

NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI VÀ CHỈ THỊ DNA BARCODE CỦA LOÀI XÁO TAM PHÂN (*Paramignya trimera*) THU THẬP TẠI KHÁNH HÒA, VIỆT NAM

Phí Thị Cẩm Miên^{1,✉}, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Nguyễn Đức Bách¹

¹Học viện Nông nghiệp Việt Nam (VNUA)

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: mienbmtvat@gmail.com

Ngày nhận bài: 28.5.2020

Ngày nhận đăng: 19.9.2020

TÓM TẮT

Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) là loài cây dược liệu bản địa quý, đặc hữu của tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. Trong nhiều năm trở lại đây, *P. trimera* được khai thác sử dụng trong hỗ trợ và điều trị các bệnh lý về gan như viêm gan, xơ gan và ung thư gan. Ghi nhận trong quá trình điều tra cho thấy *P. trimera* xuất hiện một số dạng cây có sự sai khác về hình thái lá và gai. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện để hỗ trợ cho việc nhận diện loài *P. trimera* tại Khánh Hòa, phục vụ cho công tác nhận diện, nhân giống và bảo tồn. Kết quả nghiên cứu đã xác định được đặc điểm hình thái đặc trưng và mối quan hệ di truyền giữa các mẫu bằng phương pháp phân tích mã vạch DNA dựa trên chỉ thị gen *ITS*, *matK* và *rbcL*. Về mặt hình thái, *P. trimera* Khánh Hòa được phân biệt với các loài khác thuộc chi *Paramignya* ở các đặc điểm: Lá thon dài, duy nhất, đầu lá xẻ thùy hình tim, gân lá hình lông chim. Cuống lá có gai to, nhọn và thẳng, hoa tràng 3, 6 nhị đực, bầu trên, có ba lá đài và hai lá noãn, hạt có áo hạt màu trắng trong. Kết quả phân tích các mã vạch DNA ba vùng gen *ITS*, *matK* và *rbcL* để xác định mối quan hệ di truyền giữa năm mẫu *P. trimera* thu thập được tại Khánh Hòa. Độ dài trình tự nucleotide các mẫu nghiên cứu cho 3 vùng gen *ITS*, *matK* và *rbcL* lần lượt là 850 bp, 850 bp và 500 bp, tương ứng. Trên cơ sở phân tích dữ liệu cây kiểu hình cho thấy, các mẫu (X1, X2, X3, X4, X5) có cùng nguồn gốc tiến hoá về trình tự gen nhân (*ITS*), lục lạp (*matK*) và *rbcL*. Trên cơ sở đó nhận định 5 dạng hình thái *P. trimera* phân bố tại Khánh Hòa là cùng loài và mở rộng vùng phân bố cũng như nghiên cứu chuyên sâu về các dạng hình thái *P. trimera* ở Khánh Hòa, Việt Nam.

Từ khóa: Đặc điểm hình thái, *Paramignya*, *ITS*, mã vạch DNA, *matK*, *rbcL*

MỞ ĐẦU

Trong dân gian, *P. trimera* là loài cây dược liệu quý, có tác dụng phòng ngừa và điều trị nhiều loại ung thư khác nhau. Những nghiên cứu về thành phần hóa học và dược lý cho thấy các hoạt chất có tác dụng dược lý của *P. trimera* là các coumarin, otruthin, saponin, sequitecpen. Các hoạt chất này có khả năng kháng u, hạ cholesterol, kháng viêm, kháng nấm và ức chế ngưng tập tiểu cầu (Son, 2018).

Ở Việt Nam, hầu hết các loài thuộc chi *Paramignya* đều đang bị khai thác ráo riết để làm thuốc chữa ung thư gan khiến nguồn dược liệu này trong tự nhiên ngày càng cạn kiệt (Nguyễn Mạnh Cường *et al.*, 2016). Nguyễn Vũ Toàn Phan đã thống kê có 7 loài trong chi *Paramignya* bao gồm quýt gai (*Paramignya armata*); Xáo griffith (*Paramignya griffithii*); cựa gà nhám (*Paramignya hispida*); Xáo

một hoa (*Paramignya monophylla*); Xáo petelot (*Paramignya petelotii*); Xáo leo (*Paramignya scandens*); Xáo tam phân (*Paramignya trimera*); 7 loài thuộc này phân bố rải rác ở các tỉnh phía nam Việt Nam (Nguyễn Vũ Toàn Phan *et al.*, 2016). Trong đó, *P. trimera* phân bố rộng nhất, chủ yếu ở tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. Quan sát các quần thể của loài này trong tự nhiên thấy tỷ lệ đậu hạt và khối lượng thân rễ của các cá thể chiếm tỷ lệ khá cao so với các loài khác trong chi. Để phát triển nguồn dược liệu *P. trimera*, các cá thể xáo tam phân được thu thập trong tự nhiên để nghiên cứu, bảo tồn và nhận diện. Tuy nhiên, việc định danh các cá thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu gặp khó khăn vì các cá thể tự nhiên vốn hiếm gặp lại thường không mang hoa.

