

# Đánh giá khả năng phân loại của hai chỉ thị *rbcL* và *trnL* với một số mẫu Bách bộ (*Stemonaceae*) thu tại phía Bắc Việt Nam

Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1,2</sup>, Đào Quang Hà<sup>1</sup>, Lê Hồng Điệp<sup>3</sup>, Nguyễn Đăng Tôn<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam (VAST)

<sup>2</sup>Học viện KH&CN, VAST

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 2/3/2021; ngày chuyển phản biện 5/3/2021; ngày nhận phản biện 20/4/2021; ngày chấp nhận đăng 4/5/2021

## Tóm tắt:

Bách bộ là cây thuốc quý thuộc họ Bách bộ (*Stemonaceae*), có tính ứng dụng cao trong đời sống. Các chiết xuất từ lá hay rễ của loài cây này chứa nhiều hoạt chất sinh học, có nhiều giá trị về mặt dược lý nên có giá trị kinh tế. Tuy nhiên, việc nghiên cứu, đánh giá và phân loại dựa trên chỉ thị DNA cho Bách bộ ở Việt Nam vẫn chưa được tiến hành nhiều. Ở nghiên cứu này, các tác giả thực hiện phân tích hai chỉ thị mã vạch DNA (DNA barcode) gồm *rbcL* và *trnL* để có những đánh giá ở mức độ phân tử cho 4 mẫu Bách bộ thu được từ vùng núi miền Bắc Việt Nam, đồng thời so sánh với các trình tự tương đồng trong họ Bách bộ đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (GenBank). Bước đầu, các kết quả nghiên cứu khoảng cách di truyền và cây phát sinh chủng loại cho thấy mối quan hệ gần gũi giữa các mẫu Bách bộ nghiên cứu với trình tự của loài *Stemona tuberosa* Lour. Vùng gen *trnL* (1100 bp) cho thấy khả năng phân biệt các loài Bách bộ tốt hơn so với vùng gen *rbcL* (600 bp). Những kết quả này là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về loài Bách bộ và những loài cây thuốc quý khác, phục vụ cho nghiên cứu khoa học và thực tiễn như phân loại đánh giá đa dạng và bảo tồn.

**Từ khóa:** Bách bộ, mã vạch DNA, *rbcL*, *Stemona*, *trnL*.

**Chỉ số phân loại:** 1.6

## Mở đầu

Bách bộ (*Stemona tuberosa* Lour.), hay dây ba mươi, là một loài thảo mộc có hoa thuộc chi Bách bộ (*Stemona*), có giá trị kinh tế cũng như giá trị dược liệu cao. Cây được phân bố ở nhiều vùng trên thế giới như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản hay Đông Nam Á. Ở nước ta, loài cây này mọc hoang ở nhiều nơi, đặc biệt là vùng đồi núi, ở nhiều tỉnh như Hà Giang, Hòa Bình, Bắc Kạn... Vị thuốc này cũng dễ bị nhầm lẫn với một số loại dược liệu quý hiếm như Đảng sâm, Nhân sâm... Đây là một cây thuốc quý, thành phần giàu alkaloid, trong đó có những loại quan trọng như: croomine, stemonimine, tuberostemonine, neotuberostemonine và 2 dẫn xuất của 3,4-dehydrotocopherol [1], cùng với nhiều hoạt chất khác. Nhờ vào những đặc tính đó, Bách bộ đã được sử dụng rộng rãi, có nhiều công dụng trong chữa các bệnh liên quan tới hệ hô hấp như làm thuốc ho, chữa các chứng rối loạn hô hấp như viêm phế quản, ho gà hay lao phổi [2]. Hơn nữa, cây còn có thể được sử dụng như thuốc giun cho người hoặc vật nuôi; chống lại nhiều loại vi khuẩn, nấm [3] hay côn trùng có hại [4]. Do sự phong phú trong công dụng, Bách bộ đang chịu sự khai thác cao, dẫn tới tình trạng hiếm gặp ngoài tự nhiên, có nguy cơ đe dọa sự tồn tại [5]. Do đó, cần có những giải pháp cho công tác bảo tồn và

phát triển đối với cây thuốc quý này. Bên cạnh đó, việc sử dụng các loài trong chi Bách bộ chưa được xác định chính xác nguồn gốc do hình thái tương tự có thể dẫn tới việc hạ thấp giá trị dược liệu của chúng. Vì vậy, việc sưu tầm và định danh chính xác cho loài cây này là cần thiết.

