

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA SÁU MẪU GIỐNG/ LOÀI NGHỆ (*CURCUMA LONGA*) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG DỰA VÀO HÌNH THÁI VÀ DẤU PHÂN TỬ ITS

THIỀU VĂN ĐƯỜNG¹, ĐỖ VĂN MÃI³, NGUYỄN THÚY NGÂN¹,
 TRƯƠNG TRỌNG NGÔN^{2*}

Tóm tắt

Nghệ (*Curcuma longa*) là loại cây quý thường được dùng làm thuốc trong y học và cũng được chế biến nhiều dạng khác nhau dùng làm gia vị trong bữa ăn. Nghệ có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới Tamil Nadu, đông nam Ấn Độ. Theo các nghiên cứu trước đây cho thấy Nghệ có hai giống chủ yếu. Vì vậy xác định đặc điểm di truyền của các mẫu giống/loài là bước đầu quan trọng trong việc đánh giá đa dạng di truyền. Mục tiêu của nghiên cứu này bước đầu đánh giá được đặc điểm di truyền của 6 mẫu nghệ thu thập ở các tỉnh vùng đồng bằng sông Cửu Long dựa vào đặc điểm hình thái và dấu phân tử ITS. Trên cơ sở dữ liệu đó xác định được mối quan hệ di truyền giữa chúng bằng cách thiết lập cây phả hệ dựa trên dấu phân tử DNA-ITS từ đó giúp định hướng chiến lược khai thác và nhân trồng chúng một cách hiệu quả.

Từ khóa: Nghệ, dấu ITS, cây phả hệ

Abstract

Turmeric (*Curcuma longa*) is a valuable plant that is used not only for medicinal purposes but also for processing like spices for meal. This species is origin from tropical region, Tamil Nadu, southeastern India. It is now widely grown in the Mekong Delta provinces. According to previous studies, there are two kinds of turmeric, so identifying genetic characteristics of samples for species is an important first step in evaluating genetic relationship. The objective of this study was to primary evaluate the agronomic and genetic characteristics of some samples Curmuric longa collected in six provinces in the Mekong Delta based on morphological and molecular marker of ITS. From these database, the genetic relationship was determined based on ITS marker, then an appropriate strategy will be proposed for exploiting and propagating them more effectively.

Keywords: ITS marker, Phylogenetic tree, Curmuric longa

1. Dẫn nhập

Nghệ (*Curcuma longa* L.), còn có tên gọi

là Khương hoàng, Uất kim, thuộc họ Gừng. Chúng thuộc nhóm thân thảo lâu năm, bộ phận sử dụng chính là củ (thân ngầm). Củ nghệ thường có màu vàng cam, chứa chất Curcumin là chính, có vị hơi cay nóng, hơi đắng, có chút mùi mù tạc và mang “mùi hương của đất” một cách khác biệt, được sử dụng làm dược liệu

¹Trường Đại học Tây Đô

²Trường Đại học Cần Thơ

³Trường Đại học Nam Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Trọng Ngôn (Email: ttngon@ctu.edu.vn)

[1, 2]. Ngoài ra, nghệ còn được dùng như gia vị trong ẩm thực, cũng như được dùng làm nguyên liệu làm mỹ phẩm. Hiện nay trong nhân gian có hai giống nghệ thường được trồng là giống nghệ vàng và nghệ đỏ. Hầu hết các gen với bản sao đơn (single-copy genes) nằm trong nhân của bộ gen, cùng các đoạn “introns”, đều không được xem như các ứng viên mã vạch (barcode candidates) do hiện nay thiếu các cặp môi phổ biến (universal primers) dùng để khuếch đại [3].

