

## XÁC ĐỊNH MÃ VẠCH DNA, THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN TỪ CAO CHIẾT ETHANOL CỦA PHÂN LOÀI *JASMINUM ANNAMENSE* SUBSP. *ANNAMENSE* (HỌ OLEACEAE)

ĐÀM SAO MAI<sup>1</sup>, NGUYỄN THỊ QUỲNH HOA<sup>2</sup>, LÊ VĂN SƠN<sup>3</sup>, NGUYỄN VĂN DŨNG<sup>2</sup>,  
VĂN HỒNG THIÊN<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Phòng quản lý khoa học và hợp tác quốc tế, Trường Đại học Công Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh,

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh,

<sup>3</sup>Khu Bảo tồn Thiên nhiên Bình Châu-Phước Bửu, xã Bung Riềng, huyện Xuyên Mộc, tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu  
vanhongthien@iuh.edu.vn

**Tóm tắt.** *Jasminum annamense* subsp. *annamense* là một phân loài hiếm trong họ Nhài (Oleaceae Hoffmanns. & Link). Nghiên cứu này lần đầu tiên khuếch đại và giải trình tự thành công vùng trình tự ITS, qua đó đã xác định được vị trí phân loại cũng như so sánh sự khác biệt trong đặc điểm di truyền giữa phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* vốn có đặc điểm hình thái tương tự và rất khó phân biệt. Bằng phương pháp phân tích sắc ký ghép khối phổ (LC/MS), nghiên cứu này đã xác định được có 7 hợp chất hóa học trong cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* gồm:  $\beta$ -D-xylose, jasmolactone A, jasmolactone B, jasmolactone C, heptacosane, (Z)-8-dehydromelissic acid và 10-hydroxyloeuropin. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng cho thấy, cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* cho khả năng kháng lại 2 chủng vi khuẩn gây bệnh là *Bacillus cereus* và *Salmonella typhimurium*.

**Từ Khóa.** *Jasminum*, vùng trình tự ITS, LC/MS, cao chiết ethanol, kháng khuẩn.

## IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCES, CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES FROM ETHANOL EXTRACTS OF *JASMINUM ANNAMENSE* SUBSP. *ANNAMENSE* (OLEACEAE)

**Abstract.** *Jasminum annamense* subsp. *annamense* is a rare subspecies belonging Oleaceae family. Based on Molecular biology techniques, the ITS region of *Jasminum annamense* subsp. *annamense* was first successfully amplified and sequenced. The results also showed the differences in ITS sequence between *J. annamense* subsp. *annamense* and *J. annamense* subsp. *glabrescens* which are similar morphological characteristics. Furthermore, the present study found 7 compounds in ethanol extracts of leaf and stem of *J. annamense* subsp. *annamense* by using Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) analysis, including  $\beta$ -D-xylose, jasmolactone A, jasmolactone B, jasmolactone C, heptacosane, (Z)-8-dehydromelissic acid and 10-hydroxyloeuropin. Moreover, the results showed that ethanol extracts could inhibit the growth of 2 tested microorganisms, such as *Bacillus cereus* và *Salmonella typhimurium*.

**Keyword.** *Jasminum*, ITS region, LC/MS, ethanol extracts, antibacterial activities.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Jasminum* L. là một chi có chứa dược tính thuộc họ Nhài (Oleaceae Hoffmanns. & Link), được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền ở các nước như Trung Quốc, Ấn Độ, Campuchia và Việt Nam [1]. Dịch chiết từ lá, thân, rễ của một số loài trong chi có công dụng chữa bệnh xương khớp, nhiễm trùng, tiêu hóa, làm lành vết thương, hạ sốt, ... [2]. Hiện nay, trên thế giới, chi *Jasminum* có khoảng 200 loài, phân bố chủ yếu ở châu Phi, châu Á, châu Úc và một loài ở vùng Địa Trung Hải [3]. Trong nghiên cứu gần đây của Bùi Hồng Quang (2016) [1] và một số tác giả khác đã ghi nhận ở Việt Nam, chi *Jasminum* có 37 loài, 6 phân loài và 1 thứ, trong đó nhiều loài có giá trị kinh tế và khoa học [3-5]; trong đó có 5 loài là đặc hữu Việt Nam bao gồm: *J. alongence*, *J. laxiflorum*, *J. pedunculatum*, *J. eberhardtii* và *J. vietnamese* đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng do nạn chặt phá rừng, tình hình đô thị hóa, khai thác vì mục đích thương mại, ... [1].

Ở Việt Nam, theo Bùi Hồng Quang (2016) [1] và Phạm Hoàng Hộ (2000) [4], loài *J. annamense* còn có tên tiếng Việt là Nhài Trung Bộ, được tìm thấy ở các tỉnh Đắk Lắk, Thừa Thiên Huế, Lâm Đồng, Khánh Hòa, và Bà Rịa-Vũng Tàu. Hiện nay, loài *J. annamense* có 2 phân loài là *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* [1]. Cho đến thời điểm hiện tại, *J. annamense* được xem là một loài hiếm, trong đó một trong hai phân loài của loài này là *J. annamense* subsp. *annamense* chưa từng được nghiên cứu về các đặc tính di truyền cũng như thành phần hóa học. Ngày nay, việc áp dụng chỉ thị phân tử để hỗ trợ phân loại cũng như phân biệt các loài thực vật có hình thái tương tự nhau đang được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam và trên thế giới, nổi bật nhất là sử dụng các đoạn gen nằm trong hệ thống mã vạch DNA [6].

