

ĐẶC ĐIỂM CỦA TRÌNH TỰ VÙNG ITS PHÂN LẬP TỪ CÂY BÂY LÁ MỘT HOA

Vũ Thị Thu Thủy*, Tạ Thị Thu Thương, Chu Hoàng Mậu
Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Phương pháp phân loại học phân tử được xây dựng dựa trên sự nhận biết các gen đặc hữu của các taxon sinh vật và các kỹ thuật dựa trên phân tích DNA là phương pháp có hiệu quả cao trong việc định loại và giám định loài. Hiện nay, trình tự vùng ITS của nhân tế bào được xem là một chỉ thị phân tử hữu ích để đánh giá sự phát sinh và mối quan hệ di truyền của các loài thực vật bậc cao. Bài báo này trình bày kết quả sử dụng trình tự vùng ITS để định loại mẫu cây Bảy lá một hoa thu thập tại Lào Cai. Vùng ITS phân lập từ cây Bảy lá một hoa thu thập tại Sapa, Lào Cai có kích thước 676 bp và cây Bảy lá một hoa ở Lào Cai có quan hệ gần nhất với loài *Paris vietnamensis*, với độ tương đồng đạt 99%. Mẫu cây Bảy lá một hoa thu tại Sapa, Lào Cai thuộc loài *Paris vietnamensis*.

Từ khóa: chỉ thị DNA, giám định loài, *Paris*, *Paris vietnamensis*, vùng ITS

MỞ ĐẦU

Phân loại học truyền thống sử dụng chủ yếu dựa vào đặc điểm hình thái, đặc biệt là hình thái cơ quan sinh sản, vì cơ quan này ít biến đổi hơn so với cơ quan sinh dưỡng khi điều kiện môi trường thay đổi. Những thực vật càng gần nhau càng có nhiều đặc điểm chung về hình thái. Do vậy, phương pháp phân loại này hiện nay vẫn được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên, các tính trạng hình thái thường biến đổi rất phức tạp, nên đôi khi việc xác định sự tương đồng gặp nhiều khó khăn. Trong trường hợp các mẫu vật cần giám định không còn nguyên vẹn, biến dạng thì việc định loại càng khó khăn hơn. Mặt khác, trong phân loại các loài được liệu quý hiếm bằng phương pháp truyền thống còn gặp nhiều khó khăn khi trong tự nhiên tồn tại nhiều dạng trung gian của các loài thực vật dẫn đến việc dễ gây nhầm lẫn.

Sự ra đời của kỹ thuật giải trình tự DNA đã mở ra một hướng ứng dụng to lớn cho phân loại học phân tử. Phân loại học phân tử dựa trên nguyên lý mỗi sinh vật sống đều mang các phân tử DNA, các sinh vật có quan hệ họ hàng gần gũi thì có mức độ tương đồng cao trong cấu trúc phân tử DNA, ngược lại những sinh vật có quan hệ xa nhau sẽ có những đặc

điểm cấu trúc khác biệt. Dựa vào mức độ đột biến của những đoạn DNA bảo thủ trong phân tử DNA mà có thể xây dựng được cây phát sinh và xác định được khoảng cách di truyền của các đối tượng nghiên cứu. Do lợi thế trong nghiên cứu biến đổi tiến hóa nhỏ nên dữ liệu phân tử có giá trị cao trong phân tích quan hệ phát sinh chủng loại giữa các taxon ở bậc phân loại thấp cũng như đa dạng di truyền quần thể [4].

Cây Bảy lá một hoa là thảo dược quý được sử dụng để chữa bệnh. Nhu cầu về nguồn dược liệu này rất lớn [1]. Khai thác nguồn gen cây Bảy lá một hoa không có kế hoạch cùng với sự hủy hoại môi trường sống làm giảm nghiêm trọng số lượng cá thể của quần thể trong tự nhiên. Bảy lá một hoa đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam từ năm 1996 ở cấp đánh giá ở mức hiếm (Bậc R), cần có biện pháp khai thác hợp lý nguồn thuốc, đồng thời đưa vào trồng để bảo vệ nguồn gen [2].

