

ĐA DẠNG THỰC VẬT CHO LÂM SẢN NGOÀI GỖ TẠI RỪNG ĐẶC DỤNG – PHÒNG HỘ SÓP CỘP, TỈNH SƠN LA

Lò Thị Mai Thu¹, Trần Hồng Sơn¹, Phạm Văn Công¹,
SouLavanh Leeyiapao,² Souliphong Phaimany³, Nguyễn Văn Dũng^{1*}

¹. Khoa Khoa học Tự nhiên - Công nghệ, Trường Đại học Tây Bắc.

². Trường trung học phổ thông Ét, huyện Ét, tỉnh Hòa Phăn.

³. Trường trung học phổ thông Na muông, huyện Thông Mi Xay, tỉnh Say Ya Bu Ly

Tóm tắt: Mu chun là một trong các cây thuốc đã và đang được bà con các dân tộc Tây Bắc nói chung và Sơn La nói riêng sử dụng làm gia vị, làm thuốc rất phổ biến. Chính vì vậy, phát triển các phương pháp để nhận diện Mu chun là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích trình tự gen ITS và RbcL cây Mu Churn có nguồn gốc tại Sơn La, Việt Nam, được sử dụng như DNA mã vạch tiềm năng để nhận diện cây Mu Churn. Kết quả cho thấy vùng ITS và đoạn gen RbcL phân lập từ mẫu Mu churn ở Sơn La có kích thước lần lượt là 370 bp và 580 bp.

Dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS và đoạn gen RbcL, bằng BLAST trong NCBI đã xác định mẫu Mu churn thu tại Sơn La thuộc Họ Cam Rutceae

Từ khóa: Mã vạch DNA, *Murraya glabra* (Guillaumin) Swingle; gen ITS, RbcL.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nền y học cổ truyền bản địa của cộng đồng dân tộc thiểu số ở Việt Nam là kho tri thức khổng lồ. Mỗi một dân tộc đều có kinh nghiệm dân gian riêng trong việc sử dụng cây cỏ làm thuốc chữa bệnh, đặc biệt những kinh nghiệm quý báu của các thầy lang, của bà con dân bản đang ngày một mất dần, những loài cây thuốc quý hiếm đến nay bị suy giảm nghiêm trọng. Chi *Murraya* được Guillaumin mô tả trong Thực vật chí Đông Dương năm 1912 với 3 loài là *M. alata*, *M. koenigii* và *M. exotica*, trong đó có loài Mu chun (*Murraya glabra* (Guillaumin) Swingle) được biết đến nhiều bởi giá trị làm gia vị và làm thuốc. Mu chun là vị thuốc quý, được sử dụng trong y học cổ truyền từ lâu. Theo Đông y, Mu chun có vị ngọt, tính mát, bổ

âm, được dùng để tăng cường sức khỏe, làm thuốc bổ, chữa suy nhược thần kinh, kém ăn, thanh nhiệt giải độc, cao huyết áp, viêm gan, ho khan, tiêu đờm, sốt cao..... Do bị thu hái nhiều để bán làm thuốc từ rất lâu nên loài Mu chun đang bị đe dọa nghiêm trọng, rất có thể sẽ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên nếu chúng ta không có biện pháp bảo tồn hữu hiệu.

Tại Sơn La, Mu chun được cho là cây thuốc có giá trị y học cao. Tuy nhiên, khả năng tái sinh của loài này trong tự nhiên rất thấp, đặc biệt hiện nay môi trường sinh thái của chúng đang bị tàn phá. Thực tế cho thấy, những nghiên cứu đặc điểm thực vật học, sinh học phân tử của loài cây này còn hạn chế, đây là một trong những trở ngại lớn trong việc bảo tồn, phát triển và khai thác. Chính vì vậy, sử

dụng mã vạch DNA để định danh cây Mu chun thu mẫu tại tỉnh Sơn La sẽ góp phần làm cơ sở dữ liệu cho việc nghiên cứu, bảo tồn phát triển loài cây này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu cây Mu Chun thu thập tại Sơn La.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Thực hành Thí nghiệm, Trường Đại học Tây Bắc, thành phố Sơn La, tỉnh Sơn La; Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