Do vậy, nghiên cứu này lần đầu tiên cung cấp dữ liệu phân tử cho phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* thông qua một vùng trình tự thuộc hệ gen nhân là vùng ITS, từ đó xây dựng cây phát sinh loài giữa loài nghiên cứu và các taxa thuộc chi *Jasminum* trên cơ sở dữ liệu của Genbank. Thông qua sự so sánh chi tiết vùng trình tự ITS, nghiên cứu này giúp phân biệt 2 phân loài của loài *J. annamense* là *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* vốn có đặc điểm hình thái tương tự và rất khó phân biệt [1]. Ngoài ra, như đã đề cập trên đây, chi *Jasminum* với nhiều loài có chứa dược tính, do vậy, nghiên cứu này cũng lần đầu xác định thành phần hóa học cũng như khả năng kháng khuẩn từ cao chiết ethanol ly trích từ lá và thân của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense*. Từ đó hướng tới việc ứng dụng vào thực tiễn của phân loài này trong tương lai.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, vật liệu

Mẫu vật của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* được thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Bình Châu-Phước Bửu, tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu, vị trí tọa độ là 10°32'47"N; 107°28'57"E, ở độ cao khoảng 43m so với mực nước biển (Hình 1). Ngoài ra, nghiên cứu này có sử dụng các trình tự vùng ITS của các loài thuộc chi *Jasminum* cũng như loài *Ligustrum vulgare* (Oleaceae) từ cơ sở dữ liệu GenBank (Bảng 1). Hơn nữa, vùng trình tự ITS của phân loài *J. annamense* subsp. *glabrescens* từ công bố của Bùi Hồng Quang (2016) [1] cũng được sử dụng trong nghiên cứu này.



Hình 1: Phân loài *J. annamense* subsp. *annamense*. A. Cây ngoài thực địa và phát hoa. B. Lá.  
Bảng 1: Trình tự của các loài thuộc chi *Jasminum* và loài *Ligustrum vulgare* (Oleaceae) từ dữ liệu GenBank được sử dụng trong nghiên cứu này

Tên loài	Mã số	Tên loài	Mã số
<i>J. humile</i>	AF534818	<i>J. agastyamalayanum</i>	MG727719
<i>J. nudiflorum</i>	AF361301	<i>J. caudatum</i>	MG727724
<i>J. trichotomum</i>	MG727730	<i>J. sambac</i>	MG727729
<i>J. elongatum</i>	KP092837	<i>J. azoricum</i>	MG727721

<i>J. humile</i> SBB-1113	JN115027	<i>J. fluminense</i>	GQ478093
<i>J. auriculatum</i>	MG727720	<i>J. grandiflorum</i>	MG727725
<i>J. brevilobum</i>	MG727722	<i>J. didymum</i> subsp. <i>lineare</i>	HM116983
<i>J. affine</i>	MG727718	<i>J. floridum</i>	MH711206
<i>J. lanceolarium</i>	MH710699	<i>J. mesnyi</i>	MH268169
<i>J. polyanthum</i>	MG727726	<i>J. calophyllum</i>	MG727723
<i>J. ritchiei</i>	MG727731	<i>Jasminum</i> sp.	HQ705324
<i>J. volubile</i>	HM116984	<i>Ligustrum vulgare</i>	EU314901

## 2.2. Chủng vi khuẩn

Bốn chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này gồm 2 chủng gram dương là *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) và 2 chủng gram âm gồm *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). Các chủng này được lưu tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp Tp. HCM với điều kiện  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 20% glycerol và chuyển sang môi trường Luria-Bertani broth ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

## 2.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Quá trình tách chiết DNA được thực hiện trên mẫu lá tươi với quy trình được thực hiện như sau: (1) Khử mẫu lá với cồn 70% ; (2) Nghiền 100mg mẫu lá trong 1000  $\mu\text{l}$  dung dịch đệm tách chiết (NaCl 1.5M, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM; EDTA (pH 8,0) 20 mM, CTAB 4%), vortex mạnh và ủ  $60^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút (3 phút đảo đều); (3) Bổ sung 800  $\mu\text{l}$  chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1), đảo đều; (4) Ly tâm 13000 vòng trong 10 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ , thu dịch nổi trên cùng sang 1 eppendorf khác; (5) Thêm 800  $\mu\text{l}$  isopropanol, đảo nhẹ, để ủ ở tủ  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút; (6) Ly tâm 13000 vòng trong 10 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ , loại bỏ dịch nổi và thu tủa; (7) Thêm 800  $\mu\text{l}$  ethanol 70%, ly tâm 13000 vòng trong 10 phút ở  $4^{\circ}\text{C}$  thu tủa; (8) Để khô tủa 15-25 phút, thêm 50  $\mu\text{l}$  dung dịch TE và bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$  [7].