Hiện nay, việc phân loại sinh học ở mức độ dưới loài có quan hệ gần gũi và mang các đặc điểm hình thái tương đồng cao đang gặp nhiều khó khăn. Vì vậy,

để khắc phục các nhược điểm của phương pháp phân loại sinh học dựa trên hình thái, các phương pháp dựa trên vật liệu di truyền đã dần được nghiên cứu và phát triển. Trong các phương pháp phân loại phân tử, phương pháp sử dụng mã vạch DNA (DNA barcode) là phương pháp phổ biến dựa trên những đoạn trình tự DNA ngắn, có tốc độ tiến hóa đủ nhanh để hỗ trợ giải quyết những khó khăn trong phân loại hình thái. Trên đối tượng thực vật, các vùng mã vạch DNA thường được sử dụng trong phân loại phân tử thường là các trình tự gen nhân như *ITS* (Internal transcribed spacer) và hệ gen lục lạp như *matK* và *rbcL*. Tuy nhiên nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc sử dụng kết hợp nhiều hơn hai mã vạch DNA cho kết quả tốt hơn so với từng mã vạch đơn lẻ (CBOL Plant Working Group, 2009; Pang *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2017).

Cho đến nay, ở Việt Nam, vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu đặc điểm hình thái chi tiết và mã vạch DNA của trong chi *Paramignya* cũng như loài *P. trimera*. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành nhằm mô tả, xác định các đặc điểm hình thái đặc trưng và phân

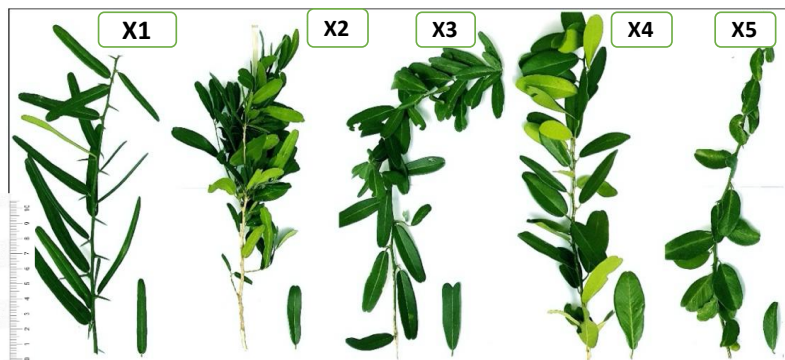
tích trình tự ba vùng gen có độ biến thiên cao, thích hợp cho định danh phân tử là *ITS*, *matK* và *rbcL* của loài *P. trimera* Khánh Hòa, hỗ trợ công tác định danh loài, hỗ trợ cho công tác tiếp theo về chọn tạo giống, nhân giống loài được liệu có giá trị này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Năm (5) mẫu xáo tam phân, trong đó mẫu X1 (mẫu chuẩn) được cung cấp bởi Viện Dược liệu thu tại Ninh Vân, Khánh Hòa, mẫu X2 (thu thập tại xã Ninh Vân, Khánh Hòa), mẫu X3 (thu thập tại xã Ninh Hoà, Khánh Hòa), mẫu X4 (thu thập tại xã Ninh Hoà, Khánh Hòa), mẫu X5 (thu thập tại xã Diên Khánh, Khánh Hòa). Thời gian tiến hành thu thập tháng 8-10/2018.

Mỗi *ITS*, *rbcL* và *matK* được sử dụng là các môi được đặt tại Công ty TNHH MTV Sinh Hoá Phù Sa có trình tự dưới đây (Bảng 1).



Hình 1. Các dạng kiểu hình cây xáo tam phân (*P. trimera*) thu thập được.

Bảng 1. Trình tự các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên cặp môi	Trình tự (5'-3')	Kích thước môi (bp)	Nguồn
MatK (F)	TAATTTACRATCAATTCATTCAATATTTCC	850 bp	Kyndt <i>et al.</i> , 2005
MatK (R)	GARGAYCCRCTRTRATAATGAGAAAGATT		
ITS (F)	AGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC	850 bp	Sun <i>et al.</i> , 1994
ITS (R)	GATATGCTTAAACTCAGCGGGTC		
Rbcl (F)	ATGTCACCA CAAACAGAGACTAA	500 bp	CBOL, 2009
Rbcl (R)	TTCGGCACAAAATACGAAACGATCTCTC		

Phương pháp

Phương pháp phân loại hình thái

Các mẫu Xáo tam phân Khánh Hòa được xác

định tên khoa học bằng phương pháp so sánh hình thái, đối chiếu với khóa phân loại trong các bộ thực vật chí (Phạm Hoàng Hộ, 1999; Nguyễn Nghĩa Thìn, 2007) tại bộ môn Thực vật, khoa Nông học, Học viện Nông Nghiệp Việt Nam.