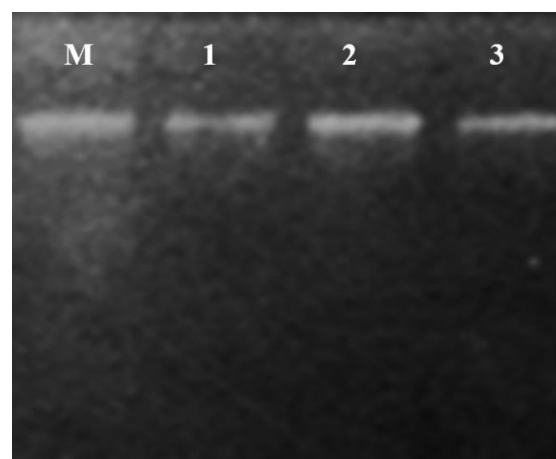
Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp dùng CTAB (Collins & Symons, 1992) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Mẫu lá được nghiền nhanh trong nitơ lỏng, bổ sung đệm tách và ủ 65°C trong 2 giờ. Dùng phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) để loại bỏ tạp chất và dùng isopropanol để tủa DNA. Gen ITS được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu (trình tự mồi xuôi/mồi ngược: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT -3'/5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'). Gen *RbcL* được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu (trình tự mồi xuôi/mồi ngược: 5'-ATGTCACCACAAACAGAAC -3'/5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC -3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 12 µl H₂O; 2 µl đệm 10x; 2µl MgCl₂ 25 mM, 1,6 µl dNTPs 2,5 mM; 0,8 µl mồi 10 pmol mỗi loại; 3 µl DNA tổng số (nồng độ 50 µmol) và 0,4 µl Taq DNA

polymerase 1u/µl. Phản ứng được tiến hành trong máy PCR với chu trình nhiệt bao gồm các bước: 94⁰ C/5 phút; 30 chu kỳ (94⁰ C/1 phút; 52⁰ C/1 phút; 72⁰ C/1 phút); kết thúc ở 72⁰ C/10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng để xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotid tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Các trình tự được xử lý bằng các phần mềm DNASTAR và BioEdit. So sánh, phân tích trình tự gen ITS và *RbcL* phân lập được với một số trình tự ITS và *RbcL* được công bố trên GenBank (NCBI)(4).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá cây Mu chun theo phương pháp CTAB và được kiểm tra chất lượng DNA tổng số bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260nm. Kết quả DNA tổng số đảm bảo chất lượng cho phản ứng PCR và các phân tích DNA khác (Hình 1).



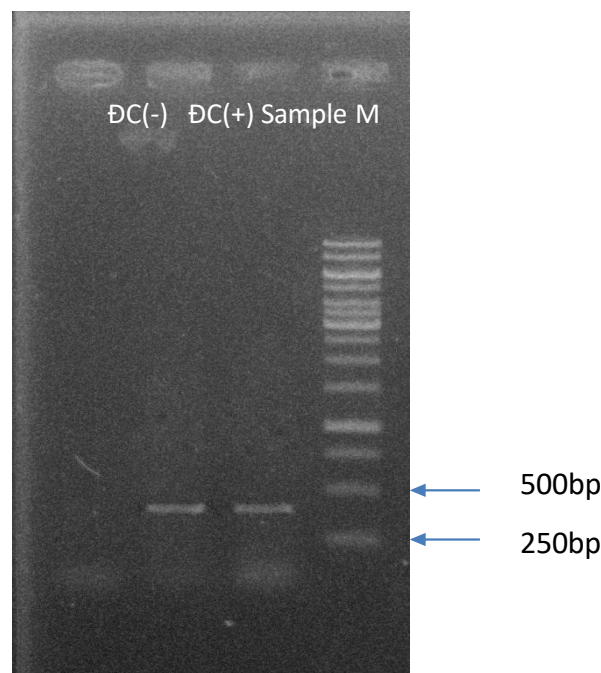
Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm DNA tổng số tách từ lá cây Mu chun
M: DNA chuẩn; 1, 2, 3: DNA tổng số tách từ lá Mu chun thu tại Sơn La

