

XÁC ĐỊNH CHỈ THỊ PHÂN TỬ VÀ TÁI SINH CHỖI *IN VITRO* CỦA LOÀI HOÀNG TINH HOA ĐỎ (*Polygonatum kingianum* Coll ex Hemsl.) THU TẠI SA PA - LÀO CAI

La Việt Hồng^{1*}, Trần Hồng Thu¹, Phạm Thị Quy¹,
Đinh Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Thanh¹, Phạm Ngọc Khánh²

¹ Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,

² Trạm Nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa, Viện Dược liệu

TÓM TẮT

Cây Hoàng tinh hoa đỏ là một trong những dược liệu trong y học cổ truyền. Trong nghiên cứu này, mẫu Hoàng tinh hoa đỏ thu tại Sa Pa - Lào Cai được phân loại ở mức độ loài qua đặc điểm hình thái và xác định hai trình tự *psbA-trnH* và *rpoC1* của loài này để làm chỉ thị phân tử. Tiếp đó, quy trình tạo vật liệu khởi đầu và tái sinh chồi *in vitro* Hoàng tinh hoa đỏ đã được xây dựng nhằm bảo tồn loài này. Kết quả cho thấy trên đối tượng loài Hoàng tinh hoa đỏ, trình tự *psbA-trnH* có chiều dài 616 bp dùng để phân loại và nhận dạng ở mức độ loài, trình tự *rpoC1* có chiều dài 542 bp dùng để phân loại và nhận dạng đến mức độ Chi. Trong quá trình tạo mẫu sạch *in vitro*, chồi non được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% (v/v)/15 phút và javen 10% (v/v)/15 phút Môi trường MS, 30 g/l đường saccharose, 7 g/l agar có bổ sung 5 mg/l BAP và 0,2 mg/l IAA là thích hợp nhất để tái sinh chồi *in vitro* của cây Hoàng tinh hoa đỏ. Đây là lần đầu tiên cây Hoàng tinh hoa đỏ được tái sinh chồi *in vitro*, kết quả này hứa hẹn để bảo tồn cây thuốc này trong tương lai bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

Từ khóa: Chỉ thị, Phân tử, Hoàng tinh hoa đỏ, *in vitro*, Sa Pa

MỞ ĐẦU

Loài Hoàng tinh hoa đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll. Et Hemsl.) là loại cây thuốc quý được sử dụng phổ biến trong Y học cổ truyền phương Đông với tên vị thuốc “Thục hoàng” [14]. Loài Hoàng tinh hoa đỏ thuộc Chi *Polygonatum*, họ Măng tây (Convallariaceae). Trên thế giới, chi *Polygonatum* có 60 loài, phân bố chủ yếu ở khu vực ôn đới từ dãy Himalaya đến Nhật Bản, Bangladesh, Myanmar, Trung Quốc, Ấn Độ, Thái Lan và Malaysia. Ở Anh có 3 loài đặc hữu, ở Trung Quốc có 32 loài, trong đó có 20 loài là đặc hữu có ở Trung Quốc trong đó có loài Hoàng tinh hoa đỏ. Ở Nước ta, cây Hoàng tinh hoa đỏ (tên gọi khác củ côm nếp, Hoàng tinh vòng) được ghi nhận chủ yếu ở Lai Châu, Điện Biên, Lào Cai, Sơn La, Hà Giang, Yên Bái, Cao Bằng [6]. Hoàng tinh hoa đỏ thuộc nhóm EN A1c,d [6], hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại [5]. Tuy nhiên, trong những năm qua, nguồn dược liệu Hoàng tinh trong nước đứng trước

