LOẠI LOÀI KHỔ SÂM (*CROTON SP.*) ĐƯỢC THU HÁI TẠI XÃ NHƯ XUÂN, TỈNH THANH HOÁ

Lê Đình Chấn¹, Hoàng Thị Hà²

TÓM TẮT

Sử dụng các chỉ thị phân tử (DNA barcode) để nhận diện các loài sinh vật nói chung, các loài thực vật được nói riêng luôn có độ tin cậy cao. Đặc biệt là các loài quý hiếm, loài có giá trị trong thực tiễn. Về bản chất, DNA barcode là kỹ thuật sử dụng một trình tự DNA (khoảng 400 - 1000 bp) như một chỉ thị để xác định quan hệ chủng loài và nhận diện các loài sinh vật một cách nhanh chóng và chính xác và có thể nhận diện các loài thực vật được giả mạo hoặc các loài quý hiếm cần được bảo tồn, ... Do vậy, vấn đề này đang được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học trong và ngoài nước, đặc biệt là những loài đồng hình, hoặc những mẫu vật chưa phát triển hoàn thiện, hoặc những mẫu không có hình thái nguyên vẹn. Vì vậy, trong bài viết này, chúng tôi đề cập đến việc nhận diện loài Khổ sâm (*Croton sp.*) bằng trình tự DNA barcode *trnH*. Kết quả đã phân lập và xác định được trình tự của kích thước của gen *trnH*. Thông qua việc so sánh với các dữ liệu trên ngân hàng gen, trình tự nucleotide của gen này được xác định là loài *Croton kongensis*.

Từ khóa: DNA barcode, *Croton sp.*, gen *trnH*, *trnH*.

DOI: <https://doi.org/10.70117/hdujs.81.11.2025.819>

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong y học dân gian, Khổ sâm được sử dụng trong điều trị hiệu quả các bệnh như: kháng viêm, giảm đau, rối loạn tuần hoàn, dị ứng, mỡ máu, ngăn ngừa thiếu máu... [1][2]. Ngoài ra, nước sắc từ lá khổ sâm có tác dụng ức chế hiệu quả vi khuẩn tụ cầu vàng, liên cầu khuẩn nhóm B, ức chế phát triển của một số loại nấm ngoài da, ... Y học hiện đại đã chứng minh được khổ sâm chứa các hoạt chất nhóm flavonoid, alkaloid, β -sitosterol, terpenoid, stigmasterol, acid benzoic, ... Các hoạt chất này có giá trị dược học cao [6][7]. Mặt khác, thành phần hóa học có trong lá của loài cây này còn có tác dụng chống oxy hóa, chống dị ứng, kháng ung thư, chống loãng xương, ... [9][11][12]. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập trình tự nucleotide của gen *trnH*, để so sánh và xác định quan hệ di truyền của mẫu Khổ sâm thu hái tại xã Như Xuân, tỉnh Thanh Hóa với các trình tự nucleotide của gen *trnH* đã được công bố trên Genbank làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

¹ Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức; Email: ledinhchac@hdu.edu.vn

² Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu Khổ sâm thu hái tại xã Như Xuân, Thanh Hóa: 19027'56.41'' vĩ độ Bắc; 1050027'10.58'' kinh độ Đông; Cặp môi đặc hiệu được sử dụng để nhân bản trình tự gen nói trên được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các nucleotide của cặp môi sử dụng để nhân bản trình tự nucleotide của gen *trnH*

Gen	Tên môi	Trình tự	Kích thước	Tác giả
trnH-psbA	trnHf	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	490bp	Kress et al. 2005 [5]
	psbA3'1	GTTATGCATGAACGTAATGCTC		Kress et al. 2005 [5]

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ lá Khổ sâm

Được thực hiện theo phương pháp CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) [3]. Về bản chất là sử dụng CTAB (chất tẩy rửa không chứa ion) có thể kết tủa nucleic acid và polysaccharide.

*Phương pháp nhân gen *trnH* bằng kỹ thuật PCR*

Đoạn gen *trnH* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp môi đặc hiệu *trnHf/trnHl* với kích thước dự kiến là khoảng 490 nucleotide.