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Doyle (1990) có cải tiến. Mẫu mô sau khi nghiền sẽ được phá màng tế bào trong dung dịch đệm chiết CTAB (1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8; 2% CTAB) trong 2h ở 65°C. Dung dịch sau đó được ly tâm loại cặn tế bào và chiết với chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Dung dịch chiết được xử lý với RNase và tủa DNA sử dụng 2 lần thể tích EtOH 100%; 0,3 M CH₃COONa trong 3h ở -20°C. Kết tủa DNA được rửa bằng EtOH 70%, làm khô và hòa tan trong nước khử ion vô trùng.

Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số sau tách chiết được sử dụng làm khuôn cho PCR với các cặp mồi đã thiết kế và tổng hợp (Bảng 1) (Kyndt *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 1994; CBOL, 2009). Thành phần phản ứng PCR được tiến hành với thể tích 20 µL gồm: 1X DreamTaq Buffer; 1 mM dNTPs; 2,5 µM mỗi mồi; 0,75 unit DreamTaq DNA polymerase; 50 ng DNA tổng số. PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 94°C/4 mins; (94°C/30 sec; 52°C – 30 sec; 72°C/45 sec x 30 chu kỳ, 72°C/7 min, sau đó giữ ở 15°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng phương pháp tủa EtOH 100% theo tỷ lệ 4:1 ở -20°C trong 30 min; Ly tâm tốc độ 12000v/p trong 5 phút, thu cặn, bỏ dịch; Thêm 500 µL EtOH 70%, ly tâm 12000v/p trong 5 phút, thu cặn, bỏ dịch (2 lần); Làm khô cặn trong box cây, hòa loãng sản phẩm tinh sạch với 50 µL nước khử trùng và sản phẩm tinh sạch được giải trình tự tại Viện Công nghệ sinh học trên máy giải trình tự tự động ABI 3500; 3500 Genetic Analyzer bằng cách sử dụng BigDye; Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit. Thành phần của PCR đọc trình tự gồm: 3,2 pM mỗi, 200 ng sản phẩm PCR tinh sạch, BigDye, đệm tương ứng tổng thể tích 15 mL với chu trình nhiệt trên máy luân nhiệt IBM Veriti như sau: 96°C/1 min; 25 chu kỳ (96°C/60 sec, 50°C/ 5 sec, 60°C/4 min); giữ ở 4°C.

Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự

Các mẫu sau đó được điện di trong ống mao quản 80 cm × 50 µm với polymer POP-4 của Hãng ABI, Hoa Kỳ. Kết quả giải trình tự được xử lý thô để loại bỏ các tín hiệu nhiễu, yếu và hiệu chỉnh những vị trí có tín hiệu không rõ ràng. Trình tự sau khi được xử lý thô sẽ được sử dụng để so sánh với các trình tự tương ứng đã được

công bố và các loài gần gũi trên GenBank sử dụng công cụ BLAST trong NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do giải trình tự và phát hiện các đa hình nucleotide đơn. Việc phân tích trình tự đã được hỗ trợ bằng các phần mềm chuyên dụng như SeqScape 2.6; DNASTARLasergene 7.1; BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng sử dụng phần mềm MEGAX theo phương pháp Neighbour-Joining và Maximum-Likelihood (ML) với giá trị bootstrap là 1000 dựa trên cơ sở số liệu thu được (Kumar *et al.*, 2016). Từ đó, đưa ra những kết luận về mã vạch phân tử để định loại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái của loài xáo tam phân Khánh Hòa, Việt Nam

Sự đa dạng về hình thái xáo tam phân thu thập tại Khánh Hòa

Phân tích nhiều mẫu xáo tam phân thu thập ở Khánh Hòa, nhóm nghiên cứu tiến hành phân loại hình thái, so sánh giữa các mẫu thu thập được, mẫu của Viện Dược liệu và phân loại sơ bộ về mặt hình thái theo khoá phân loại của Phạm Hoàng Hộ, 1999; Nguyễn Nghĩa Thìn, (2007) thu được 5 mẫu kiểu hình đặc trưng cho loài *P. trimera* (Hình 1). Sự đa dạng về hình thái giữa các cá thể được thể hiện ở đặc điểm hình thái lá, kích thước lá, kích thước gai và độ cong của gai (Hình 1).