Thông thường, việc phân loại sẽ dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa... Điều này có thể dẫn tới sai sót trong phân loại, khi những quan sát hình thái, các giai đoạn sinh trưởng, phát triển chưa đủ để định danh hoặc phân biệt loài. Hiện nay, phương pháp hiện đại để giải quyết khó khăn này là ứng dụng những hiểu biết trong sinh học phân tử để so sánh sự tiến hóa hay khác biệt giữa các loài bởi các đoạn DNA đặc trưng, được gọi là DNA barcoding. Đây là phương pháp đã và đang được sử dụng phổ biến trên thế giới để định danh hay nghiên cứu di truyền với ưu điểm nhanh chóng và độ chính xác cao, có ứng dụng lớn trong công tác đánh giá, phân loại mức độ đa dạng sinh học và bảo tồn nguồn gen của nhiều loài thực vật [6]. Phương pháp này đã được áp dụng cho nhiều đối tượng khác nhau, từ động, thực vật cho tới các loài vi sinh vật, dựa trên nguyên tắc so sánh một số trình tự DNA ở trong nhân, ty thể hay lục lạp, có tốc độ tiến hóa đủ lớn để phân loại ở quy mô các loài trong một chi hoặc giữa các chi. Một số mã vạch thường

\*Tác giả liên hệ: Email: dunguyen@igr.ac.vn

## Assessment of classification ability for *rbcL* and *trnL* barcode in some *Stemonaceae* samples collected from northern Vietnam

Thi Thu Hue Huynh<sup>1,2</sup>, Quang Ha Dao<sup>1</sup>, Hong Diep Le<sup>3</sup>, Dang Ton Nguyen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome Research,

Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, VAST

<sup>3</sup>University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 2 March 2021; accepted 4 May 2021

### Abstract:

*Stemona tuberosa* Lour. a precious medicinal plant that belongs to the *Stemonaceae* family, has high applicability to human life. Extracts from leaves or roots of this herb contain many bioactive compounds with great value for both medical application and economy. However, there is not enough data related to evaluation and classification for *Stemona* species in Vietnam. Therefore, in this study, the authors used the DNA barcoding method to evaluate at the molecular level for four samples of *Stemona tuberosa* Lour. in northern Vietnam compared with other reference sequences from other species in the *Stemonaceae* family from GenBank based on two chloroplast barcodes *rbcL* and *trnL*. The primary results of genetics distance analysis and phylogenetic trees showed the close relationship between the four studied samples with *Stemona tuberosa* Lour. (sequenced from GenBank). The *trnL* with 1100 bp in length also proves the better classification ability of *Stemona* than the *rbcL* region with 600 bp in length. These outcomes would be the first promising step for further studies about *Stemona* and other herbs, thus contributing to both scientific research and practical applicability demands as classification and conservation.

**Keywords:** DNA barcoding, *rbcL*, *Stemona*, *Stemona tuberosa* Lour., *trnL*.

**Classification number:** 1.6

được sử dụng ở thực vật được biết đến là *matK*, *rbcL* [6], *rpoC1*, *rpoB* [7], *trnH-psbA* [8] thuộc vùng gen lục lạp, hay ITS (internal transcribed spacer) ở vùng gen nhân. Trên thế giới, đã có những nghiên cứu về chỉ thị phân tử cho Bách bộ như nghiên cứu về mã vạch phân tử của loài *Stemona tuberosa* ở những vùng chỉ thị *trnH-psbA* [9] hay *trnL* [10]. Ở Việt Nam, cũng đã có những tìm hiểu về loài cây quý này, ví dụ như công bố của Đậu Xuân Đức và Võ Công Dũng (2017) [11] về tổng hợp alkaloid từ cây Bách bộ. Tuy nhiên, việc nghiên cứu phân tích các chỉ thị phân tử ở cây Bách bộ vẫn ở mức độ khá hạn chế.

Với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học phân tử hiện nay, việc khai thác thông tin loài thông qua mã vạch phân tử là rất cần thiết phục vụ cho nghiên cứu cơ bản cũng như các ứng dụng trong đời sống. Từ thực tiễn nêu trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Đánh giá khả năng phân loại của hai chỉ thị *rbcL* và *trnL* với một số mẫu Bách bộ (*Stemonaceae*) thu tại phía Bắc Việt Nam” để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa Bách bộ với những loài cùng chi đã được định danh trên GenBank, qua đó góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về phân tử, đồng thời làm cơ sở cho việc phân tích di truyền và ứng dụng vào thực tiễn, như nhận diện và bảo tồn sự phát triển các loài Bách bộ của Việt Nam.

### Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### Vật liệu

Mẫu Bách bộ sử dụng trong nghiên cứu là 4 mẫu lá phơi khô được thu thập từ các vườn dược liệu khác nhau ở Bắc Bộ, được ký hiệu lần lượt là A, B, C và D. Mẫu lá được lưu trữ và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ -80°C để đảm bảo chất lượng cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại gen và giải trình tự

DNA tổng số được tách chiết bằng cách nghiền các mẫu lá trong N<sub>2</sub> lỏng, sau đó thực hiện chiết DNA bằng phenol : chloroform theo phương pháp CTAB của Doyle và es [12] với một số cải tiến để phù hợp hơn với các mẫu. Các đoạn mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR khuếch đại gen *rbcL* dài khoảng 600 nucleotide và gen *trnL* dài khoảng 1100 nucleotide, được thiết kế dựa trên thông tin về trình tự gen từ GenBank (*trnL-trnF*: F: 5' TGGCGAAATTGGTAGACGC 3'; -R: 5' AACCATCTCGTCTCCTGA 3' và *rbcL*: F: 5' ATTTGAACTGGTGACACGAG 3'; R: 5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'). Phản ứng khuếch đại được tối ưu ở các điều kiện bao gồm 25 µl tổng thể tích, chứa 50 ng DNA tổng số, 2,5 µM mỗi primer, 1 unit Taq DNA Polymerase, 1 mM dNTPs và đệm tương ứng. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bao gồm 1 chu kỳ biến tính 95°C/3 phút, 35 chu kỳ (95°C/30 giây, 52°C/30 giây, 72°C/ phút) và bước tổng hợp cuối cùng 72°C/5 phút. Sản phẩm

PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, tinh sạch bằng bộ hóa chất GeneJET<sup>TM</sup> PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ), sau đó trình tự được xác định bằng hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger, với bộ kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Mỹ).

**Phân tích so sánh kết quả trình tự nucleotide**

Các trình tự DNA thu được sau khi giải trình tự được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit [13], trong đó so sánh với các trình tự tương đồng trong chi Bách bộ (*Stemona*), trình tự loài *Croomia heterosepala* (mã số MH191379.1) thuộc một chi khác trong họ Bách bộ được sử dụng làm loài ngoài (bảng 1). Khoảng cách di truyền theo từng cặp mẫu và cây phát sinh chủng loại được xây dựng bởi phương pháp Maximum likelihood bằng phần mềm MEGA-X [14] với giá trị bootstrap 1000.

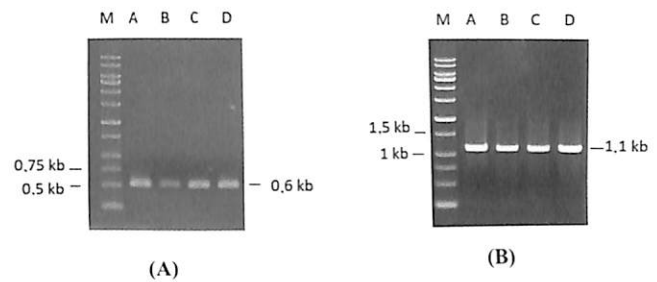
**Bảng 1.** Thông tin về các trình tự được sử dụng để so sánh trong họ Bách bộ.

TT	Tên loài	Vùng DNA barcode	Mã số Genbank (NCBI)
1	<i>Stemona tuberosa</i>	<i>rbcL</i>	MW246829.1
		<i>trnL</i>	MW246829.1
2	<i>Stemona sessilifolia</i>	<i>rbcL</i>	MW023922.2
		<i>trnL</i>	MW023922.2
3	<i>Stemona kerrii</i>	<i>rbcL</i>	MN853949.1
		<i>trnL</i>	FJ194466.1
4	<i>Stemona parviflora</i>	<i>rbcL</i>	MN853948.1
		<i>trnL</i>	AB490133.1
5	<i>Stemona japonica</i>	<i>rbcL</i>	MH191381.1
		<i>trnL</i>	MH191381.1
6	<i>Stemona mairei</i>	<i>rbcL</i>	MH191382.1
		<i>trnL</i>	MH191382.1
7	<i>Stemona javanica</i>	<i>rbcL</i>	MN853938.1
		<i>trnL</i>	FJ194465.1
8	<i>Croomia heterosepala</i>	<i>rbcL</i>	MH191379.1
		<i>trnL</i>	MH191379.1

**Kết quả và thảo luận**

**Kết quả tách chiết DNA tổng số và khuếch đại PCR**

Trong nghiên cứu này, DNA tổng số của 4 mẫu Bách bộ được tách chiết và tinh sạch có chất lượng đảm bảo cho các bước khuếch đại PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% cho thấy, các cặp mồi *rbcL* và *trnL* đều được khuếch đại thành công, các băng sáng rõ, chỉ xuất hiện một băng vạch duy nhất với kích thước như dự đoán khoảng 0,6 và 1,1 kb lần lượt với hai vùng gen *rbcL* và *trnL* (hình 1), sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và sử dụng cho bước phân tích xác định trình tự gen tiếp theo.



