

## ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CÂY THỎ NHÂN SÂM (*TALINUM PANICULATUM*) VÀ TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÙNG ITS, GEN *RPOC1* VÀ *RPOB*

Vũ Thị Như Trang<sup>1,2</sup>, Hồ Mạnh Tường<sup>3</sup>, Lê Văn Sơn<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Tâm<sup>1</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Đại học Y-Dược, Đại học Thái Nguyên

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chuhoangmau@tnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 11.5.2017

Ngày nhận đăng: 20.8.2018

### TÓM TẮT

Cây Thỏ nhân sâm (*Talinum paniculatum*) thuộc chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae) chứa các hợp chất có dược tính, như phytosterol, saponin, flavonoid, tanin, steroid. Những hợp chất này có tác dụng chống virus và rất hiệu quả đối với bệnh nhiễm trùng da và bệnh Herpes. Bên cạnh đó, chúng cũng có thể được sử dụng như một loại thuốc hỗ trợ cho bệnh Parkinson, bệnh tim và làm giảm lượng cholesterol trong máu. Hiện nay, việc nhận diện cây Thỏ nhân sâm chủ yếu dựa trên các phân tích về hình thái, nhưng phương pháp này thường gặp phải khó khăn khi cây Thỏ nhân sâm đã được chế biến một phần hoặc hoàn toàn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích đặc điểm hình thái và trình tự nucleotide của vùng ITS và đoạn gen *rpoC1*, *rpoB* của cây Thỏ nhân sâm thu tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Cây Thỏ nhân sâm có rễ củ hình trụ và mang nhiều rễ con. Thân cây mọc thẳng và phân thành nhiều cành. Lá cây mọc so le, hình trứng ngược hoặc hình bầu dục, không lông, phiến lá dày. Hoa của cây có 5 cánh màu tím nhạt, có 2 lá đài, có hơn 10 nhị, bầu nhụy hình cầu. Quả nhỏ, khi chín có màu xám tro. Hạt Thỏ nhân sâm rất nhỏ, màu đen, hơi dẹt. Vùng ITS và hai đoạn gen *rpoC1*, *rpoB* được phân lập từ cây Thỏ nhân sâm có kích thước tương ứng là 643 bp, 595 bp và 518 bp. Dựa trên sự kết hợp đặc điểm hình thái và trình tự nucleotide của vùng ITS, gen *rpoC1*, gen *rpoB* các mẫu Thỏ nhân sâm thu tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam được xác định thuộc loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae). Đặc điểm trình tự của vùng ITS và hai đoạn gen *rpoC1*, *rpoB* là cơ sở dữ liệu mã vạch DNA để định danh cây Thỏ nhân sâm Việt Nam.

**Từ khóa:** Gen *rpoB*, Gen *rpoC1*, Mã vạch DNA, *Talinum paniculatum*, Vùng ITS

### MỞ ĐẦU

Cây Thỏ nhân sâm (*T. paniculatum*) chứa các hợp chất phytosterol, saponin, tanin, steroid. Phytosterol có hoạt tính ức chế sinh sản, steroid saponin có tác dụng phòng và chữa bệnh xơ vữa động mạch, là nguyên liệu để tổng hợp hormone sinh dục (Thanamool *et al.*, 2013). Trong lá Thỏ nhân sâm có galactogue có tác dụng kích thích tăng tiết sữa ở phụ nữ và có khả năng chống viêm và chữa viêm loét (Petprai *et al.*, 1996), rễ Thỏ nhân sâm có thành phần hóa học tương tự như ở sâm Hàn Quốc (Yulia *et al.*, 2005).

Thỏ nhân sâm là loại cây thảo dược mọc tự nhiên khắp nơi trên thế giới (Petprai *et al.*, 1996). Ở Việt Nam, Thỏ nhân sâm vừa là cây mọc tự nhiên, vừa là cây trồng để làm thuốc. Từ sự khác biệt về

đặc điểm hình thái của các cơ quan trong cơ thể thực vật, đặc biệt là hoa mà loài cây này gặp nhiều ở các tỉnh Hà Giang, Tuyên Quang, Lạng Sơn, Cao Bằng, Thái Nguyên, Bắc Giang, Quảng Ninh, Hà Nội, Hòa Bình ... (Đỗ Tất Lợi, 2004). Tuy nhiên, các mẫu cây Thỏ nhân sâm ở những địa phương này thuộc cùng một loài hay khác loài, và ở giai đoạn cây chưa ra hoa hoặc nguyên liệu thảo dược đã được chế biến một phần hay ở dạng bột thì dựa vào cơ sở nào để có thể nhận diện được mẫu Thỏ nhân sâm là loài *T. paniculatum*. Nghiên cứu này tiếp cận kết hợp khóa phân loại hình thái và nguyên lý sử dụng mã vạch DNA làm cơ sở định danh mẫu Thỏ nhân sâm ở Việt Nam.

