

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ MÃ VẠCH DNA CỦA LOÀI CÂY BẢY LÁ MỘT HOA, *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li, Ở VIỆT NAM

Nguyễn Tiến Dũng^{1,2*}, Nguyễn Quỳnh Nga³, Trần Ngọc Liên², Nguyễn Thị Thu², Ninh Thị Phíp¹,
Đoàn Thị Thanh Nhân⁴, Lê Thị Thu Hiền⁵, Nguyễn Nhật Linh⁵

¹*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam,*

²*Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ,*

³*Viện Dược liệu, Bộ Y tế, ⁴Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

*Email: dungnguyentien85@gmail.com

Ngày gửi bài: 15.11.2017

Ngày chấp nhận: 17.06.2018

TÓM TẮT

Để hỗ trợ cho việc định danh loài Bảy lá một hoa Việt Nam - *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li phục vụ nghiên cứu chọn tạo giống và nhân trồng, nghiên cứu này đã mô tả, xác định đặc điểm hình thái đặc trưng và phân tích mã vạch DNA dựa trên hai vùng gen ITS và *psbA-trnH*. Bảy lá một hoa Việt Nam được phân biệt với các loài khác thuộc chi *Paris* ở các đặc điểm: nhị có trung đới kéo dài hình trụ; cánh hoa dài hơn đài (1,2) 1,5 - 2 lần; lát cắt ngang qua bầu có hình sao, 4 - 7 cạnh, cạnh bầu lõm sâu, nhụy có phần hợp rất ngắn, hạt có áo hạt màu đỏ. Kết quả phân tích các mã vạch DNA cho thấy vùng gen ITS có thể sử dụng để phân biệt Bảy lá một hoa Việt Nam với các loài thuộc chi *Paris* với độ tin cậy cao (giá trị bootstrap là 100).

Từ khóa: *Paris vietnamensis*, đặc điểm hình thái, mã vạch DNA, ITS, *psbA-trnH*.

Morphological Characteristics and DNA Barcodes of *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li in Vietnam

ABSTRACT

In order to identify the species *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li for breeding, propagation and cultivation, a study on its morphological characteristics and DNA barcodes based on ITS and *psbA-trnH* regions were carried out. Results showed that *P. vietnamensis* is characterized by several features such as: free portion of anther connective cylindrical; inner tepals longer than outer ones; ovary 4 - 7 deeply ribbed, horizontal cross section star-shaped, style inconspicuous, and seeds with red aril. DNA barcoding analyses provided support for the use of the ITS region as an efficient DNA marker for molecular identification of this species within the *Paris* L. genus (bootstrap value at 100).

Keywords: *Paris vietnamensis*, morphological characteristics, DNA barcodes, ITS, *psbA-trnH*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong Y học cổ truyền Trung Quốc, Bảy lá một hoa là vị thuốc quý được lấy từ thân rễ của một số loài thuộc chi *Paris* (Bảy lá một hoa, Trọng lâu), họ Melanthiaceae (Committee for the Pharmacopoeia of P.R. China, 2010). Những nghiên cứu về thành phần hóa học và dược lý cho thấy các hoạt chất có tác dụng dược lý của Bảy lá một hoa là các saponin steroid,

đặc biệt là diosgenin và các pennogenin (Zhang *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014). Các saponin này có khả năng giúp hạ cholesterol máu, kháng u (đặc biệt với một số dòng tế bào ung thư vú và ung thư phổi), kháng viêm, kháng nấm và ức chế ngưng tập tiểu cầu. Zhang *et al.* (2012) và Wei *et al.* (2014) khi nghiên cứu tổng hợp các thành phần saponin steroid trong thân rễ của một số loài thuộc chi *Paris* thu thập ở Trung Quốc đã đề xuất ngoài 2 loài được đề cập trong

Được điển Trung Quốc (*Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz và *P. polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara.), nhiều loài khác thuộc chi *Paris* (trong đó có một số loài phân bố ở Việt Nam như *P. vietnamensis*, *P. fargesii*, *P. delavayi*.) cũng có tác dụng dược lý đáng chú ý.

Ở Việt Nam, tất cả các loài thuộc chi *Paris* đều đang bị khai thác ráo riết để làm thuốc và bán qua biên giới khiến nguồn dược liệu này trong tự nhiên ngày càng cạn kiệt. Nguyen Quynh Nga *et al.* (2016) đã thống kê và ghi nhận tổng số 8 loài và 2 thứ thuộc chi *Paris* phân bố rải rác ở một số tỉnh miền núi phía Bắc cho tới vùng núi cao miền Trung và Tây Nguyên. Trong đó, *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li là một trong những loài có phân bố rộng nhất. Quan sát các quần thể của loài này trong tự nhiên cho thấy tỷ lệ đậu hạt và khối lượng thân rễ của các cá thể khá cao so với những loài khác trong chi. Để phát triển nguồn dược liệu, Bảy lá một hoa Việt Nam đã được thu thập trong tự nhiên để nghiên cứu, bảo tồn và nhân trồng. Tuy nhiên, việc định danh các cá thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu gặp khó khăn vì các cá thể trong tự nhiên vốn hiếm gặp lại thường không mang hoa. Hơn nữa, giữa các loài trong chi *Paris* có sự tương đồng rất cao về các đặc điểm hình thái của lá, thân và rễ. Thêm vào đó, giữa các cá thể trong loài cũng có sự đa dạng về số lượng lá, đài hoa, cánh hoa, nhị, cạnh bầu, thùy của vòi nhụy cũng như hình dạng lá gây khó khăn cho việc định loại (Liang and Soukup, 2000; Nguyễn Thị Đỏ, 2007; Nguyen Quynh Nga *et al.*, 2016)

Hiện nay, việc phân loại sinh học ở mức độ loài dựa trên các đặc điểm về hình thái đang gặp nhiều khó khăn, nhất là đối với những nhóm loài có quan hệ gần gũi và mang các đặc điểm hình thái tương đồng cao. Vì vậy, để khắc phục các nhược điểm của phương pháp phân loại sinh học dựa trên hình thái, các phương pháp định loại dựa trên vật liệu di truyền đã dần được nghiên cứu và phát triển. Trong các phương pháp phân loại phân tử, mã vạch DNA (DNA barcode) là phương pháp phổ biến nhất