## 2.4. Phương pháp PCR khuếch đại vùng trình tự ITS

Vùng ITS được khuếch đại bằng cặp mồi được White et al. (1990) [8] thiết kế và được sản xuất bởi Công ty Integrated DNA Technologies, Hoa Kỳ, với trình tự như sau: chiều xuôi-5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'; chiều ngược-5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Mastercycler (hãng Eppendorf, Đức) với các thành phần bao gồm: 12,5  $\mu\text{l}$  Go Taq Green Master Mix (hãng Promega, Mỹ), 1,25  $\mu\text{l}$  mỗi mồi xuôi và ngược có nồng độ 10  $\mu\text{M}$ , 9,5  $\mu\text{l}$  nước khử ion và 0,5  $\mu\text{l}$  DNA mẫu. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR gồm: 5 phút ở  $95^{\circ}\text{C}$ ; 35 chu kỳ gồm: biến tính (1 phút ở  $94^{\circ}\text{C}$ ), bắt cặp mồi (1 phút 30 giây ở  $55^{\circ}\text{C}$ ) và tổng hợp mạch mới (1 phút 30 giây ở  $72^{\circ}\text{C}$ ); hoàn thiện phản ứng ở  $72^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tại Công ty TNHH Công nghệ Sinh học Nam Khoa (quận 7, Tp. Hồ Chí Minh) bằng máy ABI 3130 XL Sequencer.

## 2.5. Phương pháp hiệu chỉnh trình tự và xây dựng cây phát sinh loài

Kết quả giải trình tự 2 chiều được kiểm tra độ chính xác với sự hỗ trợ của phần mềm FinchTV và Seaview. Các trình tự được sắp giống bằng phần mềm ClustalX2.1 (Thompson et al, 1994), xây dựng cây phát sinh loài của mẫu nghiên cứu và các trình tự từ Genbank (Bảng 02) bằng phần mềm PAUP\* 4.0a166 theo phương pháp maximum parximony với nhóm ngoại là loài *Ligustrum vulgare* [9]. Ngoài ra, việc so sánh trình tự ITS giữa 2 thứ của loài *J. annamense* là *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* được thực hiện bằng phần mềm Biodeit theo phương pháp sắp giống toàn cục (Global Alignment).

## 2.6. Phương pháp tạo cao ethanol

Thân và lá tươi rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ  $50^{\circ}\text{C}$  đến khi khối lượng không đổi, xay nhuyễn. Cân 50g bột được liệu ngâm với 500ml ethanol 99% trong 21 ngày ở nhiệt độ phòng. Lọc bỏ bã thu được dịch chiết. Cô cạn dịch chiết dưới áp suất chân không ở  $60^{\circ}\text{C}$  thu được dạng cao màu nâu [10].

## 2.7. Phương pháp sắc ký ghép khối phổ

Mẫu cao chiết sau khi sấy thăng hoa được gửi phân tích sắc ký ghép khối phổ (LC/MS) tại Phòng phân tích trung tâm, Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. HCM, sử dụng (1) hệ thống khối phổ MS/MS phân giải cao micrOTOF-QII Bruker Daltonic (Đức) có cấu tạo gồm: nguồn tạo ion theo kiểu ESI, bộ lọc ion gồm Dual Ion Funnel ghép với Hexapole, bộ cô lập khối Analytical Quadrupole, nguồn ion hóa nội CID, bộ tách khối phân giải cao TOF, đầu dò ion multichannel; (2) Các dữ liệu được xử lý trên phần mềm Data Analysis (Bruker, Đức); (3) Hệ thống sắc ký lỏng siêu cao áp Agilent 1200 (Hoa Kỳ) bao gồm: bơm đôi cao áp (trộn dòng áp suất cao), bộ tiêm mẫu tự động, lò cột; (4) bộ bơm mẫu trực tiếp bằng Syringe (kdScientifit, Hoa Kỳ).

Quy trình phân tách bằng sắc ký lỏng pha đảo được thực hiện với (1) Pha tĩnh: cột ACE3- C<sub>18</sub> (4.6 ×150mm, 3,5 μm), được ổn nhiệt ở 40 °C; (2) Pha động: chương trình pha động được thực hiện theo Bảng 1 tại tốc độ dòng 0,3 mL/phút. Trong đó, pha A là dung dịch nước khử ion chứa 0,1 % acid formic và pha B là Acetonitril chứa 0,1 % acid formic.

Bảng 2: Chương trình pha động trên cột C18

Thời gian(phút)	%Pha A*	% Pha B*
0	90	10
15	0	100
30	0	100
31	90	10
40	90	10

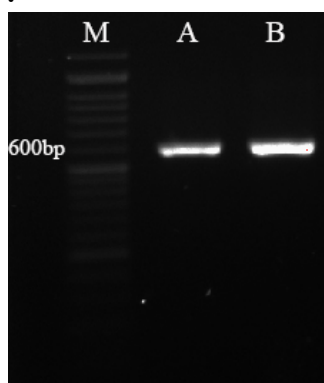
(\*): tính theo % về thể tích

## 2.8. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn từ cao chiết ethanol của thân và lá của phân loài *J. annamense* là *J. annamense* được thực hiện theo Bauer et al. (1996) [11]. Môi trường LB Broth được sử dụng nhằm tăng sinh các chủng vi khuẩn cho tới khi đạt được độ đục là 0,5 theo tiêu chuẩn McFarland. Cho 100μl dịch vi khuẩn và trải lên đĩa Petri Mueller Hinton Agar (Himedia, Ấn Độ), đĩa giấy thấm vô trùng chứa 15μl dung dịch nghiên cứu được đặt lên bề mặt đĩa Petri đã dàn đều vi khuẩn. Các đĩa Petri được để yên trong 4°C cho dung dịch nghiên cứu thấm vào môi trường thạch trong 2 giờ và sau đó được đem ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Đĩa kháng sinh Gentamycin (Nam Khoa, Việt Nam) được sử dụng như đối chứng dương cho các thí nghiệm. Làm song song mẫu chứng âm đối với các dung môi dung hòa tan dịch nghiên cứu. Khả năng kháng khuẩn của các dung dịch nghiên cứu đối với các chủng vi khuẩn được đo bằng đường kính vòng vô khuẩn sau 16-18h nuôi ủ. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần. Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.2 và phần mềm Excel 2010 dùng để tính toán trung bình và độ lệch chuẩn của các phép đo.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

