

ĐỊNH DANH BA LOÀI, *Paris fargesii*, *Paris polyphylla*, *Paris vietnamensis* THU TẠI VIỆT NAM VÀ SUY LUẬN SỰ PHÁT SINH LOÀI Ở CHI *Paris*

Nguyễn Thị Ngọc Lan*, Nguyễn Hữu Quân,
Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu
Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Các loài thuộc chi *Paris* (Bảy lá một hoa) là loại dược liệu quý, chứa nhiều loại dược chất có tác dụng cân bằng nội môi, kháng khuẩn, kháng virus, chống viêm và ức chế tế bào ung thư. Tuy nhiên, do khai thác quá mức để sản xuất dược phẩm đã phá hủy quần thể tự nhiên, làm cho số cá thể trong mỗi loài trong chi này còn rất ít, do đó, các loài Bảy lá một hoa cần được thực hiện các biện pháp bảo tồn khẩn cấp. Chính vì vậy, việc thu thập, định danh loài và phân tích phát sinh loài làm cơ sở xây dựng các biện pháp bảo tồn, phát triển các loài thuộc chi *Paris* ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, ba loài thuộc chi *Paris* (*Paris fargesii*, *Paris polyphylla* var *chinensis*, *Paris vietnamensis*) thu tại Lai Châu, Lạng Sơn và Thanh Hóa (Việt Nam) được định danh dựa trên phương pháp hình thái so sánh và mã vạch DNA với trình tự vùng ITS và đoạn gen *matK*. Cây phát sinh loài được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS và đoạn gen *matK* phân lập từ ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis* ở Việt Nam và 21 loài thuộc chi *Paris* có trình tự ITS và *matK* trên GenBank theo phương pháp Maximum Likelihood đã cho thấy kết quả bước đầu về sự tiến hóa các loài thuộc chi *Paris*.

Từ khóa: Chi *Paris*; đặc điểm hình thái; ITS; mã vạch DNA; *matK*; phân tích phát sinh loài.

Ngày nhận bài: 07/7/2020; Ngày hoàn thiện: 17/7/2020; Ngày đăng: 31/7/2020

IDENTIFICATION OF THREE SPECIES, *Paris fargesii*, *Paris polyphylla*, *Paris vietnamensis* COLLECTED IN VIET NAM AND PHYLOGENETIC INFERENCE IN THE GENUS *Paris*

Nguyen Thi Ngoc Lan*, Nguyen Huu Quan,
Vu Thi Thu Thuy, Chu Hoang Mau
TNU - University of Education

ABSTRACT

Species of the genus *Paris* are precious medicinal herbs, which consist of many kinds of pharmaceutical substances with homeostasis effect, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and detoxification activities as well as inhibition of cancer cells. However, due to overexploitation of these species to produce pharmaceuticals, the number of individuals in each species of the *Paris* genus declined dramatically, which is why it is necessary to carry out emergency conservation measures for the *Paris* species. Therefore, the collection, identification and phylogenetic analysis of *Paris* species are a basis for conduction of conservation and development measures for species of the genus *Paris* in Vietnam. In this study, three species of the genus *Paris* (*Paris fargesii*, *Paris polyphylla* var *chinensis*, *Paris vietnamensis*) collected in Lai Chau, Lang Son and Thanh Hoa (Vietnam) were identified based on comparative morphology and DNA barcode including ITS and *matK*. Phylogenetic tree was established based on nucleotide sequences of ITS region and *matK* gene isolated from three *Paris* species of *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis* in Vietnam and ITS and *matK* sequences of 21 *Paris* species on GenBank using Maximum Likelihood method has shown initial results of evolution of *Paris* species.

Keywords: *Paris* genus; morphological characteristics; ITS; DNA barcode; *matK*; phylogenetic analysis.