Chu trình nhiệt cho phản ứng của PCR như sau: Biến tính 95°C/4 phút, 30 chu kỳ (94°C/30 giây; 55°C/40 giây; 72°C/40 giây). Sản phẩm được kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

Phản ứng PCR được tiến hành với thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	PCR Master Mix	2X	12,5
2	Môi xuôi	10 pmol/ml	1
3	Môi ngược	10 pmol/ml	1
4	DNA khuôn	10ng/μl	1
5	Nước khử ion	-	9,5
Tổng thể tích			25

Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Sau khi nhân được gen *trnH*, bước tiếp theo cần thu nhận gen ở dạng tinh sạch và không lẫn gel agarose. Quá trình tinh sạch được thực hiện theo Kit GenJET PCR Purification của hãng Thermo Scientific.

*Phương pháp giải trình tự, phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen *trnH* và xây dựng cây phát sinh chủng loại*

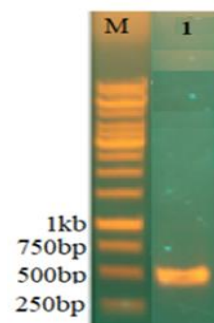
Trình tự nucleotide của các đoạn gen được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu. Trình tự gen đó được phân tích, so sánh và lập cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình BLAST [8], MEGA XI [4].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nhân bản trình tự *trnH*

Sau khi tách chiết thành công DNA, tiến hành nhân bản trình tự *trnH* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu, sau đó tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose, chụp ảnh, kết quả thể hiện trên hình 1.

Kết quả trên hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR của trình tự tương ứng với cặp mồi *trnH* F/R đặc hiệu được thể hiện với các kích thước khoảng 500 bp. Kết quả này phù hợp với trình tự các cặp mồi tương ứng, đủ độ tin cậy làm cơ sở cho việc đọc trình tự *trnH*; phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả PCR với cặp mồi *trnH* (M: Marker; 1: *trnH* NXTH)

3.2. Kết quả đọc trình tự đoạn gen *trnH* của loài Khổ sâm

Sau khi điện di, tiến hành đọc trình tự gen *trnH* thu được trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu, kết quả thu được như sau:

Trình tự nucleotide *trnH*

```

10      20      30      40      50      60      70
AGCTCCATCTATCAATGGATAAGACTCTGATCTTAGTGTGTACGAGTTCTTGAAAACATAAAGCTTAAAA

80      90      100     110     120     130     140
AGGGAGCAATTGCTCCCTTTTATAGGTTATAGTTTTTTTTTTAGTATTTTTTTTCGATTTCAAATATCA

150     160     170     180     190     200     210
AATAATAGATAAAGCTTTTCATTTTTATGCCTTTGATATTTTTGTAGTTGTATTTTTTTGTTGATTTGTA

220     230     240     250     260     270     280
TTTTATAAGTTATAAGAAAGAAAAAATGGAATTTTAATATTAATCCTAGGGATTTAATACTAGAAATTG

290     300     310     320     330     340     350
AAATTCCTTGACCTTCTAAAACTCAAAAAAAATATTTTCATTTTAATAACTTAATAATTTTATAATAAT

360     370     380     390     400     410
CTTAATCTAATTTTGAATTTTGAATATAAGTAGAATATTGTAATATTCTATTACGGGCTT

```

Hình 2. Trình tự nucleotide của gen *trnH*

Với trình tự *trnH* thu được là 410 bp (Hình 2), hoàn toàn phù hợp với kích thước của cặp mồi đặc hiệu. Kết quả này là cơ sở để tiến hành phân tích, so sánh quan hệ di truyền của các trình tự *trnH* đã công bố trên Genbank làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Kết quả phân tích trình tự *trnH*

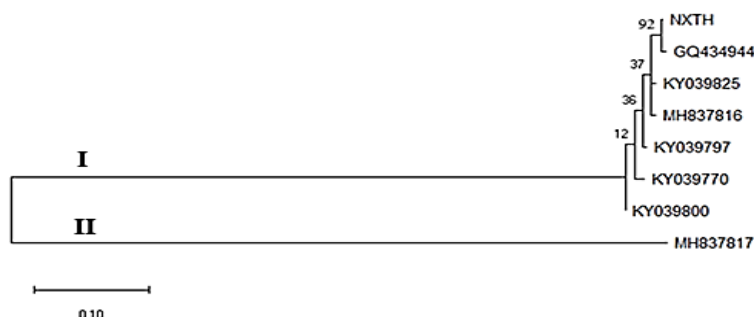
Sau khi thu được trình tự *trnH*, sử dụng phần mềm MEGA XI để tiến hành phân tích, so sánh và xác định quan hệ di truyền của trình tự *trnH* thu được và các trình tự *trnH* đã được công bố trên Genbank. Kết quả được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự *trnH* thu được với các trình tự *trnH* đã công bố trên Genbanks

