

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ *ITS* CỦA LAN MỘT LÁ (*Nervilia fordii* (Hance) Schlechter) THU THẬP TẠI CAO BẰNG VÀ THÁI NGUYÊN

Nguyễn Thị Tâm^{1,*}, Trần Thị Thùy Linh²

Tóm tắt: Lan một lá (*Nervilia fordii* (Hance) Schlechter) thuộc chi Lan một lá (*Nervilia*), họ Lan (*Orchidaceae*) chứa terpenoids, flavonoid, axit amin và một số loại dầu dễ bay hơi. Các hợp chất này có hoạt tính dược lý chống viêm, chống virus và giảm đau, giảm ho, hen suyễn và viêm phế quản mãn tính. Sử dụng phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái, kết hợp với phân tích trình tự *ITS* của 2 mẫu Lan một lá thu thập tại Cao Bằng và Thái Nguyên cho thấy, các mẫu đều thuộc loài *N. fordii* (Hance) Schlechter. Hình thái của hai mẫu Lan một lá LML-01-TN thu tại Thái Nguyên và LML-02-CB thu tại Cao Bằng là giống nhau. Trình tự vùng *ITS* cả hai mẫu Lan một lá thu thập tại Cao Bằng và Thái Nguyên có hệ số tương đồng 100% so với trình tự vùng *ITS* của *N. fordii* (Hance) Schlechter mang mã số JX011630 trên GenBank.

Từ khóa: *Nervilia fordii*, hình thái, *ITS*, Lan một lá, Cao Bằng, Thái Nguyên.

1. MỞ ĐẦU

Lan một lá (*Nervilia fordii* (Hance) Schlechter) thuộc chi *Nervilia*, họ Lan (*Orchidaceae*) được phân bố rải rác ở các tỉnh miền núi phía Bắc. Lan một lá thường mọc ở kẽ núi đá, nơi thấp và ẩm ướt, dưới bóng cây to hoặc dưới đám cỏ dày đặc. Lan một lá chứa terpenoids, flavonoid, axit amin và một số loại dầu dễ bay hơi. Các hợp chất này có hoạt tính dược lý chống viêm, chống vi rút và giảm đau, giảm ho, hen suyễn và viêm phế quản mãn tính. Do nạn chặt phá rừng và bị khai thác để bán làm thuốc khiến cho loài cây này trở nên quý hiếm và có nguy cơ bị đe dọa tuyệt chủng. Lan một lá được ghi vào danh sách các loài cây cần được bảo vệ trong “Sách Đỏ Việt Nam” của Bộ Khoa học và Công nghệ (2007).

Gần đây, trong các nghiên cứu phân loại thực vật ở mức độ loài, vùng *ITS* (Internal transcribed spacer) là locus được giải mã phổ biến. Ở mức độ loài, vùng *ITS* có độ đa dạng cao (khoảng 13,6% giữa các loài gần gũi). Vùng gen *ITS* bao gồm 2 locus riêng biệt là *ITS1* và *ITS2* và được nối với nhau qua locus 5.8S. Nghiên cứu của Huang et al. (2012) cho thấy, phương pháp nhận dạng mới đối với *Nervilia fordii* là thông qua phân tích trình tự *ITS2*. *ITS2* là một chỉ thị sinh học hiệu quả trong việc nhận dạng *Nervilia fordii*. Huang et al. (2013) đã nghiên cứu 4 mã vạch DNA phổ biến là *ITS2*, *rbcL*, *matK* và *LSUD1-D3* để xác định loài *Nervilia fordii* và sáu loài trong chi *Nervilia*. Kết quả cho thấy, *ITS2* có khả năng phân biệt các loài trong chi *Nervilia* đứng sau *matK*, tiếp theo là *rbcL* và *LSU D1-D3*.