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 (Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2012; Mishra, 2016). Trên đối tượng thực vật, các vùng mã vạch DNA thường được sử dụng trong phân loại phân tử thường là các trình tự thuộc hệ gen nhân như ITS (Internal transcribed spacer) và hệ gen lục lạp như *psbA-trnH*, *matK*, *rbcl*, *rpoC1*... (Kress *et al.*, 2005; CBOL Plant Working Group, 2009). Đối với các loài cây thuốc thuộc chi *Paris*, nghiên cứu của Zhu và cộng sự (2010) đã chỉ ra ưu thế phân loại của vùng gen ITS so với 5 vùng gen *psbA-trnH*, *rpoB*, *rpoC1*, *rbcl*, *matK* của 11 loài và thứ thuộc chi *Paris*. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu về mã vạch DNA đã chỉ ra rằng việc sử dụng kết hợp hai mã vạch DNA cho kết quả phân loại 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 loài *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li. Vì vậy, nghiên cứu này đã được tiến hành nhằm mô tả, xác định các đặc điểm hình thái đặc trưng và phân tích trình tự hai vùng gen có độ biến thiên cao, thích hợp cho định loại phân tử là ITS và *psbA-trnH* của loài Bảy lá một hoa Việt Nam, hỗ trợ cho công tác định danh loài, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về chọn tạo giống và nhân trồng loài dược liệu có giá trị này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu đặc điểm hình thái là các mẫu của loài Bảy lá một hoa Việt Nam - *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li được thu thập trong tự nhiên và ở vùng trồng tại Sa Pa (Lào Cai) vào tháng 4 - 6/2016. Tiêu bản của các mẫu được lưu giữ tại Phòng Tiêu bản của Viện Dược liệu (NIMM).

Phân tích mã vạch DNA: 3 mẫu lá tươi (PR1, PR2, PR3) thu thập từ các cá thể Bảy lá một hoa trồng ở Sa Pa (Lào Cai).

2.2. Phương pháp

- Các mẫu Bầy lá một hoa Việt Nam được Khoa Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu định danh bằng phương pháp hình thái.

- Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại, giải trình tự vùng gen ITS và *psbA-trnH*:

DNA tổng số từ mô lá được tách chiết dựa theo phương pháp của Doyle & Doyle (1990) có cải biến. Đầu tiên, mẫu mô sau khi nghiền sẽ được phá màng tế bào trong dịch đệm chiết CTAB (1,4 M NaCl; 0,1 M Tris - HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 2% CTAB) trong 2 giờ ở 56°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 rửa DNA sử dụng 2 lần thể tích EtOH 100%, 0,3 M CH₃COONa trong 3 giờ ở -20°C. Kết tủa DNA được rửa bằng EtOH 70%, làm khô và hòa tan trong nước khử ion vô trùng.

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). Thành phần 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 - 2 phút; (94°C - 30 giây; 50 - 55°C - 20 giây; 72°C - 60 giây) x 35 chu kỳ, 72°C - 5 phút, sau đó giữ ở 25°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng phương pháp rửa EtOH/EDTA: 5 µl EDTA 125 mM, 60 µl EtOH 100% được bổ sung và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Tủa DNA được thu nhờ ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút và loại bỏ EtOH. DNA tiếp tục được rửa với 60 µl EtOH 70% và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau khi đã tinh sạch sẽ được bổ sung 10 µl Hi-Di Formamide và biến tính tại 95°C trong 5 phút. Trình tự của các đoạn DNA được xác định trên máy giải trình tự tự động ABI 3500 Genetic Analyzer bằng cách sử dụng BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Thành phần của PCR đọc trình tự gồm: 3,2 pM mồi, 200 ng sản phẩm PCR tinh sạch, BigDye, đệm tương ứng trong tổng thể tích 15 µl

với chu trình nhiệt trên máy luân nhiệt IBM Veriti như sau: 96°C - 1 phút; 25 chu kỳ (96°C - 10 giây, 50°C - 5 giây, 60°C - 4 phút); giữ ở 4°C. 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 vùng tín hiệu yếu, nhiễu và hiệu chỉnh những vị trí có tín hiệu không rõ ràng. Trình tự sau khi xử lý thô sẽ được sử dụng để so sánh với trình tự tương ứng đã được công bố và các loài thân thuộc trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do giải trình tự và phát hiện các đa hình nucleotide đơn. Việc phân tích trình tự được hỗ trợ bằng các phần mềm chuyên dụng như SeqScape 2.6; DNASTAR Lasergene 7.1; BioEdit 7.0.9.0. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA 7 theo phương pháp Neighbour-Joining và Maximum-Likelihood với giá trị bootstrap là 1.000 dựa trên cơ sở số liệu thu được. Từ đó, đưa ra những kết luận về mã vạch phân tử để định loài.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái của loài Bầy lá một hoa Việt Nam