Vùng Internal transcribed spacer (ITS) là một đoạn đệm nằm giữa gen mã hóa RNA tiểu phần nhỏ và RNA tiểu phần lớn của ribosome (rRNA). Trình tự vùng ITS có chứa các cấu trúc lặp ngắn, có mức độ biến đổi ngoại loài cao, nhưng lại có tính bảo thủ rất cao trong cùng một loài, vì vậy sử dụng kỹ thuật so sánh trình tự ITS được sử dụng khá rộng rãi và hiệu quả trong phân loại sinh vật [3], [5],

* Tel: 0979 855136, Email: vuthithuthuy@dhsptn.edu.vn

[7,], [8], [9]... đó là lý do vùng *ITS* được lựa chọn để định loại mẫu cây Bầy lá một hoa thu thập tại Lào Cai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu cây Bầy lá một hoa thu thập tại Sa Pa (ký hiệu là LC7) được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu (Hình 1A). Tách chiết DNA tổng số từ lá cây Bầy lá một hoa theo phương pháp của Doyle và cs [6]. DNA tổng số sau

khi tách chiết được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, trong đệm TAE 1X, ở hiệu điện thế 90 V. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được kiểm tra qua phương pháp đo quang phổ hấp phụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm.

Nhân bản vùng *ITS* từ DNA tổng số bằng kỹ thuật *PCR* với cặp mồi ITS-12F/ITS-12R (Bảng 1).

Bảng 1. Thông tin về cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi	Nhiệt độ gắn mồi	Kích thước dự kiến
ITS-12F	5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG-3'	56° C	Gần 700 bp
ITS-12R	5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'		

Thành phần phản ứng *PCR* gồm master mix (2X) – 12,5 µl, mồi xuôi (10 pmol/µl) – 0,5 µl, mồi ngược (10 pmol/µl) – 0,5 µl, DNA khuôn (10 ng/µl)– 1 µl, H₂O – 9,5 µl và tổng thể tích phản ứng là 25 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng: 94 °C/4 phút; lặp lại 35 chu kì với (94 °C/30 giây, 56 °C/30 giây, 72 °C/45 giây); 72 °C/10 phút và giữ ở 4 °C.

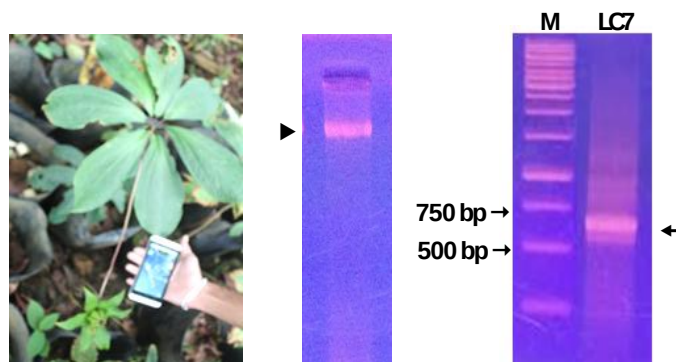
Trình tự nucleotide của vùng *ITS* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit Gen JET *PCR* Purification của hãng Thermo Scientific. Trình tự nucleotid của vùng *ITS* được phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng các phần mềm BLAST, BioEdit và DNASTar.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết và khuếch đại trình tự nucleotide của vùng *ITS* từ cây Bầy lá một hoa

DNA tổng số tách chiết từ cây Bầy lá một hoa được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di và đo quang phổ hấp phụ. Kết quả cho thấy DNA thu được đảm bảo chất lượng cho các phân tích tiếp theo.