Received: 07/7/2020; Revised: 17/7/2020; Published: 31/7/2020

* Corresponding author. Email: ntnlan.dhsptn@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Trong những năm gần đây, các loài thuộc chi *Paris* đã thu hút nhiều sự chú ý trong hệ thống y học cổ truyền. Bảy lá một hoa là dược liệu quan trọng, là nguồn của các hợp chất hoạt tính sinh học khác nhau [1]. Rễ, củ của cây Bảy lá một hoa chứa saponin, flavonol, sphingolipid và nhiều glycoside khác [2]. Saponin trong rễ, củ của cây Bảy lá một hoa có tác dụng kháng khuẩn, kháng virus, chống viêm và giải độc. Saponin cũng là một thành phần của một số dược phẩm được sử dụng để ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư [3]. Nghiên cứu của Wang và đồng tác giả (đtg) (2013) đã báo cáo rằng 70 loại saponin steroid đã được phân lập từ một số loài thuộc chi *Paris* và thành phần, hàm lượng của các dược chất là khác nhau giữa các loài trong chi [4]. Hiện nay, có 24 loài thuộc chi *Paris* đã được xác định phân bố khắp châu Âu, châu Á và vùng Himalaya; ở một số quốc gia như Bhutan, Nepal và Ấn Độ, Tây nam Trung Quốc [5]. Ở Việt Nam tìm thấy 8 loài phân bố ở các địa phương miền núi phía Bắc, miền Trung và Tây Nguyên. Các loài *Paris* nằm rải rác trên các khu rừng nhiệt đới thường xanh, trong đất ẩm và mùn ở vùng núi, ở độ cao từ 100 m đến 1500 m [6]. Việc khai thác quá mức các loài thuộc chi *Paris* đã dẫn đến sự hủy diệt của quần thể tự nhiên và các loài Bảy lá một hoa được đưa vào danh mục nguy cấp [7]. Do đó, cần phải thực hiện các biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn gen bằng việc thu thập, định danh, lưu giữ, nhân giống loài cây dược liệu quý này.

Mã vạch DNA được báo cáo là công cụ đáng tin cậy trong định danh loài và có thể sử dụng một hay một số trình tự DNA ngắn trong hệ gen để xác định loài. Việc sử dụng kết hợp hai mã vạch DNA sẽ cho kết quả chính xác hơn khi sử dụng mã vạch riêng lẻ [8], [9].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả định danh, phân tích tính đa dạng và phát sinh loài dựa trên đặc điểm hình thái và sự kết hợp trình tự gen *matK* và vùng ITS của ba loài thuộc chi *Paris* (*P. fargesii*, *P. var chinensis*, *P. vietnamensis*) thu thập tại Lai Châu, Lạng Sơn và Thanh Hóa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu cây thuộc chi *Paris* được thu tại Lai Châu (mẫu Lai Châu), Bắc Sơn - Lạng Sơn (mẫu Lạng Sơn), Pù Luông (mẫu Thanh Hóa) và được lưu giữ tại Vườn tiêu bản ở huyện Bắc Sơn, tỉnh Lạng Sơn. Lá non của các mẫu Bảy lá một hoa được sử dụng cho tách chiết DNA. Các trình tự vùng ITS và đoạn gen *matK* khai thác từ cơ sở dữ liệu NCBI [10].

2.2. Phương pháp

2.2.1. Định danh mẫu Bảy lá một hoa

Định danh loài thuộc chi *Paris* theo Nguyễn Quỳnh Nga và đtg (2016) [6] và tra cứu trên trang web của Tropicos [11], kết hợp với hai mã vạch DNA dựa trên trình tự gen *matK* và vùng ITS.

2.2.2. Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại, giải trình tự đoạn gen *matK* và vùng ITS

DNA tổng số từ mô lá được tách chiết theo phương pháp của Saghai-Marooof và cộng sự (cs) (1984) [12]. DNA tổng số sau tách chiết được sử dụng làm khuôn cho PCR với các cặp mồi được tổng hợp dựa trên trình tự mồi nhân bản đoạn gen *matK* và vùng ITS đã công bố. Cặp mồi *matK-F/matK-R* sử dụng trong PCR khuếch đại đoạn gen *matK* có trình tự nucleotide là: *matK-F*: 5'-CGATCTATTCAATCAATATTTC-3'

matK-R: 5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3' [13] và đoạn gen *matK* được nhân bản có kích thước dự kiến khoảng 0,8 kb. PCR nhân bản vùng ITS với cặp mồi *ITS-F/ITS-R* có trình tự nucleotide là:

ITS-F: 5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTCG-3'