Tuy nhiên, ngoại trừ vùng 5.8S, còn có vùng ITS (the internal transcribed spacer) của DNA nằm ở nhân ribosome được xem là có tiềm năng sử dụng làm mã vạch [3, 4]. Các nghiên cứu nghiên cứu chuyên sâu trước đây thường tập trung vào các gen và các introns nằm ở bộ gen lục lạp (chloroplast genome). Ngoài ra, vùng ITS2 là một phần của DNA trong nhân ở sinh vật nhân chuẩn (eukaryote), đó là vùng của hai tiểu đơn vị (5.8S) và (28S), qua đó giúp cho việc thực hiện phân tích mối quan hệ di truyền hay các phân tích phá hệ (phylogenetic analyses), và xếp nhóm ở mức loài (classification at the species level) bằng cách khuếch đại vùng DNA tại các điểm có mức bảo tồn cao (highly conserved sites [5, 6].

Phạm vi nghiên cứu đề tài tập trung chủ yếu là các mẫu giống/loài nghệ vàng. Cho đến nay hầu như các công trình nghiên cứu về giống/loài nghệ này chưa được chú trọng nhiều cũng như chưa thành hệ thống. Nhằm đáp ứng nhu cầu thực tiễn việc nghiên cứu đặc điểm di truyền của các mẫu giống/loài nghệ dựa vào đặc điểm nông học và dấu phân tử ITS đã được thực hiện qua việc thu thập sáu mẫu giống/loài ở các tỉnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Thông qua đó giúp xác định mối quan hệ di truyền giữa chúng với nhau, từ đó có một chiến lược phù hợp nhằm nhân giống, bảo tồn và khai thác nguồn cây dược liệu quý này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và kiểu bố trí

Sáu mẫu giống/loài nghệ trồng tại các tỉnh như Cà Mau, Cần Thơ, Đồng Tháp, Kiên Giang, Tiền Giang, và Vĩnh Long, đã được thu thập. Tại mỗi địa điểm tiến hành thu củ nghệ tiêu biểu có trọng lượng tương đương nhau khoảng 200-250g, Vị trí thu mẫu qua sáu tỉnh và thành phố được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ký hiệu và vị trí thu sáu mẫu giống/loài nghệ tại đồng bằng sông Cửu Long

Ký hiệu	Địa điểm thu	Kinh độ	Vĩ độ
Ngh1	Cà Mau	105°08'43" Đ	9°10'02" N
Ngh2	Cần Thơ	105°39'60" Đ	10°06'24" N
Ngh3	Đồng Tháp	106°06'47" Đ	10°18'52" N
Ngh4	Kiên Giang	105°06'12" Đ	9°59'30" N
Ngh5	Tiền Giang	106°06'47" Đ	10°18'52" N
Ngh6	Vĩnh Long	105°53'24" Đ	10°19'10" N

Các mẫu củ giống nghệ sau khi mang được trồng trong nhà lưới trồng cây dược liệu

thuộc trường đại học Tây Đô, Cần Thơ. Các củ giống được ngâm trong chậu và được bố

trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại. Mỗi lặp lại có 4 chậu, tổng cộng có 96 chậu quan sát.

Kích thước chậu có đường kính 35cm, chiều cao chậu 30,5cm, có hình trụ tròn. Đất trồng được sử dụng là loại đất sạch giàu dinh dưỡng TRiBAT do công ty TNHH Công nghệ Sinh học Sài Gòn xanh sản xuất.

Đất được pha trộn với tỷ lệ 2/3 đất sạch TRiBAT với 1/3 tro trấu và được trộn đều trước khi cho vào chậu để trồng. Thời gian được thực hiện từ tháng 01/2020 đến tháng 06/2021. Các chỉ tiêu nông học được đo đếm trên 16 cây ở độ tuổi tương đối đồng đều của mỗi cây.

2.2. Phương pháp hình thái

Phương pháp quan sát và mô tả hình thái bên ngoài được thực hiện dựa theo phương pháp nghiên cứu thực vật của Nguyễn Nghĩa Thìn (2006) [7] có cải tiến. Các bộ phận mô tả bao gồm: thân, lá, rễ. Phương pháp đo đếm được tiến hành như sau:

- Chiều cao thân (cm): tiến hành đo hết phần thân trên trên mặt đất, đo từ mặt đất đến cuối chồi ngọn, phương pháp được trình bày ở Hình 1 bên dưới; trong khi đó lá: tiến hành đo hai chỉ số là chiều dài lá từ cuống lá đến chót lá; và chiều rộng phần phiến lá lớn nhất (Hình 2A và 2B). Riêng rễ: đo từ phần dưới mặt đất (miền trường thành) đến chóp rễ.