3.2. Đặc điểm của vùng gen ITS phân lập

từ cây *Mu chun*

Sử dụng cặp mồi ITS-F/ITS-R cho phản ứng PCR nhân bản vùng ITS trong DNA hệ gen cây *Mu chun*, kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 0,8% cùng thang DNA chuẩn 1 kb được thể hiện ở hình 2. Kết quả hình 2 cho thấy sản phẩm PCR của mẫu *Mu chun* thu được một băng DNA sáng rõ nét, có kích thước khoảng 0,37 kb, kích thước này phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết của vùng gen ITS như dự kiến. Kết quả điện di cũng cho thấy, không có băng DNA phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR nhân bản vùng gen ITS là đặc hiệu, có thể sử dụng trực tiếp các sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide.

Trình tự nucleotide được xử lý, phân tích bằng phần mềm DNASTar và BLAST trong NCBI, kết quả đã xác định được đoạn DNA có kích thước 370 bp. Sử dụng chương trình BLAST trong NCBI để



Mồi ITS2/ITS4

Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm nhân bản vùng gen ITS
M: thang DNA chuẩn 1 kb; Sample: Vùng gen ITS nhân bản từ mẫu *Mu*

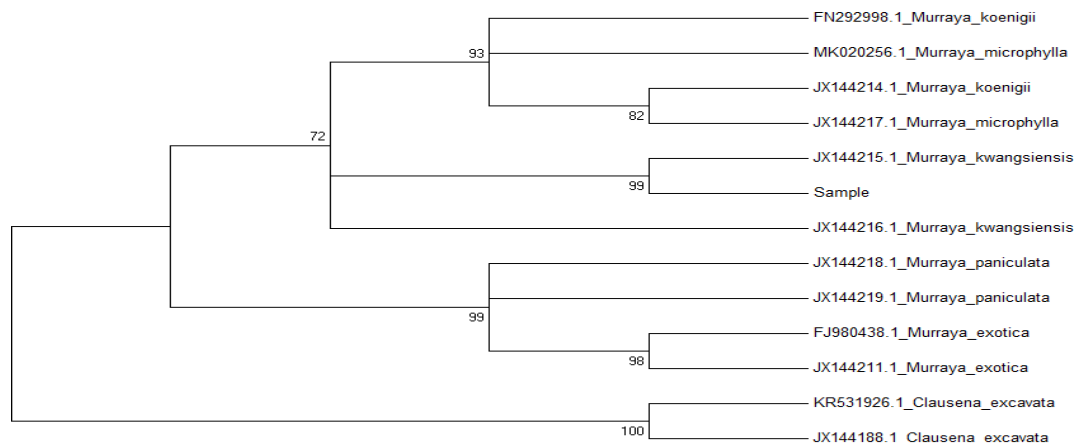
so sánh tương đồng, kết quả đã xác định được đoạn DNA phân lập được là vùng ITS và mẫu *Mu chun* thu thập Sơn La, Việt Nam là chi *Muraya* (Hình 3).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Murraya kwangsiensis isolate GX-LZ-LH internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Murraya kwangsi...	608	608	91%	1e-169	99.12%	575	JX144215.1
Clausena excavata isolate L034 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inte...	Clausena excavata	584	584	100%	2e-162	95.42%	496	KR531927.1
Murraya koenigii ITS1 (partial), 5.8S rRNA gene and ITS2 (partial), specimen voucher 247705	Murraya koenigii	560	560	97%	3e-155	95.01%	657	FN292998.1
Murraya kwangsiensis isolate YN-FN internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene an...	Murraya kwangsi...	551	551	91%	2e-152	96.18%	558	JX144216.1
Murraya koenigii isolate YN-XSBN-YY 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5...	Murraya koenigii	547	547	92%	3e-151	95.91%	689	JX144214.1
Bergera koenigii voucher ATGLAB 2018100 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed space...	Murraya koenigii	545	545	95%	9e-151	94.66%	387	MH133462.1
Clausena anisata voucher NMK/EA 13526 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer...	Clausena anisata	544	544	99%	3e-150	93.51%	467	MT137494.1
Merrillia caloxylon internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence...	Merrillia caloxylon	544	544	99%	3e-150	93.73%	703	FJ434149.1
Murraya koenigii voucher 200505105 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 2, co...	Murraya koenigii	542	542	97%	1e-149	93.92%	450	MH688894.1
Glycosmis esquirolii isolate L020 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Glycosmis esquirolii	542	542	100%	1e-149	93.50%	492	KR532184.1
Murraya microphylla isolate HN-WN 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Murraya microph...	542	542	92%	1e-149	95.61%	690	JX144217.1
Murraya euchrestifolia isolate GZ-AL internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, co...	Murraya euchrest...	542	542	84%	1e-149	98.08%	546	JX144210.1
Murraya koenigii isolate YN-ML 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribo...	Murraya koenigii	534	534	91%	2e-147	95.31%	688	JX144213.1