Việc lựa chọn các gen hoặc các đoạn DNA hoặc các sản phẩm khác nhau của hệ gen để định danh loài phụ thuộc vào mục đích hoặc đối tượng nghiên cứu

(Hebert *et al.*, 2003). Một số mã vạch DNA đã được nghiên cứu và ứng dụng trong việc nhận diện cây được liệt kê như *ITS* (*Internal transcribed spacers*), *rpoC1*, *rpoB*... *ITS* là trình tự không mã hóa nằm ở hai bên sườn của trình tự mã hóa ribosome 5,8S bao gồm có *ITS1*, *ITS2* (Vijayan *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2010). Nhờ việc sử dụng trình tự vùng *ITS* mà Sharma *et al.*, (2002) đã đánh giá được tính đa dạng di truyền trong các giống lúa mạch và giữa các giống lúa mạch với loài lúa mạch hoang dại. Stern *et al.*, (2012) đã phân biệt được các loài trong cùng một chi và 96% các mẫu cùng loài từ 78 loài khác nhau nhờ việc sử dụng mã vạch *ITS*. Gen *rpoB*, *rpoC1* mã hóa hai trong 4 tiểu đơn vị của RNA polymerase lục lạp. Khi nghiên cứu họ *Dipterocarpaceae*, Tsumura *et al.*, (1996) đã nhận thấy gen *rpoB* là thích hợp để nghiên cứu phát sinh loài, cùng với gen *16S rRNA*, *rpoB* được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để xác định loài vi khuẩn mới, do vậy gen này được đề xuất là chỉ thị barcode độc lập hoặc kết hợp với một số gen khác. Madesis *et al.*, (2012) khi nghiên cứu phân loại 25 giống cây họ đậu ở Địa Trung Hải bằng việc sử dụng gen *rpoC1* và một số gen khác đã có nhận xét rằng, khi sử dụng kết quả phân tích gen *rpoC1* có khả năng xác định được 72% trong tổng số mẫu cây họ đậu nghiên cứu (Wu *et al.*, 2006; Vijayan *et al.*, 2010). Đối với cây Thổ nhân sâm, khi so sánh hiệu quả sử dụng 7 mã vạch DNA (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *ITS2* và *ITS*) Chen *et al.*, (2010) đã nhận xét rằng vùng *ITS2* có thể sử dụng như một mã vạch DNA chuẩn để định danh cây Thổ nhân sâm với tỷ lệ thành công là 92,7%.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích đặc điểm hình thái và trình tự nucleotide của vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1*, *rpoB*

của cây Thổ nhân sâm góp phần nhận diện các mẫu cây Thổ nhân sâm ở Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Hạt và mẫu cây Thổ nhân sâm được thu từ tháng 9/2015 đến tháng 3/2016 tại 5 địa phương: huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang (BG); thành phố Thái Nguyên (TN1); huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên (TN2); thị xã Sơn Tây, Hà Nội (HT); huyện Hoàn Bô, tỉnh Quảng Ninh (QN).

### Phương pháp

Tại mỗi địa phương, thu 5 cây Thổ nhân sâm non và thu hạt của 5 cây Thổ nhân sâm khác đem trồng tại vườn Thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên. Đặc điểm hình thái của cây Thổ nhân sâm được quan sát trực tiếp và mô tả đặc điểm rễ, thân lá, hoa, quả, hạt. Nhận diện cây Thổ nhân sâm theo phương pháp phân loại của Phạm Hoàng Hộ (1999) và tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178> tại Bộ môn Thực vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

Lá non của tất cả các cây Thổ nhân sâm trong vườn Thực nghiệm được sử dụng cho chiết rút DNA và DNA được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo Shanghai-Marroof *et al.*, (1984), điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 0,8% và bằng quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm.

Trình tự nucleotide của các cặp mồi *ITS-F/ITS-R*, *rpoC1-F/rpoC1-R*, *rpoB-F/rpoB-R* sử dụng trong PCR được tổng hợp theo Kress *et al.*, (2005) được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1.** Trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR sử dụng nhân bản các đoạn DNA (Kress *et al.*, 2005; Mark *et al.*, 2007).