Đặc điểm hình thái đặc trưng của xáo tam phân Khánh Hòa

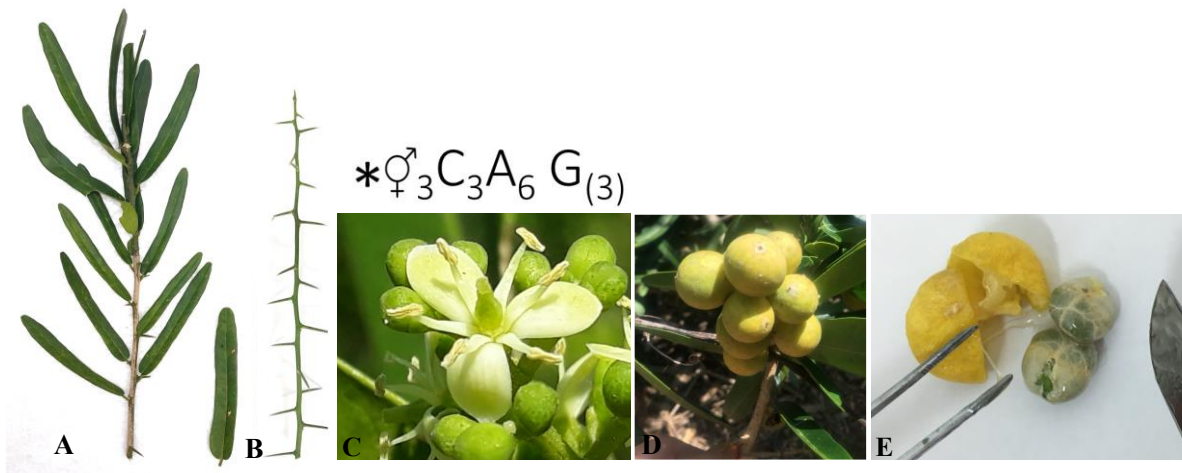
Căn cứ vào nghiên cứu về chi *Paramignya* ở Việt nam và trên thế giới cùng với bộ dữ liệu mẫu, hình ảnh xáo tam phân do Viện Dược liệu cung cấp cho thấy xáo tam phân Khánh Hòa được phân biệt với các loài khác thuộc chi *Paramignya* ở các đặc điểm đặc trưng bao gồm: lá đơn, mọc cách, so le nhau, phiến lá dày, kích thước dài 8–12 cm, rộng 1–3 cm; đỉnh lá có khía nhỏ, góc lá tròn, chóp lá hình tim, mép cong xuống dưới; mặt trên xanh đậm, mặt dưới nhạt và bóng, bên trong có nhiều điểm dầu, có 8–10 đôi gân bên; cuống lá dài khoảng 4–8 mm, nhẵn. Lá mọc ở gần ngọn có phiến kích thước lớn hơn so với lá ở đoạn trên thân và cành (Hình 3). Gai nhọn, mọc dưới mỗi cuống lá, số lượng và kích thước gai thay đổi đa dạng theo vùng địa lý và theo từng cá thể thu thập (Phạm Hoàng Hộ, 2000). Cụm hoa dạng chùm mọc ở nách lá gồm 2–8 hoa. Hoa đều (*), có màu

trắng ngà, có 3 lá dài dính nhau (K_3), 6 nhị đực (A_{3+3}) ngắn hơn cánh hoa, chỉ nhị dày và dẹt, bao phấn hình bầu dục; 1 đầu nhụy, 1 vòi nhụy dày, có tuyến, đầu nhụy dẹt, có 3 gờ; cuống hoa ngắn, nhẵn, có lá bắc, đài tồn tại trên

quả, có tuyến rõ, mép có lông, 3 cánh hoa nhỏ, dài 4 mm, bầu 1-2 ô và mỗi ô chứa 1 noãn. Quả chứa từ 1-2 hạt được bao bọc bởi lớp dịch nhầy dạng keo dính, trong (Hình 3).



Hình 2. Sự đa dạng hình thái lá và gai xáo tam phân. A: Các dạng hình thái lá của loài xáo tam phân; B: Các dạng hình thái gai của loài xáo tam phân.



Hình 3. Hình ảnh đặc trưng của loài xáo tam phân thu thập tại Khánh Hoà. A. Hình thái lá; B. Hình thái gai; C. Hình thái hoa; D. Hình thái quả; E. Hình thái hạt sau tách vỏ.

Phân tích mã vạch DNA

Các mẫu *P. trimera* sau khi được định loại về mặt hình thái sẽ được tách chiết DNA, khuếch đại bằng phản ứng PCR, giải trình tự và xác định mối quan hệ di truyền.

Trình tự nucleotide và cây kiểu hình vùng gen ITS của 5 mẫu *P. trimera*

Nghiên cứu của Zhu *et al.* (2010) cho thấy vùng gen *ITS* là vùng gen thích hợp nhất được sử dụng trong phân loại loài. Kết quả kiểm tra cho thấy DNA tổng