2.3. Phương pháp phân tử

Các mẫu lá non và tươi được thu và trữ lạnh ở -20°C. Việc tách chiết ADN được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ. ADN toàn phần của các mẫu giống/loài nghệ được ly trích từ các mẫu lá tươi theo quy trình tách chiết bằng phương pháp CTAB có cải tiến (Doyle and Doyle, 1990) [8]. Sau khi tinh sạch việc

kiểm tra chất lượng ADN bằng điện di trên gel agarose 1%; sau khi điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm redsafe (Biobasic, UK). Khuếch đại PCR được thực hiện với cặp mồi và giải trình tự vùng ITS (White *et al.*, 1990) [9], trình tự của cặp mồi như sau:

ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCGCGG-3' và

ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Phản ứng PCR bao gồm 35 chu kỳ gia nhiệt, giai đoạn biến tính với 5 phút ở 95°C, 60 giây ở 95°C, thời gian bắt cặp là 50 giây ở 54°C, thời gian kéo dài là 90 giây ở 72°C, kéo dài chuỗi trong 5 phút ở 72°C, và sản phẩm được trữ ở 10°C trong 20 phút. Điện di sản phẩm PCR rồi tinh chế bằng bộ kit Wizard SV gel và PCR Clean-up System (Promega).

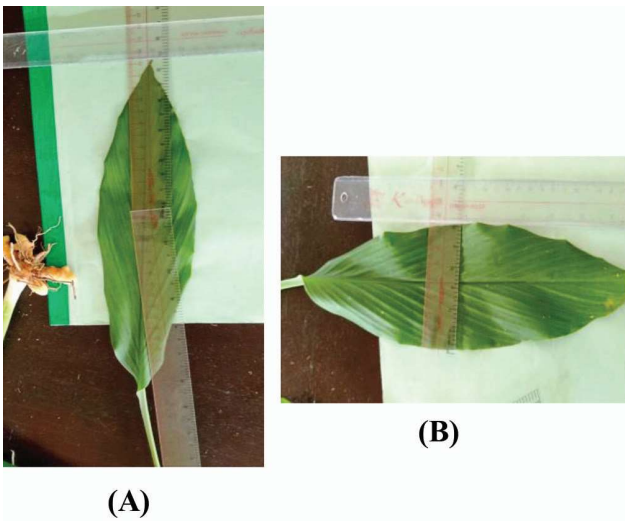
2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu hình thái đều được tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (Standard deviation-SD) bằng phần mềm Microsoft Excell 10.0. Trọng lượng phân tử được tính toán bằng phần mềm Gel Analyzer. Kết quả giải trình tự đoạn ITS được lưu trữ dạng FASTA và phân tích bằng phần mềm BioEdit ver. 7.0.5. Sau đó so sánh bằng phương pháp BLAST trên hệ thống ngân hàng gen NCBI (National Center for Biotechnology Information) dùng cho việc xác định loài.

Để xác định mối quan hệ di truyền giữa bảy mẫu giống/loài nghệ tiến hành xây dựng giản đồ cây phả hệ bằng phần mềm Mega X với phương pháp Maximum likelihood, mô hình Kimura 2 thông số, chỉ số bootstrap là 1000 lần. Các trình tự ITS của bảy mẫu giống nghệ sử dụng để xây dựng giản đồ phả hệ đều được canh hàng (alignment) bằng phần mềm *BioEdit* và loại bỏ một số trình tự bị nhiễu ở hai đầu của mỗi trình tự.



Hình 1. Đo chiều cao thân (cm).