ITS-R: 5'-TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'

dự kiến đoạn DNA được nhân bản có kích thước 0,8 kb [14]. Thành phần PCR được tiến hành với thể tích là 20 μ L gồm: 1X DreamTaq Buffer; 1 mM dNTP; 2,5 μ M mỗi mồi; 0,75 unit Dream Taq DNA polymerase; 50 ng DNA tổng số. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Eppendorf Mastercycler với

chu trình nhiệt của PCR để khuếch đại đoạn gen *matK* là 94°C trong 1 phút; 35 chu kỳ với 94°C/30 giây, 53°C/40 giây, 72°C/40 giây; 72°C/10 phút, sau đó giữ ở 10°C. Chu trình nhiệt của PCR khuếch đại vùng *ITS* là 94°C/4 phút; 35 chu kỳ với 94°C/30 giây, 58°C/60 giây, 72°C/60 giây; 72°C/10 phút, sau đó giữ ở 10°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,0%.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Gen JET PCR Purification của hãng Thermo Scientific. 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.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Trình tự nucleotide được phân tích bằng BLAST trong NCBI để nhận diện đoạn gen *matK*, vùng *ITS* và định danh loài. Phân tích tiến hóa và sự phát sinh loài thực hiện bằng phần mềm MEGAX [15] theo phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei [15]. Cây liên kết ứng với giá trị bootstrap suy luận ra từ 1000 lần lặp lại được sử dụng để thể hiện lịch sử tiến hóa của các loài [17].

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Các mẫu cây Bầy lá một hoa thu thập tại Lai Châu, Lạng Sơn và Thanh Hóa được lưu giữ tại Vườn tiêu bản ở huyện Bắc Sơn, tỉnh Lạng Sơn và được định danh dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích đặc điểm phân tử của gen *matK* và vùng *ITS*.

3.1. Đánh giá mức độ đa dạng các đặc điểm hình thái của ba loài Bầy lá một hoa thu thập tại Lai Châu, Lạng Sơn, Thanh Hóa

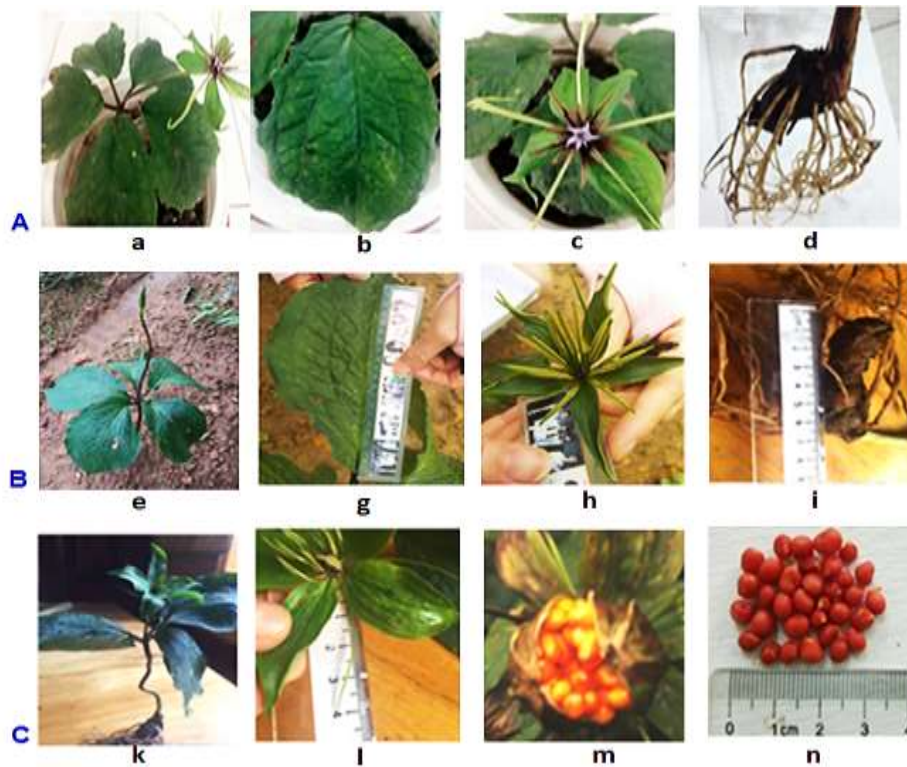
Bảng 1. Một số đặc điểm sai khác về hình thái giữa ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis*

Đặc điểm	<i>P. fargesii</i>	<i>P. polyphylla</i> var <i>chinensis</i>	<i>P. vietnamensis</i>
Số lượng lá	5 lá	5 lá	5 – 9
Chiều cao thân cây	50 cm	40 cm	25 - 70 cm
Chiều dài lá	17 cm	26 cm	11 - 12 cm
Chiều rộng lá	10 - 12 cm	15,6 cm	5 - 9 cm
Hình dạng phiến lá	Hình trứng, mép lá trơn, hơi lượn sóng	Hình xoan ngược, không có lông, chóp lá có mũi 1,5 cm	Lá hình mác thuôn, đầu nhọn
Màu sắc lá	Xanh đậm	Xanh hơi vàng	Xanh hơi vàng