3.1.1. Sự đa dạng về hình thái

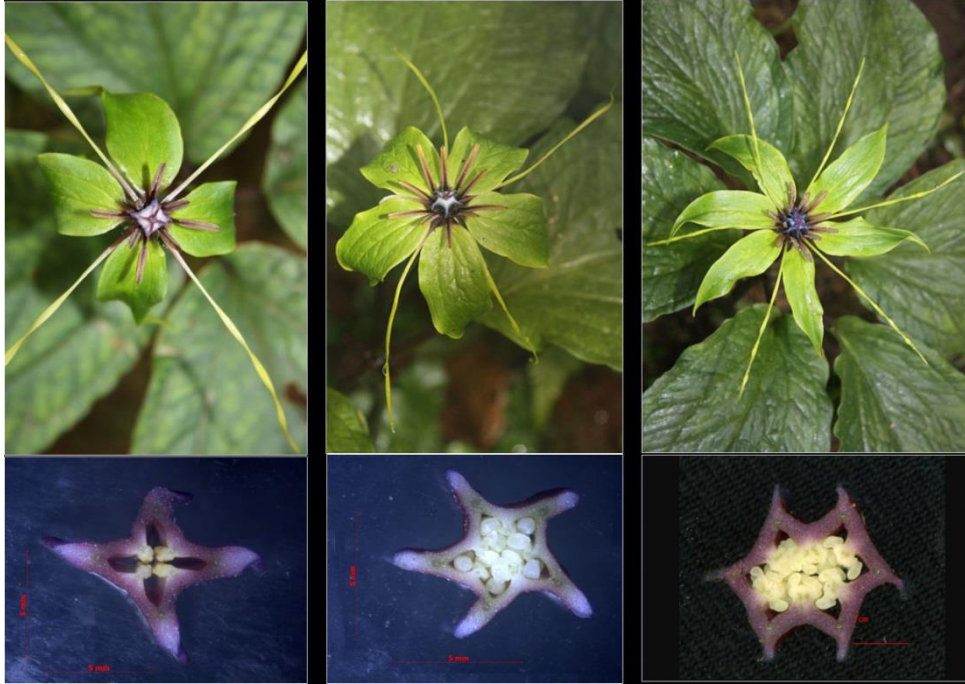
Phân tích các mẫu nghiên cứu của loài Bầy lá một hoa Việt Nam - *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li cho thấy có sự đa dạng về hình thái giữa các cá thể ở đặc điểm số lượng của các bộ phận lá, lá đài, cánh hoa, nhị, cạnh bầu, thùy của đầu nhụy (Hình 1), cụ thể như sau: Lá 4 - 7 (thường 6 lá) xếp thành vòng trên thân. Số lá đài, thường bằng (hoặc xấp xỉ) số lá và số cánh hoa. Số lá đài có thể thay đổi nhiều hay ít trong cùng 1 loài chứ không phải là con số cố định. Cánh hoa dạng dải, xoắn ít tới nhiều, dài hơn lá đài 1,2 - 2 lần. Nhị 8 - 14, số lượng nhị thường gấp 2 lần số lá, số lá đài và số cánh hoa; xếp 2 vòng. Bầu có cạnh bầu lõm sâu, 4 - 7 cạnh, số cạnh bầu thường bằng với số lá, số lá đài, số cánh hoa và số thùy của đầu nhụy. Phần gốc vòi nhụy - đỉnh bầu thường có màu sắc đa dạng từ màu tím, tím tới màu xanh lam.

Đặc điểm hình thái và mã vạch dna của loài cây bảy lá một hoa, *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li, ở Việt Nam

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

Tên môi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Tài liệu tham khảo
ITS-AB-101	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	850	Sun <i>et al.</i> , 1994
ITS-AB-102	TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC		
Pr-psbA-trnH-F	GACCTAGCTGCTGTTGAAGC	803	Tự thiết kế
Pr-psbA-trnH-R	CCACAATGATTGGCCATACAATCG		

a.



b.



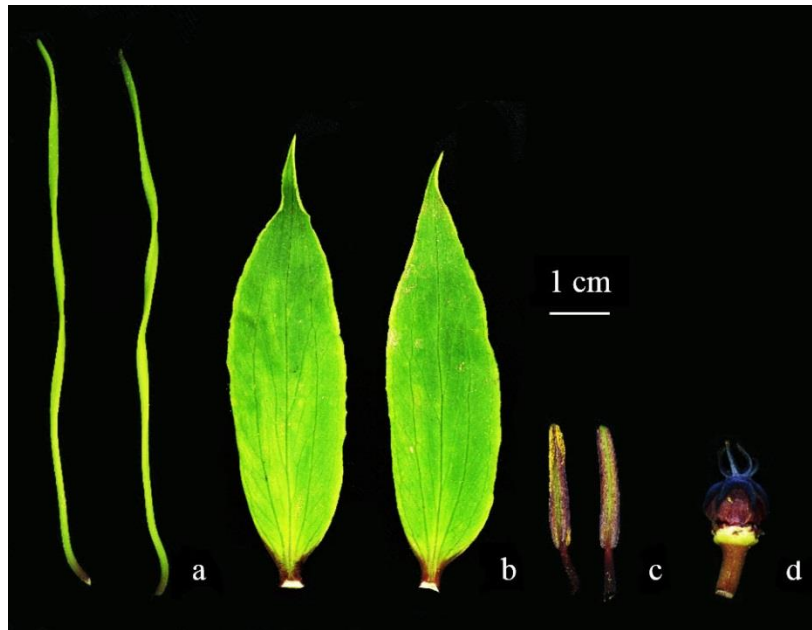
Hình 1. Sự đa dạng hình thái hoa và lá của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li

Ghi chú: a. Các dạng hình thái hoa và bầu cắt ngang tương ứng của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; b. Các dạng hình thái lá của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li.

3.1.2. Đặc điểm hình thái đặc trưng

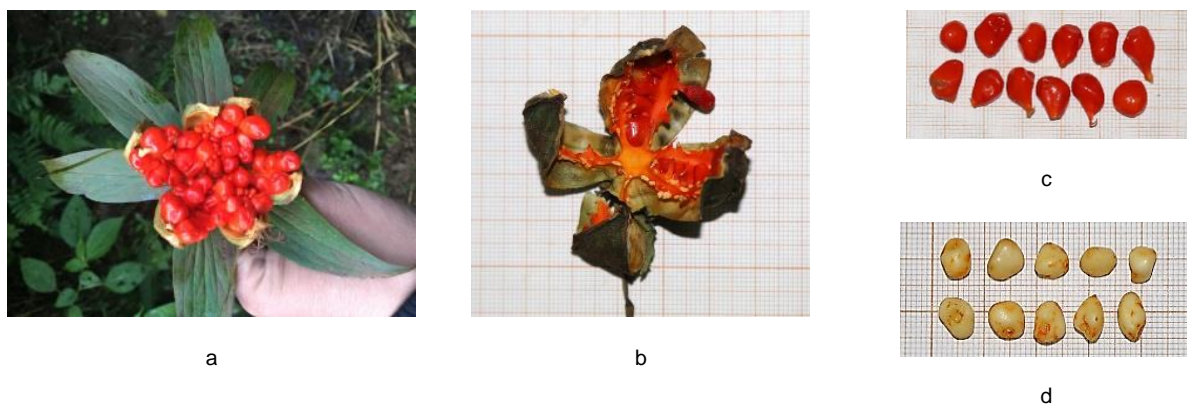
Căn cứ vào các nghiên cứu về chi *Paris* L. ở Việt Nam và trên thế giới (Liang & Soukup, 2000; Nguyễn Thị Đở, 2007; Nguyen Quỳnh Nga *et al.*, 2016) kết hợp với việc phân tích các mẫu nghiên cứu cho thấy Bảy lá một hoa Việt Nam - *P. vietnamensis* (Takht.) H Li được phân biệt với các