Hình 2. Đo chiều dài (A) và chiều rộng lá (B) (cm)

3. Kết quả

3.1. Đặc tính nông học

Các đặc tính nông học của sáu mẫu giống/loài nghệ thu được sáu tỉnh thuộc vùng đồng bằng sông Cửu Long được trình bày ở Bảng 2.

- Chiều cao thân dao động từ 44cm (mẫu Đồng Tháp) đến 82,64cm (Cà Mau), kết quả này phù hợp với các kết quả đã công bố trước đây (*Từ điển Bách Khoa Dược học*) [10].

- Chiều dài trung bình lá là 27,97cm (mẫu Cần Thơ) đến 46,61cm (Tiền Giang), qua đó cho thấy kết quả này phù hợp với các kết quả đã công bố trước đây dao động 28,2-81,9cm (*Từ điển Bách Khoa Dược học*). Trong khi đó chiều rộng lá biến thiên từ 6,33cm (mẫu Cần Thơ) đến 9,38cm (mẫu Vĩnh Long), kết quả này cho thấy tương đương với kết quả đã công bố trung bình 8,5cm (*Từ điển Bách Khoa Dược học*) [10].

- Chiều dài rễ biến thiên từ 3,60cm (mẫu Cà Mau) đến 21,9cm (mẫu Đồng Tháp). Chưa tìm thấy kết quả này công bố trong *Từ điển Bách Khoa Dược học* [10].

Bảng 2. Đặc tính nông học của sáu mẫu giống/loài nghệ (đơn vị: cm)

Địa điểm	Chiều cao thân	Chiều dài lá	Chiều rộng lá	Chiều dài rễ
1. Cà Mau	82,64 ± 12,57	44,96 ± 8,91	7,34 ± 1,34	3,60 ± 3,32
2. Cần Thơ	61,31 ± 21,79	27,97 ± 14,49	6,33 ± 0,81	5,42 ± 1,42
3. Đồng Tháp	44,00 ± 7,96	29,50 ± 14,85	7,40 ± 3,18	21,90 ± 20,43
4. Kiên Giang	76,30 ± 45,19	30,50 ± 7,81	8,90 ± 2,52	21,75 ± 15,42
5. Tiền Giang	82,05 ± 15,38	46,61 ± 12,36	7,34 ± 1,51	6,85 ± 1,89
6. Vĩnh Long	45,2 ± 9,40	31,50 ± 5,44	9,38 ± 1,04	14,00 ± 7,94

3.2. So sánh trình tự tương đồng

Kết quả so sánh trình tự ITS với ngân hàng NCBI được trình bày ở Bảng 3. Đa số các trình tự của sáu mẫu giống/loài nghệ đều cho giá trị tương đồng cao, thấp nhất 85,57% (Cần Thơ) và cao nhất 100% (mẫu

Tiền Giang và Vĩnh Long). Các kết quả này cho thấy các mẫu giống/loài nghệ đều tương đồng cao với loài *Curcuma longa*, kết quả cũng phù hợp với các kết quả đã được công bố trước đây (Đỗ Tất Lợi, 2006 [11]; Võ Văn chi, 2009 [12]).