STT	Loài	Mã số	Kích thước gen	Tỉ lệ % nucleotide tương đồng	Tác giả công bố	Nơi công bố
1	<i>Croton sp</i>	NXTH	430			
2	<i>Croton kongensis</i>	GQ434944	427	0,0074	Chen, S. all	Trung Quốc
3	<i>Croton lachnocarpus</i>	MH837817	420	1,0454	Zhang, D	Trung Quốc
4	<i>Croton lachnocarpus</i>	MH837816	428	0,0127	Zhang, D	Trung Quốc
5	<i>Croton phebaloides</i>	KY039825	428	0,0127	Haber, E.A., et all	Ấn độ
6	<i>Croton hildebrandtii</i>	KY039800	424	0,0228	Haber, E.A., et all	Ấn độ
7	<i>Croton chapelieri</i>	KY039770	424	0,0306	Haber, E.A., et all	Ấn độ
8	<i>Croton grangerioides</i>	KY039797	424	0,0229	Haber, E.A., et all	Ấn độ

Kết quả bảng 3 cho thấy, trình tự *trnH* phân lập được từ mẫu cây Khổ sâm thu được tại Như Xuân, Thanh Hóa là không có sự khác nhau nhiều so với trình tự *trnH* của loài *Croton kongensis* mang mã số GQ434944 do Chen, S et all công bố năm 2010 tại Trung Quốc và có sự sai khác lần lượt là 0,0127%; 0,0228%; 0,0229%; 0,0306% và 1,0454% so với trình tự *trnH* mang các mã số tương ứng là MH837816 do Zhang, D công bố tại Trung Quốc năm 2019; KY039825; KY039800; KY039797; KY039770 do Haber, E.A., all công bố tại Ấn độ năm 2017 và MH837817 do Zhang, D công bố tại Trung Quốc năm 2019.

Như vậy, qua phân tích tại bảng 3, có thể rút ra kết luận, loài Khổ sâm được thu mẫu tại xã Như Xuân, Thanh Hoá là loài *Croton kongensis*. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen *trnH* thu được với trình tự nucleotide của gen *trnH* đã công bố trên Genbank được thể hiện rõ trên hình 3.



Hình 3. Cây phát sinh loài giữa loài khổ sâm được thu ở xã Như Xuân, Thanh Hoá với các loài khác trong chi *Croton*

Kết quả trên hình 3 cho thấy, trên sơ đồ cây phát sinh có sự phân ly về quan hệ di truyền của trình tự *trnH* thu được với các trình tự *trnH* đã công bố trên Genbank là khá rõ ràng. Cụ thể, tại nhánh II của cây phát sinh chỉ xuất hiện duy nhất một trình tự *trnH* mang mã số MH837817. Đây cũng chính là trình tự *trnH* có tỉ lệ sai khác lớn nhất so với trình tự *trnH* thu được.

Tại nhánh I, sự phân ly của các nhóm là khá khác biệt, trong đó trình tự *trnH* thu được có quan hệ di truyền với loài *Croton kongensis* với trình tự *trnH* mang mã số GQ434944, điều này được khẳng định khi tỉ lệ Bootstrap giữa hai loài này là 92% và khác loài với các trình tự *trnH* khác. Kết quả này, một lần nữa khẳng định loài Khổ sâm được thu mẫu tại xã Như Xuân, tỉnh Thanh Hóa là loài *Croton kongensis*, đồng thời khẳng định độ tin cậy khi sử dụng trình tự *trnH* trong việc nhận diện loài Khổ sâm *Croton sp.* nói riêng và độ tin cậy khi sử dụng DNA barcode trong việc nhận diện các loài sinh vật, đặc biệt là những loài quý, hiếm.