loài khác thuộc chi ở các đặc điểm đặc trưng bao gồm: nhị có trung đới kéo dài hình trụ ngắn 1 - 1,5mm; cánh hoa dài hơn đài (1,2) 1,5 - 2 lần; cạnh bầu lõm sâu, lát cắt ngang qua bầu hình sao, nhụy gần như xẻ từ gốc với phần hợp (vòi nhụy) rất ngắn, phần xẻ thành các thùy (đầu nhụy) dài; hạt có áo hạt màu đỏ (Hình 2, 3).



Hình 2. Một số đặc điểm hình thái đặc trưng của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li

Ghi chú: a. Lá dài của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; b. Cánh hoa của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; c. Nhị của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; d. Bộ nhụy của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li.



Hình 3. Quả và hạt của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li

Ghi chú: a. Quả chín tự mở của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; b. Vỏ quả đã tách hạt của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; c. Hạt của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li; d. Hạt đã tách áo hạt của loài *P. vietnamensis* (Takht.) H.Li.

3.2. Phân tích mã vạch DNA của loài Bầy lá một hoa Việt Nam

3.2.1. Tách chiết DNA tổng số và PCR khuếch đại các vùng gen

DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra chất lượng thông qua điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả kiểm tra cho thấy DNA tổng số sau tách chiết bị đứt gãy tương đối nhiều tạo vệt smear trên gel. Tuy nhiên, với kích thước các vùng gen cần khuếch đại không lớn (850 bp đối với cặp mồi ITS-AB-101/102 và 803 bp với cặp mồi Pr-psbA-trnH-F/R), DNA tổng số thu được đạt yêu cầu cho các thí nghiệm tiếp theo. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được tham khảo và được thiết kế dựa trên trình tự tham chiếu của các vùng gen tương ứng của loài thuộc chi *Paris* trên GenBank (Bảng 1). DNA tổng số sau đó được sử dụng làm khuôn cho PCR khuếch đại vùng gen ITS và *psbA-trnH*. Kết quả điện di cho thấy các vùng gen quan tâm đã được khuếch đại thành công với kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết (Hình 4). Các vùng gen sau PCR được tinh sạch và giải trình tự.

3.2.2. Kết quả phân tích trình tự vùng gen ITS và *psbA-trnH* của các mẫu PR1, PR2, PR3

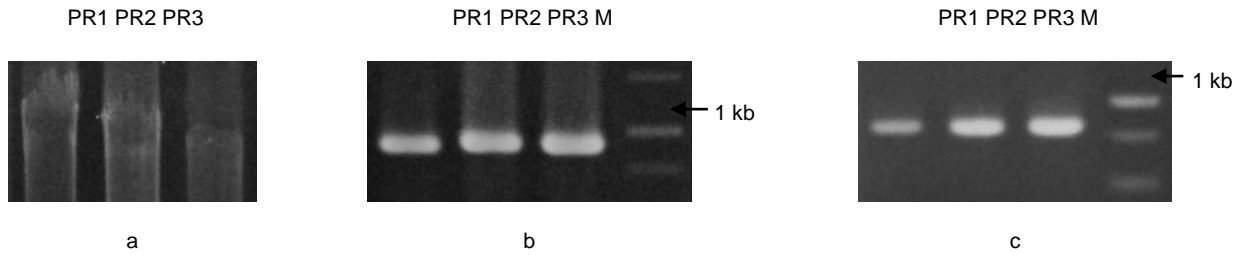
Nghiên cứu của Zhu *et al.* (2010) đã chỉ ra rằng ITS là vùng gen thích hợp nhất trong phân loại phân tử đối với các loài thuộc chi *Paris*. Tuy nhiên, như đã trình bày, nhiều nghiên cứu về mã vạch DNA đã chỉ ra rằng việc sử dụng kết hợp hai mã vạch DNA cho kết quả phân loại tốt hơn so với từng mã vạch đơn lẻ (CBOL Plant Working Group, 2009; Pang *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2017). Vì vậy, dựa trên cơ sở các nghiên cứu trước đây kết hợp với số lượng trình tự tham chiếu trên GenBank, hai vùng gen có độ biến thiên cao nhất thích hợp làm mã vạch phân tử cho phân loại các loài thuộc chi *Paris* là ITS và *psbA-trnH* đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

Ba mẫu Bầy lá một hoa được sử dụng để đảm bảo tính lặp lại của phân tích. Trình tự của hai vùng gen ITS và *psbA-trnH* ở ba mẫu PR1, PR2, PR3 được xử lý thô để loại bỏ những vùng

tín hiệu yếu, nhiễu và hiệu chỉnh các vị trí cần thiết. Trình tự nucleotide của 22 loài chi *Paris* trên GenBank được sử dụng để làm trình tự tham chiếu khi so sánh trình tự với các mẫu PR1, PR2, PR3 sử dụng phần mềm BioEdit 7.0.9.0. Để củng cố tính chính xác của phân tích phát sinh chủng loại, trình tự của một loài chi *Trillium* thuộc cùng phân họ Parideae với chi *Paris* được sử dụng làm nhóm ngoại (outgroup). Điều này đảm bảo nhóm ngoại sẽ không có khoảng cách di truyền quá lớn so với các loài thuộc chi *Paris*. Kết quả so sánh sắp hàng cho thấy có sự tương đồng rất cao giữa 3 mẫu nghiên cứu với nhau và với trình tự loài *P. vietnamensis* trên GenBank ở cả hai vùng gen. Trong đó, vùng gen ITS cho thấy khả năng phân biệt loài tốt hơn với độ biến thiên trình tự giữa các loài cao hơn so với vùng gen *psbA-trnH* (Hình 5).