Hình 3. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng gen ITS của mẫu cây *Mu chun* (Sơn La, Việt Nam) so với một số trình tự vùng gen ITS trên GenBank bằng BLAST trong NCBI

Hình 3 cho thấy, vùng gen *ITS* cây Mu chun phân lập tại Sơn La có tỷ lệ tương đồng lớn với 13 trình tự gen *ITS* cùng chi *Muraya* dao động từ 93,5% đến 99,12% trên GenBank. Như vậy, kết quả so sánh bằng BLAST trong NCBI đã khẳng định

được trình tự đoạn DNA phân lập từ Mu chun thu tại Sơn La là trình tự nucleotide của vùng gen *ITS* của chi *Muraya*.

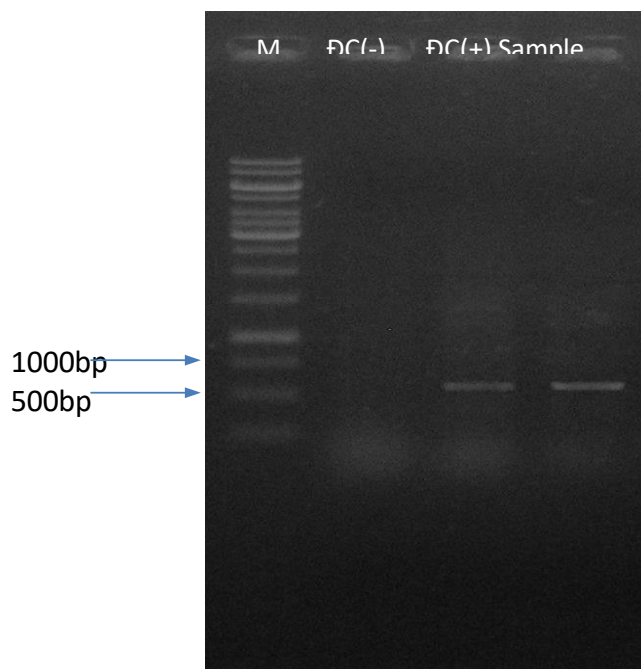


Hình 4. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu thuộc loài Mu chun dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS*

3.3. Đặc điểm của vùng gen *RpcL* phân lập từ cây Mu chun

Từ DNA tổng số, thực hiện phản ứng nhân bản đoạn gen *RpcL* bằng PCR với cặp
Hình 5 cho thấy băng DNA có kích thước khoảng 0,6 kb, tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết của đoạn gen *RpcL*. Băng DNA rõ nét được tách ra khỏi bản gel, khuếch đại và giải trình tự DNA trên thiết bị tự động. Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được đoạn gen *RpcL* có kích thước 580 bp. Sử dụng chương trình BLAST trong NCBI đã xác định được trình tự đoạn DNA là đoạn gen *RpcL* và mẫu Mu chun thu tại Sơn La là chi *Clausena* (Hình 6)

mỗi *RpcL* - F/ *RpcL* - R, kết quả được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *RpcL* từ mẫu Mu chun