**Hình 1.** Kết quả sản phẩm PCR khuếch đại gen *rbcL* (A) và *trnL* (B). M: thang DNA chuẩn (marker 1 kb plus); A, B, C, D: sản phẩm PCR tương ứng của các mẫu nghiên cứu.

**Kết quả phân tích trình tự, tính toán khoảng cách tiến hóa và cây phát sinh chủng loại**

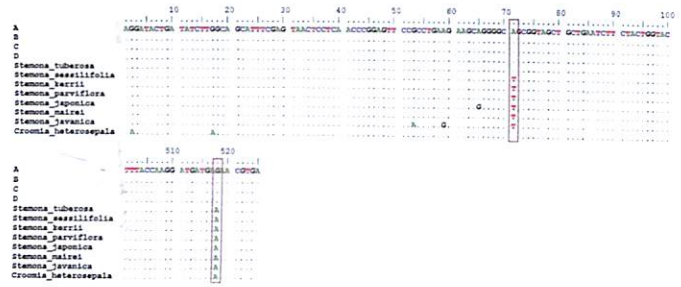
Các trình tự gen sau khi khuếch đại và giải trình tự cho kết quả đúng kích thước tính toán, vùng nhiễu ở hai đầu của các đoạn trình tự sau đó được tiến hành loại bỏ chỉ giữ lại vùng trình tự có tín hiệu tốt, do vậy độ dài đoạn *rbcL* được sử dụng phân tích là khoảng 545 bp và độ dài đoạn *trnL* khoảng 941 bp, được so sánh với các trình tự tương ứng của các loài trong chi Bách bộ đã được công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST.

Các loài được so sánh bao gồm 7 loài thuộc chi *Stemona* và 1 loài ngoài nhóm là *Croomia heterosepala* (bảng 1). Qua phân tích cho thấy, cả 2 chi thị trên đều chứa một số nucleotide khác biệt giữa các mẫu nghiên cứu với các loài tham chiếu, đặc biệt là ở mã vạch *trnL*. Những sai khác này đều là các thay đổi nằm trên vùng không mã hóa cho tRNA là vùng intron và vùng xen kẽ (intergenic spacer). Trên vùng mã hóa tRNA của mã vạch này không có sự khác biệt nào giữa các mẫu cũng như các trình tự cùng chi *Stemona* (bảng 2).