nguy cơ cạn kiệt do bị khai thác bừa bãi, hiện chưa có biện pháp ngăn chặn hữu hiệu. Do đó, nhiều nguồn gen dược liệu có nguy cơ cạn kiệt, tuyệt chủng trong hệ thực vật Việt Nam, trong đó có các loại Hoàng tinh. Hiện nay, kỹ thuật DNA barcoding là một trong những công cụ phục vụ định danh loài chính xác, nhanh chóng, tự động hóa. Kỹ thuật này thường sử dụng các đoạn trình tự đặc trưng như *psbA-trnH*, *ITS*, *rpoC1*, *matK*... [8], [10], [11]. Việc xác định loài bằng kỹ thuật này có hiệu quả cao trong việc phân biệt các loài thực vật trong khi những quan sát hình thái, sinh trưởng và phát triển chưa đủ cơ sở để định danh hoặc phân biệt loài [9]. Xuất phát lý do trên, chúng tiến hành nghiên cứu chỉ thị phân loại phân tử bổ sung và tái sinh chồi *in vitro* cây Hoàng tinh hoa đỏ *Polygonatum kingianum* Coll. Et Hemsl. góp phần bảo tồn nguồn gen loài này.

VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu thực vật

Mẫu được thu tại Trạm Nghiên cứu Trồng cây thuốc Sa Pa - Lào Cai (Viện Dược liệu).

* Tel 0973.376 668. Email. laviethong.sp2@gmail.com

Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mẫu và nhận dạng loài

Mô tả đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu để xác định loài, tên khoa học dựa vào các tài liệu phân loại thực vật.

Xác định hai trình tự *psbA-trnH* và *rpoC1*: DNA từ lá Hoàng tinh hoa đỏ được tách chiết bằng phương pháp CTAB và tinh sạch. DNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR, các cặp mồi được sử dụng để khuếch đại hai trình tự *psbA-trnH* và *rpoC1* này lần lượt là:

01_F:5'-

GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3',

01_R:5'-

CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3';

02_F:5'-

GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3';

02_R:5'CCATAAGCATATCTTGAGTTGG-3'.

Chu trình nhiệt: 94°C/ 4 phút; 30 chu kỳ x (94°C/ 30 giây; 54°C/ 30 giây; 72°C/ 45 giây); 72°C/ 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và được xác định trình tự tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trình tự DNA được xử lý và phân tích bằng phần mềm Bioedit, DNA star và BLAST của NCBI [13].

Tái sinh chồi in vitro cây Hoàng tinh hoa đỏ

Tạo vật liệu khởi đầu: Củ Hoàng tinh hoa đỏ chứa chồi non được rửa sạch, ngâm trong nước xà phòng loãng 20 - 30 phút và rửa kỹ dưới vòi nước chảy. Sau đó khử trùng bề mặt bằng cồn 70° trong 15 - 30 phút, tiếp đến khử trùng bằng dung dịch javen 3 - 40% (v/v) trong 15 - 30 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại 4 lần bằng nước cất khử trùng. Chồi non Hoàng tinh hoa đỏ được cấy lên môi trường cơ bản gồm MS, 30 g/l saccharose, 8 g/l agar. Theo dõi tỉ lệ mẫu nhiễm, tỉ lệ mẫu sạch - sống, tỉ lệ mẫu sạch - chết sau 5-7 ngày.

Tái sinh chồi in vitro: Các chồi sạch được chuyển sang môi trường MS có bổ sung BAP (6-benzylaminopurine), BAP kết hợp với IAA (Idol acid acetic). Cụ thể: BAP (1; 2; 3; 5; 8

mg/l); BAP (1;2; 3; 5 mg/l) kết hợp IAA nồng độ 0,2 mg/l. Các chỉ tiêu theo dõi: Tỉ lệ mẫu phát sinh chồi (%), số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi (cm), số lá/chồi (lá) và đặc điểm chồi tái sinh sau 6 tháng nuôi cấy.