Sử dụng kỹ thuật *PCR* với cặp mồi ITS-12F/ITS-12R khuếch đại vùng *ITS*, nhiệt độ bắt cặp mồi đặc hiệu ở 56° C. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm *PCR* được thể hiện trên hình 1C cho thấy băng DNA đặc hiệu có kích thước đúng như tính toán lý thuyết, gần 700 bp (Hình 1).



Hình 1. Hình ảnh cây Bầy lá một hoa (A), kết quả điện di DNA tổng số (B) và sản phẩm *PCR* nhân bản vùng *ITS* của mẫu lá Bầy lá một hoa (C). M: thang DNA 1kb; LC7: mẫu Bầy lá một hoa thu tại Sa Pa, Lào Cai

Kết quả xác định trình tự nucleotide vùng *ITS* của cây Bầy lá một hoa LC7

LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

110 120 130 140 150 160 170 180
 LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

210 220 230 240 250 260 270 280
 LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

310 320 330 340 350 360 370 380
 LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

410 420 430 440 450 460 470 480
 LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

510 520 530 540 550 560 570 580
 LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

610 620 630 640 650 660 670
 LC7
 Paris axialis
 Paris dunniana
 Paris forrestii
 Paris undulata
 Paris vietnamensis

31

Kết quả cho thấy trình tự nucleotide của vùng *ITS* phân lập được từ mẫu Bảy lá một hoa LC7 có kích thước 676 bp (như trên hình 2). Dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS*, bằng phần mềm DNASTar, bảng ma trận về hệ số tương đồng di truyền và hệ số phân ly được thiết lập (Bảng 2).

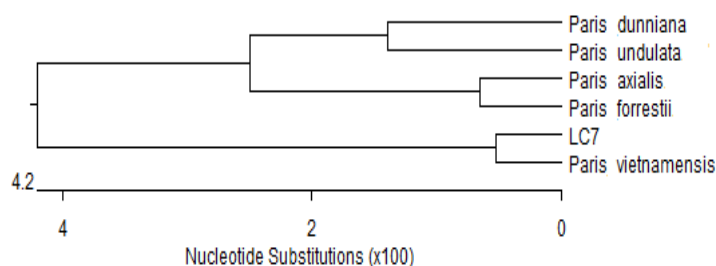
Bảng 2. Độ tương đồng và phân ly về trình tự nucleotide của vùng *ITS* phân lập từ mẫu LC7 và các trình tự *ITS* công bố trên GenBank

Percent Identity							
	1	2	3	4	5	6	
1		93.5	92.4	92.2	92.5	99.0	1
2	6.8		95.7	99.2	96.3	92.6	2
3	8.0	4.4		94.6	97.3	91.5	3
4	8.2	0.8	5.6		95.2	91.3	4
5	8.0	3.8	2.8	5.1		91.4	5
6	1.0	7.8	9.0	9.2	9.1		6
	1	2	3	4	5	6	

Divergence

LC7
Paris <i>axialis</i>
Paris <i>dunniana</i>
Paris <i>forrestii</i>
Paris <i>undulata</i>
Paris <i>vietnamensis</i>

Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide của vùng *ITS* ở mẫu LC7 và các trình tự gen đã công bố trên GenBank dao động từ 91,3% đến 99,0%; hệ số phân ly dao động từ 0,8% đến 9,2%. Như vậy, trình tự nucleotide vùng *ITS* của mẫu LC7 có độ tương đồng với các trình tự vùng *ITS* của *Paris vietnamensis* là 99,0%, với *Paris axialis* là 93,5%, với *Paris undulata* là 93,5%. Mỗi quan hệ di truyền về trình tự nucleotide của vùng *ITS* thể hiện trên sơ đồ hình cây (hình 3).