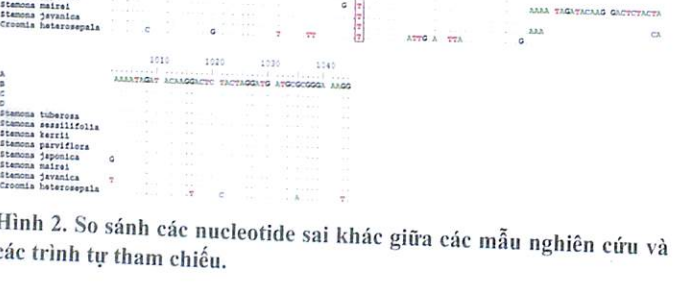
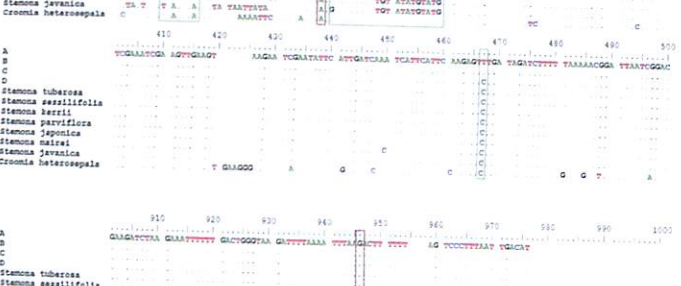
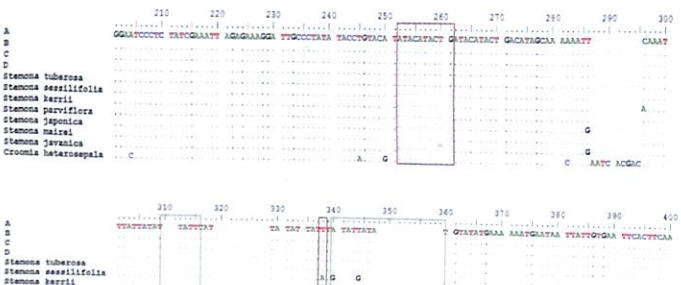
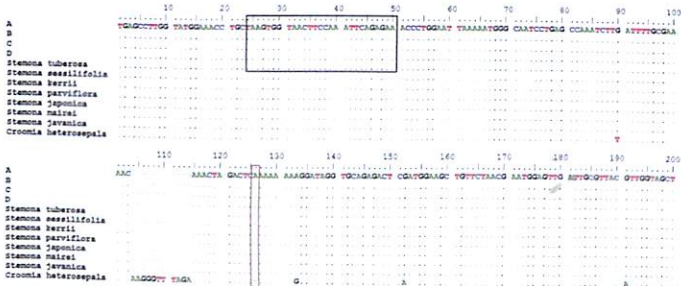
Kết quả so sánh trình tự các chi thị cho thấy, gen *rbcL* có độ bảo thủ khá lớn khi không có nhiều sự thay đổi giữa các mẫu thu thập với các loài khác nhau trong chi Bách bộ, tuy nhiên có hai sự khác biệt đặc trưng cho các mẫu Bách bộ Việt Nam ở vị trí nucleotide thứ 518 (G>A) và một sự khác biệt cho loài *S. tuberosa* ở vị trí 71 (A>T). Ở vùng *trnL*, xuất hiện nhiều hơn những điểm đa hình, trong đó vị trí 126 (insert A), 252-261 (insert ATACATACTG), 338 (T>A) hay 348-359 (indel TGTATATGTATG) là những thay đổi về nucleotide đặc trưng cho các mẫu thuộc loài *S. tuberosa* và có sự khác biệt với các trình tự thuộc các loài khác trong chi này. Ngoài ra, còn tồn tại một số sai khác đơn lẻ giữa các mẫu so sánh (vị trí 25-49, 466) hay sai khác không đặc trưng hoàn toàn (vị trí 340-359). Sự đa hình nucleotide của các trình tự được biểu diễn đầy đủ lần lượt cho hai chi thị ở hình 2. Qua phân tích, hai chi thị đều tồn tại những vị trí đa hình để phân biệt với các loài khác trong chi *Stemona* và bước đầu cho thấy có hiệu quả trong phân tích đánh giá mối

quan hệ phát sinh loài ở cây Bách bộ, tuy vậy vùng gen *trnL* (1100 bp) cho thấy phát hiện được nhiều vị trí nucleotide sai khác hơn so với vùng gen *rbcL* (600 bp).

a) *rbcL*



b) *trnL*



Hình 2. So sánh các nucleotide sai khác giữa các mẫu nghiên cứu và các trình tự tham chiếu.

Bảng 2. Khoảng cách di truyền theo cặp mẫu (genetic distance pairwise) giữa các mẫu Bách bộ dựa trên trình tự chỉ thị a. *rbcL*, b. *trnL* và c. *rbcL*+ *trnL*.

a. *rbcL*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.A	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.001924	0.002613	0.002613	0.002613	0.003294	0.003737	0.003368	0.006817
2.B	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.001924	0.002613	0.002613	0.002613	0.003294	0.003737	0.003368	0.006817
3.C	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.001924	0.002613	0.002613	0.002613	0.003294	0.003737	0.003368	0.006817
4.D	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.001924	0.002613	0.002613	0.002613	0.003294	0.003737	0.003368	0.006817
5. <i>Stemona tuberosa</i>	0.001905	0.001905	0.001905	0.001905	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
6. <i>Stemona sessilifolia</i>	0.003810	0.003810	0.003810	0.003810	0.001905	0.00000	0.00000	0.00000	0.001908	0.002613	0.004839	0.005847
7. <i>Stemona kerrii</i>	0.003810	0.003810	0.003810	0.003810	0.001905	0.00000	0.00000	0.00000	0.001908	0.002613	0.004839	0.005847
8. <i>Stemona parviflora</i>	0.003810	0.003810	0.003810	0.003810	0.001905	0.00000	0.00000	0.00000	0.001908	0.002613	0.004839	0.005847
9. <i>Stemona japonica</i>	0.003714	0.003714	0.003714	0.003714	0.001905	0.00000	0.00000	0.00000	0.001905	0.002613	0.004839	0.005847
10. <i>Stemona mairei</i>	0.007619	0.007619	0.007619	0.007619	0.003714	0.00000	0.00000	0.00000	0.003714	0.004839	0.005847	0.006817
11. <i>Stemona javanica</i>	0.015238	0.015238	0.015238	0.015238	0.007619	0.003714	0.003714	0.003714	0.007619	0.011429	0.011429	0.006817
12. <i>Croomia heterosepala</i>	0.024762	0.024762	0.024762	0.024762	0.015238	0.007619	0.007619	0.007619	0.024762	0.024762	0.024762	0.025271

