



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.002

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG MỘT SỐ DNA BARCODE TRONG PHÂN TÍCH DI TRUYỀN VÀ NHẬN DIỆN MỘT SỐ LOÀI LAN KIM TUYẾN (*Anoetochilus* spp.)

Huỳnh Hữu Đức^{1*}, Nguyễn Trường Giang¹, Dương Hoa Xô¹, Hà Thị Loan¹, Phan Đình Yên^{1,3}, Trần Trọng Tuấn² và Đỗ Đăng Giáp²

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện sinh học nhiệt đới

³Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Hữu Đức (email: huuduchuyh82@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 16/01/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Using some dna barcode for the genetic analysis and identifying some species of *Anoetochilus* spp.

Từ khóa:

DNA barcode, Lan Kim tuyến, ITS, matK, rbcL

Keywords:

Anoetochilus, DNA barcode, ITS, matK, rbcL

ABSTRACT

In this study, to conserve and exploit properly genetic resources of *Anoetochilus* and *Lusidia* species, nine DNA barcodes: *rbcL*, *matK*, *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC1*, *rpoC2*, *ITS1*, *ITS2*, *ITS* were used to for genetic analysis of six species of these genera.. The results showed that the amplifications of the DNA regions were different between barcodes and ranged from 50%-100%. The amplifications of region *ITS1* and *ITS2* 100%, region *ITS* 83.3%, region *rbcL* 50%, region *matK* range from 66.7 – 83.3%, region *rpoB* and *rpoC* is 83.3%. Based on *ITS1* and *ITS2* DNA sequence, genetics analysis phylogenetic tree constructing results showed the relationship and the discrimination between and among *Anoetochilus* and *Lusidia* species. The results showing successful uses of these DNA barcodes in identifying and discriminating *Anoetochilus* species and their relatives can be performed successfully, then open opportunities for conservation and sustainable uses genetic resources.

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, nhằm mục tiêu bảo tồn, khai thác một cách hợp lý nguồn gen một số loài lan thuộc chi *Anoetochilus* và *Lusidia*, 9 vùng DNA barcode: *rbcL*, *matK*, *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC1*, *rpoC2*, *ITS1*, *ITS2*, *ITS* được sử dụng để phân tích di truyền 06 mẫu giống lan. Kết quả phân tích DNA của các mẫu giống cho tỷ lệ khuếch đại thành công từ 50-100% cho các DNA barcode khác nhau. Vùng *ITS1* và *ITS2* cho tỷ lệ khuếch đại đạt 100%, vùng *ITS* 83,3%, vùng *rbcL* 50%, vùng *matK* từ 66,7 – 83,3%, vùng *rpoB* và *rpoC* đạt 83,3%. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các giống dựa trên trình tự DNA của một số vùng DNA barcode như *ITS1* và *ITS2* cho thấy có thể phân biệt giữa các loài gần nhau. Cây phân nhóm dựa trên vùng *ITS2* chia *Anoetochilus* và *Lusidia* làm 2 nhóm chính, trong nhóm *Anoetochilus* chia làm hai nhóm phụ thuộc hai loài *Anoetochilus formosanus* và *Anoetochilus roxburghii*. Các kết quả này có thể ứng dụng trong việc nhận diện và phân biệt các loài lan Kim tuyến và họ hàng của chúng, từ đó mở ra khả năng trong bảo tồn và khai thác bền vững nguồn gen các loài này.

Trích dẫn: Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Trường Giang, Dương Hoa Xô, Hà Thị Loan, Phan Đình Yên, Trần Trọng Tuấn và Đỗ Đăng Giáp, 2019. Nghiên cứu sử dụng một số DNA barcode trong phân tích di truyền và nhận diện một số loài lan kim tuyến (*Anoetochilus* spp.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 14-23.

