

## ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÙNG GEN ITS-rDNA CỦA LOÀI HOÀNG LIÊN Ô RÔ LÁ DÀY (*Mahonia bealei* (FORTUNE) CARRIÈRE) CỦA VIỆT NAM

Nguyễn Thị Phương Trang<sup>1</sup>, Vũ Thị Huệ<sup>2</sup>, Vũ Thị Dung<sup>2</sup>, Ngô Văn Tùng<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Hồng Liên<sup>2</sup> và Bùi Thu Hà<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

**Tóm tắt.** Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích đặc điểm phân tử vùng gen *ITS-rDNA* của loài Hoàng liên ô rô lá dày. Kết quả cho thấy vùng gen ITS dài 700 bp có chứa 24,1% Timin, 28,4% Guamin, 23,4% Adenin và 24,1% Cistezin, là vùng gen phù hợp để sử dụng trong công tác xác định loài và nghiên cứu mối quan hệ di truyền cho các loài họ Berberidaceae. Sự khác biệt di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* và chi *Berberis* là 2,3%, với các chi khác là 17% đến 22%. Cặp mồi đặc hiệu khuếch đại vùng gen ITS dài 300 bp loài *Mahonia bealei* đã được phát triển và tổng hợp. Trình tự vùng gen ITS-300 của Hoàng liên ô rô lá dày đã được đăng ký lên ngân hàng gen thế giới với mã số MT 008067.

**Từ khóa:** Hoàng liên ô rô lá dày, *ITS*, *Mahonia bealei*.

### 1. Mở đầu

Hoàng liên ô rô lá dày có tên khoa học là *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert thuộc họ Hoàng liên gai (Berberidaceae). Theo Sách đỏ Việt Nam (2007) loài này được xếp vào danh mục (EN - bị đe dọa ở mức độ cao nhất do có số lượng cá thể trong tự nhiên còn rất ít. Hiện nay, các nghiên cứu ở Việt Nam về loài này chủ yếu chỉ tập trung vào mô tả hình thái, đặc điểm sinh học, sinh thái, phân bố, giá trị tài nguyên, nhân giống bằng giâm hom... mà chưa có công trình nào nghiên cứu về đặc điểm phân tử, phát triển mồi khuếch đại vùng gen đặc hiệu phục vụ cho công tác giám định và bảo tồn loài. Trên thế giới, có một số công trình nghiên cứu về dịch chiết thân của *Mahonia bealei* có tác dụng chống ung thư (Mohib U.K. 2019). Năm 2004, Kim Y.D. *et al.* nghiên cứu hệ thống của họ Beberidaceae dựa vào các gen *ndhF*, *rbcL* và *ITS* trong đó chỉ đề cập đến trình tự gen *rbcL* có mã số L75871 của loài *Mahonia bealei* trên GenBank.

Giải mã trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* của loài nghiên cứu nhằm tìm hiểu về đặc điểm phân tử cũng như khả năng phân loại của vùng gen và góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về di truyền cho loài. Dựa trên kết quả đạt được, phát triển cặp mồi đặc hiệu phục vụ cho công tác giám định khi nghiên cứu về dược học y học của loài này khi thu mẫu định loại chưa đủ đặc điểm mang tính bảo thủ như hoa hoặc quả.

---

Ngày nhận bài: 20/2/2021. Ngày sửa bài: 13/3/2021. Ngày nhận đăng: 20/3/2021.

Tác giả liên hệ: Bùi Thu Hà. Địa chỉ e-mail: [thuhabui.plant@gmail.com](mailto:thuhabui.plant@gmail.com)

## 2. Nội dung nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Có 06 mẫu được thu bởi Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật và 17 mẫu sử dụng trên GenBank.