Cặp mồi	Trình tự nucleotide 5' → 3'	Kích thước đoạn DNA (bp) dự kiến
<i>ITS-F/ITS-R</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	665
	TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTACT	
<i>rpoC1-F/rpoC1-R</i>	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	600
	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	
<i>rpoB-F/rpoB-R</i>	AAGTGCATTGTTGGAAGTGG	500
	GATCCCAGCATCACAATTCC	

Chu trình nhiệt của PCR đối với hai cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R*, *rpoB-F/rpoB-R* là 94°C trong 1 min, lặp lại 40 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 30 s, gắn mồi ở 53°C trong 40 s và tổng hợp ở 72°C trong 40 s; sau 40 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 min, lưu giữ ở 4°C. Chu trình nhiệt của PCR đối với cặp mồi *ITS-F/ITS-R* là 94°C trong 5 min, lặp lại 40 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 1 min, gắn mồi ở 58°C trong 1 min và tổng hợp ở 72°C trong 1 min; sau 40 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 min, lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR từ gel điện di được tinh sạch sử dụng bộ Kit QiAquick Gel Extraction (Qiagen, Đức). Sản phẩm này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp hai chiều (mỗi xuôi và mỗi ngược) bằng máy phân tích trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, Mỹ) theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye terminator cyclor v3.1. Trình tự nucleotide được so sánh với các trình tự đã có trên GenBank bằng phần mềm BLAST trong NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trình tự DNA sau khi đọc được hiệu chỉnh với sự trợ giúp của phần mềm Bioedit v7.0.5.2.

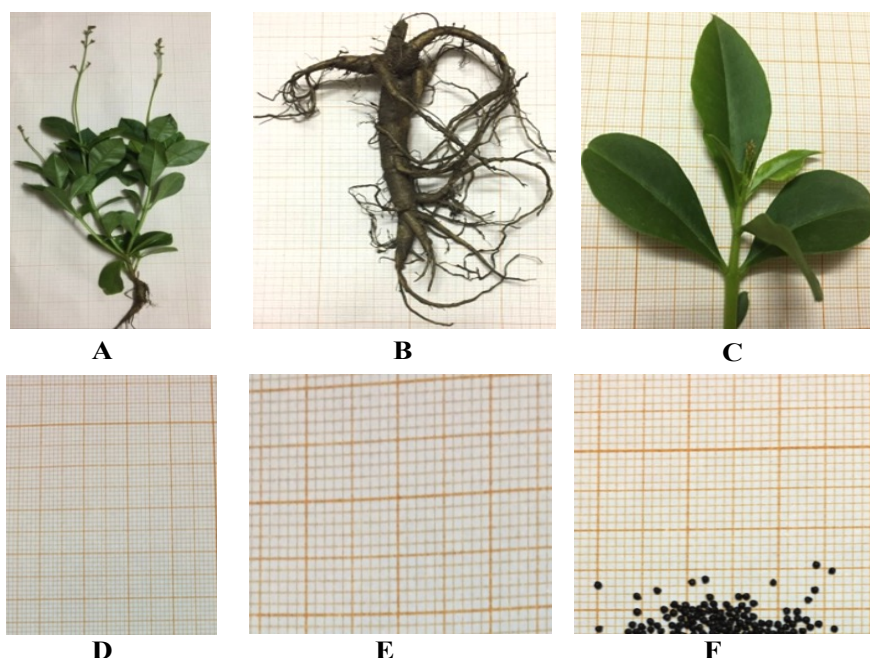
Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa

trên trình tự nucleotide của vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1*, *rpoB* bằng phương pháp Clustal W nhờ phần mềm DNASTar.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Đặc điểm hình thái và phân loại của cây Thổ nhân sâm

Kết quả quan sát hình thái ở hình 1 cho thấy cây Thổ nhân sâm gồm rễ, thân, lá, hoa (Hình 1A). Rễ Thổ nhân sâm là rễ củ, hình trụ và mang nhiều rễ con (Hình 1B) bề mặt ngoài màu nâu đen, lúc mới thu hoạch bên trong củ màu hồng trắng, nhưng khi phơi khô chuyển màu đen, hình dáng củ gần giống hình người, giống củ nhân sâm. Thân Thổ nhân sâm mọc thẳng, thân màu xanh, chia thành nhiều cành (Hình 1A). Lá mọc so le, hình trứng ngược, hoặc hình thìa hoặc hình muống, không lông, không có lá bẹ, phiến lá dày, hơi thẫm, hai mặt đều bóng, đầu lá nhọn hoặc tù, phía cuống hẹp lại, cuống rất ngắn (Hình 1C). Đầu cành xuất hiện cụm hoa hình chùm nhiều hoa nhỏ, đường kính 6 mm, 5 cánh hoa màu tím nhạt, hơn 10 nhị dài 2 mm, bầu hoa hình cầu, hoa có 2 lá đài (Hình 1D). Quả nhỏ, khi chín có màu xám tro, đường kính ước 3 mm (Hình 1E). Hạt Thổ nhân sâm rất nhỏ, màu đen nhánh hơi dẹt, trên mặt hơi có vân nổi (Hình 1F).



**Hình 1.** Cây Thổ nhân sâm. Cơ quan sinh dưỡng và sinh sản của cây Thổ nhân sâm A: cây Thổ nhân sâm; B: rễ, củ; C: thân, lá; D: hoa; E: quả; F: hạt.