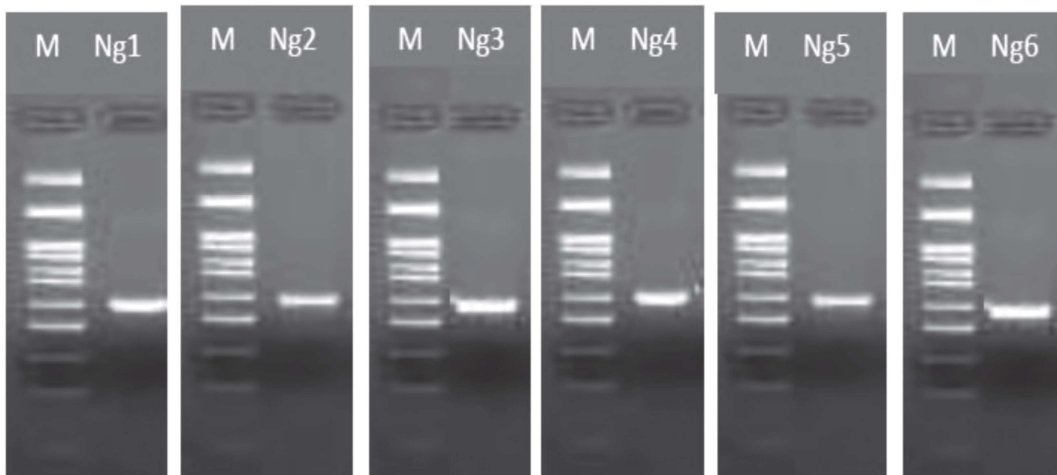
Bảng 3. Giá trị tương đồng của 6 mẫu giống/loài nghệ so sánh trình tự ITS trên ngân hàng NCBI.

Giống/loài	Địa điểm	Ngân hàng NCBI	Giá trị tương đồng	Tác giả
Ng1	1. Cà Mau	<i>Curcuma longa isolate CL9 clone 2 18S, internal transcribed spacer 1</i>	89,60%	Duan,Z., Song, W. and Ye, M., 2017
Ng2	2. Cần Thơ	<i>Curcuma longa isolate CL9 clone 2 18S, internal transcribed spacer 1</i>	85,57%	Duan,Z., Song, W. and Ye, M., 2017
Ng3	3. Đồng Tháp	<i>Curcuma longa isolate CL2 clone 3</i> 18S, internal transcribed spacer 1, tương đồng 88,57%	88,57%	Duan,Z., Song, W. and Ye, M., 2017
Ng4	4. Kiên Giang	<i>Curcuma longa isolate CL9 clone 2</i> 18S, internal transcribed spacer 1,	85,87%	Duan,Z., Song, W. and Ye, M., 2017
Ng5	5. Tiền Giang	<i>Curcuma longa isolate CL4 clone 2 18S</i>	100%	Duan,Z., Song, W. and Ye, M., 2017
Ng6	6. Vĩnh Long	<i>Curcuma longa isolate 45.9 clone 5 internal transcribed spacer 1</i>	100%	Vinitha, M. R., Suresh Kumar, U., Sabu, M. and George, T., 2016

3.3. Kết quả trình tự đoạn ITS và mối quan hệ di truyền

Các sản phẩm PCR cho đoạn ITS của sáu

mẫu giống/loài nghệ đều cho băng khuếch đại ở vị trí khoảng 700bp, kết quả được trình bày ở Hình 4, các kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước đây.