¹Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

²Trường Trung học phổ thông Gang thép Thái Nguyên

*Email: tamnt@tnue.edu.vn

Cho đến nay, ở Việt Nam vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu đặc điểm trình tự *ITS* của Lan một lá *N. fordii* (Hance) Schlechter. Nghiên cứu này đề cập đến một số đặc điểm hình thái và trình tự vùng *ITS* cây Lan một lá với mục tiêu góp phần tư liệu hóa nguồn gen của loại cây này trong xây dựng mã vạch DNA.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: Mẫu cây Lan một lá thu thập ở hai khu vực là xã Bộc Nhiêu, huyện Định Hóa, tỉnh Thái Nguyên (LML-01-TN) và xã Bình Dương, huyện Hòa An, tỉnh Cao Bằng (LML-02-CB) được dùng làm vật liệu nghiên cứu.

Phương pháp xác định tên khoa học: Để xác định tên khoa học cây Lan một lá, chúng tôi sử dụng phương pháp so sánh hình thái. Căn cứ vào đặc điểm của cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản, đối chiếu với mẫu type chuẩn và các tài liệu chuyên khảo về họ Lan (*Orchidaceae*) của Phạm Hoàng Hộ (2003), Chen et al. (2009) và Bộ Khoa học và Công nghệ (2007) để định loại.

Phương pháp xác định trình tự vùng *ITS*: DNA tổng số được tách chiết bằng Kit GeneJET Plant Genomic DNA Purification (K0791). DNA tổng số sau đó được kiểm tra bằng điện di và bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo. Vùng *ITS* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu (*ITS-F*, *ITS-R*) công bố trên website: <http://www.kew.org/barcoding/protocols.html> và có trình tự:

ITS-F 5' ATGCGATACTTGGTGAAT 3'

ITS-R 5' GACGCTTCTCCAGACTACAAT 3'

Kích thước đoạn DNA dự kiến khoảng 500bp.

Tổng thể tích mỗi phản ứng PCR là 15 μl , bao gồm: 7,5 μl PCR Master Mix 2X, 0,5 μl mồi xuôi 10 pmol/ μl , 0,5 μl mồi ngược 10 pmol/ μl , 0,5 μl DNA khuôn 50-100 ng/ μl , 6 μl nước cất khử ion vô trùng. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR eppendorf (Đức). Chu trình nhiệt: Biến tính 95°C 5 phút, 35 chu kỳ [95°C 30 giây, 56°C 30 giây, 72°C 30 giây], 72°C 10 phút và lưu giữ ở 4°C . Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% trong đệm TAE 1X. Bản gel được nhuộm trong ethidium bromide 3-5 phút, soi dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit GenJET PCR Purification theo hướng dẫn của hãng Thermo Scientific. Trình tự nucleotit vùng *ITS* được xác định bằng máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu (*ITS-F*, *ITS-R*). Sau đó được phân tích, so sánh bằng các chương trình Bioedit, BLAST, DNASTAR.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm hình thái của mẫu Lan một lá thu thập tại Thái Nguyên và Cao Bằng

Để xác định tên khoa học, chúng tôi đã mô tả chi tiết các đặc điểm hình thái của cả cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản của 2 mẫu thu tại Thái Nguyên và Cao Bằng (Bảng 1). Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, đối chiếu với mẫu type chuẩn và các tài liệu chuyên khảo về họ *Orchidaceae* của Phạm Hoàng Hộ (2003), Chen et al. (2009), Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), chúng tôi kết luận được rằng, cả hai mẫu thu ở Thái Nguyên và

Cao Bằng có hình thái hoàn toàn giống nhau và đều là loài Lan một lá với tên khoa học là *N. fordii* (Hance) Schlechter.

Bảng 1. Các đặc điểm hình thái của mẫu cây Lan một lá thu tại Thái Nguyên và Cao Bằng