Kết quả phân tích đặc điểm hình thái theo khóa phân loại và tra cứu trên <http://www.tropicos.org/Name/26200178> cho thấy các mẫu Thổ nhân sâm BG, TN1, TN2, HT, QN thu tại thành phố Thái Nguyên; huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên; thị xã Sơn Tây, Hà Nội; huyện Hoàn Bô, tỉnh Quảng Ninh thuộc loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae), bộ Cẩm chướng (*Caryophyllales*), phân lớp Cẩm chướng (*Caryophyllidae*), lớp Hai lá mầm (*Magnoliopsida*), ngành Thực vật có hoa; Mộc lan; Hạt kín (*Magnoliophyta*).

Tuy nhiên, sử dụng phương pháp phân loại hình thái rất khó xác định được cây Thổ nhân sâm khi cây đang trong giai đoạn phát triển (chưa ra hoa) và dễ nhầm lẫn với loài *Talinum fruticosum*. Vì vậy, để có thể tránh được sự nhầm lẫn với các thảo dược khác, cần kết hợp phương pháp phân loại hình thái với việc sử dụng mã vạch DNA trong nhận diện mẫu cây Thổ nhân sâm.

**Kết quả nhân bản vùng ITS và hai đoạn gen *rpoC1*, *rpoB***

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của 5 mẫu nghiên cứu cho thấy kích thước vùng ITS và đoạn gen *rpoC1* khoảng 0,6 kb, còn kích thước đoạn gen *rpoB* khoảng 0,5 kb đúng như kích thước tính

toán lý thuyết. Sản phẩm PCR được tinh sạch phục vụ giải trình tự nucleotide.

**Đặc điểm của trình tự vùng ITS phân lập từ các mẫu Thổ nhân sâm**

Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được vùng ITS có kích thước 643 bp. Bằng BLAST trong NCBI cho thấy vùng ITS phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*ITS-TN1*, *ITS-TN2*, *ITS-BG*, *ITS-HT*, *ITS-QN*) có tỷ lệ tương đồng là 99% với ba trình tự vùng ITS cùng loài *T. paniculatum*, mang mã số *JF508608* (Ocampo *et al.*, 2012), *L78094* (Hershkovitz *et al.*, 2000), *EU410357* trên GenBank; tương đồng 91% với trình tự vùng ITS của loài *T. fruticosum* cùng chi *Talinum*, mang mã số *KJ380908* trên GenBank; tương đồng 87% với trình tự vùng ITS của loài *Portulaca oleracea* mang mã số *L78047* trên GenBank trong cùng họ Rau sam (Portulacaceae). Trình tự vùng ITS của 5 mẫu nghiên cứu (*ITS-BG*, *ITS-HT*, *ITS-QN*, *ITS-TN1*, *ITS-TN2*) đã được GenBank chấp nhận và công bố với các mã số lần lượt là *LT852522*, *LT852523*, *LT852524*, *LT852525*, *LT852526*.

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của vùng ITS phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm với trình tự vùng ITS của *T. paniculatum* mang mã số *EU410357* (cùng loài) trên GenBank thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2.** Sự sai khác về trình tự nucleotide của vùng ITS phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm so với *T. paniculatum*, mã số *EU410357*.

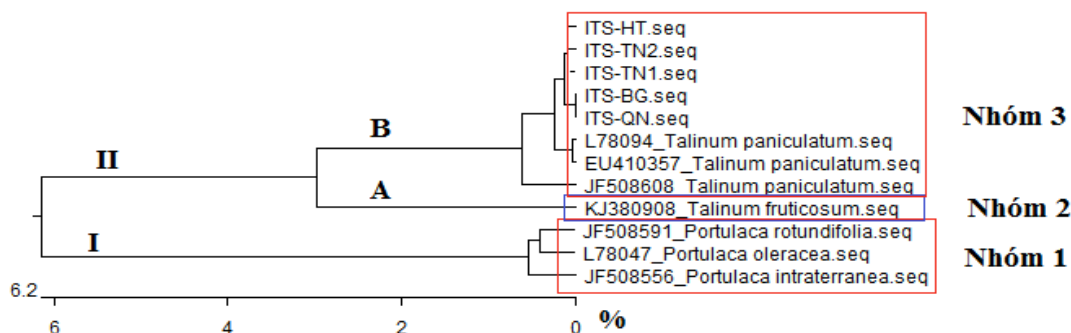
Mẫu	Vị trí 139	Vị trí 148	Vị trí 219	Vị trí 455
<i>EU410357</i>	A	G	C	A
<i>ITS-BG</i>	T	G	A	G
<i>ITS-TN1</i>	A	G	A	G
<i>ITS-TN2</i>	A	G	A	G
<i>ITS-HT</i>	A	A	A	G
<i>ITS-QN</i>	T	G	A	G

Bảng 2 cho thấy có 4 vị trí nucleotide sai khác giữa các trình tự của vùng ITS phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm (*ITS-TN1*, *ITS-TN2*, *ITS-BG*, *ITS-HT*, *ITS-QN*) với trình tự cùng loài mang mã số *EU410357*, đó là các vị trí nucleotide thứ 139, 148, 219 và 455, chiếm 0,62%, tất cả đều là đột biến thay thế cặp nucleotide.