Từ kết quả phân tích so sánh trình tự, cây phát sinh chủng loại được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA 7 với giá trị bootstrap là 1.000. Phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu là Neighbor-Joining và Maximum-Likelihood. Phương pháp Neighbor-Joining đại diện cho nhóm phương pháp khoảng cách có tốc độ phân tích nhanh nhưng độ chính xác thấp hơn. Trong khi đó phương pháp dựa trên đặc điểm của bộ dữ liệu như Maximum-Likelihood tuy có tốc độ xây dựng cây chậm nhưng có độ chính xác cao hơn. Hai phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại được sử dụng để kiểm tra sự tương quan về độ chính xác của hai cách thức thiết lập cây phát sinh chủng loại từ một cơ sở dữ liệu so sánh chung, góp phần đánh giá toàn diện hơn khả năng phân biệt loài của các vùng gen nghiên cứu.

Với tốc độ tiến hóa và độ biến thiên trình tự lớn, vùng gen ITS thường được sử dụng để định loại phân tử các loài thực vật trên cạn (China Plant BOL Group *et al.*, 2011). Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng gen ITS cho thấy quan hệ gần gũi nhất giữa các mẫu PR1, PR2, PR3 với loài *P. vietnamensis* với giá trị bootstrap là 100 (Hình 6). Giá trị bootstrap cao ở cả hai phương pháp tương đương với độ tin cậy cao của phân tích



Hình 4. Kết quả điện di DNA tổng số (a) và sản phẩm PCR các vùng gen ITS (b) và *psbA-trnH* (c) của mẫu PR1, PR2, PR3

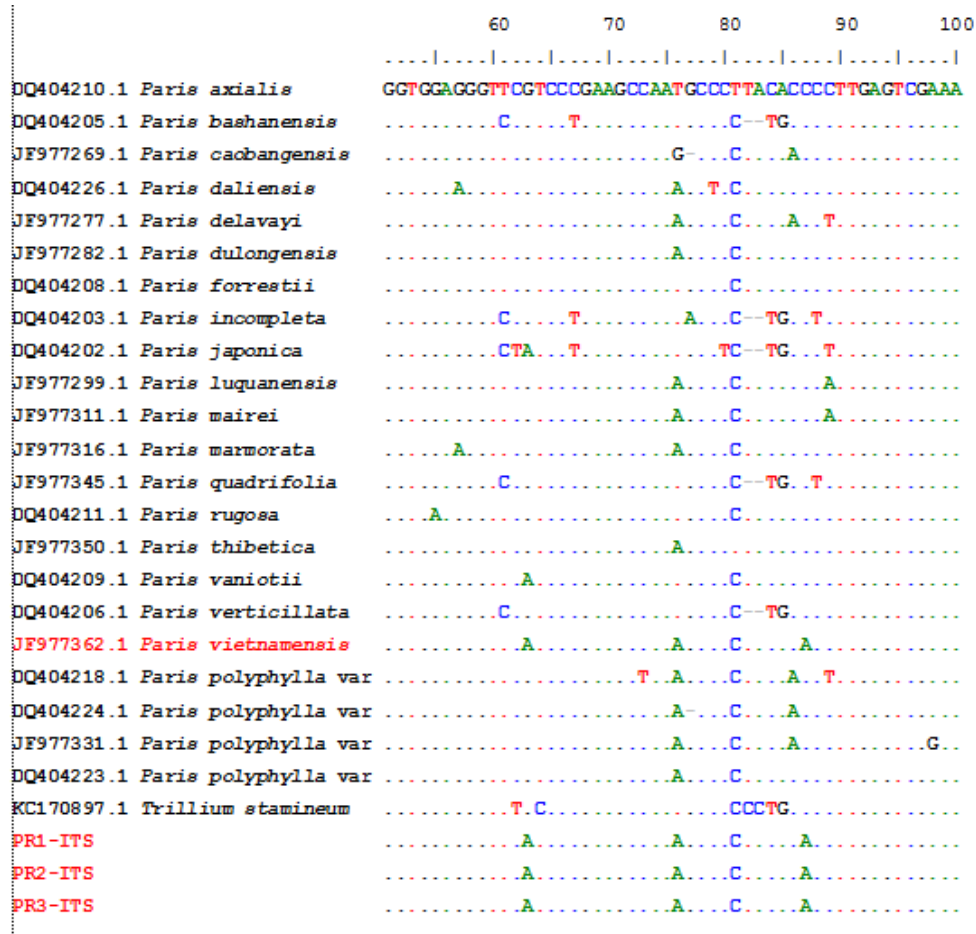
giúp củng cố cho định loại bằng phương pháp hình thái. Ngoài ra, hai phương pháp phân tích đều cho kết quả hình thái cây phát sinh chủng loại tương tự nhau, đặc biệt là ở nhóm loài

nghiên cứu. Điều này cho thấy độ tin cậy cao về kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại và khả năng định loại loài tốt của vùng gen này trong chi *Paris*.

a.