Sử dụng phương pháp hình thái so sánh [6] và tra cứu trên trang web của Tropicos [11] các mẫu Bầy lá một hoa bước đầu đã được xác định thuộc chi *Paris* và tên khoa học của mẫu Lai Châu thuộc loài *P. fargesii*, mẫu Lạng Sơn là loài *P. polyphylla* var *chinensis* và mẫu Thanh Hóa là loài *P. vietnamensis*. Kết quả so sánh hình thái giữa ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis* cho thấy rất ít điểm sai khác và sự khác nhau là không lớn (Bảng 1, Hình 1). Những điểm sai khác chủ yếu là các tính trạng số lượng và hình dạng lá. Như vậy, có thể thấy hình thái ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis* có mức độ đa dạng thấp, rất khó phân biệt, cho nên dễ nhầm lẫn giữa các loài. Do vậy, mã vạch DNA cần được sử dụng để khẳng định chính xác tên khoa học của ba loài Bầy lá một hoa này.

3.2. Sự đa dạng trong trình tự đoạn gen *matK* và vùng *ITS* ở ba loài Bầy lá một hoa

DNA tổng số tách chiết từ lá non của ba mẫu Bầy lá một hoa và kiểm tra bằng điện di và quang phổ hấp thụ, kết quả cho thấy DNA đảm bảo độ tinh sạch sử dụng cho PCR. PCR nhân bản đoạn gen *matK* với cặp mồi *matK-F/matK-R* và nhân bản vùng *ITS* với cặp mồi *ITS-F/ITS-R* được thực hiện và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%. Sản phẩm PCR được tách từ gel điện di và tinh sạch sử dụng để giải trình tự nucleotide. Sau khi xử lý và loại bỏ những đoạn nhiễu, kết quả thu được đoạn gen *matK* phân lập từ 3 mẫu Bầy lá một hoa thu tại Lai Châu, Lạng Sơn và Thanh Hóa có 800 nucleotide; vùng *ITS* có kích thước 695 nucleotide. Phân tích trực tuyến bằng chương trình BLAST trong NCBI đã xác định được mẫu Bầy lá một hoa thu tại Lai Châu là loài *P. fargesii*, mẫu Lạng Sơn là loài *P. polyphylla* var *chinensis* và mẫu Thanh Hóa là loài *P. vietnamensis*.



Hình 1. Một số đặc điểm hình thái của ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis* và *P. vietnamensis* thu tại Lai Châu, Lạng Sơn và Thanh Hóa (Việt Nam).

A: Loài *P. fargesii* (a- cây; b- lá; c-hoa; d-củ); B: Loài *P. polyphylla* var *chinensis* (e- cây; g- lá; h-hoa; i- củ); C: Loài *P. vietnamensis* (k-cây; l-hoa; m-quả chín; n-hạt)

So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* và vùng ITS bằng phần mềm BioEdit đã xác định được 78 vị trí nucleotide sai khác trong trình tự đoạn gen *matK* và 76 vị trí nucleotide sai khác trong trình tự vùng ITS giữa ba loài với nhau (Bảng 2). Sự sai khác biểu hiện ở sự thay đổi cùng nhóm base (đồng hoán): A → T; G → C; hoặc khác nhóm (dị hoán): A → C; A → G; C → T; G → T. Đặc điểm này đã cho thấy tính đa dạng trong trình tự đoạn gen *matK* và vùng ITS của ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis*.

3.3. Phân tích sự phát sinh loài thuộc chi *Paris* dựa trên dữ liệu trình tự vùng ITS và đoạn gen *matK*

Chi *Paris* có 24 loài, trong đó 21 loài tìm được dữ liệu trình tự đoạn gen *matK* và vùng ITS trên GenBank, đó là các loài *Paris axialis*, *Paris bashanensis*, *Paris caobangensis*, *Paris cronquistii*, *Paris*

daliensis, *Paris delavayi*, *Paris dulongensis*, *Paris dunniana*, *Paris fargesii*, *Paris forrestii*, *Paris luquanensis*, *Paris mairei*, *Paris marmorata*, *Paris polyphylla*, *Paris quadrifolia*, *Paris rugosa*, *Paris thibetica*, *Paris vaniotii*, *Paris verticillata*, *Paris vietnamensis*, *Paris xichouensis*.