1 GIỚI THIỆU

Chi Lan Kim tuyến (*Anoectochilus*) thuộc họ lan (Orchidaceae) có nhiều loài có giá trị kinh tế và giá trị dược liệu cao như: *Anoectochilus formosanus*, *Anoectochilus roxburhii*. Có khoảng 30 - 40 loài phân bố chủ yếu từ vùng Himalaya đến Đông Nam Á, miền Nam Trung Hoa, Australia, Malaysia, Ấn Độ, Nhật, Papua New Guinea và một số quần đảo thuộc quần đảo Thái Bình Dương (Teuscher, 1978). Ở Việt Nam, lan Kim tuyến (*Anoectochilus*) hiện thống kê được 12 loài, trong đó có loài lan Kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume, tên khác *Anoectochilus roxburghii* Wall. ex Lindl. phân bố rộng ở hầu hết các tỉnh trong cả nước và được biết đến nhiều không những bởi giá trị làm cảnh, mà bởi giá trị làm thuốc của nó (Phạm Hoàng Hộ, 2010). Chúng có nhiều hoạt chất có giá trị như thân cây và lá chứa kinsenoside có khả năng bảo vệ gan, chứa rất nhiều hợp chất glycoside và flavonoids khác có khả năng chữa các bệnh như tiểu đường, cao huyết áp, viêm thận và ung thư... (Du *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2008). Do có giá trị dược liệu và giá trị kinh tế cao nên bị khai thác quá mức, không kết hợp bảo vệ, do đó loài lan Kim tuyến đang bị đe dọa nghiêm trọng, rất có thể sẽ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên, nếu không có biện pháp bảo tồn hữu hiệu. Năm 2007, trong Nghị định số 32/2006/CP và Sách đỏ Việt Nam, lan Kim tuyến đã được xếp vào nhóm IA, là nhóm thực vật rừng đang nguy cấp EN và là nhóm thực vật nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại và nhóm thực vật rừng đang nguy cấp EN A1 a, c, d, trong Sách đỏ Việt Nam.

Đồng thời, việc sử dụng các nguồn nguyên liệu lan Kim tuyến chưa được xác định rõ nguồn gốc (hình thái tương tự nhau) có thể làm giảm giá trị dược liệu. Do đó, việc sưu tập, đánh giá, định danh và bảo tồn các giống lan Kim tuyến nói riêng và lan dược liệu là yêu cầu thiết yếu. Theo truyền thống, việc định danh thường dựa trên các đặc tính hình thái, đặc biệt là hoa. Tuy nhiên, các loài lan rất đa

dạng và phong phú đồng thời các loài gần nhau thường có hình thái tương tự nhau nên rất khó phân biệt khi thiếu hoa. Hiện nay, phương pháp sử dụng chỉ thị phân tử trong việc định danh và nghiên cứu di truyền ngày càng được sử dụng phổ biến. Trong đó, DNA barcode là phương pháp phổ biến để xác định loài có thể sử dụng những vùng DNA đáng tin cậy và đang được ứng dụng rộng rãi trên thế giới nhằm phục vụ công tác phân loại, đánh giá đa dạng sinh học và bảo tồn nguồn gen (Group *et al.*, 2009). Ở Hàn Quốc, đã nghiên cứu chuyên sâu và ứng dụng hệ thống mã vạch trên một số giống lan của 94 loài trong 42 chi đại diện cho tất cả các loài chính của họ lan nhằm phát triển ngành công nghiệp hoa lan. Trong đó, nhiều loài trong số này có giá trị cao được dùng làm cảnh hay dược liệu cũng được sử dụng chỉ thị phân tử DNA barcode để định danh (Lee, 2011; Kim *et al.*, 2014). Các mối quan hệ phát sinh loài của các loài chính trong họ lan đã được phân tích dựa trên các marker phân tử DNA barcode khác nhau như: *rbcL* (Cameron *et al.*, 1999), *psaB*, *atpB* (Cameron, 2006) và *matK* (Freudenstein and Chase, 2015). Hiện nay, một số nhóm nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật DNA barcode để phân tích mối quan hệ di truyền và xác định loài của một số loài thuộc chi *Anoectochilus*, *Lusidia* (Chen and Shiau, 2015; Xu *et al.*, 2015; Đỗ Thị Gấm và *ctv.*, 2015; Asahina *et al.*, 2010)

Trong nghiên cứu này, bước đầu sử dụng vùng DNA barcode *rbcL*, *matK*, *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC1*, *rpoC2*, ITS1, ITS2, ITS để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa một số loài lan Kim tuyến đã được định danh từ đó làm cơ sở cho việc phân tích di truyền và nhận diện loài.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