### 3.1. Kết quả khuếch đại vùng trình tự ITS

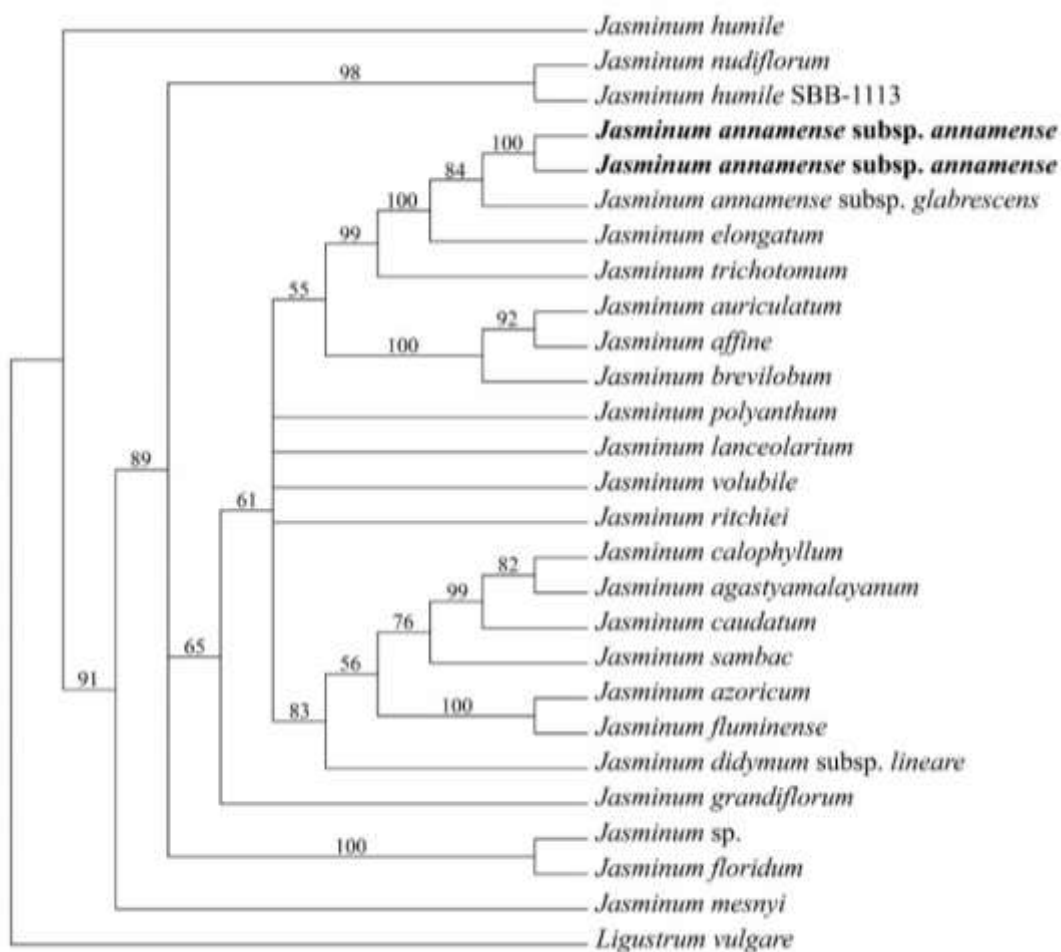


Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng trình tự ITS 2 cá thể của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* (A và B) với M là thang chuẩn.

Để đảm bảo tính chính xác, các thí nghiệm phân tử được thực hiện với 2 cá thể khác nhau của phân loài nghiên cứu. Từ DNA tổng thu được, phản ứng PCR khuếch đại vùng trình tự ITS được tiến hành. Kết quả thể hiện ở Hình 2 cho thấy, sản phẩm PCR có một vạch kích thước sang rõ, không bị nhòe hay mờ, kích thước so với thang chuẩn tương đương khoảng 600bp. Kết quả này phù hợp với kích thước lý thuyết của cặp mồi do White et al. (1990) [8] thiết kế được sử dụng cho nghiên cứu này.