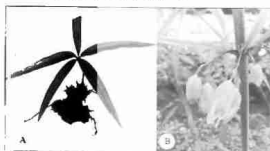
Phân tích thống kê: Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng chương trình Excel 2010 [4]. Sai khác giữa các công thức được kiểm tra bằng phương pháp giới hạn sai khác nhỏ nhất - LSD_{0,05} với $\alpha = 0,05$. Giá trị thể hiện trong các bảng số liệu là giá trị trung bình.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm phân loại loài Hoàng tinh hoa đỏ thu tại Sa Pa (Lào Cai)

Đặc điểm hình thái

Loài Hoàng tinh hoa đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll et Hemsl.) thuộc loại cây thân rễ sống lâu năm. Thân rễ mọc ngang, phình lên thành củ màu vàng hay trắng, trên củ có các vết sẹo của thân khí sinh. Thân cây mọc đứng, cao 50 - 80 cm. Lá không có cuống, mọc vòng trên các đốt thân; phiến lá hình mác, dài 7 - 12 cm, rộng 0,5 - 1,2 cm; chóp lá nhọn và quăn. Hoa mọc ở kẽ lá, cuống hoa dài 1,5 - 2 cm, mỗi cuống mang hai hoa hình ống, dài 8 - 15 mm, màu đỏ tím. Quả mọng, hình cầu đường kính 7 - 10 mm, khi chín màu tím đen [1], [2], [3], [7], [12].

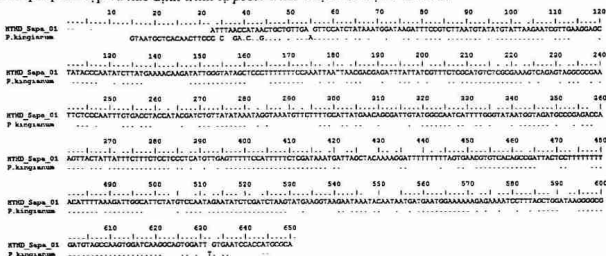


Hình 1. Mẫu cây thu tại Sa Pa-Lào Cai.

(A): Toàn bộ cây, (B): Lá cây mọc vòng, hoa màu đỏ. Trong nghiên cứu này, mẫu được thu tại Sa Pa (Lào Cai) được thể hiện ở Hình 1. Dựa trên đặc điểm hình thái so sánh cho thấy mẫu thu tại Sa Pa (Lào Cai) chính là loài Hoàng tinh hoa đỏ, có tên khoa học *Polygonatum kingianum* Coll ex Hemsl.

Chỉ thị phân loại phân tử

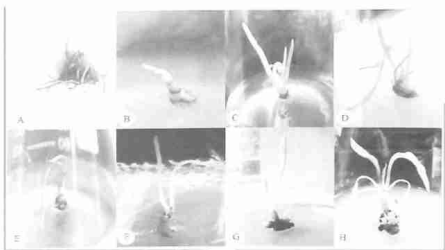
Kết quả phân lập và xác định trình tự *psbA-trnH* được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. So sánh trình tự *psbA-trnH* (ki hiệu HTHD_Sapa_01) thu từ cây Hoàng tinh hoa đỏ thu tại Sa Pa và của loài *P. kingianum* (Mã số trên Genbank: KJ745828.1).

Phân tích Hình 2 cho thấy, trình tự *psbA-trnH* của loài *P. kingianum* thu tại Sa Pa - Lào Cai có chiều dài là 616 bp, có độ tương đồng 99% với trình tự *psbA-trnH* (Mã số: KJ745828.1) của loài *P. kingianum* với chiều dài 622 bp đã công bố trên Genbank. Như vậy, trình tự *psbA-trnH* phân lập được là đặc trưng cho loài *P. kingianum*, có thể dùng để phân loại và nhận dạng loài này. Tiến hành phân tích tương tự đối với trình tự *rpoCl*, kết quả cho

thấy trình tự *rpoCl* phân lập được từ loài Hoàng tinh hoa đỏ thu tại Sa Pa - Lào Cai có chiều dài 542 bp và có độ tương đồng 99% với trình tự *rpoCl* của nhiều loài thuộc chi *Polygonatum* như *P. sibiricum* (KT695605.1), *P. verticillatum* (KT722981.1), *P. cyrtoneura* (KT630835.1)... Như vậy, trình tự *rpoCl* của các loài thuộc Chi *Polygonatum* không có sự khác biệt, do đó chỉ sử dụng trình tự này để nhận dạng cho Chi này.