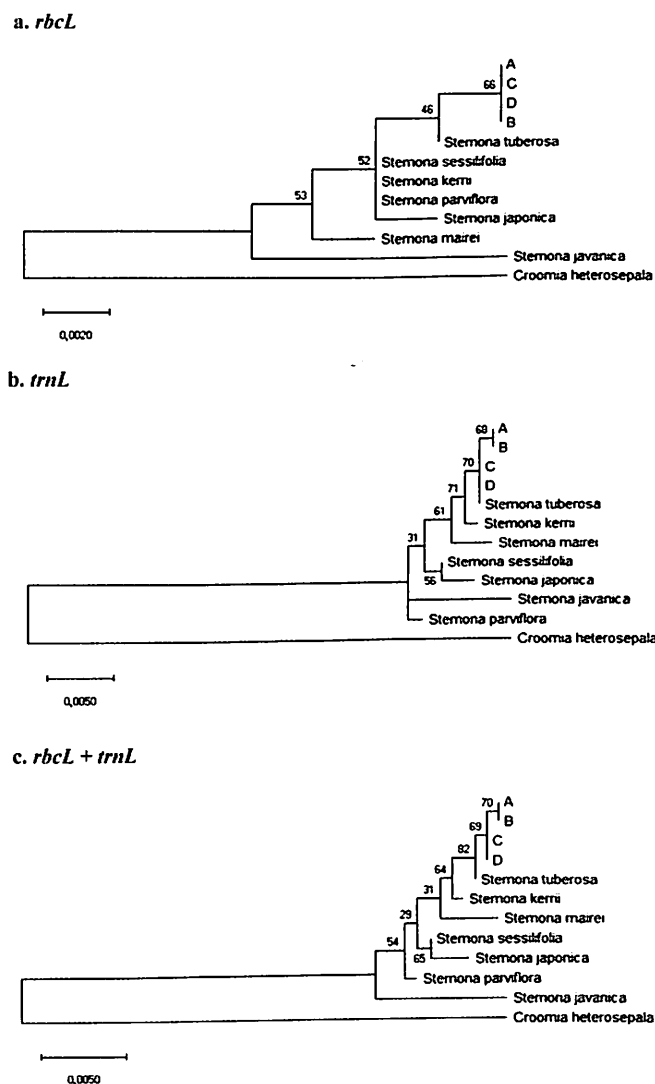
b. *trnL*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.A	0.00000	0.00000	0.001090	0.001089	0.001089	0.002549	0.001855	0.002640	0.002593	0.002661	0.003354	0.008100
2.B	0.00000	0.00000	0.001091	0.001089	0.001091	0.002552	0.001859	0.002648	0.002597	0.002667	0.003358	0.008116
3.C	0.001066	0.001067	0.000000	0.000000	0.000000	0.002343	0.001524	0.002593	0.002437	0.002437	0.003161	0.008100
4.D	0.001065	0.001065	0.000000	0.000000	0.000000	0.002341	0.001523	0.002591	0.002434	0.002434	0.003160	0.008087
5. <i>Stemona tuberosa</i>	0.001065	0.001067	0.000000	0.000000	0.000000	0.002341	0.001523	0.002591	0.002434	0.002434	0.003160	0.008087
6. <i>Stemona sessilifolia</i>	0.006479	0.006466	0.002405	0.002405	0.002405	0.000000	0.000000	0.000000	0.002431	0.002431	0.003080	0.008080
7. <i>Stemona kerrii</i>	0.003233	0.003240	0.002160	0.002157	0.002155	0.003405	0.000000	0.000000	0.001857	0.001857	0.002586	0.008258
8. <i>Stemona parviflora</i>	0.007034	0.007030	0.006057	0.006057	0.006055	0.008543	0.000000	0.000000	0.002430	0.002430	0.003195	0.008055
9. <i>Stemona japonica</i>	0.006539	0.006549	0.007568	0.007559	0.007559	0.006539	0.000000	0.000000	0.002396	0.002396	0.003001	0.008182
10. <i>Stemona mairei</i>	0.006459	0.006471	0.005471	0.005471	0.005471	0.007559	0.000000	0.000000	0.002396	0.002396	0.003001	0.008182
11. <i>Stemona javanica</i>	0.010858	0.010870	0.009783	0.009772	0.009772	0.008705	0.000000	0.000000	0.002784	0.002784	0.003389	0.008285
12. <i>Croomia heterosepala</i>	0.061742	0.061878	0.060773	0.060705	0.060639	0.061874	0.060706	0.061111	0.060877	0.061742	0.066225	0.008375