Trình tự nucleotide của vùng ITS của ba loài *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis*, *P. vietnamensis* (thu tại Việt Nam) và các loài có trình tự ITS trên GenBank được lựa chọn để phân tích sự phát sinh loài và xây dựng cây phát sinh chủng loại của các loài thuộc chi *Paris*. Phân tích sự tiến hóa phân tử được thực hiện bằng phần mềm MEGAX [15]. Lịch sử tiến hóa đã được suy luận bằng cách sử dụng phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei. Phân tích sự phát sinh loài bằng phương pháp Bootstrap với số lần lặp là 1000 theo mô hình Tamura-Nei [16].

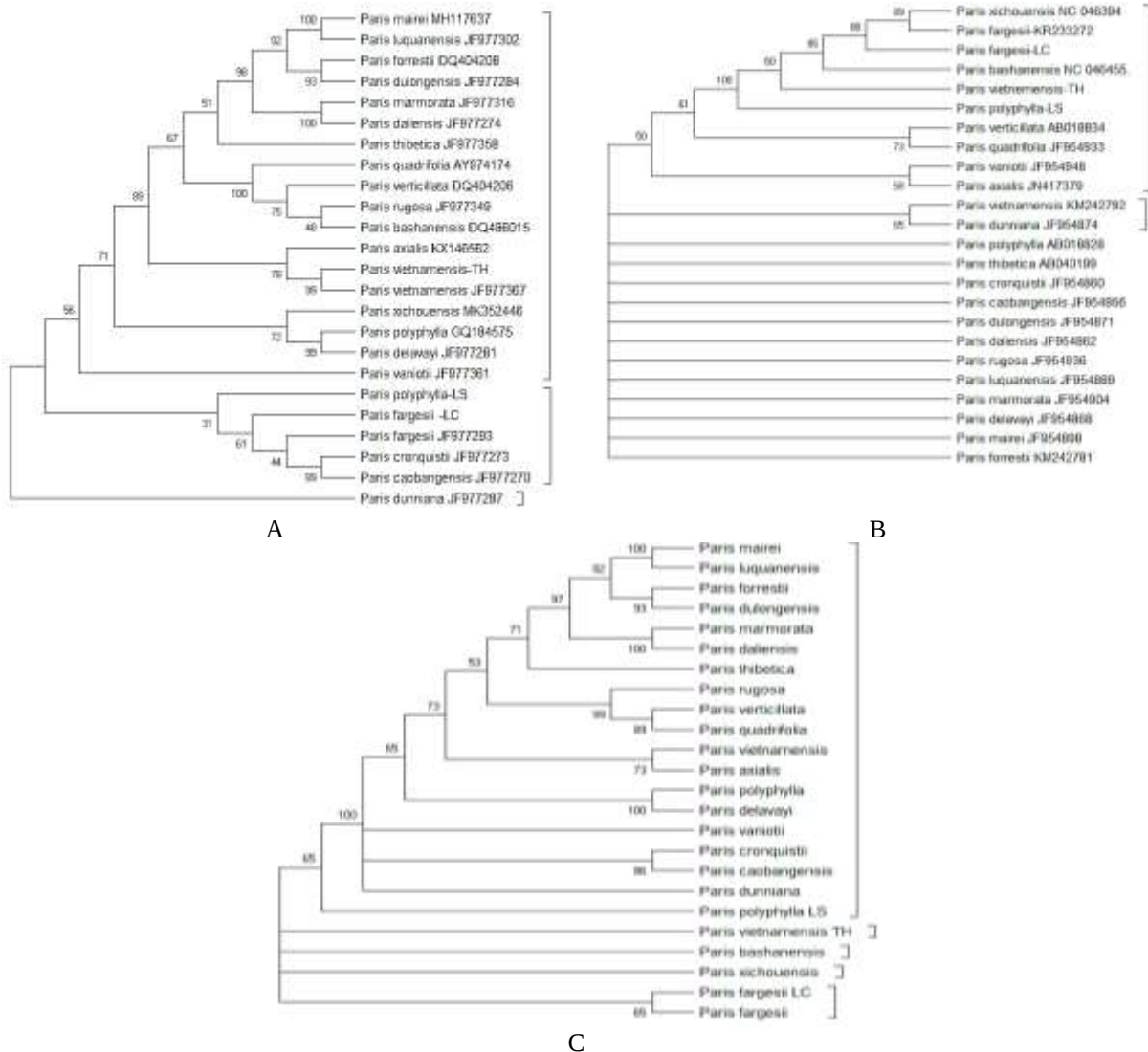
Bảng 2. Sự sai khác trong trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* và vùng *ITS* giữa ba loài Bầy lá một hoa