Hình 3. Tạo vật liệu khởi đầu và tái sinh chồi in vitro cây Hoàng tinh hoa đỏ

(A): Củ cây Hoàng tinh hoa đỏ chứa chồi non. (B): Mẫu chồi sạch - vô trùng.
(C-H): Chồi in vitro sau 6 tháng nuôi cấy, C: BAP 1,0 mg/l, D: BAP 2,0 mg/l, E: BAP 5,0 mg/l,
F: BAP 2 mg/l+IAA 0,2 mg/l, G: BAP 3 mg/l+IAA 0,2 mg/l MS, H: BAP 5 mg/l+IAA 0,2 mg/l.

Tái sinh chồi *in vitro* cây Hoàng tinh hoa đỏ

Tạo vật liệu khởi đầu

Chồi non thu từ củ Hoàng tinh hoa đỏ (Hình 3A) được sử dụng làm nguồn mẫu. Kết quả cho thấy nồng độ thích hợp nhất để khử trùng bề mặt chồi non là cồn 70% trong thời gian 15 phút, dung dịch javen 10% trong thời gian 15 phút, cho tỉ lệ mẫu sạch cao nhất là 50% (Hình 3B). Các mẫu này được nuôi cấy để tái sinh chồi.

Tái sinh chồi *in vitro*

Kết quả tái sinh chồi cây Hoàng tinh hoa đỏ *in vitro* được thể hiện ở Hình 3 (C-H) và Bảng 1 và Bảng 2.

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng phát sinh chồi *in vitro*

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi (sau 6 tháng nuôi cấy)

BAP (mg/l)	Mẫu phát sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Đặc điểm chồi tái sinh (*)
ĐC-0	33,3	1,00 ^a	2,32 ^a	2,50 ^a	Kém
1	100	1,25 ^a	4,11 ^d	3,75 ^b	Tốt
2	100	3,00 ^b	3,55 ^c	2,75 ^{ab}	Tốt
3	100	1,75 ^a	2,95 ^b	2,00 ^a	Trung bình
5	100	1,25 ^a	3,20 ^b	1,75 ^a	Trung bình
8	0	-	-	-	-

(*) Tốt: chồi mập, lá xanh; Trung bình: chồi bình thường, lá xanh nhạt; Kém: chồi gầy, lá xanh nhạt,

(-) Không có phản ứng, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Kiểm định Duncan cho các hàng.

Kết quả nghiên cứu trong Bảng 2 cho thấy môi trường có nồng độ 2 mg/l BAP có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng tạo chồi, số chồi đạt được là 3 chồi/mẫu, số lá đạt được là 2,75lá/chồi, chiều cao chồi đạt 3,55cm.

Ảnh hưởng của BAP và IAA đến khả năng nhân chồi *in vitro*

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và IAA đến khả năng tạo chồi (sau 6 tháng nuôi cấy)

Chất điều tiết sinh trưởng		Mẫu phát sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Đặc điểm chồi tái sinh (*)
BAP (mg/l)	IAA (mg/l)					
ĐC	0,0	33,3	1,00 ^a	2,32 ^a	2,50 ^a	Kém
1	0,2	0,0				
2	0,2	100	1,25 ^{ab}	3,13 ^b	2,00 ^a	Kém
3	0,2	100	2,25 ^{bc}	3,35 ^b	2,75 ^a	Trung bình
5	0,2	100	3,00 ^c	4,20 ^c	4,75 ^b	Tốt

Kết quả tại Bảng 2 cho thấy ở công thức BAP 5 mg/l + IAA 0,2 mg/l cho chiều cao chồi, số lá/chồi lần lượt là 4,2 cm và 4,75 lá/chồi, và cao hơn rõ rệt so với thí nghiệm chỉ dùng BAP đơn lẻ chỉ đạt 3,55 cm và 2,75 lá/chồi.