Khi so sánh trình tự nucleotide của vùng ITS phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm với loài *T. fruticosum* (cùng chi *Talinum*) cho thấy các mẫu *ITS-BG*, *ITS-QN*, *ITS-TN2*, *ITS-TN1* có 37 vị trí sai

khác nucleotide (chiếm 5,75%), mẫu *ITS-HT* có 38 vị trí sai khác nucleotide (chiếm 5,9%). Tất cả các vị trí nucleotide sai khác đều do đột biến thay thế.

Kết quả xác định mối quan hệ di truyền của trình tự vùng ITS phân lập từ các mẫu nghiên cứu và các trình tự vùng ITS mang mã số *EU410357*, *L78094*, *JF508608* cùng loài *T. paniculatum*, *KJ380908* (*T. fruticosum*) cùng chi *Talinum* và các trình tự gen cùng họ Rau sam như *L78047* (*P. oleracea*), *JF508591* (*P. rotundifolia*), *JF508556* (*P. intraterranea*) được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Sơ đồ hình cây thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS.

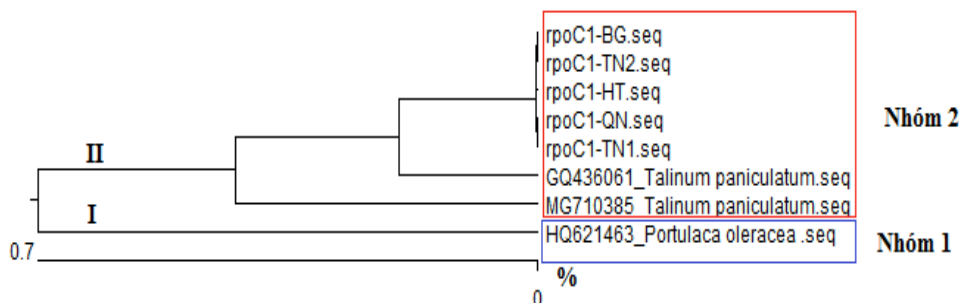
Sơ đồ hình cây ở hình 2 cho thấy, các đối tượng phân bố trên 2 nhánh lớn, nhánh I có 3 trình tự vùng ITS và nhánh II có 9 trình tự vùng ITS, tất cả các trình tự thuộc hai chi *Talinum* và *Portulaca* cùng thuộc họ Rau sam (Portulacaceae) có độ tương đồng 88,4- 89,2%, khoảng cách di truyền giữa hai chi *Talinum* và *Portulaca* là 6,2%. Nhánh II lại chia thành 2 nhánh phụ A và B. Nhánh A có một trình tự vùng ITS mang mã số KJ380908 của loài *T. fruticosum* và nhánh B có 8 trình tự ITS cùng loài *T. paniculatum* với độ tương đồng là 94,1-100% và khoảng cách di truyền giữa hai loài *T. paniculatum* và *T. fruticosum* khoảng 3%.

#### Đặc điểm của trình tự đoạn gen *rpoC1* phân lập từ các mẫu Thổ nhân sâm

Kết quả giải trình tự nucleotide thu được đoạn gen *rpoC1* có kích thước 595 bp và bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn gen *rpoC1* phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*rpoC1-TN1*, *rpoC1-TN2*, *rpoC1-BG*, *rpoC1-HT*, *rpoC1-QN*) có tỷ lệ tương đồng với gen *rpoC1* của loài *T. paniculatum* mang mã số MG710385 trên GenBank (Liu *et al.*, 2018) là 99%, kết quả này đã khẳng định trình tự nucleotide phân lập được là đoạn gen *rpoC1* thuộc loài *T. paniculatum*. Tuy nhiên, 5 trình tự gen *rpoC1* phân