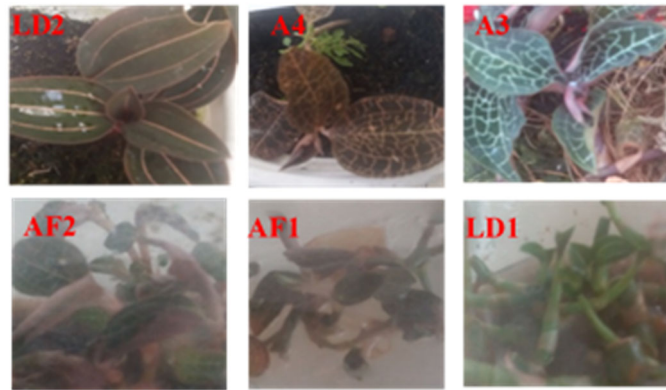
2.1 Vật liệu nghiên cứu

06 mẫu thuộc chi *Anoectochilus* và *Lusidia* được thu thập từ các nguồn khác nhau (Bảng 1).

Bảng 1: Danh sách các loài thuộc chi *Anoectochilus* và *Lusidia* thu thập

Ký hiệu	Tên khoa học	Nơi thu thập
AF1	<i>Anoectochilus formosanus</i>	Trung tâm CNSH Tp Hồ Chí Minh
AF2	<i>Anoectochilus formosanus</i>	Trung tâm CNSH Tp Hồ Chí Minh
A3	<i>Anoectochilus</i> sp.	Tp Hồ Chí Minh
A4	<i>Anoectochilus</i> sp.	Đà Nẵng
LD1	<i>Lusidia discolor</i>	Quảng Nam
LD2	<i>Lusidia discolor</i>	Trung tâm CNSH Tp Hồ Chí Minh

Chú thích: CNSH: Công nghệ sinh học



Hình 1: Một số loài thuộc chi *Anoctochilus*, *Lusidia* được sử dụng trong nghiên cứu

2.2 Ly trích DNA tổng số

Mẫu lá của các mẫu lan Kim tuyến được thu thập ở các vùng địa lý khác nhau (đã được xác định hoặc chưa xác định loài) và các mẫu có đặc điểm hình thái tương tự để tiến hành phân tích.

DNA tổng số của các mẫu giống được ly trích dựa trên quy trình CTAB cơ bản (Doyle, 1987) được thay đổi một số điều kiện. Nghiền 100 mg mẫu lá trong 500 µl CTAB 2% + PVP 2% ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp mẫu/CTAB được ủ ở 65°C trong 60 phút, ly tâm hỗn hợp mẫu/CTAB ở 14.000 rpm trong 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống mới, bổ sung 4µl

RNAase, ủ ở 37°C trong thời gian 5 phút, bổ sung 500 µl hỗn hợp chloroform: isoamyl alcohol (24:1), lắc đều, ly tâm ở tốc độ 14.000 rpm trong 10 phút. Thu dịch nổi (chứa DNA) sang ống mới (khoảng 450-500µl), bổ sung ethanol tuyệt đối (tỷ lệ 1:1 so với thể tích thu được) và ½ thể tích NaCl 5M so với thể tích thu được. Hỗn hợp được ủ trên đá trong 1 giờ, ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút. Hỗn hợp sau ly tâm được loại bỏ dịch nổi và thu tủa, bổ sung 500 µl ethanol 70% lạnh và đảo ống, ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút (lặp lại 2 lần), loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Để khô kết tủa ở nhiệt độ phòng. Hòa DNA trong 200 µl nước khử trùng hai lần.