c. *rbcL* + *trnL*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.A	0.00000	0.00000	0.002712	0.002712	0.000971	0.001978	0.001604	0.002141	0.002333	0.002991	0.005756	0.009756
2.B	0.00000	0.00000	0.002712	0.002712	0.000971	0.001978	0.001606	0.002144	0.002334	0.002992	0.005763	0.009763
3.C	0.000684	0.000684	0.000000	0.000000	0.000079	0.001832	0.001423	0.002006	0.002007	0.002121	0.002883	0.005706
4.D	0.000683	0.000683	0.000000	0.000000	0.000079	0.001832	0.001422	0.002005	0.002005	0.002119	0.002881	0.005705
5. <i>Stemona tuberosa</i>	0.001066	0.001068	0.000684	0.000684	0.000678	0.004435	0.001508	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868
6. <i>Stemona sessilifolia</i>	0.006341	0.006350	0.002956	0.002956	0.002955	0.004448	0.001508	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868
7. <i>Stemona kerrii</i>	0.003441	0.003446	0.002273	0.002273	0.002265	0.003448	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868	0.005848
8. <i>Stemona parviflora</i>	0.007584	0.007586	0.006587	0.006587	0.006587	0.004448	0.001508	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868
9. <i>Stemona japonica</i>	0.007581	0.007586	0.006587	0.006587	0.006587	0.004448	0.001508	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868
10. <i>Stemona mairei</i>	0.006479	0.006487	0.005471	0.005471	0.005471	0.004448	0.001508	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868
11. <i>Stemona javanica</i>	0.012448	0.012457	0.011785	0.011785	0.011785	0.009772	0.001508	0.001153	0.001198	0.001896	0.002554	0.005868
12. <i>Croomia heterosepala</i>	0.048154	0.048232	0.047532	0.047519	0.048728	0.048151	0.047519	0.047719	0.050244	0.048154	0.052411	0.008121

Dựa trên sự so sánh trình tự ở mẫu nghiên cứu với những trình tự trong cùng chi khai thác từ GenBank, chúng tôi đã tính toán khoảng cách di truyền và xây dựng cây phả hệ. Việc kết hợp các chỉ thị để tăng hiệu quả phân loại đã được thực hiện ở một số nghiên cứu về thực vật trước đây [15]. Khoảng cách tiến hóa giữa các đơn vị phân loại (taxon) được tính toán dựa trên mô hình p-distance và giả sử tỷ lệ thay đổi là đồng nhất giữa các vị trí. Chỉ số biến thiên trung bình của khoảng cách di truyền trong chi *Stemona* ở các chỉ thị dao động trong khoảng 0,0018-0,0149, 0,0005-0,0103 và 0,0013-0,0123, lần lượt cho *rbcL*, *trnL* và khi kết hợp cả hai vùng ở các loài thuộc chi *Stemona*. Kết quả từ số liệu khoảng cách di truyền ở bảng 2 cũng một lần nữa khẳng định các mẫu quan tâm có quan hệ gần gũi nhất với loài *S. tuberosa* khi khoảng cách giữa các mẫu luôn gần nhất với loài này. Ngoài ra, kết quả cây phả hệ của cả ba trường hợp cũng đều chỉ ra mối quan hệ gần gũi giữa các mẫu với trình tự của loài *S. tuberosa* so với một số loài khác trong cùng chi. Đáng lưu ý, chỉ số bootstrap cao hơn khi kết hợp các mã vạch cho thấy kết quả đáng tin cậy hơn so với kết quả đơn lẻ từ mỗi trình tự, phù hợp với một số nghiên cứu trước đây cũng sử dụng phương pháp kết hợp này [15]. Chỉ số bootstrap không quá cao (hình 3) có thể lý giải do số lượng mẫu còn ít, khiến kết quả phân tích phát sinh loài còn tồn tại những hạn chế. Tuy nhiên, việc kết hợp cả hai chỉ thị để phân tích cũng giúp cho độ tin cậy của cây phân loại được cải thiện.



**Hình 3.** Biểu đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên các trình tự nucleotide các vùng gen nghiên cứu được xây dựng bằng phương pháp Maximum likelihood ở chỉ thị a. *rbcL*, b. *trnL* và c. *rbcL+trnL*.