KẾT LUẬN

Loài Hoàng tinh hoa đỏ (*Polygonatum kingianum* Coll. Et Hemsl.) thu tại Sa Pa-Lào Cai được bổ sung thêm hai chi thị phân loại phân tử là *psbA-trnH* và *rpoC1* có chiều dài

lần lượt 616 bp và 542 bp, có thể sử dụng trình tự *psbA-trnH* để nhận dạng loài này trong khi trình tự *rpoC1* để nhận dạng mức độ Chi *Polygonatum*. Chồi non trên thân rễ cây Hoàng tinh hoa đỏ được khử trùng bằng cách rửa bằng nước sạch, khử trùng trong cồn 70% (v/v)/15 phút và javen 10% (v/v)/15 phút. Môi trường tái sinh chồi MS, 3% đường saccharose, 0,7% agar có bổ sung 5 mg/l BAP và 0,2 mg/l IAA thích hợp nhất để tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, Hà Nội, tập I, tr. 1119-1120.
2. Phạm Hoàng Hộ, (2006), *Cây cỏ vị thuốc ở Việt Nam*, Nxb Trẻ, tr. 483-484.
3. Đỗ Tất Lợi (1996), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội,
4. Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ong Xuân Phong (2013), *Phương pháp nghiên cứu sinh lý học thực vật*, Nxb Đại học Quốc gia, Hà Nội tr. 179-194.
5. Nghị định số 32/2006/NĐ-CP ngày 30/3/2006 của Chính phủ.
6. Viên Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật (2007), *Sách đỏ Việt Nam, phần II. Thực vật* - tr. 388 (*Vietnam red data book, Part II. Plants*), Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
7. Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 960-963.
8. Chase M. W., Cowan R. S., Hollingsworth P. M., et al (2007), "A proposal for a standard

- protocol to barcode all land plants", *Taxon*, 56, pp. 295-299.
9. Gonzalez M. A., Baraloto C., Engel J., Mori S. A., Pétronelli P. (2009), "Identification of Amazonian trees with DNA barcodes", *PLoS ONE* 4(10), p. 7483
10. Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A., Janzen D. H. (2005a), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102, pp. 8369-8374.
11. Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A., Janzen D. H., (2005b), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102(23), pp. 8369-8374.
12. Zheng-Yi W., Raven P. H. (2003), "Flagellariaceae through Marantaceae", *Flora of China*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 24, pp. 223-233.
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
14. <http://www.vncreatures.net>

SUMMARY

DETERMINATION OF MOLECULAR MARKERS AND REGENERATION OF *IN VITRO* SHOOTS OF *Polygonatum kingianum* Coll ex Hemsl.

La Viet Hong^{1*}, Tran Hong Thu¹, Pham Thi Quy¹,
Dinh Phuong Thao¹, Nguyen Thi Thanh¹, Pham Ngoc Khanh²
¹Hanoi Pedagogical University, No 2
²Sapa Center for planting medicinal plant, National Institute of Medicinal materials

Polygonatum kingianum Coll. Et Hemsl. is an important medicinal material in traditional medicine. In this study, Explants of *Polygonatum kingianum* Coll. Et Hemsl were collected from SaPa-Lao Cai and classified at species level through anatomical characteristics and two molecular markers of this species including psbA-trnH and rpoC1 were sequenced. After that, in vitro shoots of *P. kingianum* were regenerated from young shoots of rhizome for multiplication to conserve this species. The result showed that the first sequence, psbA-trnH, had 616 bp and was a good marker for identification at species level. The second sequence, rpoC1, had 542 bp and was useful to classify *Polygonatum* genus. Young shoots of rhizome were surface sterilized in 70% (v/v) ethanol for 15 minutes, in 10% (v/v) javel (Sodium hypochlorite) solution for 15 minutes. The medium including MS, 30 g/l saccharose, 7 g/l agar and supplemented with 5 mg/l BAP and 0.2 mg/l IAA was suitable for in vitro shoots regeneration. For the first time, in vitro shoots regeneration of *Polygonatum kingianum* Coll Et Hemsl. was established, this result is potential for the conservation of medicinal material in the future.

Keywords: Marker, Molecular, *Polygonatum kingianum*, in vitro, Sapa

Ngày nhận bài: 07/4/2017; Ngày phản biện: 10/4/2017; Ngày duyệt đăng: 27/4/2017

* Tel: 0973.376.668; Email: laviethong.sp2@gmail.com