Vị trí	<i>P. far.</i>	<i>P. polyp.</i>	<i>P. vie.</i>	Vị trí	<i>P. far.</i>	<i>P. polyp.</i>	<i>P. vie.</i>	Vị trí	<i>P. far.</i>	<i>P. polyp.</i>	<i>P. vie.</i>
Các vị trí sai khác trong gen <i>matK</i> giữa ba loài <i>P. fargesii</i> , <i>P. polyphylla</i> var <i>chinensis</i> và <i>P. vietnamensis</i>											
22	A	T	A	454	T	A	T	649	A	T	A
24	C	T	C	456	A	G	A	651	A	G	A
25	A	T	A	467	C	T	C	652	T	G	T
26	A	T	A	504	T	A	T	653	T	G	T
31	A	G	A	514	G	A	G	654	T	C	T
34	T	A	T	518	C	T	C	671	A	A	T
46	G	G	C	526	G	T	G	702	A	A	G
54	A	A	C	535	A	G	A	712	A	A	T
55	G	G	T	565	A	T	A	719	A	A	G
60	T	-	C	568	A	G	A	720	G	G	A
71	A	A	G	570	A	A	G	724	G	G	A
73	G	A	G	595	-	A	G	725	A	A	G
99	G	G	T	605	G	-	C	734	G	G	A
117	A	A	G	618	C	A	C	751	T	T	A
121	G	A	G	619	-	T	C	752	T	T	A
122	-	G	G	629	C	T	C	753	T	T	A
139	A	A	T	630	T	G	T	754	T	T	G
198	C	A	C	632	T	G	T	760	A	A	G
251	A	T	A	634	-	T	T	762	A	A	G
289	G	G	C	635	G	T	G	765	T	T	A
311	T	G	T	636	A	G	A	774	A	A	T
323	C	A	A	637	A	G	A	775	T	T	A
350	T	A	T	638	A	A	C	776	A	A	G
386	C	A	C	642	C	T	C	777	G	G	A
400	C	T	C	643	G	A	G	778	G	G	T
444	C	T	C	644	G	A	G	786	A	A	T
Các vị trí sai khác trong vùng <i>ITS</i> giữa ba loài <i>P. fargesii</i> , <i>P. polyphylla</i> var <i>chinensis</i> và <i>P. vietnamensis</i>											
2	T	C	C	255	C	T	C	592	A	A	C
10	A	G	G	260	T	C	C	596	G	G	C
23	C	G	G	278	C	C	T	600	G	G	C
34	A	A	T	316	T	A	C	603	G	G	A
52	G	G	C	317	A	T	T	608	C	C	G
58	G	A	A	322	T	T	A	611	G	G	A
64	G	G	A	353	T	T	A	612	A	T	T
77	C	T	C	358	G	G	T	616	C	C	T
88	A	A	T	389	C	C	T	621	G	G	C
111	G	G	A	431	G	C	C	622	G	G	C
115	C	C	T	443	C	C	T	639	G	G	C
124	G	A	A	477	C	T	C	644	C	C	A
134	A	A	C	478	T	C	T	645	C	T	C
135	C	C	A	505	T	T	C	646	A	A	C
138	T	T	C	536	C	T	C	648	T	T	C
142	G	G	C	562	T	T	C	653	T	T	C
144	C	C	G	566	G	G	C	658	T	C	C
145	G	T	T	573	A	A	C	662	A	A	T
155	C	C	G	575	G	G	C	671	C	C	G
170	A	A	G	576	G	G	T	672	T	T	C
187	G	T	T	578	G	G	C	675	G	C	C
192	T	A	A	580	G	G	C	680	C	C	T
193	T	A	A	581	T	T	C	691	T	T	C
236	G	G	A	582	G	G	A	692	A	A	T
237	T	C	C	589	A	A	C	695	C	C	T
254	C	C	T								