Đặc điểm hình thái	Mẫu LML-01-TN thu tại Thái Nguyên	Mẫu LML-02-C B thu tại Cao Bằng
Chiều cao cây	10 – 20 cm	10 – 20 cm
Số lượng củ/1 cây	1 (số ít cây có 2 củ)	1 (số ít cây có 2 củ)
Màu sắc củ	Trắng xám	Trắng xám
Hình dạng và đường kính củ	Tròn hoặc bầu dục 0,7 - 1,2 cm	Tròn hoặc bầu dục 0,7 - 1,2 cm
Số đốt phần trên củ	3-5	3-5
Hình dạng lá	Tim rộng	Tim rộng
Đường kính lá	3-6 cm	3-6 cm
Màu sắc của lá (mặt trên và mặt dưới)	Mặt trên màu xanh nhạt, mặt dưới màu hơi tím	Mặt trên màu xanh nhạt, mặt dưới màu hơi tím
Kích thước cuống lá	9 - 18 cm	8 - 18 cm
Kiểu gân lá	Hình chân vịt tỏa đều từ góc lá đến mép lá	Hình chân vịt tỏa đều từ góc lá đến mép lá
Đặc điểm mép lá	Uốn lượn	Uốn lượn
Kích thước của cụm hoa	13-18 cm	13-18 cm
Màu sắc hoa	Trắng có đốm tím hồng	Trắng có đốm tím hồng
Đặc điểm của cánh hoa	môi 3 thùy, thùy nhọn tròn, có lông	môi 3 thùy, thùy nhọn tròn, có lông
Quả	Nang, hình thoi có múi	Nang, hình thoi có múi



a



b



c

Hình 1. Ảnh chụp cây Lan một lá (*N. fordii* (Hance) Schlechter) (a) và hình thái thân, rễ, lá, củ (b, c)

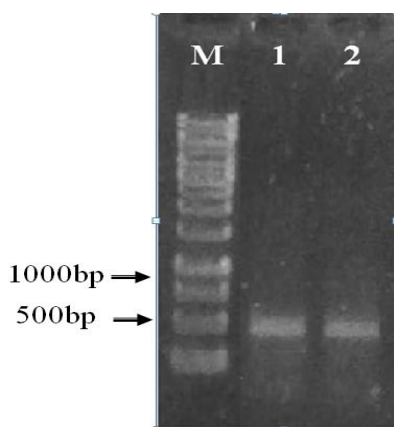
Đặc điểm hình thái Lan một lá (*N. fordii* (Hance) Schlechter): Cây thân thảo, chiều cao từ 10 - 20 cm. Mỗi cây có 1-2 củ; củ có màu trắng xám, hình tròn, đường kính từ 0,7 - 1,2 cm, phần trên củ có 3 - 5 đốt, trên đó có một số rễ ngắn và một số rễ dài; củ mới được hình thành ở đầu tận cùng của rễ dài. Mỗi cây chỉ có 1 lá; lá có dạng hình tim, đường kính từ 3 - 6 cm, có màu xanh nhạt ở cả 2 mặt; cuống lá dài từ 8 - 18 cm; gân lá hình chân vịt

tỏa đều từ gốc lá đến mép lá; mép lá uốn lượn. Hoa mọc thành chùm, màu trắng có đốm tím hồng, xuất hiện trước khi mọc lá. Lá đài và cánh hoa giống nhau. Cánh mỗi 3 thùy, thùy nhọn tròn, có lông dày. Quả nang, hình thoi có múi.

3.2. Đặc điểm trình tự vùng ITS phân lập từ 2 mẫu Lan một lá thu thập tại Thái Nguyên và Cao Bằng

Kết quả nhân vùng ITS bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu ITS-F/ITS-R từ DNA hệ gen của hai mẫu LML-01-TN và LML-02-CB được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy, cả 2 mẫu Lan một lá đều xuất hiện 1 băng DNA với kích thước ước tính khoảng 500bp (Hình 2).

Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được tinh sạch và được xác định trình tự trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.



Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân vùng ITS (M: DNA marker; 1: vùng ITS từ mẫu LML-01-TN; 2: vùng ITS từ mẫu LML-02-CB)

Kết quả xác định trình tự vùng ITS từ mẫu LML-01-TN và mẫu LML-02-CB đều có 450 nucleotit. Số lượng, tỉ lệ từng loại nucleotit thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Số lượng và tỉ lệ từng loại nucleotit của vùng ITS từ mẫu LML-01-TN và mẫu LML-02-CB

Nucleotit	ITS-02-CB		ITS-01-TN	
	Số lượng	Tỉ lệ %	Số lượng	Tỉ lệ %
A	84	18,67	85	18,89
C	131	29,11	132	29,33
G	164	36,44	161	35,78
T	71	15,78	72	16,00

Tiến hành phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng ITS mẫu Lan một lá LML-01-TN và LML-02-CB với 13 trình tự vùng ITS trên GenBank bằng chương trình so sánh tương đồng BLAST trong NCBI chúng tôi thu được kết quả Hình 3 và Hình 4.