Bảng 2: Vùng gen DNA barcode và primer được sử dụng để sàng lọc vùng gen thích hợp trong phân tích một số loài thuộc chi *Anoctochilus*, *Lusidia*

Vùng gen	Primer	Trình tự primer (5'-3')	T _a (°C)
ITS	ITS1-F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	57
	ITS4-R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
ITS1	ITS1-L1F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	55
	ITS1-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS2	ITS2-S3R	GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	53
	ITS2-F	CGA TAC TTG GTG TGA ATT GCA G	
matK	matK-1F	ATC CAT ATG GAA ATC TTG GTT C	50
	matK-1R	GTT CTA GCA CAC GAA AGT CG	
	matK390F	CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C	50
	matK1326R	TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T	
	matK2.1F	CCT ATC CAT CTG GAA ATC TTA G	54
matK5R	GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG		
rbcL	rbcLa - F	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	55
	rbcLa - R	GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG	
rpoB1	rpoB1_F	AAG TGC ATT GTT GGA ACT GG	55
	rpoB1_R	CCG TAT GTG AAA AGA AGT ATA	
rpoB2	rpoB2_F	ATG CAA CGT CAA GCA GTT CC	59
	rpoB2_R	GAT CCC AGC ATC ACA ATT CC	
rpoC1	rpoC1_F	GTG GAT ACA CTT CTT GAT AAT GG	60
	rpoC1_R	TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC	
rpoC2	rpoC2_F	GGC AAA GAG GGA AGA TTT CG	58
	rpoC2_R	CCA TAA GCA TAT CTT GAG TTG G	

Nguồn: (Sinclair, Pérez-Losada et al., 2005, Asahina, Shinozaki et al., 2010, Singh, Parveen et al., 2012, Siripiyasing et al., 2012)

2.3 PCR

Các phản ứng PCR được thực hiện nhằm khuếch đại vùng ITS, ITS1, ITS2, *rbcL*, *matK*, *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC1*, *rpoC2* với các cặp primer tương ứng (Bảng 2). Thành phần cơ bản cho 1 phản ứng PCR 20 µl: 0,2 mM dNTP mix, enzyme DreamTaq polymerase 1U, dream taq buffer 10X, 0,4 µM primer xuôi, 0,4 µM primer ngược, nước cất 2 lần khử trùng, 1 µl mẫu với nồng độ DNA từ 100 – 500 ng/µl. Chu kỳ PCR tiền biên tính 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ (biến tính ở 95°C trong 30 giây; bắt cặp (T_a: Bảng 2) trong 30 giây; 72°C trong 40 giây); chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Kết quả PCR được phân tích đánh giá trên gel agarose 1,2%, hiệu điện thế 100V, thời gian 30-45 phút, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It®2315 imager UVP-Mỹ).

2.4 Giải trình tự và phân tích mối quan hệ di truyền

Trên cơ sở phân tích khả năng khuếch đại thành công của các cặp primer với các vùng gen tương ứng cho tỷ lệ khuếch đại thành công cao nhất cho tất cả các mẫu sẽ được chọn để giải trình tự DNA. Sản phẩm PCR được giải trình tự tại công ty Macrogen

(10F, 254 Beotkot-ro geumcheon-gu, Soul 08511, Rep. of Korea).