lập từ các mẫu Thổ nhân sâm Việt Nam và trình tự gen *rpoC1* cùng loài mang mã số MG710385 sai khác ở 4 vị trí nucleotide, chủ yếu là sự thay thế nucleotide, đó là các vị trí 144, 280, 399, 516. Kết quả tìm kiếm bằng BLAST xác định được một trình tự của loài *P. oleracea* (Arakaki *et al.*, 2011) cùng họ Rau sam mang mã số HQ621463 có tỷ lệ tương đồng là 98%, nhưng không tìm thấy trình tự gen *rpoC1* của các loài khác cùng chi *Talinum* trên GenBank. Khi so sánh trình tự gen *rpoC1* phân lập từ 5 mẫu thu tại các địa phương Việt Nam và trình tự gen *rpoC1* mang mã số HQ621463 (*P. oleracea*) trên GenBank cho thấy có 9 vị trí sai khác nucleotide (chiếm 1,5 %) và tất cả 9 điểm khác biệt đều là đột biến thay thế. Trình tự đoạn gen *rpoC1* của 5 mẫu nghiên cứu (*rpoC1-BG*, *rpoC1-HT*, *rpoC1-QN*, *rpoC1-TN1*, *rpoC1-TN2*) đã được đăng ký trên GenBank với các mã số lần lượt là LT852532, LT852533, LT852534, LT852535, LT852536.

Kết quả xác định mối quan hệ di truyền của các mẫu nghiên cứu dựa trên 5 trình tự gen *rpoC1* và các trình tự gen *rpoC1* mang mã số GQ436061, MG710385 cùng loài *T. paniculatum* và một trình tự gen của loài *P. oleracea* cùng họ Rau sam mang mã số HQ621463 thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Sơ đồ hình cây thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của gen *rpoC1*.

Sơ đồ hình cây ở hình 3 chia làm 2 nhánh lớn, nhánh I chỉ có trình tự gen *rpoC1* mang mã số HQ621463 (*P. oleracea*) thuộc chi *Portulaca* cùng họ Rau sam (Portulacaceae) và nhánh II gồm các trình tự cùng loài *T. paniculatum* đó là *rpoC1- BG*, *rpoC1- QN*, *rpoC1- HT*, *rpoC1- TN2*, *rpoC1- TN1*, MG710385 và GQ436061. Khoảng cách di truyền giữa hai chi *Talinum* và *Portulaca* dựa trên trình tự gen *rpoC1* là 0,7%.

**Đặc điểm của trình tự gen *rpoB* phân lập từ các mẫu Thổ nhân sâm**

Kết quả giải trình tự nucleotide đã xác định được đoạn gen *rpoB* có kích thước 518 bp. Bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự đoạn gen *rpoB* phân lập từ 5 mẫu nghiên cứu (*rpoB-TN1*, *rpoB-TN2*, *rpoB-BG*, *rpoB-HT*, *rpoB-QN*) tương đồng 99% so với gen *rpoB* của loài *T. paniculatum* mang mã số MG710385 trên GenBank (Liu *et al.*, 2018). Kết quả này đã khẳng định trình tự nucleotide phân lập được là đoạn gen *rpoB* thuộc loài *T. paniculatum*. Trên GenBank có trình tự gen *rpoB* mang mã số HQ621454 của loài *P. oleracea* (Arakaki *et al.*, 2011) thuộc chi *Portulaca* cùng họ Rau sam (Portulacaceae) có hệ số tương đồng là 96,3% với trình tự gen *rpoB* của 5 mẫu Thổ nhân sâm. Trình tự đoạn gen *rpoB* của 5 mẫu nghiên cứu (*rpoB-BG*,

*rpoB-HT*, *rpoB-QN*, *rpoB-TN1*, *rpoB-TN2*) đã được đăng ký trên GenBank với các mã số lần lượt là LT852527, LT852528, LT852529, LT852530, LT852531.

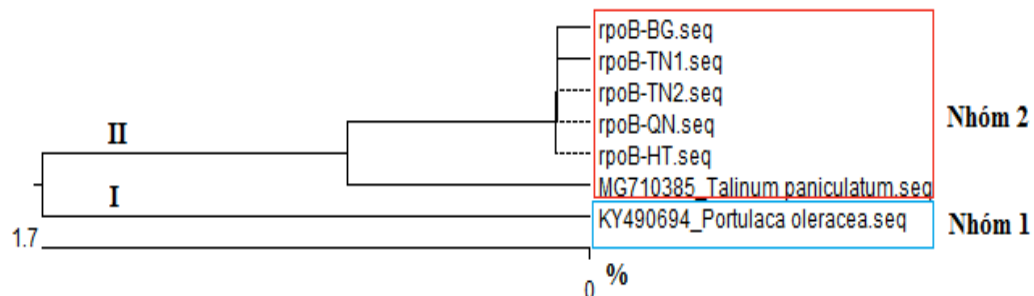
Kết quả khi so sánh trình tự gen *rpoB* của 5 mẫu Thổ nhân sâm với trình tự cùng loài *T. paniculatum* mang mã số MG710385 cho thấy có 8 vị trí sai khác nucleotide chiếm 1,54% (Bảng 3). Trình tự đoạn gen *rpoB* của 5 mẫu Thổ nhân sâm có 18 điểm sai khác (chiếm 3,47%) so với trình tự gen *rpoB* của loài *P. oleracea* (cùng họ Rau sam) mang mã số HQ621454 trên GenBank, tất cả đều là đột biến thay thế cặp nucleotide.

Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Thổ nhân sâm Việt Nam với trình tự cùng loài *T. paniculatum* mang mã số MG710385 và một trình tự của loài *P. oleracea* (cùng họ Portulacaceae) với mã số HQ621454 dựa trên trình tự gen *rpoB* được thiết lập ở hình 4.

Sơ đồ hình cây ở hình 4 được chia làm 2 nhánh lớn, nhánh I chỉ có trình tự gen *rpoB* mang mã số HQ621454 của loài *P. oleracea* thuộc họ Portulacaceae và nhánh II gồm có các trình tự gen *rpoB* của *rpoB-BG*, *rpoB-QN*, *rpoB-HT*, *rpoB-TN2*, *rpoB-TN1* và MG710385 cùng loài *T. paniculatum*.

**Bảng 3.** Sự sai khác về trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoB* phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm so với *T. paniculatum*, mã số MG710385.

Vị trí	MG710385	<i>rpoC1-BG</i>	<i>rpoC1-TN1</i>	<i>rpoC1-TN2</i>	<i>rpoC1-HT</i>	<i>rpoC1-QN</i>
Vị trí 71	A	G	G	G	G	G
Vị trí 195	C	A	A	A	A	A
Vị trí 254	T	G	G	G	G	G
Vị trí 392	G	T	T	T	T	T
Vị trí 428	C	A	A	A	A	A
Vị trí 463	A	A	C	A	A	A
Vị trí 479	C	A	A	A	A	A
Vị trí 488	T	C	C	C	C	C



**Hình 4.** Sơ đồ hình cây thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của gen *rpoB*.

## KẾT LUẬN

Cây Thổ nhân sâm thu huyện Tân Yên, tỉnh Bắc Giang (BG); thành phố Thái Nguyên (TN1); huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên (TN2); thị xã Sơn Tây, Hà Nội (HT); huyện Hoành Bồ, tỉnh Quảng Ninh (QN) có rễ củ hình trụ và mang nhiều rễ con; thân mọc thẳng, màu xanh, phân cành; lá mọc so le, hình trứng ngược, hoặc thìa hoặc hình muống, không lông, không lá bẹ, phiến lá dày; hoa chùm có 5 cánh hoa màu tím nhạt, hơn 10 nhị; bầu nhụy hình cầu, hoa có 2 lá đài; quả nhỏ, khi chín có màu xám tro; hạt rất nhỏ, màu đen, hơi det. Từ hệ gen cây Thổ nhân sâm, vùng *ITS* được phân lập có kích thước 643 bp, hai đoạn gen *rpoC1* và *rpoB* có kích thước tương ứng là 595 bp và 518 bp. Sự kết hợp đặc điểm hình thái và trình tự nucleotide của vùng *ITS*, đoạn gen *rpoC1*, đoạn gen *rpoB* cho phép xác định được các mẫu Thổ nhân sâm thu tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam thuộc loài *T. paniculatum*, chi *Talinum*, họ Rau sam (Portulacaceae).

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ một phần kinh phí của đề tài cấp Đại học Thái Nguyên (mã số ĐH2017-TN05-04) và sử dụng trang thiết bị của Phòng Công nghệ DNA ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học. Các tác giả xin cảm ơn PGS.TS. Sỹ Danh Thường, Trưởng bộ môn Thực vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ nhóm nghiên cứu trong việc phân loại mẫu Thổ nhân sâm bằng đặc điểm hình thái.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Phạm Hoàng Hộ (1999) *Cây cỏ Việt Nam*. Nhà xuất bản trẻ Thành phố Hồ Chí Minh.

Đỗ Tất Lợi (2004) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Y học, Hà Nội.

Arakaki M, Christin PA, Nyffeler R, Lendel A, Egli U, Ogburn RM, Spriggs E, Moore MJ, Edwards EJ (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 8379–8384.

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5: e8613.

Hebert PDN, Alina C, Shelley LB, Jeremy R (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313–321.

Hershkovitz MA, Zimmer EA (2000) Ribosomal DNA evidence and disjunctions of western American *Portulacaceae*. *Mol Phylogenet Evol* 15: 419–439.

Kress JW, Wurdack KJ, Zimmer EA, Wei LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369–8374.

Liu X, Li Y, Yang H, Zhou B (2018) Chloroplast genome of the folk medicine and vegetable plant *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.: gene organization, comparative and phylogenetic analysis. *Molecules* 23: E857.

Madesis P, Ganopoulos I, Ralli P, Tsaftaris A (2012) Barcoding the major Mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and nuclear DNA sequence targets. *Genet Mol Res* 11: 2548–2558.