Kết quả cho thấy, trình tự vùng ITS phân lập từ 2 mẫu Lan một lá LML-01-TN và LML-02-CB có độ tương đồng trên 90% so với 13 trình tự vùng ITS trên GenBank của các mẫu thuộc chi *Nervilia*. Như vậy, kết quả so sánh bằng BLAST trong NCBI đã khẳng định trình tự phân lập từ mẫu Lan một lá LML-01-TN và LML-02-CB là vùng ITS. Kết quả so sánh trình tự ITS cho biết 2 mẫu nghiên cứu đều thuộc chi *Nervilia*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Nervilia fordii voucher QTK120315NF11 internal transcribed spacer 2, partial sequence	448	448	53%	1e-121	100.00%	JX011630.1
Nervilia aragoana voucher NAGX01 internal transcribed spacer 2, partial sequence	442	442	53%	5e-120	99.59%	JX865491.1
Nervilia fordii voucher QTK120315NF12 internal transcribed spacer 2, partial sequence	442	442	53%	5e-120	99.59%	JX011631.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0883 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	636	636	77%	2e-178	99.43%	JN114615.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0885 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	632	632	77%	3e-177	99.43%	JN114617.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0884 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	630	630	77%	1e-176	99.43%	JN114616.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0881 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	616	616	75%	3e-172	99.41%	JN114613.1
Nervilia mekongensis isolate Sando02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	597	597	73%	1e-166	99.39%	MG452047.1
Nervilia mekongensis isolate CC01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed sp	597	597	73%	1e-166	99.39%	MG452046.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0882 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	595	595	72%	4e-166	99.39%	JN114614.1
Nervilia aragoana voucher NFGX02 internal transcribed spacer 2, partial sequence	431	431	53%	1e-116	98.76%	JX865492.1
Nervilia holochila internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	640	640	82%	2e-179	97.84%	AF324178.1
Nervilia shirensis internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	407	407	68%	2e-109	90.35%	AF521066.1

Hình 3. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng ITS Lan một lá LML-02-CB với một số trình tự vùng ITS trên GenBank bằng BLAST trong NCBI