Ghi chú: ***P. far.***- loài *P. fargesii*; ***P. polyp.***- loài *P. polyphylla* var *chinensis*; ***P. vie.***-loài *P. vietnamensis*; (-): Khuyết nucleotide

Tỷ lệ bootstrap với 1000 lần lặp lại được hiển thị bên cạnh các nhánh trong cây phát sinh chủng loại. Phân tích liên quan đến 24 trình tự nucleotide. Tất cả các vị trí chứa

khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã được loại bỏ, sơ đồ cây thiết lập trên cơ sở sử dụng bộ dữ liệu cuối cùng (Hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh loài thuộc chi *Paris* thiết lập dựa trên trình tự nucleotide đoạn gen *matK* và vùng ITS theo phương pháp Maximum Likelihood trong MEGAX. *P.vietnamensis*-TH: loài *P.vietnamensis* thu tại Thanh Hóa; *P. fargesii*-LC: loài *P. fargesii* thu tại Lai Châu; *P. polyphylla*-LC: loài *P. polyphylla* thu tại Lạng Sơn; Các loài còn lại thuộc chi *Paris* có trình tự vùng ITS và đoạn gen *matK* công bố trên GenBank với mã số đính kèm. Sơ đồ cây thiết lập dựa trên trình tự nucleotide vùng ITS (A), đoạn gen *matK* (B) và sự kết hợp ITS và *matK* (C).

Kết quả phân tích ở hình 2A dựa trên trình tự ITS với 613 nucleotide trong bộ dữ liệu cuối cùng cho thấy, các loài thuộc chi *Paris* phân bố trong 2 nhánh, ở nhánh thứ nhất các loài phân bố trong hai nhóm, một nhóm gồm 18

loài, trong đó có loài *P.vietnamensis* thu tại Thanh Hóa và nhóm còn lại có 5 loài, trong đó có loài *P. fargesii* thu tại Lai Châu và loài *P. polyphylla* var *chinensis* thu tại Lạng Sơn. Nhánh thứ hai chỉ có một loài *P. dunniiana*

(JF977287). Kết quả phân tích tiến hóa dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* với 709 nucleotide trong bộ dữ liệu cuối cùng (Hình 2B) cho thấy các loài phân bố ở 14 nhánh, thứ nhất gồm 10 loài, trong đó ba *P.vietnamensis*, *P. fargesii*, *P. polyphylla* var *chinensis* thu tại Thanh Hóa, Lai Châu và Lạng Sơn. Nhánh thứ hai có hai loài và các nhánh còn lại mỗi nhánh chỉ có một loài. Kết hợp trình tự nucleotide của vùng gen ITS và đoạn gen *matK* với 1322 nucleotide trong bộ dữ liệu cuối (Hình 2C) cho thấy các loài phân bố ở 5 nhánh, trong đó một nhánh có 19 loài, một nhánh có 2 loài, còn lại 3 nhánh, mỗi nhánh có một loài. Loài *P. polyphylla* var *chinensis* thu tại Lạng Sơn phân bố ở nhóm 19 loài. Trong các nghiên cứu trước, sự kết hợp phân tích đặc điểm hình thái và vùng gen ITS đã sử dụng để định danh các mẫu *P. vietnamensis* thu tại Lào Cai (Việt Nam) [18], [19]. Nghiên cứu của Nguyễn Tiến Dũng và cộng sự (2018) đã cho thấy sử dụng vùng gen ITS có thể phân biệt loài *P. vietnamensis* với các loài thuộc chi *Paris* với độ tin cậy cao (giá trị bootstrap là 100) [18]. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, trong cả 3 cây phát sinh loài, tỷ lệ bootstrap ở nhiều nhánh thấp cho thấy độ tin cậy về kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại còn hạn chế. Do vậy, để có bức tranh toàn diện về lịch sử tiến hóa của các loài thuộc chi *Paris* phân bố ở Việt Nam cần phân tích số lượng mẫu lớn và sử dụng trình tự của cả hệ gen lục lạp kết hợp với một số gen phân loại trong hệ gen nhân.