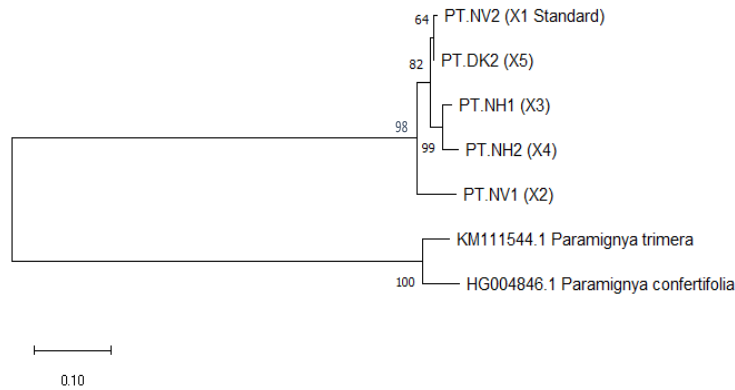
số sau tách chiết bị đứt gãy tương đối nhiều tạo vết trên gel điện di. Sau khi chỉnh sửa và loại bỏ các vị trí trống thì các mẫu *P. trimera* thu thập có chiều dài vùng gen *ITS* là 850 bp và các trình tự này đã được đăng ký trình tự trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI) với mã số MT193827, MT193826, MT193831, MT193833, MT193834. Trình tự thu được từ các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank của một số loài trong cùng một chi *Paramignya*. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của các mẫu thu thập được xây dựng theo phương pháp

Maximum Likelihood (Hình 4). Kết quả phân tích cho thấy các mẫu nghiên cứu có mối quan hệ họ hàng gần

gửi với nhau (Bảng 1) với mức độ tương đồng đạt 98% (Hình 4).

Bảng 1. Khoảng cách di truyền của các mẫu *P. trimera* với các mẫu trong chi *Paramignya* trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS*.

Mẫu	PT.NV1_(X2)	PT.NV2_Standard (X1)	PT.NH1_(X3)	PT.NH2_(X4)	PT.DK2_(X5)	KM111544.1_Paramignya_trimera	HG004846.1_Paramignya_confertifolia
PT.NV1_(X2)							
PT.NV2_Standard (X1)	0,0720						
PT.NH1_(X3)	0,0950	0,0364					
PT.NH2_(X4)	0,1051	0,0451	0,0341				
PT.DK2_(X5)	0,0692	0,0052	0,0350	0,0433			
KM111544.1_Paramignya_trimera	1,1015	1,0877	1,1250	1,1382	1,0957		
HG004846.1_Paramignya_confertifolia	1,1760	1,1212	1,1463	1,1661	1,1351	0,0866	



Hình 4. Mối quan hệ họ hàng của các mẫu thu thập với loài cùng chi trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS* bằng phương pháp ML, các số trên nhánh là giá trị bootstrap (%).

Kết quả cây kiểu hình *ITS* cho thấy, vùng gen *ITS* chưa phải là chỉ thị tốt nhất cho định loại phân tử ở cấp độ loài thuộc chi *Paramignya* và việc sử dụng kết hợp các chỉ thị có thể giúp định loại các loài thuộc chi này rõ hơn. Điều này cũng cho thấy giới hạn giữa các loài trong cùng chi khi các loài trong chi *Paramignya* thuộc họ Rutaceace có cấu trúc hoa thuộc loài giao phấn. Giá trị bootstrap cao cho thấy độ tin cậy cao về kết quả xây dựng cây chủng loại phát sinh cũng như củng cố kết quả định loại bằng phương pháp hình thái.

Trình tự nucleotide vùng gen *matK* của 5 mẫu *P. trimera* và các mẫu cùng chi *Paramignya* trên Genbank

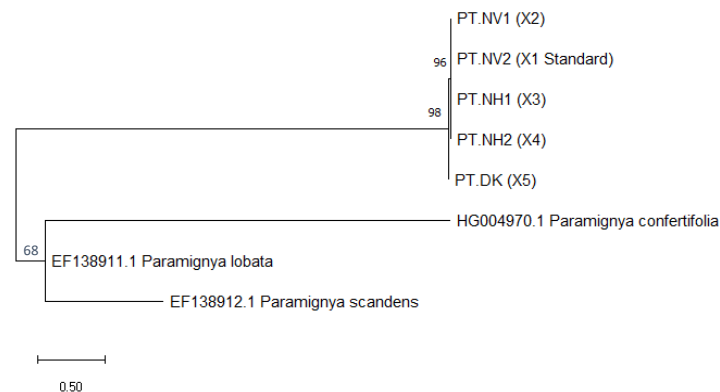
Các mẫu nghiên cứu sau khi đọc trình tự, chỉnh sửa và loại bỏ các vị trí trống của vùng gen *matK*, kết quả kích thước các vùng gen *matK* cần khuếch đại thu

được không quá lớn 850 bp và được đăng ký trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI) với mã số MT215524, MT215522, MT215523, MT215525, MT215521. Kết quả so sánh chỉ ra 5 mẫu nghiên cứu có mức độ tương đồng với hệ gen *matK* trong lục lạp là 98% và được xếp vào cùng một nhóm, khoảng cách di truyền giữa các mẫu thu thập là rất thấp, trung bình từ 0–2,4% (Bảng 2). Trình tự thu được từ các mẫu này cũng được kiểm tra mức độ tương đồng với các trình tự sẵn có trên Ngân hàng gen bằng công cụ BLAST(Hình 5).