	60	70	80	90	100
DQ404210.1 <i>Paris axialis</i>	GGTGGAGGGTT	CGTCCCGAAGCCAAT	GCCCTTACACCCCTT	GAGTCGAAA	
DQ404205.1 <i>Paris bashanensis</i>C.....T.....C-TG.....			
JF977269.1 <i>Paris caobangensis</i>G.....C.....A.....				
DQ404226.1 <i>Paris daliensis</i>A.....A..T.C.....			
JF977277.1 <i>Paris delavayi</i>A.....C.....A..T.....				
JF977282.1 <i>Paris dulongensis</i>A.....C.....				
DQ404208.1 <i>Paris forrestii</i>C.....				
DQ404203.1 <i>Paris incompleta</i>C.....T.....A..C-TG..T.....			
DQ404202.1 <i>Paris japonica</i>CTA.....T.....TC-TG..T.....			
JF977299.1 <i>Paris luquanensis</i>A.....C.....A.....				
JF977311.1 <i>Paris mairei</i>A.....C.....A.....				
JF977316.1 <i>Paris marmorata</i>A.....A..C.....			
JF977345.1 <i>Paris quadrifolia</i>C.....C-TG..T.....			
DQ404211.1 <i>Paris rugosa</i>A.....C.....			
JF977350.1 <i>Paris thibetica</i>A.....				
DQ404209.1 <i>Paris vaniotii</i>A.....C.....			
DQ404206.1 <i>Paris verticillata</i>C.....C-TG.....			
JF977362.1 <i>Paris vietnamensis</i>A.....A..C.....A.....			
DQ404218.1 <i>Paris polyphylla</i> varT..A.....C.....A..T.....				
DQ404224.1 <i>Paris polyphylla</i> varA.....C.....A.....				
JF977331.1 <i>Paris polyphylla</i> varA.....C.....A.....G.....			
DQ404223.1 <i>Paris polyphylla</i> varA.....C.....				
KC170897.1 <i>Trillium stamineum</i>T.C.....CCCTG.....			
PR1-ITSA.....A..C.....A.....			
PR2-ITSA.....A..C.....A.....			
PR3-ITSA.....A..C.....A.....			

b.

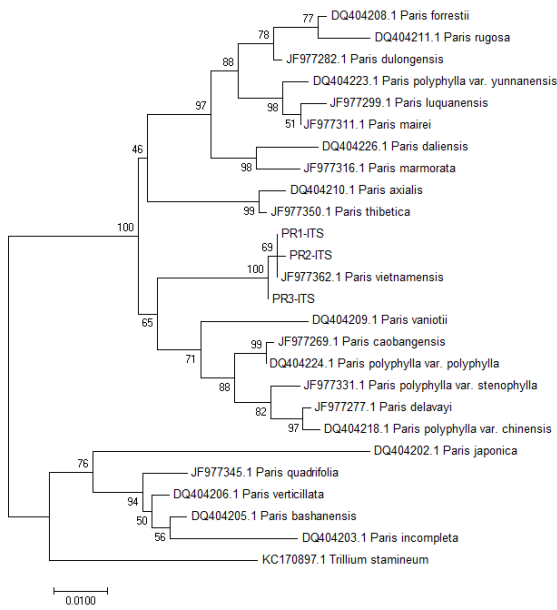


Hình 5. Kết quả so sánh sắp hàng trình tự các mẫu nghiên cứu với vùng gen ITS (a) và *psbA-trnH* (b)

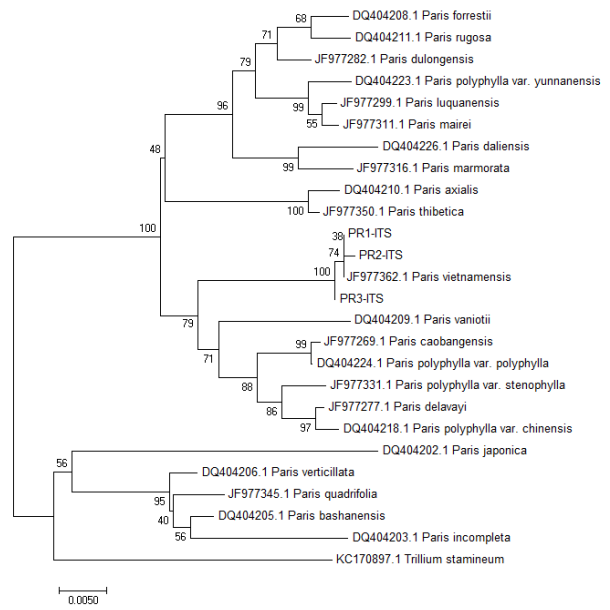
Kết quả lập cây chủng loại phát sinh dựa trên trình tự vùng gen *psbA-trnH* cho thấy quan hệ gần gũi giữa các mẫu PR2 với loài *P. vietnamensis*, *P. luquanensis* và *P. marmorata* với giá trị bootstrap là 99. Giá trị bootstrap cao cho thấy độ tin cậy cao về kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại. Các mẫu PR1 và PR3 có quan hệ gần gũi với nhóm các loài *P. vietnamensis*, *P. polyphylla* var. *chinensis*, *P. delavayi* và *P. caobangensis* với giá trị bootstrap là 57 cho thấy độ tin cậy thấp (Hình 7). Điều này chỉ ra rằng vùng gen *psbA-trnH* của các loài này không phải là chỉ thị tốt nhất cho định loại phân tử ở cấp độ loài. Như vậy, có thể thấy trong ba mẫu nghiên cứu, mẫu PR2 có trình tự tương đối khác so với mẫu PR1 và PR3. Tuy

nhiên, trình tự hai vùng gen này ở cả ba mẫu đều có độ tương đồng cao với hai trình tự tương ứng của *P. vietnamensis* trên GenBank.

Có sự khác nhau giữa chỉ thị phân tử giữa vùng gen trong nhân (ITS) và vùng gen thuộc lục lạp (*psbA-trnH*) đã được công bố trong các nghiên cứu trước đây của chi này. Hiện tượng này được cho là do sự chọn giống hoặc do ảnh hưởng của việc chuyển gen tế bào chất giữa các loài trong quá trình lai xa khác loài (Ji *et al.*, 2006). Vì vậy, hai vùng gen nghiên cứu (ITS và *psbA-trnH*) được phân tích kết hợp để kiểm tra hiệu quả phân loại so với việc sử dụng các barcode đơn lẻ. Trình tự hai vùng gen của ba mẫu thực vật nghiên cứu được so sánh với trình tự đã biết của 22 loài thuộc chi *Paris* và 1 loài