4. Kết luận

Những dữ liệu phân tích kết hợp phương pháp hình thái so sánh với mã vạch DNA dựa trên trình tự vùng gen ITS và đoạn gen *matK* đã xác định được mẫu Bầy lá một hoa thu tại Lai Châu thuộc loài *P. fargesii*, mẫu Lạng Sơn là loài *P. polyphylla* var *chinensis* và mẫu Thanh Hóa là loài *P. vietnamensis*. Các cây phát sinh loài thuộc chi *Paris* đã được thiết lập dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS, đoạn gen *matK* và dựa trên sự kết hợp ITS và

matK đã cho thấy sơ bộ về sự tiến hóa các loài thuộc chi *Paris* trong phạm vi chỉ dựa trên trình tự vùng gen ITS và đoạn gen *matK*. Cần tiếp tục nghiên cứu và giải trình tự toàn bộ hệ gen lục lạp của các loài Bầy lá một hoa để có dữ liệu chính xác hơn về lịch sử tiến hóa của chi *Paris*.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo Việt Nam trong Nhiệm vụ Quỹ gen B2018-TNA-04-GEN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. M. Tariq, S. Paul, I. D. Bhatt, K. Chandrasekar, V. Pande, and S. K. Nandi, "Paris polyphylla Amith: An important high value Himalayan medicinal herb.," *Int. J. Adv. Res.*, vol. 4, pp. 850-857, 2016.
- [2]. T. L. Do, *Medicinal plants and medicines in Viet Nam*. Medical Publishing House, Vietnam, 2004.
- [3]. J. C. Wei, W. Y. Gao, X. D. Yan, Y. Wang, S. S. Jing, and P. G. Xiao, "Chemical constituents of plants from the genus Paris," *Chemistry & Biodiversity*, vol. 11, pp. 1277-1297, 2014.
- [4]. Y. Wang, W. Gao, X. Li, J. Wei, S. S. Jing, and P. Xiao, "Chemotaxonomic study of the genus Paris based on steroidal saponins," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 48, pp. 163-173, 2013.
- [5]. H. Li, "The phylogeny of the genus Paris L.," *Acta Botanica Yunnanica*, vol. 6, pp. 351-362, 1984.
- [6]. Q. N. Nguyen, T. H. Pham, V. T. Phan, and V. T. Hoang, "Taxonomy of the genus Paris L. (Melanthiaceae) in Vietnam," *Journal of Biology*, vol. 38, pp. 333-339, 2016.
- [7]. N. T. Dang, and T. B. Nguyen, *Vietnam Red List*. Publishing House for Science and Technology, 2007.
- [8]. CBOL Plant Working Group, "A DNA barcode for land plants," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 106, pp. 12794-12797, 2009.
- [9]. J. W. Kress, K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Wei, D. H. Janzen, "Use of DNA barcodes to identify flowering plants," *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, vol. 102, pp. 8369-8374, 2005.
- [10]. National Center for Biotechnology Information (USA). [Online]. Available:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
[Accessed June 25, 2020].
- [11]. Missouri Botanical Garden. [Online]. Available:
<http://www.tropicos.org/Name/18404296>.
[Accessed June 25, 2020].
- [12]. M. A. Saghai-Maroo, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard, "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics," *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 81, pp. 8014-8018, 1984.
- [13]. J. Yu, J. H. Xue, and S. L. Zhou, "Research ArticleNew universal matK primers for DNA barcoding angiosperms," *Journal of Systematics and Evolution*, vol. 49, pp. 176-181, 2011.
- [14]. Y. Sun, D. Z. Skinner, G. H. Liang, and S. H. Hulbert, "Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internaltranscribed spacers of nuclear ribosomal DNA," *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 89, pp. 26-32, 1994.
- [15]. S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, pp.1547-1549, 2018.
- [16]. K. Tamura, and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, pp. 512-526, 1993.
- [17]. J. Felsenstein, "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap," *Evolution*, vol. 39, pp. 783-791, 1985.
- [18]. T. D. Nguyen, Q. N. Nguyen, N. L. Tran, T. T. Nguyen, T. P. Ninh, T. T. N. Doan, T. T. H. Le, and N. L. Nguyen, "Morphological Characteristics and DNA Barcodes of Paris vietnamensis (Takht.) H.Li in Vietnam," *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 16, pp. 282-289, 2018.
- [19]. T. T. T. Vu, L. T. K. Vu, Q. H. Nguyen, K. V. Pham, D. T. Nguyen, L. T. N. Nguyen, and M .H. Chu, "Cytotoxic effects of steroidal glycosides isolated from the Paris vietnamensis plant on cancer cell lines and against bacterial strains," *Biotechnology & Biotechnological Equipment (B&BE)*, vol. 33, pp. 1516-1524, 2019.