Khi phân tích mối quan hệ di truyền vùng gen lục lạp *matK* cho thấy, các mẫu xáo tam phân thu thập có mối quan hệ di truyền gần gũi (theo dòng mẹ) với chỉ số bootstrap là 98%. Kết quả này cũng chỉ ra mối quan hệ gần gũi giữa xáo tam phân thu thập ở Ninh Vân (X1, X2) và xáo tam phân thu thập ở Ninh Hoà (X3, X4) có mức độ tương đồng cao 96% (Hình 5).

Bảng 2. Khoảng cách di truyền của các mẫu *P. trimera* với các mẫu trong chi *Paramignya* trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*.

Mẫu	PT.DK_(X5)	PT.NV1_(X2)	PT.NH1_(X3)	PT.NV2_(X1_Standard)	PT.NH2_(X4)	EF138911.1_Paramignya_lobata	EF138912.1_Paramignya_scandens	HG004970.1_Paramignya_confertifolia
PT.DK_(X5)								
PT.NV1_(X2)	0,0183							
PT.NH1_(X3)	0,0170	0,0036						
PT.NV2_(X1_Standard)	0,0171	0,001	0,003					
PT.NH2_(X4)	0,0170	0,004	0,000		0,003			
EF138911.1_Paramignya_lobata	2,926	4,414	4,413		4,413	4,413		
EF138912.1_Paramignya_scandens	3,825	4,431	4,431		4,431	4,431	0,878	
HG004970.1_Paramignya_confertifolia	4,366	5,291	5,366		5,291	5,366	2,858	4,333



Hình 5. Mối quan hệ họ hàng của các mẫu thu thập với loài cùng chi trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* bằng phương pháp ML, các số trên nhánh là giá trị bootstrap (%).

Trình tự nucleotide vùng gen *rbcL* của 5 mẫu *P. trimera* và các mẫu cùng chi trên Genbank

Để xây dựng bổ sung bộ dữ liệu về trình tự mẫu của xáo tam phân, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu và giải trình tự gen cho vùng gen *rbcL* cho 5 mẫu xáo tam phân thu thập có chiều dài 500 bp và được đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số MT215528, MT215529, MT215533, MT215532, MT215534. Kết quả cũng được so sánh với trình tự của các loài thuộc chi *Paramignya* (*P. trimera*, *P. confertifolia*, *P. lobata*, *P. scandens*, *P. monophylla*) (Bảng 3, Hình 6).

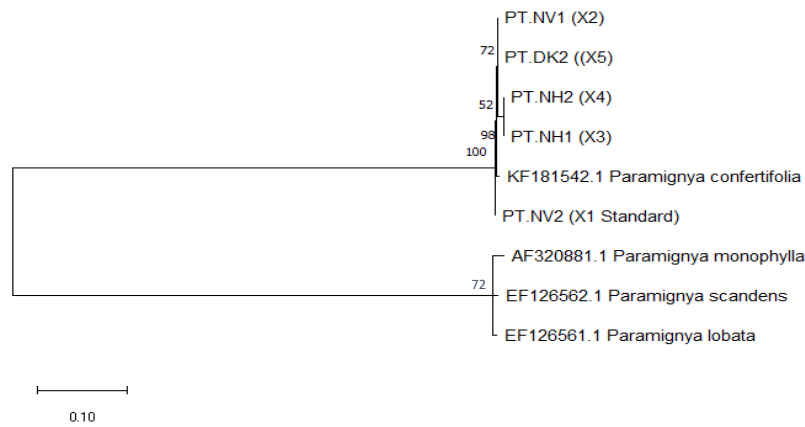
Kết quả mối quan hệ họ hàng của các mẫu thu

thập qua chi thị *rbcL* cho thấy các mẫu có mối quan hệ di truyền gần gũi, các mẫu nghiên cứu có cùng nguồn gốc di truyền và cùng là thuộc *P. trimera* (Bảng 3, Hình 6).

Mã vạch DNA là một kỹ thuật không còn mới mẻ, tuy nhiên được xem là tiêu chuẩn cho mục đích nhận dạng loài (Zuo *et al.*, 2011). Tuy nhiên, cần rất nhiều nỗ lực trước khi mã vạch DNA của thực vật trở nên đủ tin cậy để áp dụng rộng rãi. Do vậy, việc nhận diện về mặt hình thái chưa đủ cơ sở dữ liệu và sẽ gây ra nhiều tranh cãi nên việc phối kết hợp chặt chẽ để nhận diện giữa phương pháp hình thái và phân tử giúp bổ sung cơ sở khoa học về loài nghiên cứu.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền của các mẫu *P. trimera* với các mẫu trong chi *Paramignya* trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*.