### 3.2. Kết quả phân tích trình tự và xây dựng cây phả hệ

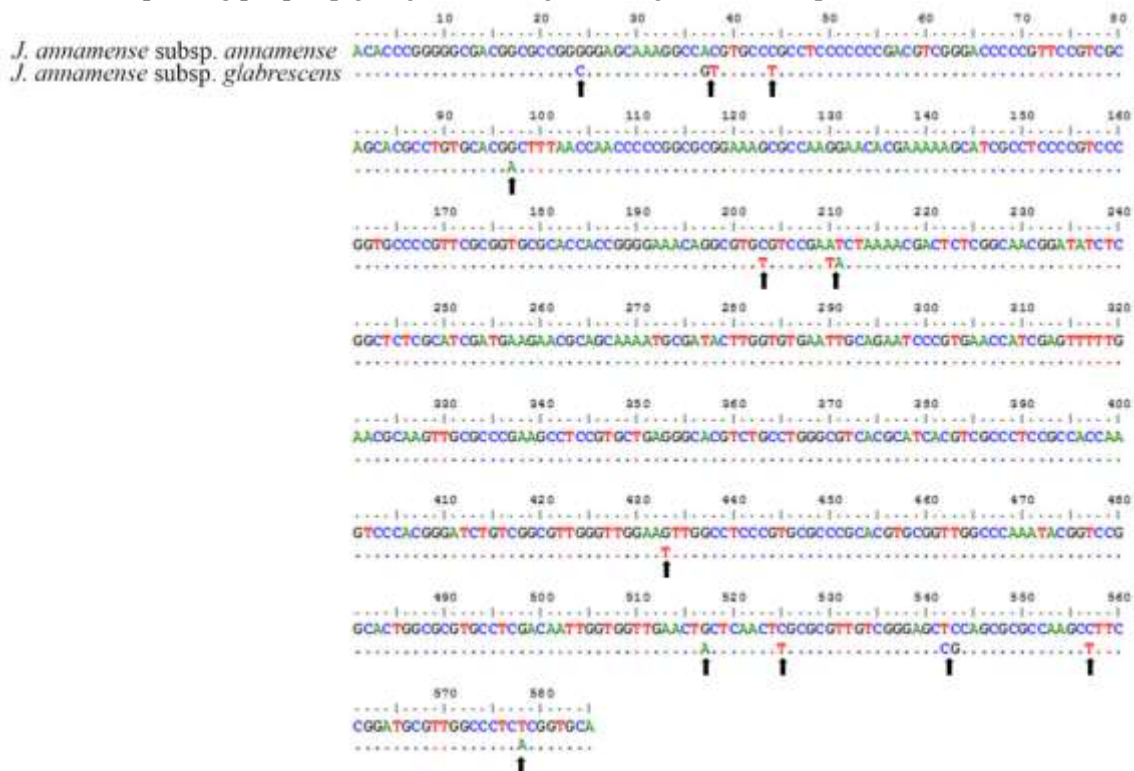
Kết quả phân tích đặc điểm trình tự của mẫu nghiên cứu cho thấy, trình tự vùng ITS sau khi được hiệu chỉnh có kích thước tương ứng là 585bp. Qua so sánh chi tiết vùng trình tự, 2 cá thể nghiên cứu có vùng trình tự ITS giống nhau 100%. Từ trình tự của 2 cá thể nghiên cứu kết hợp với các trình tự vùng ITS của các loài thuộc chi *Jasminum* từ cơ sở dữ liệu của Genbank, cây phát sinh loài được xây dựng nhằm nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* so với các loài thuộc chi *Jasminum* (Hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ di truyền (vùng ITS) giữa loài nghiên cứu và các loài thuộc chi *Jasminum*.

Kết quả thể hiện ở Hình 3 cho thấy, 2 cá thể của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* xếp gọn trong các loài khác thuộc chi *Jasminum*, qua đó đã chứng minh kết quả giải trình tự có độ tin cậy cao. Ngoài ra, 2 cá thể của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* xếp chung nhóm với phân loài *J. annamense* subsp. *glabrescens*. Kết quả này cũng phù hợp vì *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* là 2 phân loài của loài *J. annamense*, theo đó chúng có hình thái tương tự nhau và rất khó phân biệt. Theo Bùi Hồng Quang (2016) [1], 2 phân loài này có rất nhiều đặc điểm tương tự nhau như: dạng cây bụi, lá đơn mọc đối, phiến lá hình bầu dục, cuống lá tròn, cụm hoa hình xim, mọc ở đầu cành,

tràng hoa màu trắng, ... Trong khi phân loài *J. annamense* subsp. *glabrescens* chỉ có thể phân biệt với phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* ở những đặc điểm khó nhận thấy như: cành và phiến lá không lông; thùy lá dài hơn và có lông trắng như tơ. Từ kết quả này, nhằm giúp phân biệt 2 phân loài của loài *J. annamense* được rõ ràng hơn, việc so sánh chi tiết đặc điểm trình tự của vùng trình tự ITS giữa 2 phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* được tiến hành bằng phần mềm Bioedit dựa trên phương pháp sắp giống toàn cục (global alignment), kết quả được thể hiện ở Hình 4