M: thang DNA 1 kb; LKT: mẫu Mu chun thu tại Sơn La

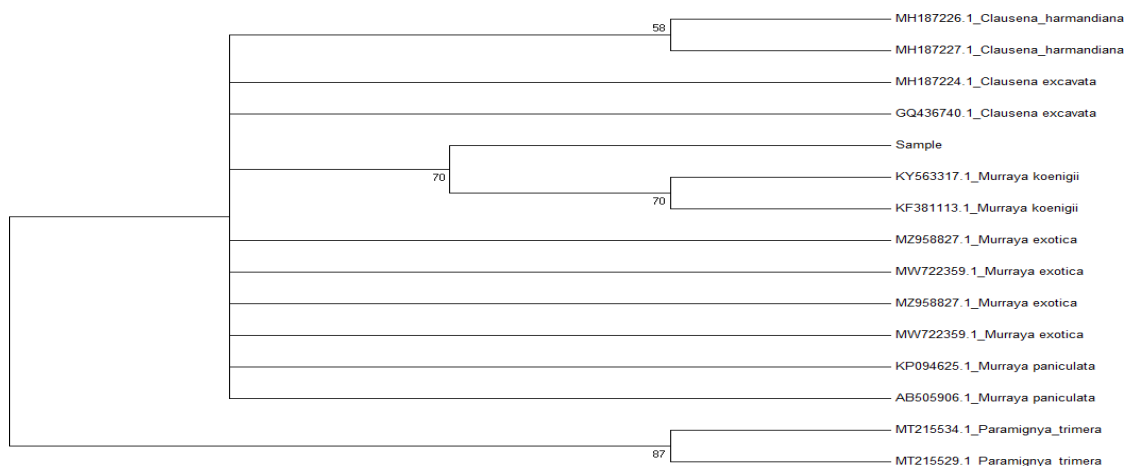
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Clausena anisum-olens.chloroplast_complete_genome	Clausena anis...	1057	1057	100%	0.0	99.65%	159753	MZ460583.1
<input checked="" type="checkbox"/> Murraya koenigii.chloroplast_complete_genome	Murraya koenigii	1046	1046	100%	0.0	99.31%	159402	KU949002.1
<input checked="" type="checkbox"/> Murraya exotica.chloroplast_complete_genome	Murraya exotica	1046	1046	100%	0.0	99.31%	160179	MZ958827.1
<input checked="" type="checkbox"/> Murraya exotica.chloroplast_complete_genome	Murraya exotica	1046	1046	100%	0.0	99.31%	160179	MW722359.1
<input checked="" type="checkbox"/> Murraya paniculata.chloroplast_complete_genome	Murraya paniculata	1046	1046	100%	0.0	99.31%	160280	NC_052700.1
<input checked="" type="checkbox"/> Atalantia kwangtungensis.chloroplast_complete_genome	Atalantia kwangt...	1040	1040	100%	0.0	99.13%	160248	MH329190.1
<input checked="" type="checkbox"/> Murraya koenigii voucher CMPR8775 ribulose_1_5-bisphosphate_carboxylase/oxygenase_large_subunit (rbcL) g	Murraya koenigii	1040	1040	100%	0.0	99.13%	746	KY563317.1
<input checked="" type="checkbox"/> Micromelum minutum.chloroplast_complete_genome	Micromelum min...	1040	1040	100%	0.0	99.13%	160416	KU949007.1
<input checked="" type="checkbox"/> Atalantia buxifolia.chloroplast_complete_genome	Atalantia buxifolia	1040	1040	100%	0.0	99.13%	160056	OK356595.1

HÌNH 6.

Hình 6: Trình tự nucleotide đoạn gen *RpcL* của mẫu Mu chun thu tại Sơn La và các trình tự trên GenBank

Kết quả hình 6 cho thấy, đoạn gen *RpcL* phân lập từ Sơn La có tỷ lệ tương đồng với 6 trình tự đoạn gen *RpcL* chi *Murraya* dao động từ 99,13 đến 99,31% trên Genbank nhưng lại giống với chi *Clausena* tới dao động từ 98,56

đến 99,65%. Như vậy việc sử dụng 2 trình tự vùng gen bảo thủ như *ITS*, *RbcL* chỉ phân loại được đến Họ Cam (Rutceae), chưa thể khẳng định phân loại đến Chi và loài. Cần tiếp tục sử dụng thêm các trình tự khác để khẳng định.