Mẫu	PT.NV2_(X1_Standard)	PT.NV1_(X2)	PT.NH2_(X4)	PT.NH1_(X3)	PT.DK2_(X5)	EF126562.1_Paramignya_scandens	EF126561.1_Paramignya_lobata	AF320881.1_Paramignya_monophylla	KF181542.1_Paramignya_confertifolia
PT.NV2_(X1_Standard)									
PT.NV1_(X2)	0,0046								
PT.NH2_(X4)	0,0139	0,0093							
PT.NH1_(X3)	0,0139	0,0093	0,0000						
PT.DK2_(X5)	0,0046	0,0000	0,0093	0,0093					
EF126562.1_Paramignya_scandens	5,884	5,884	5,8854	5,8854	5,8843				
EF126561.1_Paramignya_lobata	5,7192	5,720	5,7215	5,7215	5,7202	0,01499			
AF320881.1_Paramignya_monophylla	5,9210	5,9218	5,9229	5,9229	5,9218	0,02560	0,02414		
KF181542.1_Paramignya_confertifolia	0,0069	0,0069	0,0163	0,0163	0,0069	5,8838	5,7196	5,9213	



Hình 6. Mối quan hệ họ hàng của các mẫu thu thập với loài cùng chi trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* bằng phương pháp ML, các số trên nhánh là giá trị bootstrap (%).

KẾT LUẬN

Kết quả thu thập cho thấy sự đa dạng về mặt hình thái giữa các loài xáo tam phân tại Khánh Hòa, Việt Nam. Điều này thể hiện rõ ở đặc điểm về mặt hình thái (hình thái lá, hình dạng gai). Xét về mặt hình thái, đặc trưng giúp phân biệt được chi *Paramignya* với các loài trong chi khác là cụm hoa dạng chùm, mọc ở nách lá gồm 2–8 hoa. Hoa màu trắng ngà, hoa mẫu 3, cuống

hoa ngắn, nhẵn, có lá bắc, đài tồn tại trên quả, 3 lá đài dính nhau, có tuyến rõ, mép có lông, 3 cánh hoa nhỏ, dài 4 mm, nhị 6, ngắn hơn cánh hoa, chỉ nhị dày và dẹt, bao phấn hình bầu dục, bầu 2–3 ô, mỗi ô chứa 1 noãn, vòi nhụy dày, có tuyến, đầu nhụy dẹt, có 3 gờ. Phân tích vùng gen *ITS*, *matK* và *rbcL* của mẫu *P. trimera* thu thập và giải trình tự có kích thước 850 bp, 850 bp và 500 bp, tương ứng. Các trình tự này được đăng ký trên ngân hàng gen thế giới Genbank góp

phần xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA cung cấp dữ liệu phân tử, cho các nghiên cứu tiến hoá và hệ thống sinh học loài *P. trimera*. Hơn nữa, kết quả phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS*, *matK*, *rbcL* chỉ ra các mẫu thu thập có cùng nguồn gốc và cùng là *P. trimera*.

Kết quả nghiên cứu cũng giúp đưa ra bộ dữ liệu đầy đủ nhất từ trước đến nay ở Việt Nam về đặc điểm hình thái cũng như mã vạch DNA của cây Xáo tam phân Việt Nam, góp phần trong công tác nhận diện, định danh loài xáo tam phân, làm nguyên liệu ban đầu cho công tác khai thác, chọn tạo giống cây dược liệu bản địa của Việt Nam

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu cảm ơn Chương trình dự án Việt Bỉ (AI Programe-VNUA, 2014–2019) đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài “A study of phylogenetics and biopharmaceutical properties of the Vietnamese traditional medicinal plants belonging to the genus *Paramignya* for the development of hepatoprotective nutraceuticals” giai đoạn 2018–2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Burkill IH (1931) An enumeration of the species of *Paramignya*, *Atalantia* and *Citrus*, found in Malaya. *Gardens Bulletin Straits Settlements* 5: 212–220.

Cuenoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ, Chase MW (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am J Bot* 89: 132–144.

CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12794–12797.

Cuong NM, Huong TT, Khanh PN, Tai NV, Ha VT, Son NT, Tai BH, Kim YH (2015) Paratrimerins A and B, two new dimeric monoterpene-linked coumarin glycosides from the roots and stems of *Paramignya trimera*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 63: 945–949.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.

Group CPW (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12794–12797.

Ho PH (2000) *An Illustrated flora of Vietnam*. Ho Chi Minh City Youth Publishing House, Ho Chi Minh City.

Khan IA (2007) *Citrus germplasm resources*. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, CAB International Chapter 4: 45–140.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through

comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111–120.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870–1874.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6): 1547–1549.

Kurz WS (1876) International Plant Names Index. *Journal of the Asiatic Society of Bengal Part 2. Natural History. Calcutta* 44(3): 135.

Kyndt T, Van Droogenbroeck B, Romeijn-Peeters E, Romero-Motochi JP, Scheldeman X, Goetghebeur P, Van Damme P and Gheysen G (2005) Molecular phylogeny and evolution of caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 37(2): 442–459.