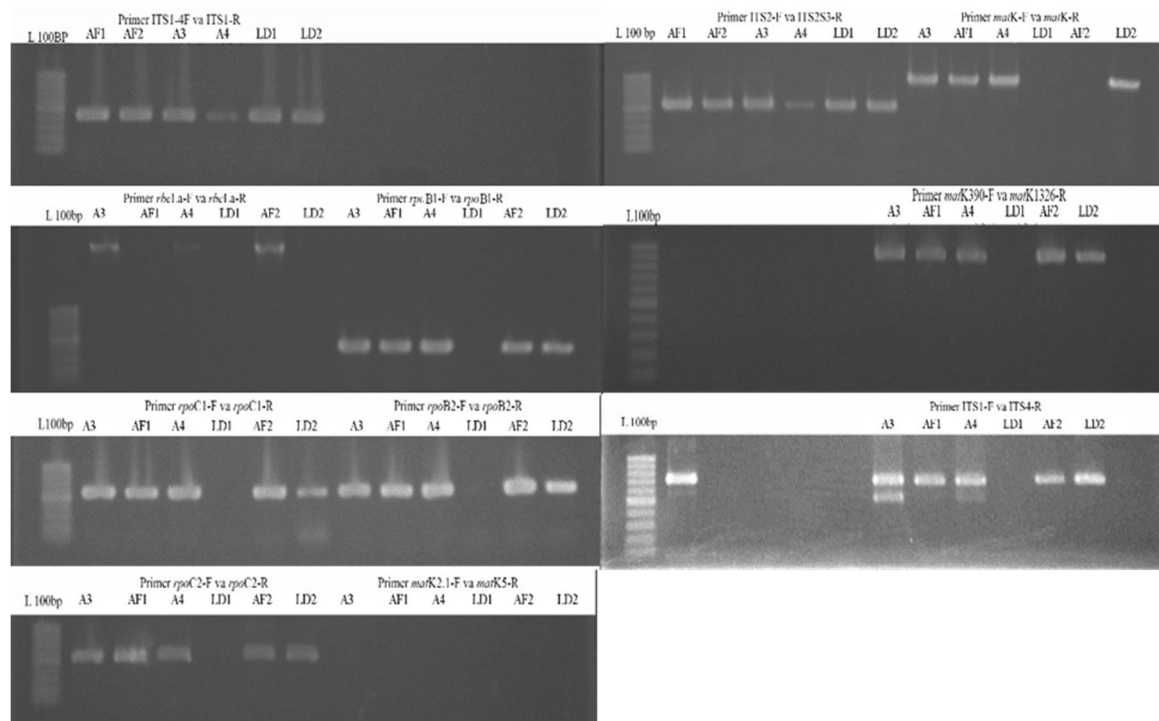
Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC và kiểm tra các sai lệch. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 (The Molecular Evolution Genetics Analysis) với hệ số bootstrap 1000.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

DNA tổng số của các loài phân tích được tiến hành định lượng và kiểm tra độ tinh sạch. Kết quả cho thấy các mẫu có độ tinh sạch cao với OD260/OD280 nằm trong khoảng 1,71 - 1,84. Nồng độ DNA tổng số ở các mẫu nằm trong khoảng 151,8 – 249,8 ng/µl đảm bảo tiêu chuẩn và chất lượng cho các bước tiếp theo.

3.1 PCR

Kết quả PCR dựa trên DNA tổng số của 06 mẫu lan nghiên cứu cho thấy các băng xuất hiện rõ. Tỷ lệ khuếch đại của các vùng DNA barcode khác nhau với primer chuyên biệt cho từng barcode cho tỷ lệ khuếch đại khác nhau (Bảng 3).



Hình 2: Kết quả PCR của 03 vùng DNA barcode: A/ gen ITS, B/gen *rbcL*, C/ gen *matK* trên gel agarose 1,2%

Bảng 3: Tỷ lệ khuếch đại các vùng DNA barcode của 06 mẫu lan nghiên cứu

Ký hiệu	Tên khoa học	Nơi thu thập	Vùng ITS			<i>rbcL</i>
			1	2	3	4
AF1	<i>Anoectochilus formosanus</i>	TT CNSH	x	x	x	-
AF2	<i>Anoectochilus formosanus</i>	TT CNSH	x	x	x	x
A3	<i>Anoectochilus</i> sp.	HCM	x	x	xx	x
A4	<i>Anoectochilus</i> sp.	Đà Nẵng	x	x	xx	x
LD1	<i>Lusidia discolor</i>	Quảng Nam	x	x	-	-
LD2	<i>Lusidia discolor</i>	TT CNSH	x	x	x	-
Tỷ lệ khuếch đại (%)			100	100	83,3	50

Ký hiệu	Tên khoa học	Nơi thu thập	Vùng <i>matK</i>		
			5	6	7
AF1	<i>Anoectochilus formosanus</i>	TT CNSH	x	x	-
AF2	<i>Anoectochilus formosanus</i>	TT CNSH	-	x	-
A3	<i>Anoectochilus</i> sp.	HCM	x	x	-
A4	<i>Anoectochilus</i> sp.	Đà Nẵng	x	x	-
LD1	<i>Lusidia discolor</i>	Quảng Nam	-	-	-
LD2	<i>Lusidia discolor</i>	TT CNSH	x	x	-
Tỷ lệ khuếch đại (%)			66,7	83,3	0