**Bảng 1. Thông tin các mẫu sử dụng trong nghiên cứu**

Stt	Tên loài	Kí hiệu mẫu	Thời gian thu mẫu	Địa điểm
1	<i>Mahonia bealei</i>	SM02	08/03/2018	Hà Giang
2	<i>Mahonia bealei</i>	BLC03	03/11/2011	Bát Xát (Lào Cai)
3	<i>Berberis hypoxantha</i>	B1	03/11/2016	Sa Pa (Lào Cai)
4	<i>Berberis julianae</i>	SB01	06/12/2007	Sa Pa (Lào Cai)
5	<i>Mahonia jingxiensis</i>	C307	2018	Yên Thuận, Hàm Yên, Tuyên Quang
6	<i>Mahonia klossii</i>	DL02	31/07/2017	Langbian, Đà Lạt, Lâm Đồng

**Bảng 2. Danh sách 17 loài lấy dữ liệu từ GenBank dùng để so sánh với 6 mẫu nghiên cứu**

Stt	Tên loài	Mã số Genbank	Stt	Tên loài	Mã số Genbank
1	<i>B. hemsleyana</i>	MH258097.1	10	<i>E. dewuense</i>	MG837288.1
2	<i>B. vulgaris</i>	KX268517.1	11	<i>D. sinensis</i>	KC494674.1
3	<i>B. fortune</i>	MK524268	12	<i>D. cymosa</i>	KC494676.1
4	<i>B. wallichiana</i>	KC575611.1	13	<i>D. difformis</i>	KC494661.1
5	<i>B. poiretii</i>	JF421477.1	14	<i>D. pleiantha</i>	KC494652.1
6	<i>B. julianae</i>	KM580586.1	15	<i>P. peltatum</i>	KC494685.1
7	<i>M. jingxiensis</i>	KU221049.1	16	<i>P. hexandrum</i>	AF328965.1
8	<i>B. bealei</i>	MG730545.1	17	<i>C. agrestis</i>	JF976160.1
9	<i>E. baojingense</i>	MG837277.1			

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp tách chiết DNA tổng số:** lá tươi được bảo quản trong silicagen được sử dụng để tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Doyle (1990) có hiệu chỉnh theo điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam.

**Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR:**

Vùng gen ITS dài 700 bp của cả 6 mẫu nghiên cứu được nhân bản bằng PCR với cặp mồi ITS1/ITS2 (Cheng, 2015).

Thành phần mỗi phản ứng Polymerase Chain Reaction (PCR) có thể tích 25 µl với các thành phần: 7 µl H<sub>2</sub>O deion; 12,5 µl PCR Master mix kit (2X); 1,25 µl mồi xuôi (10 pmol/µl); 1,25 µl mồi ngược (10 pmol/µl); 3 µl DNA (10 – 20 ng). Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 94 °C trong 3 phút; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94 °C trong 45 giây, 55 °C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72 °C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4 °C.

**Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự:** Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại công ti Firstbase (Malaysia). Trình tự DNA sau khi giải trình tự được hiệu chỉnh và loại bỏ các vùng tín hiệu nhiễu của phần mềm Chromas-Pro 2.1.6. Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu Hoàng liên ô rô lá dày (SM02 và BLC03) được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, (sử dụng công cụ BLAST trong NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2. Các vùng nucleotide bị nhiễu hoặc không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích (Hall TA, 1999).

**Xây dựng cây phát sinh chủng loại:** Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp ML (Maximum Likelihood) sử dụng phần mềm Treefinder v.0 (Jobb G., 2011). Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap). Ngoài ra, đánh giá các nút trong cây ML với giá trị bootstrap 75% trở lên. Khoảng cách di truyền ( $P$ ) giữa các loài trong chi được tính toán bằng MEGA 7.0 (Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016).

### 2.3. Kết quả nghiên cứu

#### \* **Kết quả tách chiết DNA tổng số**

Kết quả điện di DNA tổng số của 6 mẫu trên gel agarose 1% cho vạch rõ nét chứng tỏ DNA tổng số ít bị đứt gãy và tương đối sạch. Kết quả đo OD cũng cho thấy chỉ số OD260/OD280 của các mẫu đều từ 1,81 - 1,83 chứng tỏ hàm lượng DNA thu được có độ tinh khiết cao.