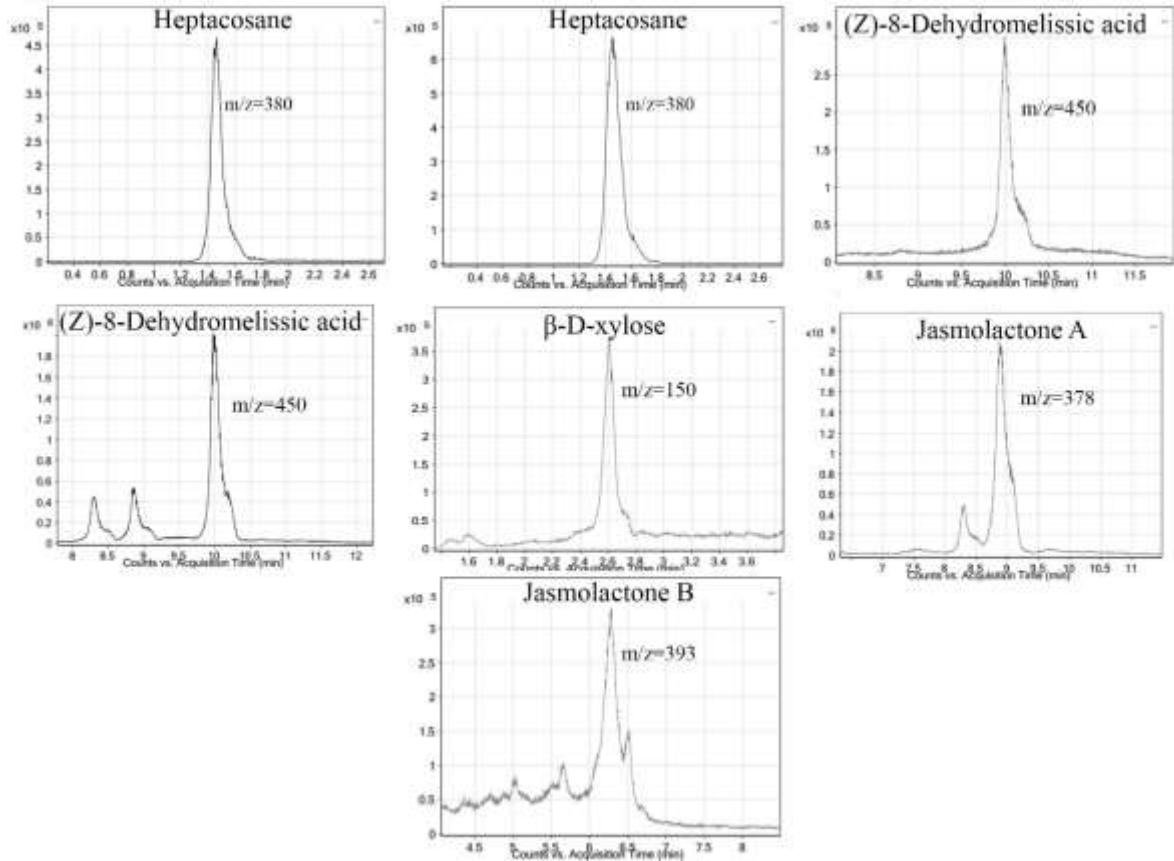
Hình 4: Kết quả sắp giống toàn cục (global alignment) giữa 2 phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens*. Ghi chú: các dấu mũi tên thể hiện sự khác biệt trong trình tự.

Kết quả thể hiện ở Hình 4 cho thấy trong tổng số 585 nucleotide được sắp giống, vùng trình tự ITS của 2 phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* không có vị trí mất điểm (gap), có 570 vị trí tương đồng (match) và có 15 điểm khác biệt (mismatch). Nhiều công bố gần đây cũng cho thấy vai trò quan trọng của các đoạn gen mã vạch (DNA barcode) trong việc hỗ trợ phân loại cũng phân biệt các loài có hình thái tương tự nhau ở thực vật. Hà Văn Huân và Nguyễn Văn Phong (2015) [12] đã sử dụng vùng gen *matK* nhằm xác định mã vạch DNA cho loài Trà hoa vàng Tam Đảo (*Camellia tamdaoensis*), trong đó, các tác giả cũng đã cho thấy sự khác biệt trong trình tự vùng *matK* của loài Trà hoa vàng Tam Đảo (*Camellia tamdaoensis*) và một loài có đặc điểm hình thái tương tự là loài Trà vàng (*Camellia petelotii*). Tương tự, Bùi Thị Ngân Hà và cs (2019) [13] đã sử dụng vùng trình tự ITS và một vùng gen lục lạp là *trnL-F* nhằm giúp phân biệt 2 loài có đặc điểm hình thái tương tự trong chi *Geodorum* thuộc họ Lan (Orchidaceae) là *G. attenuatum* và *G. recurvum*. Gần đây, Ton et al. (2019) [14] cũng đã sử dụng vùng ITS và một vùng gen lục lạp khác là *matK*, từ đó nhóm nghiên cứu này đã cho thấy sự khác biệt trong 2 vùng gen này cho 2 loài có đặc điểm hình thái tương tự trong họ Cà phê (Rubiaceae) là *Rothmannia wittii* và *R. daweshanensis*. Như vậy, trong nghiên cứu này, dựa trên sự so sánh chi tiết đặc điểm trình tự vùng trình tự ITS, đã xác định có 15 điểm khác biệt trong đặc tính di truyền của 2 phân loài của loài *J. annamense* là *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens*.

### 3.3. Kết quả xác định thành phần hóa học

Từ kết quả sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC/MS), khối lượng phân tử (*m/z*) của các hợp chất đã được thu nhận được tiến hành so sánh và đối chiếu với khối lượng phân tử của các hợp chất hóa học có trong cao

chiết của các loài khác thuộc chi *Jasminum* là *J. multiflorum* và *J. auriculatum* của các công bố trước đây [15-16]. Từ đó, chúng tôi đã dự đoán được 7 hợp chất có trong thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* (Hình 5 và Bảng 3)



Hình 5: Sắc ký đồ của 7 hợp chất được xác định có trong cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense*.