Ký hiệu	Tên khoa học	Nơi thu thập	Vùng <i>rpoB</i>		Vùng <i>rpoC</i>	
			8	9	10	11
AF1	<i>Anoectochilus formosanus</i>	TT CNSH	x	x	x	x
AF2	<i>Anoectochilus formosanus</i>	TT CNSH	x	x	x	x
A3	<i>Anoectochilus</i> sp.	HCM	x	x	x	x
A4	<i>Anoectochilus</i> sp.	Đà Nẵng	x	x	x	x
LD1	<i>Lusidia discolor</i>	Quảng Nam	-	-	-	-
LD2	<i>Lusidia discolor</i>	TT CNSH	x	x	x	x
Tỷ lệ khuếch đại (%)			83,3	83,3	83,3	83,3

Chú thích: 1/Khuếch đại vùng ITS1 với cặp primer ITS1-F và ITS1-R, 2/Khuếch đại vùng ITS2 với cặp primer ITS2-F và ITS2-S3R, 3/Khuếch đại vùng ITS với cặp primer ITS1-F và ITS4-R, 4/Khuếch đại vùng *rbcL* với cặp primer *rbcLa-F* và *rbcLa-R*, 5/Khuếch đại vùng *matK* với cặp primer *matK1-F* và *matK1-R*, 6/Khuếch đại vùng *matK* với cặp primer *matK390-F* và *matK1326-R*, 7/Khuếch đại vùng *matK* với cặp primer *matK2.1-F* và *matK5-R*, 8/Khuếch đại vùng *rpoB1* với cặp primer *rpoB1-F* và *rpoB1-R*, 9/Khuếch đại vùng *rpoB2* với cặp primer *rpoB2-F* và *rpoB2-R*, 10/Khuếch đại vùng *rpoC1* với cặp primer *rpoC1-F* và *rpoC1-R*, 11/Khuếch đại vùng *rpoC2* với cặp primer *rpoC2-F* và *rpoC2-R*. HCM: thành phố Hồ Chí Minh. TT CNSH: Trung tâm công nghệ sinh học Tp Hồ Chí Minh

Vùng ITS1, ITS2 cho tỷ lệ khuếch đại trên 06 mẫu lan thuộc chi *Anoectochilus*, *Lusidia* với 100%, kích thước tương ứng 450-500 bp và 550-600 bp. Vùng gen ITS cho tỷ lệ khuếch đại đạt 83,3% và cho 2 băng sản phẩm đối với mẫu A3 và A4. Đối với các vùng DNA barcode khác cho tỷ lệ khuếch đại thấp hơn từ 50-83,3% (Bảng 3) với kích thước từng vùng gen *matK* (900-1000bp), *rbcL* (1500-1600bp), *rpoB1* và *rpoB2* (550-600bp), *rpoC1* và *rpoC2* (500-600bp). Các vạch xuất hiện rõ khi phân tích trên gel agarose 1,2%. Đối với vùng gen *matK* khi sử dụng cặp primer *matK2.1F* và *matK5R* để khuếch đại không cho sản phẩm. Tuy nhiên, trong nghiên cứu trước đây khi sử dụng cặp primer trên để phân tích các loài lan thuộc chi *Dendrobium* cho tỷ lệ khuếch đại từ 90-100% (Nhóm tác giả, 2018). Đây là điểm đáng chú ý khi tiến hành nghiên cứu và giải trình tự các vùng gen thuộc các chi khác của họ phong lan. Dựa trên kết quả PCR của các mẫu lan nghiên cứu và khả năng nhận diện của từng DNA

barcode ở các mức độ khác nhau để tiến hành chọn lựa vùng DNA barcode và primer để tiến hành giải trình tự. Vùng ITS2 được khuếch đại với primer ITS2-F và ITS2-S3R được chọn lựa để giải trình tự do có tỷ lệ khuếch đại đạt 100% và vùng ITS2 được sử dụng nhiều trong việc nhận dạng một số loài lan Kim tuyến.

3.2 Đánh giá, định danh, phân tích mối quan hệ di truyền của giống lan Kim Tuyến

Kết quả PCR cho thấy vùng ITS1 có kích thước khoảng 450-500 bp, vùng ITS2 có kích thước 550-600 bp được giải trình tự tại công ty Macrogen (10F, 254 Beotkkot-ro geumcheon-gu, Soul 08511, Rep. of Korea). Hiệu chỉnh trình tự bằng phần mềm ATGC. Các trình tự sau khi hiệu chỉnh được BLAST trên NCBI và cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 với hệ số bootstrap là 1000.