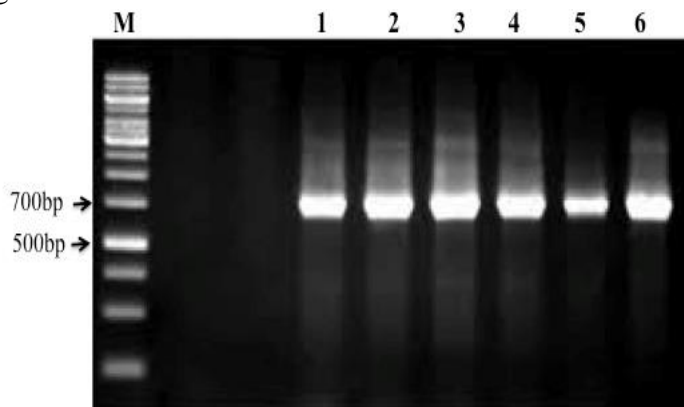
#### \* **Kết quả nhân bản trình tự gen ITS bằng PCR**

Kết quả điện di sản phẩm PCR của cả 6 mẫu đều xuất hiện 1 vạch rõ nét có kích thước khoảng 700 bp (Hình 1), chứng tỏ cặp mồi ITS1/ITS2 nhân bản thành công ở nhiệt độ gán mồi là 55 °C cho cả 6 mẫu nghiên cứu. Sản phẩm PCR sáng đậm, rõ nét, đủ tiêu chuẩn để giải mã trình tự nucleotide trực tiếp (Hình 1).

#### \* **Kết quả phân tích trình tự nucleotide**

Kết quả giải trình tự vùng gen ITS của mẫu hoàng liên ô rô lá dày được kiểm tra tính tương đồng (similarity) với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Thông thường, kết quả BLAST không cho kết luận chính xác về loài, nhưng với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (trên 98%) thì có thể đưa ra gợi ý về những loài gần gũi với mẫu nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, trình tự vùng gen ITS của cả 2 mẫu *M. bealei* SM02 và BLC03 đều giống hệt nhau và đều cho kết quả tương đồng 100% với loài *Berberis bealei* mã số MG730545 (loài của Trung Quốc), điều này chứng tỏ mẫu nghiên cứu là loài *Berberis bealei* và kết quả PCR đã nhân bản chính xác vùng gen ITS.

Kết quả so sánh vùng gen ITS của 4 mẫu nghiên cứu còn lại trên Genbank cũng đều cho thấy sự gần gũi với các loài trong chi *Berberis*, cụ thể mẫu DL02 (*M. klossii*) gần gũi 93% với loài *Berberis bealei* (mã số MG730545), mẫu C307 (*M. jingxiensis*) gần gũi 97% với loài *Berberis dictyophylla* (mã số X83829.1), mẫu SB01 (*B. julianae*) gần gũi 97,27% với loài *Berberis hemsleyana* (mã số KY 624390), và mẫu B1 (*B. hypoxantha*) gần gũi 97,89% với loài *Berberis bealei* (mã số MG730545). Điều đó cho thấy chúng tôi đã khuếch đại thành công vùng gen ITS cho tất cả 6 mẫu nghiên cứu.



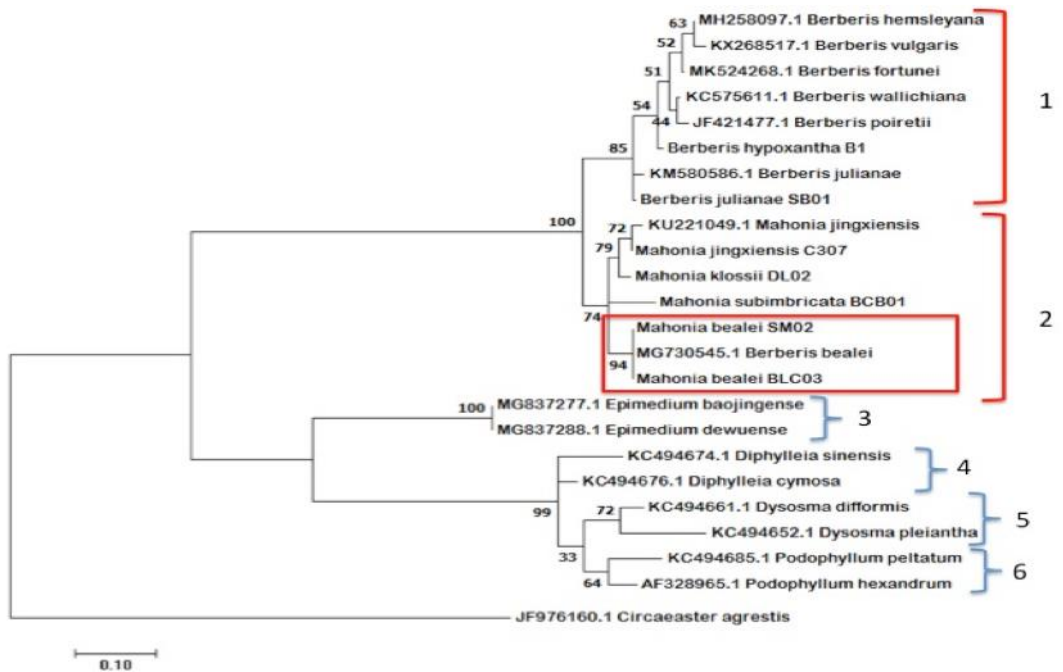
**Hình 1. Sản phẩm PCR 6 mẫu nghiên cứu khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%**  
(M: Marker phân tử DNA 1kb ladder, Lane 1-6: thứ tự các mẫu nghiên cứu lần lượt là SM02, BLC03, B1, SB01, C307, DL02)