Việc nghiên cứu Bách bộ bằng phương pháp chỉ thị mã vạch DNA là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về nghiên cứu phân tử của loài này cũng như ứng dụng cho những hệ gen dược liệu quý khác, khi hiện tại chưa có nhiều công bố theo hướng này cho cây Bách bộ ở nước ta. Tuy nhiên trên thế giới, vào năm 2006, Jiang và cs [10] sau khi phân loại một số hợp chất alkaloid của *S. tuberosa* đã phân tích trình tự *trnL* để khẳng định quan hệ gần gũi giữa *Stemona* và *Croomia*, vốn là hai nhánh của họ *Stemonaceae*. Sau đó, theo nghiên cứu của Vongsak và cs (2008) [9], vùng gen *trnH-psbA* của Bách bộ (*S. tuberosa*) Thái Lan được sử dụng cho phân biệt loài ở mức độ phân tử để ứng dụng cho mục đích nghiên cứu và phân loại. Trong một công bố khác, nhóm các nhà khoa học Trung Quốc đã phân tích 4 vùng DNA lục lạp một số loài thuộc lớp *Stemona* này, bao gồm *trnL-trnF*, *petB-petD*, *trnH-psbA* và *trnK-rps16* [16]. Như

vậy, các kết quả nghiên cứu trên các mẫu Bách bộ thu thập từ một số địa điểm thuộc vùng núi phía Bắc Việt Nam đã bổ sung thông tin ở mức độ phân tử và ứng dụng mã vạch *rbcL* và *trnL* phục vụ định danh cho nhóm loài này, hỗ trợ cho công tác sử dụng, bảo tồn và khai thác bền vững loài dược liệu quý này của Việt Nam.

### Kết luận

Qua kết quả phân tích hai vùng chỉ thị mã vạch DNA là *rbcL* và *trnL*, quan hệ của các mẫu Bách bộ thu thập ở phía Bắc Việt Nam với một số loài thuộc chi *Stemona* đã được xác định. Các mẫu Bách bộ nghiên cứu có quan hệ gần và tương đồng cao với loài *S. tuberosa* Lour. khi dựa trên sự kết hợp hai chỉ thị *rbcL* và *trnL*. Trình tự nucleotide kết hợp hai vùng chỉ thị mã vạch trên có thể là ứng viên mã vạch DNA cho định danh loài *S. tuberosa* Lour.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G. Chen, et al. (2017), "Morphological and chemical variation of *Stemona tuberosa* from southern China - Evidence for heterogeneity of this medicinal plant species", *Plant Biol. (Stuttg)*, **19**, pp.835-842.
- [2] Y.T. Xu, et al. (2006), "Antitussive effects of *Stemona tuberosa* with different chemical profiles", *Journal of Ethnopharmacology*, **108**, pp.46-53.
- [3] L.G. Lin, et al. (2008), "Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberosa*", *Phytochemistry*, **69**, pp.457-463.
- [4] H. Greger (2006), "Structural relationships, distribution and biological activities of stemona alkaloids", *Planta Med.*, **72**, pp.99-113.
- [5] G. Chen, et al. (2018), "Conserving threatened widespread species: a case study using a traditional medicinal plant in Asia", *Biodiversity and Conservation*, **28**, pp.213-227.
- [6] CBOL Plant Working Group (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, pp.12794-12797.
- [7] M.W. Chase, et al. (2007), "A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants", *Taxon*, **56**, pp.295-299.
- [8] W.J. Kress, et al. (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, pp.8369-8374.
- [9] B. Vongsak, et al. (2008), "Sequencing analysis of the medicinal plant *Stemona tuberosa* and five related species existing in Thailand based on *trnH-psbA* chloroplast DNA", *Planta Med.*, **74**, pp.1764-1766.
- [10] R.W. Jiang, et al. (2006), "Isolation and chemotaxonomic significance of tuberostemospironine-type alkaloids from *Stemona tuberosa*", *Phytochemistry*, **67**, pp.52-57.
- [11] D.X. Duc, V.C. Dung (2017), "Synthesis of (5R\*, 6R\*)-6-(3-(tert-butylidimethylsilyloxy) prop-1-ynyl)-5-hydroxypiperidin-2-one", *Journal of Science and Technology*, **55**, pp.202-208.
- [12] J.J. Doyle, et al. (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, **12**, pp.13-15.
- [13] T.A. Hall (1999), "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp.95-98.
- [14] S. Kumar, et al. (2018), "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, **35**, pp.1547-1549.
- [15] E. Pennisi (2007), "Wanted: a barcode for plants", *Science*, **318**, pp.190-191.
- [16] L.L. Fan, et al. (2009), "Molecular analysis of *Stemona* plants in China based on sequences of four chloroplast DNA regions", *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, pp.1439-1446.