4. KẾT LUẬN

Thông qua nghiên cứu chúng tôi đo được kích thước trình tự *trnH* của loài Khổ sâm thu được tại xã Như Xuân, tỉnh Thanh Hóa là 410 bp. Xác định được loài Khổ sâm ở xã Như Xuân, tỉnh Thanh Hóa là loài *Croton kongensis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V, tập 2*, Nxb. Y học, Hà Nội.
- [2] Đỗ Tất Lợi (2006), *Cây thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội.
- [3] G. C. Allen, M. A. Flores-Vergara, S. Krasynanski, S. Kumar, and W. F. Thompson, (2006), *A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide*, Nat Protoc., (1):2320-2325.
- [4] K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar, (2021), *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11*, Molecular Biology and Evolution, (38):3022-3027.
- [5] Kress WJ, Wurdack JK, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005), *Use of DNA barcodes to identify flowering plants*, Proc Natl Acad Sci USA., (102):8369-8374, 10.1073/pnas.0503123102.
- [6] L. Sun, Z. Meng, Z. Li, B. Yang, Z. Wang, G. Ding, W. Xiao (2014), *Two new natural products from Croton kongensis Gagnep*, Nat Prod Res, 28(8):563-567.
- [7] M. J. Wang, M. Wang, X. Q. Zhan, L. Liu, Q. Wu, F. L. An, Y. B. Lu, L. L. Guo, Z. X. Zhang, and D. Q. Fei, (2023), *Antimicrobial diterpenoids from the leaves and twigs of Croton kongensis Gagnepain*, Fitoterapia, vol.164(Art. No):105350.
- [8] M. Stoeckle, (2003), *Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life*, BioScience, 53(9):796-797.
- [9] R. Z. Fan, L. Chen, T. Su, W. Li, J. L. Huang, J. Sang, G. H. Tang, S. Yin, (2021), *Discovery of 8,9- seco- ent-Kaurane Diterpenoids as Potential Leads for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer*, J Med Chem, 22.64(14):9926-9942.

- [10] Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [11] T. T. Dao, K. Y. Lee, H. M. Jeong, P. H. Nguyen, T. L. Tran, P. T. Thuong, B. T. Nguyen, W. K. Oh, (2011), *Ent-Kaurane diterpenoids from Croton tonkinensis stimulate osteoblast differentiation*,” J Nat Prod., 74(12):2526-2531.
- [12] Y. Y. Fan, S. Q. Shi, G. Z. Deng, H. C. Liu, C. H. Xu, J. Ding, G. W. Wang, and J. M. Yue (2020), *Crokonoids A-C, A Highly Rearranged and Dual-Bridged Spiro Diterpenoid and Two Other Diterpenoids from Croton kongensis*, Org Lett, 7.22(3):929-933.

USING THE DNA BARCODE MARKERS TO IDENTIFICATION CROTON SP. SPECIES COLLECTED FROM NHU XUAN DISTRICT, THANH HOA PROVINCE

Le Dinh Chac, Hoang Thi Ha

ABSTRACT

Using molecular markers (DNA barcodes) to identify biological species in genral and medicinal plants in particular is always highly reliable, especially rare species and species with practical values. Essentially, DNA barcodes are a technique that uses a specific DNA sequence (about 400-1000 bp) as a marker to determine species relationships and identify biological species quickly and accurately. This approach not only enables pharmacologists to rapidly and accurately identify medicinal plants but also helps in detecting counterfeit medicinal species or rare species that need conservation ... Therefore this is receiving special attention from domestic and foreign scientists, especially homomorphic species, or specimens that have not fully developed, or specimens that have incomplete morphology. In this study, we focus on identifying Crotonsp. using the trnH DNA barcode sequence. The results of sequencing and analyzing the trnH region revealed a sequence length of 430 bp, confirming its identity as Croton kongensis.

Keywords: Barcode DNA, Croton sp, gen trnH.

* Ngày nộp bài: 23/12/2024 ; Ngày gửi phản biện: 17/2/2025; Ngày duyệt đăng: 28/4/2025

* Thời điểm công bố bài báo đã cập nhật thông tin về địa danh của vùng nghiên cứu theo địa giới hành chính mới.