Bảng 3 cho thấy, trong 7 hợp chất được dự đoán, có 5 chất có trong cao chiết ethanol ly trích từ thân và trong lá cũng có 5. Trong đó, Heptacosane, (Z)-8-Dehydromelissic acid và Jasmolactone C là 3 chất đều xuất hiện ở cả lá và thân, trong khi  $\beta$ -D-xylose, 10-Hydroxyloeupein chỉ xuất hiện ở thân; Jasmolactone A và Jasmolactone B chỉ có ở lá.

Như đã đề cập ở trên, phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* là 1 loài hiếm và chưa từng được nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học trước đây. Tuy nhiên, nhiều loài thuộc *Jasminum* đã được công bố về thành phần hóa học bởi nhiều nghiên cứu trước đây. Chẳng hạn, Sultana et al. (2018) [15] đã công bố 7 hợp chất có trong cao chiết methanol từ lá và thân của loài *J. auriculatum* gồm: (Z)-*n*-Dotriacontenyl piperate, (Z)-4-Pentadecanoxyferulic acid, (Z)-8-Dehydromelissic acid,  $\beta$ -D-xylose, (Z)-6-Lauroleiyl  $\beta$ -D-tetraglucoside, (Z)-6-Lauroleiyl  $\alpha$ -D-tetraglucoside, 5'-(2-Hydroxyphenyl)-pent-4-enyl ricinoleate. Gần đây, Singh (2016) [16] đã cho thấy trong dịch chiết methanol của loài *J. multiflorum* có 14 hợp chất hóa học, trong đó có 5 chất xuất hiện ở phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* là Jasmolactone A, Jasmolactone B, Jasmolactone C, Heptacosane và 10-Hydroxyloeupein.

Bảng 3: Thành phần hóa học được dự đoán có trong cao chiết ethanol của lá và thân của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense*.

Hợp chất		m/z	Tài liệu
Thân	Lá		
$\beta$ -D-xylose	-	150	[15]
-	Jasmolactone A	378	[16]
Heptacosane	Heptacosane	380	[16]
-	Jasmolactone B	393	[16]

(Z)-8-Dehydromelissic acid	(Z)-8-Dehydromelissic acid	450	[15]
Jasmolactone C	Jasmolactone C	500	[16]
10-Hydroxyloeupein	-	540	[16]

### 3.4. Kết quả nghiên cứu khả năng kháng khuẩn

Kết quả bước đầu nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* cho thấy, cả 2 mẫu cao chiết chỉ cho khả năng kháng lại 2 chủng vi khuẩn là *Bacillus cereus* và *Salmonella typhimurium* trong khi không có khả năng kháng 2 chủng còn lại là *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* (Hình 6 và Bảng 4). Kết quả cho thấy, khả năng kháng của mẫu nghiên cứu đối với 2 chủng vi khuẩn *B. cereus* and *S. typhimurium* là gần như nhau, trong đó mẫu lá cho khả năng kháng mạnh hơn mẫu thân, thậm chí là mẫu chứng dương (kháng sinh Gentamycin) với kích thước vòng kháng khuẩn đối với chủng *B. cereus* and *S. typhimurium* lần lượt là  $12,1 \pm 0,8$ mm và  $12,3 \pm 1,0$ mm. Trong khi đó, mẫu thân cho khả năng kháng 2 chủng vi khuẩn kiểm định là gần bằng hoặc thấp hơn mẫu chứng dương, tương ứng là  $9,5 \pm 0,6$ mm và  $9,5 \pm 0,6$ mm cho 2 chủng *B. cereus* và *S. typhimurium*.

Bảng 4: Kích thước vòng kháng khuẩn của cao chiết ethanol từ thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* đối với 2 chủng vi khuẩn kiểm định.

Chủng vi khuẩn	Kích thước vòng kháng khuẩn (mm)		
	Thân	Lá	Chứng dương
<i>Bacillus cereus</i>	$9,5 \pm 0,6$	$12,1 \pm 0,8$	$9,7 \pm 0,5$
<i>Salmonella typhimurium</i>	$9,5 \pm 0,6$	$12,3 \pm 1,0$	$11,9 \pm 0,6$



Hình 6: Kết quả kháng khuẩn của cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* đối với 2 chủng vi khuẩn kiểm định. Chú thích: (A): *Bacillus cereus*; (B): *Salmonella typhimurium*; L: mẫu lá; S: mẫu thân; dấu (+) là chứng dương; (-) là chứng âm.

Nhiều nghiên cứu gần đây cũng đã cho thấy khả năng kháng vi sinh vật từ dịch chiết của các loài *Jasminum*. Chẳng hạn, các loại dịch chiết trong các dung môi khác nhau như petroleum ether, chloroform, acetone, methanol và nước ly trích từ lá của loài *J. grandiflorum* cho khả năng kháng lại nhiều vi sinh vật gây bệnh như: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* [17]. Tương tự, dịch chiết ethanol từ 2 loài *J. grandiflorum* và *J. sambac* cho khả năng kháng lại 3 chủng vi khuẩn gây bệnh là *Staphylococcus albus*, *Proteus mirabilis* và *Salmonella typhi* [18]. Gần đây, Rama và Ampati (2016) [19] đã cho thấy, dịch chiết methanol ly