Kết quả kiểm tra trình tự nucleotide vùng gen ITS dài 700 bp của loài *Mahonia bealei* cho thấy tỷ lệ phần trăm các nucleotide T, G, A, C lần lượt là 24,1%, 28,4%, 23,4% và 24,1%. Trong đó, có 59 vị trí biến đổi (Variable) với 27 vị trí Nucleotide có giá trị mang thông tin (Parsimony informative).

**\* Khoảng cách di truyền và vị trí phân loại của loài *Mahonia bealei***

Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu SM02 và BLC03 sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống thì được sử dụng cho phân tích so sánh với 20 loài khác của họ Berberidaceae, trong đó có 17 loài lấy dữ liệu trên Genbank (GB).

Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 23 loài trong họ Berberidaceae được xây dựng theo cả 2 phương pháp ML và BI chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau. Theo đó 23 loài nghiên cứu chia thành 2 nhánh chính lớn, nhánh chính lớn 1 gồm các loài của chi *Berberis* và chi *Mahonia*, nhánh chính lớn 2 gồm các loài của chi *Epimedium*, chi *Diphylleia*, chi *Dysosma* và chi *Podophyllum*. Trong đó nhánh chính lớn 1 chia thành 2 nhánh phụ gồm nhánh phụ số 1 là các loài thuộc chi *Berberis* và nhánh phụ số 2 là các loài thuộc chi *Mahonia* (Hình 2).



**Hình 2. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 6 mẫu nghiên cứu với 17 loài**

(lấy dữ liệu trên Genbank) trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen nhân (ITS-rDNA) bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML). Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. Loài tinh diệp thảo *Circaeaster agrestis* được sử dụng làm loài ngoài nhóm (outgroup)

Nhánh chính lớn 2 chia thành 4 nhánh phụ nhỏ hơn tương ứng với các chi khác nhau (nhánh phụ số 3, 4, 5, 6) (Hình 2). Điều đó cho thấy 2 chi *Berberis* và *Mahonia* là 2 chi có quan hệ rất gần gũi với nhau, cụ thể khoảng cách di truyền trung bình của 2 chi này là 0,0236 ( $\approx 2,3\%$ ) (tính trung bình trên 7 mẫu *Mahonia* và 8 mẫu *Berberis* nghiên cứu), trong khi đó khoảng cách di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* với *Dysosma* lên đến 0,223 ( $\approx 22,3\%$ ), với chi *Epimedium* là 0,198 ( $\approx 19,8\%$ ) và với chi *Podophyllum* là 0,214 ( $\approx 21,4\%$ ) (Hình 3).