Mark WC, Robyn C, Peter MH, Cassio VDB, Santiago M, Gitte P, Ole S, Tina J, Kenneth MC, Mark C, Niklas P, Terry AJH, Ferozah C, Gerardo AS, James ER, Michelle LH, Timothy GB, Laura K and Mike W (2007) A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295–299.

Petprai D, Chanprasert C, Chanvanij N (1996) *The herb in Thailand*. War Veterans Organization of Thailand, Bangkok, Thailand.

Ocampo G, Columbus JT (2012) Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae). *Mol Phylogenet Evol* 63: 97–112.

Stern RF, Andersen RA, Jameson I, Küpper FC, Coffroth M-A, Vaultot D, et al. (2012) Evaluating the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (*ITS*) as a Candidate Dinoflagellate Barcode Marker. *PLoS ONE* 7: e42780.

Shanghai-Marooof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014–8019.

Sharma S, Rustgi S, Balyan HS, Gupta PK (2002) Internal transcribed spacer (*ITS*) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with *ITS* sequences in common wheat. *Barley Genet Newslett* 32: 38–45.

Thanamool C, Papirom P, Chanlun S, Kupittayanant S (2013) *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gertn.: A medicinal plant with potential estrogenic activity in ovariectomized rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 5: 478–485.

Tsumura Y, Kawahara T, Wickneswari R, Yoshimura K (1996) Molecular phylogeny of *Dipterocarpaceae* in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor Appl Genet* 93: 22–29.

Vijayan K, Tsou CH (2010) DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Curr Sci* 99: 1530–1540.

- Wu F, Mueller LA, Crouzillat D, Petiard V, Tanksley SD (2006) Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: A test case in the euasterid plant clade. *Genetics* 174: 1407–1420.
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S (2010) Use of *ITS2* region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE* 5: e13102.
- Yong HL, Jinlan R, Shilin C, Jingyuan S, Kun L, Dong L and Hui Y (2010) Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. *J Med Plants Res* 4: 2706–2709.
- Yulia, Wientarsih I, Razief N (2005) Study of phytochemistry of Java ginseng compare to Korean ginseng. In: *Development of animal health and production for improving the sustainability of livestock farming in the integrated agriculture systems*. Proceedings of the mini workshop Southeast Asia Germany Alumni Network (SEAG) April 25<sup>th</sup>-26<sup>th</sup>, 2005 Bogor –Indonesia, 53–57.

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *TALINUM PANICULATUM*, AND NUCLEOTIDE SEQUENCES OF *ITS* REGION, *RPOC1* AND *RPOB* GENES

Vu Thi Nhu Trang<sup>1,2</sup>, Ho Manh Tuong<sup>3</sup>, Le Van Son<sup>3</sup>, Nguyen Thi Tam<sup>1</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University of Education

<sup>2</sup>Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

Jewels of Opar (*T. paniculatum*) belongs to *Talinum* genus, Portulacaceae family which contains secondary metabolites such as phytosterols, saponins, flavonoids, tannins, steroids. These organic compounds have anti-viral effects and are very effective on Herpes' disease and skin infections. Besides, Jewels of Opar can also be used as a supporting medicine for Parkinson's disease, heart disease and for lowering blood cholesterols. Currently, the identification of *T. paniculatum* has been mainly based on morphological analysis. However, this method often encounters obstacles when *T. paniculatum* has been completely or partially processed. In this work, we present the results of morphological characteristics, taxonomy and sequences characterisation of *ITS* region and *rpoC1*, *rpoB* genes of *T. paniculatum* in Northern provinces of Vietnam. Tuberos roots of *T. paniculatum* are cylindrical with many small roots. The stems are upright and divided into several branches. The leaves are staggered, generally oval, ovate-oblong, or egg back shaped; thick, glossy with wavy veins, without hairs. The flowers of the plants have five reddish purple wings, two sepals, more than ten stamens, and a spherical ovary. The fruits are small, and the ripe fruit is ash gray in color. The seeds are very small, slightly flat, and black. *Internal transcribed spacer (ITS)* region and two partial sequences of *rpoC1* and *rpoB* genes isolated from *T. paniculatum* plants are 643 bp, 595 bp and 518 bp in length, respectively. Based on the combination of the characteristics of morphology and nucleotide sequences of *ITS* region, *rpoC1* and *rpoB* genes, the Jewels of Opar samples collected in some northern provinces of Vietnam were determined to belong to *T. paniculatum* species, *Talinum* genus, Portulacaceae family. Characteristics of sequences of *ITS* region and *rpoC1*, *rpoB* genes are valuable for exploiting DNA barcodes to identify *T. paniculatum* in Vietnam.

**Keywords:** DNA barcode, *ITS* region, *rpoB* gene, *rpoC1* gene, *Talinum paniculatum*