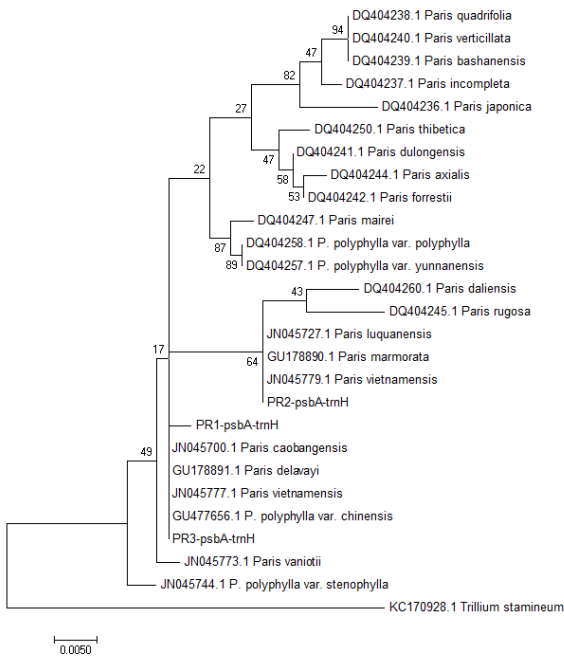


Phương pháp Maximum-Likelihood (A)

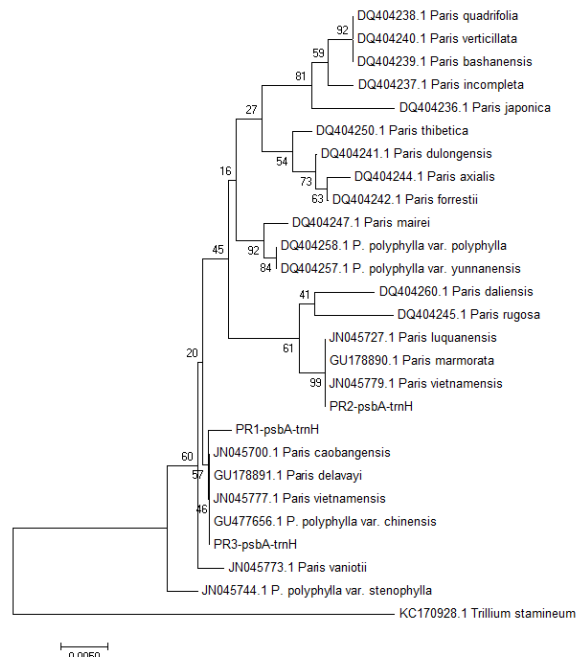


Phương pháp Neighbor-Joining (B)

Hình 6. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên vùng gen ITS của các mẫu nghiên cứu theo phương pháp Maximum-Likelihood (A) và Neighbor-Joining (B)



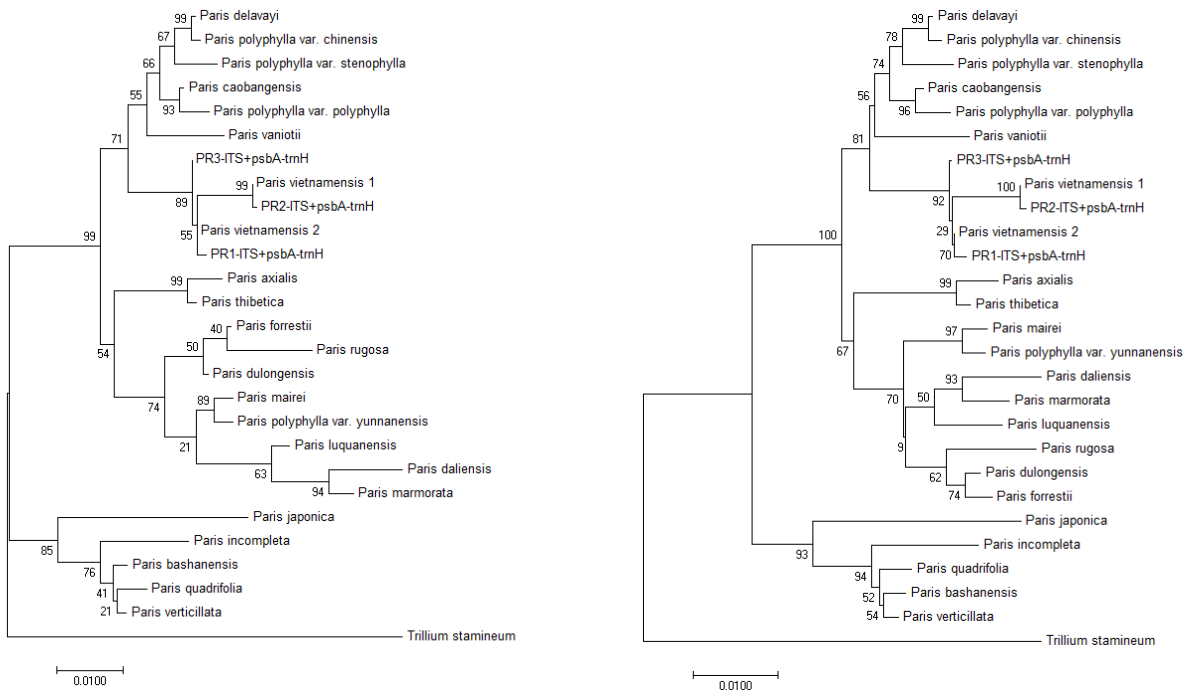
Phương pháp Maximum-Likelihood (A)



Phương pháp Neighbor-Joining (B)

Hình 7. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên vùng gen *psbA-trnH* của các mẫu nghiên cứu

Đặc điểm hình thái và mã vạch dna của loài cây bảy lá một hoa, *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li, ở Việt Nam



Phương pháp Maximum-Likelihood (A)

Phương pháp Neighbor-Joining (B)

Hình 8. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên vùng gen ITS+*psbA-trnH* của các mẫu thực vật nghiên cứu thuộc chi *Paris*

của chi *Trillium* (outgroup) đã được công bố trên GenBank. Kết quả lập cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng gen kết hợp ITS+*psbA-trnH* cho thấy quan hệ gần gũi nhất giữa các mẫu PR1, PR2 và PR3 với loài *P. vietnamensis* với giá trị bootstrap là 92 (Hình 8). Điều này cho thấy trong giới hạn các loài chi *Paris*, việc kết hợp hai vùng gen ITS và *psbA-trnH* có thể giúp định loại các loài thuộc chi này. Giá trị bootstrap cao cho thấy độ tin cậy cao về kết quả xây dựng cây chủng loại phát sinh cũng như củng cố về kết quả định loại bằng hình thái. Hai phương pháp phân tích đều cho kết quả cây phát sinh chủng loại có hình thái tương tự nhau, đặc biệt là với các nhóm loài quan tâm thuộc chi *Paris*. Kết quả phân tích chỉ ra rằng việc sử dụng kết hợp 2 vùng gen ITS+*psbA-trnH* cho hiệu quả tốt hơn việc sử dụng vùng gen *psbA-trnH* đơn lẻ. Kết quả này cũng góp phần củng cố cho kết quả phân tích vùng gen ITS và hỗ trợ việc định loại hình thái các loài thuộc chi *Paris*, đặc biệt là *P. vietnamensis*.