Trình tự vùng gen ITS dài 700 bp của loài Hoàng liên ô rô lá dày sau khi được so sánh với trình tự gen ITS của 22 loài khác đã phát hiện ra 1 đoạn trình tự dài khoảng 300 nucleotide (Nu)

nằm giữa vùng Spacer và vùng 26S có chứa đến 35 vị trí biến đổi (Variable), trong đó có 19 vị trí Nucleotide có giá trị mang thông tin (Parsimony informative) (Hình 4). Điều này gợi ý cho chúng tôi có thể xác định được 1 vùng ITS đặc hiệu cho loài *M. bealei*.

Hình 3. Bảng khoảng cách di truyền giữa 24 mẫu nghiên cứu

\* Thiết kế cặp mồi khuếch đại đặc hiệu vùng gen ITS-300 cho loài *Mahonia bealei*

Hình 4. Bảng tổng hợp các vị trí Nu biến đổi trong đoạn 300 Nu của vùng gen ITS

Chúng tôi đã tiến hành thiết kế cặp mồi theo nguyên tắc mồi xuôi có trình tự cùng trình tự với mạch gốc DNA, trong đó 2/3 trình tự mồi nằm trong vùng bảo thủ, 1/3 trình tự mồi nằm trong vùng siêu biến đổi (là vùng ITS dài 300 bp); mồi ngược có trình tự bổ sung với mạch DNA gốc, có 2/3 đoạn trình tự nằm trong vùng bảo thủ bao 2 đầu của đoạn gen chứa nhiều vị trí biến đổi và 1/3 đoạn trình tự nằm trong vùng siêu biến đổi (Hình 5). Hai đầu mỗi mồi đều có chứa G, C đảm bảo độ bắt cặp chắc chắn cho mồi trong quá trình khuếch đại gen bằng PCR. Mỗi mồi (xuôi và ngược) gồm 21 nucleotide, trong đó có 10 G-C (chiếm 48%) và 11 A-T (chiếm 52%).



**Hình 5. Sơ đồ đoạn môi thiết kế để khuếch đại vùng chứa nhiều vị trí biến đổi dài 300bp của gen ITS**

Trình tự môi thiết kế như sau (kí hiệu môi ITS-300):

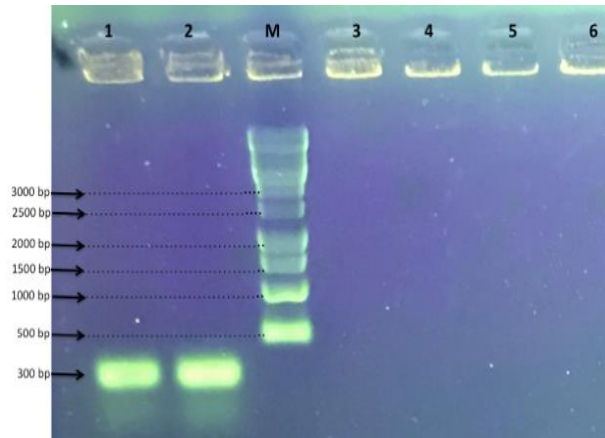
Môi xuôi (F): F: 5'- GCA-ATT-CAC-ACC-AAG-TAT-CGC-3'

Môi ngược (R): R: 5'- GCG-ATA-CTT-GGT-GTG-AAT-TGC-3'

Nhiệt độ bắt cặp  $T_m$  được tính theo công thức  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ , theo đó nhiệt độ bắt cặp lý thuyết của cả 2 môi xuôi và môi ngược đều là 62 °C.

Cặp môi sau đó đã được kiểm tra bằng PCR cho 2 mẫu nghiên cứu SM02, BLC03, và 4 mẫu đối chứng gồm B1, SB01, C307, DL02. Phản ứng trùng hợp (PCR) khuếch đại gen ITS-300 được thực hiện với 35 chu kì, bắt cặp ở 58 °C trong 30 giây.

Kết quả PCR sau đó được kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy 2 mẫu *Mahonia bealei* (SM02 và BLC03) đều cho 1 vạch sắc nét có kích thước  $\approx$  300bp, trong khi 4 mẫu đối chứng đều không có vạch (Hình 6). Điều đó cho thấy khả năng cặp môi ITS-300 là đặc hiệu cao cho loài *Mahonia bealei*. Sản phẩm PCR này sau đó đã được đọc trình tự và kết quả so sánh trên BLAST cho thấy đây đúng là đoạn gen ITS của loài *Mahonia bealei*. Trình tự đoạn gen ITS-300 này của loài *Mahonia bealei* đã được chúng tôi đăng ký lên ngân hàng gen và đã được cấp mã số là MT 008067.