Hình 3. Sản phẩm PCR của sáu mẫu giống/loài nghệ được thu ở các tỉnh ĐBSCL

Ghi chú: M: Ladder 1000bp, Ngh1-Ngh6: các mẫu thu thập ở 6 tỉnh ĐBSCL

3.4. Mối quan hệ di truyền giữa sáu mẫu giống/loài nghệ

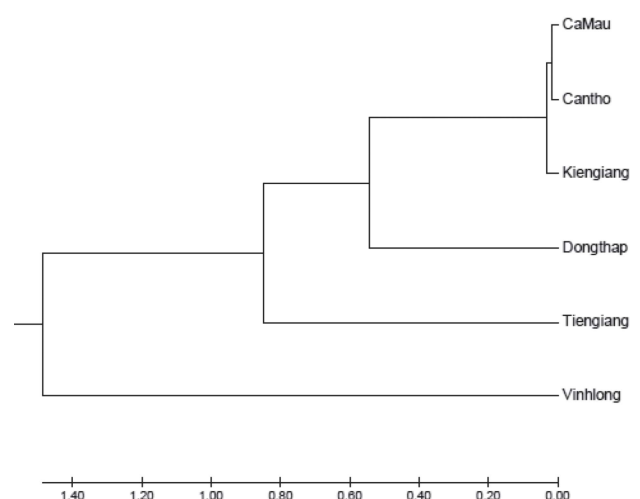
Mối quan hệ di truyền của sáu mẫu giống/loài nghệ dựa trên trình tự ITS được trình bày ở Hình 4. Kết quả cho thấy sáu mẫu giống/loài nghệ có thể được xếp làm 3 nhóm lớn. Nhóm I bao gồm ba loài, trong đó Cà Mau (Ng1), Cần Thơ (Ng2) và Kiên Giang (Ng4) gần nhau về mặt di truyền; có chỉ số giống nhau. Trong khi đó nhóm II, nhóm III và nhóm IV mỗi nhóm chỉ có 1 mẫu cụ thể Đồng Tháp (Ng3), Tiền Giang (Ng5) và Vĩnh Long (Ng6). Tuy về mặt sinh thái giữa các tỉnh có khác nhau trong đó các tỉnh thuộc vùng nước ngọt như Cần Thơ, Đồng Tháp, Tiền Giang và Vĩnh Long còn lại các tỉnh như Kiên Giang và Cà Mau, thuộc sinh thái nước mặn và lợ, nhưng các loài có thể giống nhau có thể do việc trồng của người dân đem từ vùng này qua vùng khác một cách ngẫu nhiên.

4. Kết luận và đề xuất

Qua sơ khởi việc khảo sát các đặc tính nông học của sáu mẫu giống/loài nghệ tuy có khác biệt giữa các vùng chủ yếu là do điều kiện sinh thái bao gồm đất, thời tiết và kỹ thuật chăm sóc khác nhau. Với việc giải trình tự ITS, tên

bảy mẫu giống/loài nghệ bước đầu cho thấy trùng với loài *Curcuma longa* L.

Do đây là những kết quả bước đầu, vì vậy việc xác định mối quan hệ di truyền cũng như tên loài nên được thực hiện thêm nhiều nơi trong một địa điểm cũng như cần khảo sát thêm trình tự gen chuyên biệt khác liên quan đến đặc điểm hình thái cũng như sinh hóa như hàm lượng các chất có trong lá và củ nhằm có kết luận tương đối chính xác hơn.



Hình 4. Mối quan hệ di truyền của sáu mẫu giống/loài nghệ dựa trên trình tự ITS, với bootstrap 1000.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, *et al.* (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1889–1895.
- [2]. Võ Văn Chi, 2009. Bài thuốc hay từ cây thuốc quý. Nhà xuất bản Y học. Trang 216-217.
- [3]. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369–8374
- [4]. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, *et al.* (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1889–1895.
- [5]. Feng, S., Jiang, M., Shi, Y., Jiao, K., Shen, C., Lu, J., 2016. Application of the Ribosomal DNA ITS2 Region of *Physalis* (Solanaceae): DNA Barcoding and Phylogenetic Study. *Front. Plant Sci.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01047>.
- [6]. Arif, I.A., Khan, H.A., Bahkali, A.H., Al Homaidan, A.A., Al Farhan, A.H., Al Sadoon, M., Shobrak, M., 2011. DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi J. Biological Sci.* 18, 219–225.
- [7]. Nguyễn Nghĩa Thìn, 2006. Các phương pháp nghiên cứu thực vật. Nxb. Giáo Dục.
- [8]. Doyle, J.J. and Doyle J.L., 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focu*, 12 (6), 13-15.
- [9]. White T.J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols a guide to methods and applications*, 315–322. Academic Press, San Diego.
- [10]. Tự điển Bách khoa Dược học, 2016.
- [11]. Đỗ Tất Lợi (2006), Những cây thuốc và Vị thuốc Việt Nam, Nxb. Y học, Trang 708-709.
- [12]. Võ Văn Chi (2009), Bài thuốc hay từ cây thuốc quý, Nhà xuất bản Y học, Trang 216-217.

Ngày nhận bài: 03/02/2023

Ngày gửi phản biện: 23/02/2023

Ngày duyệt đăng: 18/03/2023