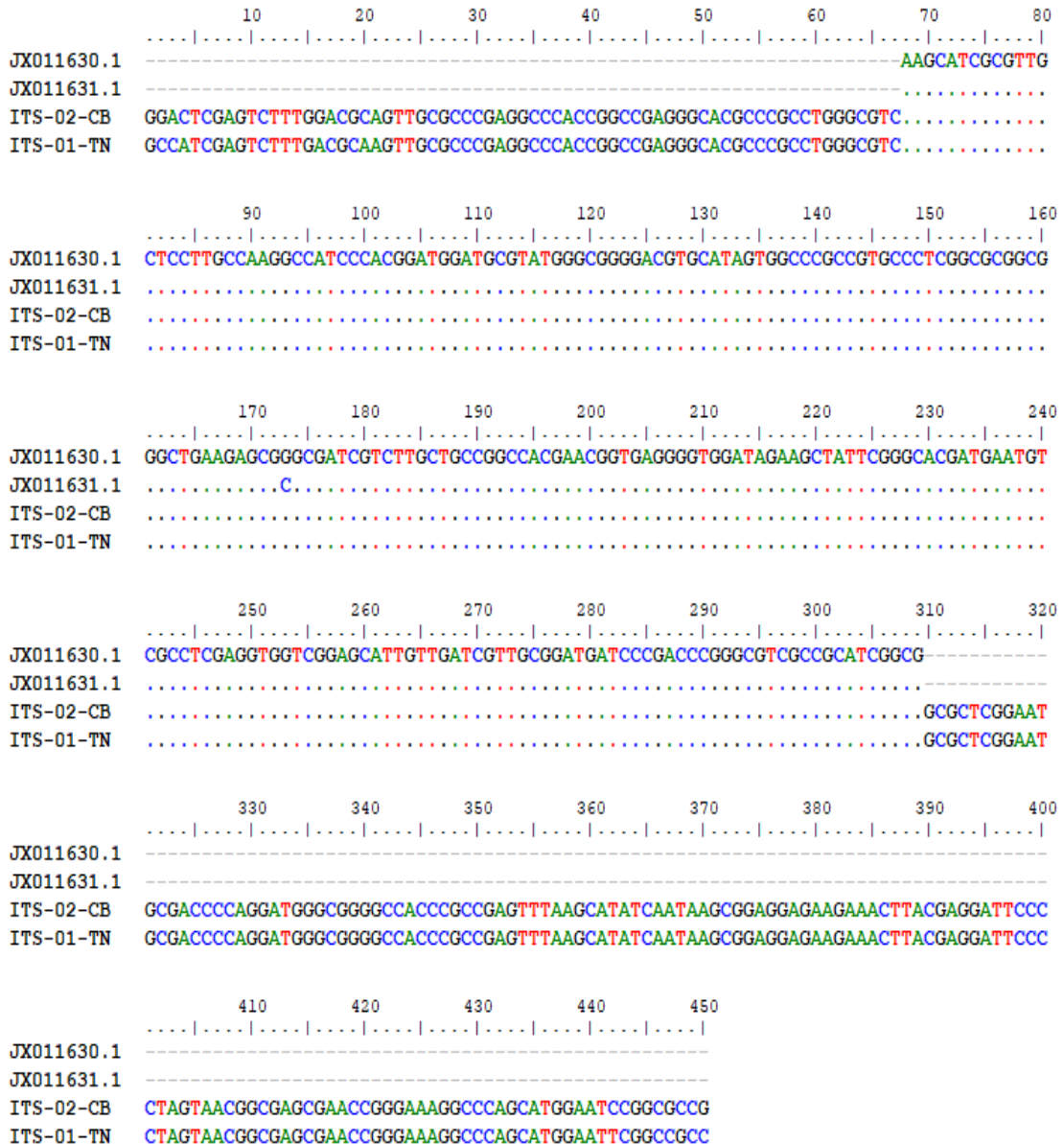
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Nervilia fordii voucher QTK120315NF11 internal transcribed spacer 2, partial sequence	448	448	53%	1e-121	100.00%	JX011630.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0883 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	647	647	78%	0.0	99.72%	JN114615.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0885 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	643	643	78%	1e-180	99.72%	JN114617.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0884 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	641	641	77%	5e-180	99.72%	JN114616.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0881 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	627	627	76%	1e-175	99.71%	JN114613.1
Nervilia mekongensis isolate Sando02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed	608	608	73%	5e-170	99.70%	MG452047.1
Nervilia mekongensis isolate CC01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed sp	608	608	73%	5e-170	99.70%	MG452046.1
Nervilia gammieana voucher SBB-0882 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	606	606	73%	2e-169	99.70%	JN114614.1
Nervilia aragoana voucher NAGX01 internal transcribed spacer 2, partial sequence	442	442	53%	5e-120	99.59%	JX865491.1
Nervilia fordii voucher QTK120315NF12 internal transcribed spacer 2, partial sequence	442	442	53%	5e-120	99.59%	JX011631.1
Nervilia aragoana voucher NFGX02 internal transcribed spacer 2, partial sequence	431	431	53%	1e-116	98.76%	JX865492.1
Nervilia holochila internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	651	651	82%	0.0	98.13%	AF324178.1
Nervilia shirensis internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	418	418	69%	9e-113	90.76%	AF521066.1

Hình 4. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng ITS Lan một lá LML-01-TN với một số trình tự vùng ITS trên GenBank bằng BLAST trong NCBI

Kết quả so sánh trình tự nucleotit của vùng ITS của hai mẫu Lan một lá LML-01-TN, LML-02-CB với hai trình tự vùng ITS mang mã số JX011630 và JX011631 trên GenBank bằng phần mềm BioEdit được thể hiện ở Hình 5.