**Hình 6. Kết quả PCR kiểm tra tính đặc hiệu của môi ITS-300 trên 6 mẫu nghiên cứu**  
Lane 1, 2: mẫu SM02, BLC 03, M: DNA 1 kb ladder,  
Lane 3, 4, 5, 6 lần lượt là các mẫu B1, SB01, DL02, C307

### 3. Kết luận

Đặc điểm vùng gen nhân (ITS-rDNA) của loài *Mahonia bealei* dài 700 bp có tỉ lệ phần trăm các nucleotide T, G, A, C lần lượt là 24,1%, 28,4%, 23,4 % và 24,1%. Trong đó, có 59 vị trí biến đổi (Variable) với 27 vị trí Nucleotide có giá trị mang thông tin (Parsimony informative).

Trình tự vùng gen ITS-300 của loài *Mahonia bealei* của Việt Nam đã được đăng kí trên ngân hàng gen thế giới với mã số là MT 008067.

Khoảng cách di truyền trung bình của 2 chi *Berberis* và *Mahonia* là 0,0236 ( $\approx 2,3\%$ ) (tính trung bình trên 7 mẫu *Mahonia* và 8 mẫu *Berberis* nghiên cứu), khoảng cách di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* với *Dysosma* là 0,223 ( $\approx 22,3\%$ ), với chi *Epimedium* là 0,198 ( $\approx 19,8\%$ ) và với chi *Podophyllum* là 0,214 ( $\approx 21,4\%$ ).

Đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu nhân bản vùng gen ITS-300 với trình tự mồi: Mồi xuôi (F): 5'-GCA-ATT-CAC-ACC-AAG-TAT-CGC-3'; Mồi ngược (R): R: 5'-GCG-ATA-CTT-GGT-GTG-AAT-TGC-3'; Nhiệt độ bắt cặp của cả 2 mồi xuôi và mồi ngược là 62°C.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] *Sách Đỏ Việt Nam*, phần Thực vật, 2007. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, tr. 131-132.
- [2] Mohib UK *et al.*, 2019. Phytochemistry and medicinal values of *Mahonia belei*: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(10), pp. 2219-2227.
- [3] Young-Dong Kim *et al.* 2004. Phylogeny of Berberidaceae based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, pp. 291-301.
- [4] Doyle JJ and Doyle JL, 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*, 12, p.13-15.
- [5] Cheng T. *et al.* 2015. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), pp.138-149.
- [6] Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.
- [7] Hall TA, 1999. BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95-98
- [8] Jobb G., 2011. Treefinder version March 2011. <http://www.treefinder.de>.
- [9] Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular Biology and Evolution*.

## ABSTRACT

### Molecular characteristics of ITS-rDNA region of *Mahonia belei* (Fortune) Carrière in Vietnam

Nguyen Thi Phuong Trang<sup>1</sup>, Vu Thi Hue<sup>2</sup>, Vu Thi Dung<sup>2</sup>, Ngo Van Tung<sup>2</sup>,  
Nguyen Thi Hong Lien<sup>2</sup> and Bui Thu Ha<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Faculty of Biology, Hanoi National University of Education*

In this research, we study on molecular characteristics of ITS-rDNA region of *Mahonia belei*. The gotten result showed that, the ITS with 700 bp in length contained 24.1% Timin, 28.4% Guamin, 23.4% Adenin and 24.1% Cistezin. The average genetic difference between *Mahonia* genus and *Berberis* genus is 2,3% while with other genera is from 17% to 22%. The gotten result also demonstrated this ITS region can be useful and suitable for identification and study phylogenetic of Berberidaceae. Specific primer to amplify the ITS genome in the length of 300 bp of *Mahonia belei* species also have been developed and synthesized. This ITS-300 genome sequence of *Mahonia belei* was registered on the Gene Bank with accession number as MT 008067.

**Keywords:** *Mahonia belei*, ITS (Internal Transcribed Spacer), conservation, Berberidaceae.