Hình 7. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu thuộc loài Mu chun dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *RpcL*

KẾT LUẬN

Vùng *ITS* và đoạn gen *RpcL* phân lập từ mẫu Mu chun tại Sơn La có kích thước lần lượt là 370 bp và 580 bp.

Dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS* và đoạn gen *RpcL*, bằng BLAST trong NCBI đã xác định mẫu Mu chun thu tại Sơn La thuộc Họ Cam Rutceae chưa thể khẳng định phân loại đến Chi và Loài. Cần tiếp tục sử dụng thêm các trình tự khác để

khẳng định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Văn Tăng, V. Đ. H., Trần Thị Việt Thanh (2014). "Đánh giá khả năng sử dụng mã vạch COI trong việc định loại động vật tại Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam." Tạp chí công nghệ sinh học, **12**(4): 631-638.
2. Trần Thị Việt Thanh, V. T. T. H., Trần Thị Liễu, Phan Kế Long (2015). "Sử dụng mã vạch DAN trong việc định loại cá biển tại bảo

- tàng thiên nhiên Việt Nam." Báo cáo toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần 6: 855
3. Vũ Huyền Trang, H. Đ. H., Chu Hoàng Hà (2013). "Nghiên cứu xây dựng mã vạch DAN cho việc phân loại nhận dạng cây sâm ngọc linh." Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc: 1099-1104.
 4. Chu Hoàng Mậu (2008), Phương pháp phân tích di truyền hiện đại trong chọn giống cây trồng. NXB Đại học Thái Nguyên.
 5. Barik Bikash Ranjan, AK Dey, PC Das, A Chatterjee, và JN Shoolery (1983), *Coumarins of *Murraya exotica*—absolute configuration of auraptenol*, *Phytochemistry*, số 22(3), tr. 792-794.
 6. Bhuiyan Md Nazrul Islam, Jasim Uddin Chowdhury, và Mohammed Yusuf (2008), *Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack*, *Bangladesh Journal of Pharmacology*, số 3(2), tr. 59-63.
 7. Kinoshita Takeshi (2014), *A new taxonomic system of the genus *Murraya* (Rutaceae) based on integration of morphology-based taxonomy and chemotaxonomy; and a philological survey on *M. exotica* in view of the relationship between Okinawa and China*, *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, số 134(12), tr. 1265-1286.
 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

A STUDY ON THE GROWTH ABILITY AND QUALITY OF SOME CHOYSOM AND GREEN MUSTARD VARIETIES IN SON LA CITY

**Lo Thi Mai Thu¹, Tran Hong Son¹, Pham Van Cong¹,
SouLavanh Leeyiapao², Souliphong Phaimany³, Nguyen Van Dung^{*}**

¹. Tay Bac University

². Et High School, Et District, Hua Phan Province.

³. Na Muong High School, Thong Mi Xay District, Say Ya Bu Ly Province.

Abstract: *The knowledge about traditional indigenous medicines owned by ethnic people in Vietnam is of great diversity. Each ethnic group has their own folk experience in using herbs as medicine, especially the valuable experiences of the healers and the aged people of the village. However, this local valuable knowledge about medicine is running the risk of disappearing along with the fact that many indigenous and rare medicinal plants have been seriously degraded. Mu chun is one of the medicinal plants that has been and is being used by people of the Northwest in general and Son La in particular as a very popular spice and medicine. There has been a strong need for research to be done in this aspect. In this study, the ITS and RbcL gene sequences of Mu Chun (*Murraya glabra* (Guillaumin) Swingle) native to Son La, Vietnam were used as barcoded DNA to identify any Mu Chun trees. The findings showed that the ITS region and the RbcL gene fragment isolated from the Mu chun sample in Son La had sizes of 370 bp and 580 bp, respectively. Based on the nucleotide sequences of the ITS region and the RbcL gene fragment, by BLAST in NCBI, this study revealed that the sample of Mu chun collected in Son La was part of the Rutaceae family.*

Keywords: *DNA barcode, *Murraya glabra* (Guillaumin) Swingle; ITS gene, RbcL gene.*

Ngày nhận bài: 03/06/2022. Ngày nhận đăng: 30/06/2022.

Liên lạc: Lò Thị Mai Thu, e - mail: thubiotbu@utb.edu.vn