Kết quả so sánh trình tự nucleotit trên Hình 5 cho thấy, trình tự vùng ITS của cả hai mẫu Lan một lá LML-01-TN, LML-02-CB so với trình tự JX011630 không có sự sai khác nào, so với trình tự JX011631 chỉ khác tại một vị trí nucleotit đó là vị trí nucleotit thứ 173 (C thay bằng G). Đặc biệt, trình tự vùng ITS của hai mẫu LML-01-TN và mẫu LML-02-

CB có hệ số tương đồng 100 % so với trình tự vùng *ITS* của loài *N. fordii* (Hance) Schlechter mang mã số JX011630 trên GenBank. Từ kết quả xác định, so sánh trình tự vùng gen *ITS* đã xác định cả 2 mẫu đều là loài *N. fordii* (Hance) Schlechter phù hợp với định danh về hình thái.



Hình 5. So sánh trình tự *ITS* của mẫu LML-01-TN, LML-02-CB và hai trình tự mang mã số JX011630 và JX011631 trên GenBank

4. KẾT LUẬN

Hình thái của hai mẫu Lan một lá LML-01-TN thu tại Thái Nguyên và LML-02-CB thu tại Cao Bằng là giống nhau và xác định thuộc loài Lan một lá (*N. fordii* (Hance)

Schlechter). Kết quả so sánh trình tự vùng gen *ITS* đã xác định cả 2 mẫu đều là loài *N. fordii* (Hance) Schlechter phù hợp với định danh về hình thái. Trình tự vùng *ITS* cả hai mẫu Lan một lá thu thập tại Cao Bằng và Thái Nguyên có hệ số tương đồng 100 % so với trình tự vùng *ITS* của *N. fordii* (Hance) Schlechter mang mã số JX011630 trên GenBank. Trình tự *ITS* có thể được sử dụng như một chỉ thị quan trọng trong việc giám định các mẫu Lan một lá phục vụ bảo tồn và phát triển nguồn gen Lan một lá - loài được liệt hiện đang có nguy cơ bị tuyệt chủng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). Sách Đỏ Việt Nam (phần I: Thực vật). Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 456 - 457.
- Chen X., Liu Z., Zhu G., Lang K., Ji Z., Luo Y. B., Jin X., Cribb P.J., Wood J. J., Gale S. W., Ormerod P., Vermeulen J. J., Wood H. P., Clayton D. & Bell A. (2009). Orchidaceae: Flora of China, vol. 25, Missouri Botanical Garden Press: 1- 45.
- Huang Q., Ma X., He R., Zhan R., Chen W., 2012. Molecular Identification of *Nervilia fordii* Hance Schltr. and its adulterants based on ITS2 DNA barcodes. Biotechnology Bulletin, 0(12), pp: 173-179.
- Huang Q., Liang L., He R., Ma X., Zhan R., Chen W., 2013. Applying DNA barcoding to identify *Nervilia fordii* and six congeneric species, POJ 6(5):325-332. ISSN:1836-3644.
- Phạm Hoàng Hộ, 2003. Cây cỏ Việt Nam, tập 3, Nhà xuất bản trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh, 760 - 968.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND *ITS* SEQUENCE ISOLATED FROM *Nervilia fordii* (Hance) Schlechter COLLECTED IN CAO BANG AND THAI NGUYEN PROVINCE

Nguyen Thi Tam^{1,*}, Tran Thi Thuy Linh²

Abstract: *Nervilia fordii* (Hance) Schlechter, which belongs to the genus *Nervilia* in the family *Orchidaceae*, contains terpenoids, flavonoids, amino acids and some volatile oils. These substances have anti-inflammatory and anti-viral activities as well as reduce pain, cough, asthma and chronic bronchitis. Combining the research results on morphological characteristics and *ITS* sequences analysis of 2 samples collected in Cao Bang and Thai Nguyen province shows that the samples were both identified as *N. fordii* (Hance) Schlechter. Morphological characteristics of two samples, LML-01-TN collected in Thai Nguyen and LML-02-CB collected in Cao Bang, are similar. *ITS* sequences of both samples have homologous rate of 100 % compared to that of *N. fordii* (Hance) Schlechter in GenBank, which had accession number JX011630.

Keywords: *Nervilia fordii* (Hance) Schlechter, *ITS*, morphology, Cao Bang province, Thai Nguyen province.

¹Thai Nguyen University of Education

²Thai Nguyen Iron and Steel High School

*Email: tamnt@tnue.edu.vn