trích từ hoa của loài *J. officinale* có khả năng kháng lại nhiều chủng vi khuẩn và nấm như: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus pumilus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* và *Aspergillus niger*.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã lần đầu tiên khuếch đại và giải trình tự thành công vùng trình tự ITS, qua đó đã xác định được vị trí phân loại cũng như so sánh sự khác biệt trong đặc điểm di truyền giữa phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* và *J. annamense* subsp. *glabrescens* vốn có đặc điểm hình thái tương tự và rất khó phân biệt. Nghiên cứu này cũng lần đầu xác định được 7 hợp chất hóa học có trong cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá của phân loài *J. annamense* subsp. *annamense* gồm:  $\beta$ -D-xylose, jasmolactone A, jasmolactone B, jasmolactone C, heptacosane, (Z)-8-dehydromelissic acid và 10-hydroxyloeuropen. Ngoài ra, cao chiết ethanol ly trích từ thân và lá của mẫu nghiên cứu cho khả năng kháng lại 2 chủng vi khuẩn gây bệnh là *Bacillus cereus* và *Salmonella typhimurium*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Hồng Quang, Nghiên cứu phân loại họ Nhài (Oleaceae Hoffmanns. & Link) ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, 2016.
- [2] Võ Văn Chi, Từ điển thực vật thông dụng, Tập 1, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2003.
- [3] F. Gagnepain, in Lecomte, Oleaceae & Jasminum, Flore Générale de L' Indochine 3: p. 1034 – 1059, Paris, 1933.
- [4] Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Tập 2, 892, Nxb. Trẻ, 2000.
- [5] Trần Đình Lý, trong Nguyễn Tiến Bản (chủ biên), *Danh mục các loài thực vật Việt Nam*, 2: 1162-1166, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 2003.
- [6] Nguyễn Đức Thành, Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật, Tạp chí Sinh học, 36, 2014.
- [7] Huỳnh Nữ Băng Thuý, Nguyễn Anh Đức, Trình Trung Hiếu, Võ Tuấn Dũng, Văn Hồng Thiện, Xác định vị trí phân loại của họ Limnocharitaceae bằng dữ liệu phân tử dựa trên DNA tổng từ quy trình tách chiết nhanh, *Chuyên san Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 4: 76-80, 2018.
- [8] T.J. White., T. Bruns., S. Lee., & J. Taylor., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand., D.H., Sninsky., J.J. & White., T.J. (eds) PCR Protocols: A Guide to methods and Applications, *Academic Press*, New York, USA, p. 315 – 322, 1990.
- [9] J.N. Jeyarani., R. Yohannan., D. Vijayavalli., M.D. Dwivedi., A.K. Pandey. Phylogenetic analysis and evolution of morphological characters in the genus *Jasminum* L. (Oleaceae) in India. *Indian Academy of Sciences*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-1019-4>.
- [10] A. Altemimi., N. Lakhssassi., A. Baharlouei., D.G. Watson., D.A. Lightfoot., Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6: p. 1 - 23, 2017.
- [11] A.W. Bauer., W.M. Kirby., J.C. Sherris., M. Turck., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45: p. 493 - 496, 1996.
- [12] Hà Văn Huân, Nguyễn Văn Phong, Xác định đoạn mã vạch DNA cho trà hoa vàng tam đảo (*Camellia tamdaoensis*): loài cây đặc hữu của Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 5: 123-130, 2015.

- [13] Bùi Thi Ngân Hà, Mai Yên Hòa, Nguyễn Minh Nhật Hòa, Nguyễn Ngọc Thuần, Lê Văn Sơn, Trịnh Ngọc Nam, Văn Hồng Thiện, Ghi nhận vùng phân bố mới ở Việt Nam và xác định mã vạch DNA cho loài *Geodorum attenuatum* (Orchidaceae). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 5: 67-73, 2019.
- [14] T.H.T. Ton., T.T. Nguyen., T.K.T Dinh., V.S. Le., G.B. Tran., H.T. Van., New distribution records of *Rothmannia wittii* (Rubiaceae) in Vietnam and identification of DNA barcode sequence for *R. wittii*. *Journal of Science, HCMC University of Education*, 16(3): 190-199, 2019.
- [15] S. Sultana., M. Ali., S. R. Mir., Chemical Constituents from the Aerial Parts of *Jasminum auriculatum* Vahl and Seeds of *Holarrhena pubescens* Wall. ex G. Don. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 2(3): 16-21, 2018.
- [16] D. Singh. *Jasminum multiflorum* (Burm. F.) Andr.: Botany, Chemistry and Pharmacology. *Asian journal of chemistry*, 28(2): 2575-2578, 2016.
- [17] L. Sandeep., P. M. Paarakh., U. Gavani., Antibacterial activity of *Jasminum grandiflorum* Linn leaves. *Journal of Pharmacy Research*, 2(7),1206-1207, 2009.
- [18] P. Joy., P. Raja., Anti-Bacterial Activity Studies of *Jasminum grandiflorum* and *Jasminum sambac*. *Ethnobotanical Leaflets*, 12: 481-483, 2008.
- [19] G. Rama., S. Ampati., Evaluation of flowers of *Jasminum officinale* for antibacterial activity. *Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences*, 3(1): 428-431, 2013.

Ngày nhận bài: 20/01/2020

Ngày chấp nhận đăng: 25/02/2020