Mabberley DJ (2004) Citrus (Rutaceae): A Review of Recent Advances in Etymology, Systematics and Medical Applications. *Blumea Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography* 49(2-3): 481–498.

Nguyen VT, Sakoff JA, Scarlett CJ (2017) Physicochemical Properties, Antioxidant and Anti-proliferative Capacities of Dried Leaf and Its Extract from Xao tam phan (*Paramignya trimera*). *Chem Biodivers* 14(6): 3.

Nguyễn Nghĩa Thìn (2007) *Các phương pháp nghiên cứu thực vật*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.

Bùi Thị Thuỳ Linh, Đặng Hoàng Phú, Nguyễn Trung Nhân (2015) Khảo sát thành phần hóa học của thân cây xáo tam phân – *Paramignya trimera* (Oliver) Burkill – Họ rutaceae. *Tạp chí phân tích Hoá, Lý và Sinh học* 20(4): 37-45.

Nguyễn Mạnh Cường, Trần Thu Hương, Phạm Ngọc Khánh, Vũ Thị Hà, Nguyễn Thị Cúc, Đỗ Thị Thảo (2016) Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng paracetamol. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 54(1): 37-45.

Hall TA (1999) BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Hoang LTA, Kim DC, Ko W, Ha TM, Nhim NX, Yen PH, Tai BH, Truong LH, Long VN, Gioi T, Quang TH, Minh CV, Kiem PV (2017) Anti-inflammatory coumarins from *Paramignya trimera*. *Pharm Biol* 55(1): 1195–1201.

Son NT (2018) *Notes on the genus Paramignya: Phytochemistry and biological activity*. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University 56(1): 1–10.

Tanak T (1928) No. 69. *Notes on the Dutch Indian species of Rutaceae-Aurantieae*.

- (Revisio Aurantiacearum-V.). Mededeelingen's Ryks Herbarium Leiden: 1–13.
- Thwaites GHK(1861) *Paramignya armata* (Thwaites) Oliv. *Journal of the Linnean Society. Botany. London* 5(2): 43.
- Kumar V, NM, MN, Wickramaratne DBM (1991) Tirucallane derivatives from *Paraminya monophylla* fruits. *Phytochemistry* 301: 231–1233.
- Van Tang Nguyen, NMQP, Quan Van Vuong, Michael C, Bowyer, Ian A, van Altena & Christopher J, Scarlett (2015) Phytochemical retention and antioxidant capacity of Xao tamphan (*Paramignya trimera*) root as prepared by different drying methods. *Drying Technology* 34(3): 324–334.
- Wiart C (2006) *Medicinal Plants of Asia and the Pacific*. Taylor & Fancis Group.
- Zhu Y(2010) Effect of epigallocatechin-3-gallate on the activity of alpha-glucosidase in vitro. *Wei Sheng Yan Jiu* 39(2): 168–176.

MORPHOLOGICAL DESCRIPTION AND DNA BARCODING STUDY OF *PARAMIGNYA TRIMERA* COLLECTED IN KHANH HOA, VIETNAM

Phi Thi Cam Mien¹, Pham Bich Ngoc², Chu Hoang Ha², Nguyen Duc Bach¹

¹Vietnam National University of Agriculture (VNUA)

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Paramignya trimera is a valuable traditional medicinal plant, typically distributing in Khanh Hoa, Vietnam. In recent years, *P. trimera* has been exploited to treat liver diseases such as hepatitis, cirrhosis and liver cancers. The recorded during the investigation, in Khanh Hoa currently appears a number of species with similar phenotypes known collectively as *P. trimera* and appeared some morphology with differences in leaf morphology and thorns. Therefore, this study was carried out for identification, breeding and propagation conservation. This study has been described, characterized morphological characteristics and analyzed DNA barcodes based on *ITS*, *matK* and *rbcL* gene markers. About the morphology, *P. trimera* is distinguished from other species of the genus *Paramignya* with the following characteristics: elongated, single leaf, leaf-shaped lobe end, leaf veins shaped like a feather. Petiole with big, pointed and straight spines. Corolla 3, 6 stamens, upper election, with three sepals and two ovule leaves, the seed has a seed coat. The analysis of DNA barcodes shows that the results combination of the analysis of the three regions of *ITS*, *matK* and *rbcL* can be used to determine the genetic relationship between five samples of *P. trimera*. The nucleotide sequence lengths of the samples for the three regions of the *ITS*, *matK* and *rbcL* genes are 850 bp, 850 bp and 500 bp, respectively. On the basis of phenotypic tree analysis, the samples (X1, X2, X3, X4, X5) have the same evolutionary origin in *ITS*, *matK* and *rbcL*. Base on to identified the five morphological forms of *P. trimera* distributed in Khanh Hoa as the same species and expanded the distribution area as well as in-depth research on *P. trimera* morphologies in Khanh Hoa, Vietnam.

Keywords: Morphological characteristics, *Paramignya*, *ITS*, DNA barcode, *matK*, *rbcL*