Hình 3. Sơ đồ hình cây được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS* phân lập từ mẫu Bảy lá một hoa LC7 và các trình tự trên GenBank

Kết quả xây dựng cây phân loại cho thấy, các mẫu so sánh được phân thành hai nhánh lớn. Nhánh thứ nhất gồm bốn giống *Paris dunniana*, *Paris undulate*, *Paris axialis*, *Paris forrestii*. Nhánh thứ hai gồm hai giống LC7 và *Paris vietnamensis*. Khoảng cách giữa hai nhánh chính là 4,2 %. Như vậy, LC7 thu tại Sapa, Lào Cai có quan hệ di truyền gần nhất và cùng loài với *Paris vietnamensis*.

KẾT LUẬN

Vùng *ITS* của mẫu Bảy lá một hoa LC7 thu tại Lào Cai đã được khuếch đại thành công có kích thước 676 bp. Dựa trên trình tự nucleotide của vùng *ITS*, mẫu Bảy lá một hoa LC7 có mối quan hệ gần nhất với loài *Paris vietnamensis*, hệ số tương đồng là 99%.

Bảy lá một hoa LC7 thu tại Sapa, Lào Cai thuộc loài *Paris vietnamensis*.

LỜI CẢM ƠN

Công trình có sự hỗ trợ của đề tài Khoa học Công nghệ cấp Bộ năm 2017 (B2017-TNA-04-QG) trong nhiệm vụ quỹ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học.
2. Đặng Ngọc Thanh, Nguyễn Tiến Bản (2007), *Danh lục đỏ Việt Nam –Vietnam Red List*, Nxb Khoa Học Tự nhiên và Công nghệ.
3. Alvarez I., Wendel J. F. (2003), “Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference”, *Mol. Phylogenet.*, Vol. 29, pp. 417–434.

4. Catherine Offord, "DNA Sequencing: From Tedious to Automatic", *The scientist*, October 1, 2016.
5. Conrad L. Schoch, Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen (2011), "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*) region as a universal DNA barcode marker for Fungi", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, pp. 6241–6246.
6. Doyle J. J. and Doyle J. L. (1987), "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochem. Bull.*, 19, pp.11-15.
7. Ghosh J. S., Bhattacharya S., Pal A. (2017), "Molecular phylogeny of 21 tropical bamboo species reconstructed by integrating non-coding internal transcribed spacer (*ITS*1 and 2) sequences and their consensus secondary structure", *Genetica*, 145(3), pp. 319–333.
8. Song, Jingyuan, Shi Linchun, Li Dezhu, Sun Yongzhen, Niu Yunyun, Chen Zhiduan, Luo Hongmei, Pang Xiaohui, Sun Zhiying (2012), "Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of Internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA", *PLOS ONE*, 7 (8): 43971. doi:10.1371/journal.pone.0043971.
9. Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J. (2010), "Use of *ITS*2 region as the universal DNA barcode for plants and animals", *PLOS ONE* (5), 13102.

SUMMARY

THE CHARACTERISTICS OF *ITS* GENE REGION ISOLATED FROM *PARIS* PLANTS

Vũ Thị Thu Thủy*, Tạ Thị Thu Thương, Chu Hoàng Mau
University of Education - TNU

Methodology molecular classification is established based on the identification of the endemic genes of the taxon and techniques based on DNA analysis method is highly effective in the classification and identification of the species. Currently, the *ITS* region of the genome is considered to be a useful molecular marker for assessing the emergence and genetic relationships of higher plant species. This article presents the results of the use of nucleotide sequences of the *ITS* region to identify the *Paris* sample collected in Lao Cai. The *ITS* region from the *Paris* LC7 collected in Sapa, Lao Cai successfully amplified and is 676 bp in length and the *Paris* plants in Lao Cai is closely related to *Paris vietnamensis*, with a similarity of 99%. Sample *Paris* LC7 collected in Sapa, Lao Cai is *Paris vietnamensis* species.

Keywords: DNA marker , *ITS* region, *Paris*, *Paris vietnamensis*, species identification

Ngày nhận bài: 28/6/2017; Ngày phản biện: 5/7/2017; Ngày duyệt đăng: 31/7/2017

* Tel: 0979 855136, Email: vuthithuthuy@dhsptn.edu.vn