4. KẾT LUẬN

Qua phân tích mẫu đã xác định được sự đa dạng hình thái giữa các cá thể trong cùng loài Bảy lá một hoa Việt Nam thể hiện ở đặc điểm số lượng của cả bộ phận thuộc cơ quan sinh dưỡng (số lá) và cơ quan sinh sản (số lá đài, cánh hoa, nhị, cạnh bầu và thùy của đầu nhụy). Đặc trưng giúp phân biệt Bảy lá một hoa Việt Nam - *Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li với các loài khác thuộc chi *Paris* là nhị có trung đới kéo dài hình trụ ngắn 1 - 1,5mm; cánh hoa dài hơn đài 1,2 - 2 lần; lát cắt ngang qua bầu hình sao, cạnh bầu lõm sâu, nhụy có vòi nhụy (phần hợp) rất ngắn; hạt có áo hạt màu đỏ.

Phân tích trình tự hai vùng gen ITS và *psbA-trnH* riêng lẻ và kết hợp của 3 mẫu Bảy lá một hoa Việt Nam cho thấy vùng gen ITS có thể sử dụng để phân biệt Bảy lá một hoa Việt Nam với các loài còn lại trong chi *Paris* với độ tin cậy cao. Ngoài ra, việc sử dụng kết hợp hai vùng gen ITS+*psbA-trnH* cũng củng cố kết quả định loại

phân tử của vùng gen ITS và định loại hình thái. Tuy nhiên, để có những dẫn liệu toàn diện hơn về mã vạch DNA của Bầy lá một hoa Việt Nam, các nghiên cứu trên số lượng mẫu lớn hơn và số lượng chỉ thị DNA nhiều hơn cần được thực hiện.

Kết quả của nghiên cứu đưa ra cơ sở dữ liệu tham chiếu đầy đủ nhất từ trước tới nay ở Việt Nam về đặc điểm hình thái và mã vạch DNA của loài Bầy lá một hoa Việt Nam (*Paris vietnamensis* (Takht.) H.Li, góp phần trong công tác định danh loài làm nguyên liệu ban đầu phục vụ các nghiên cứu tiếp theo về chọn tạo giống và nhân trồng loài cây dược liệu có giá trị này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- CBOL Plant Working Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... & Fazekas, A. J. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31): 12794-12797.
- China Plant BOL Group, Li, DZ., Gao, LM., Li, HT., Wang, H., Ge, XJ., Liu, JQ., Chen, ZD., Zhou, SL., Chen, SL., Yang, JB., Fu, CX., Zeng, CX., Yan, HF., Zhu, IJ., Sun, YS., Chen, SY., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., Duan, GW. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49): 19641-19646.
- Committee for the Pharmacopoeia of P.R. China (2010). *Pharmacopoeia of P.R. China, Part I*. Guangdong Science and Technology Publishing House and Chemical Industry Publishing House, P.R. China. pp. 204-206.
- Doyle, JJ., Doyle, JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore)
- Ji, Y., Fritsch, PW., Li, H., Xiao, T., Zhou, Z. (2006). Phylogeny and classification of *Paris* (Melanthiaceae) inferred from DNA sequence data. *Annals of Botany*, 98(1): 245-256.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23): 8369-8374.
- Lê Thị Thu Hiền, Hugo de Boer, Nông Văn Hải, Lê Thanh Hương, Nguyễn Mai Hương, Lars Bjork (2012). Mã vạch phân tử DNA và hệ thống dữ liệu mã vạch sự sống. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 10(3): 393-405.
- Liang, S., Soukup, VG. (2000), *Paris Linnaeus*. In: Wu, Z. Y., P. H. Raven (eds.), *Flora of China*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 24: 89.
- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Mani, DN., Shukla, AK., Tiwari, R., Sundaresan, V. (2016). DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1): 8-21.
- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Shukla, A. K., & Sundaresan, V. (2017). Evaluation of single and multilocus DNA barcodes towards species delineation in complex tree genus *Terminalia*. *PLoS one*, 12(8): e0182836.
- Nguyễn Thị Đô (2007). Trilliaceae. *Thực vật chí Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật*, 8: 311-321.
- Nguyen Quỳnh Nga, Phạm Thanh Huyền, Phan Văn Trường, Hoàng Văn Toàn (2016). Taxonomy of the genus *Paris* L. (Melanthiaceae) in Vietnam. *Journal of Biology*, 38(3): 333-339.
- Nguyễn Nghĩa Thìn (2007). Các phương pháp nghiên cứu thực vật. NXB Đại học Quốc gia: 23-27.
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., Cherny, S., Chen, S. (2012). Utility of the *trnH-psbA* Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 7(11): e48833.
- Sun, Y., Skinner, DZ., Liang, GH., Hulbert, SH. (1994). Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor Appl Gen*, 89: 26-32
- Wei, JC., Gao, WY., Yan, XD., Wang, Y., Jing, SS., Xiao, PG. (2014). Chemical constituents of plants from the genus *Paris*. *Chemistry & Biodiversity*, 11: 1277-1297.
- Zhang, J., Shen, T., Wang, Y., Zhang, J., Shi, Y., Jin, H. (2012). Chemical assessment of wild *Paris* rhizome from Southwest China. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (40): 2802-2807.
- Zhu, YJ. (2010). DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*. *Yao Xue Xue Bao*, 45(3): 376-82. (Abstract in English).