Kết quả BLAST trên NCBI cho thấy trình tự tương đồng và mức độ bao phủ của các DNA

barcode nghiên cứu và trình tự trên NCBI của 06 mẫu lan nghiên cứu là vùng ITS1 (99%-100%, 98-100%), ITS2 (76-79%, 99-100%). Điều này cho thấy các trình tự vùng ITS1, ITS2 khuếch đại của 6 giống nghiên cứu mức độ tương đồng cao so với các trình tự đã được công bố trên NCBI. Phân tích hai loài *Anoectochilus* sp (A3) có sự tương đồng với

Anoectochilus formosanus (GQ396668.1 và GQ328777.1) với tỷ lệ 99-100% và *Anoectochilus* sp. (A4) có sự tương đồng với *Anoectochilus roxburghii* (KR815828.1). Các loài đã được xác định dựa trên hình thái có sự tương đồng cao so với các trình tự đã công bố (Bảng 4).

Bảng 4: Đánh giá mức độ tương đồng và bao phủ của trình tự DNA các vùng ITS1, ITS2 của các mẫu nghiên cứu với trình tự tương ứng trên NCBI

Mẫu	Vùng gen	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)
AF1	ITS1	<u>GQ396668.1</u> <i>Anoectochilus formosanus</i>	99	99
AF2		GQ328777.1 <i>Anoectochilus formosanus</i>	100	100
A3		<u>GQ396668.1</u> <i>Anoectochilus formosanus</i>	100	100
A4		<u>KR815828.1</u> <i>Anoectochilus roxburghii</i>	99	100
LD 1		<u>KR815834.1</u> <i>Lusidia discolor</i>	98	99
LD 2		KR815834.1 <i>Lusidia discolor</i>	99	99
AF1	ITS2	GQ328777.1 <i>Anoectochilus formosanus</i>	76	99
AF2		GQ328777.1 <i>Anoectochilus formosanus</i>	76	99
A3		GQ328777.1 <i>Anoectochilus formosanus</i>	79	99
A4		<u>KR815828.1</u> <i>Anoectochilus roxburghii</i>	78	99
LD 1		KR815834.1 <i>Lusidia discolor</i>	77	99
LD 2		AJ539483.1 <i>Lusidia discolor</i>	77	100

Bảng 5: Vị trí sai khác của các loài lan Kim tuyến dựa trên trình tự DNA vùng ITS1

Vị trí sai khác	Mẫu					
	AF1	AF2	A3	A4	LD1	LD2
52	T	T	T	T	C	C
60	A	A	A	A	T	T
117	A	A	A	A	G	G
126	G	G	G	G	A	A
128	A	A	A	A	T	T
135	T	T	T	T	G	G
143	T	T	T	T	C	C
145	G	G	G	G	A	A
147	C	C	C	C	T	T
148	T	T	T	T	C	C
171	T	T	T	T	C	C
174	A	A	A	A	G	G
175	C	C	C	C	T	T
186	C	C	C	A	C	C
200	A	A	A	A	G	G
245	A	A	A	A	T	T
260	A	A	A	A	G	G
275	C	C	C	C	T	T
284	G	G	G	G	A	A
285	G	G	G	G	A	A
289	A	A	A	A	T	T
290	A	A	A	A	C	C
302	G	G	G	A	C	C
309	A	A	A	A	T	T
329	C	C	C	C	T	T
335	A	A	A	A	G	G
359	A	A	A	A	T	T
393	A	A	A	A	A	T

Phân tích trình tự DNA của vùng gen ITS1, ITS2 sau khi được hiệu chỉnh có kích thước tương ứng là 393 bp và 477 bp, thực hiện phân tích bằng phần mềm MEGA 6.0 cho kết quả vùng bảo tồn của trình tự ITS1 là 365/393, ITS 2 là 438/477 vị trí, vùng biến đổi của trình tự ITS1 là 27/393 trong đó 1 vị trí

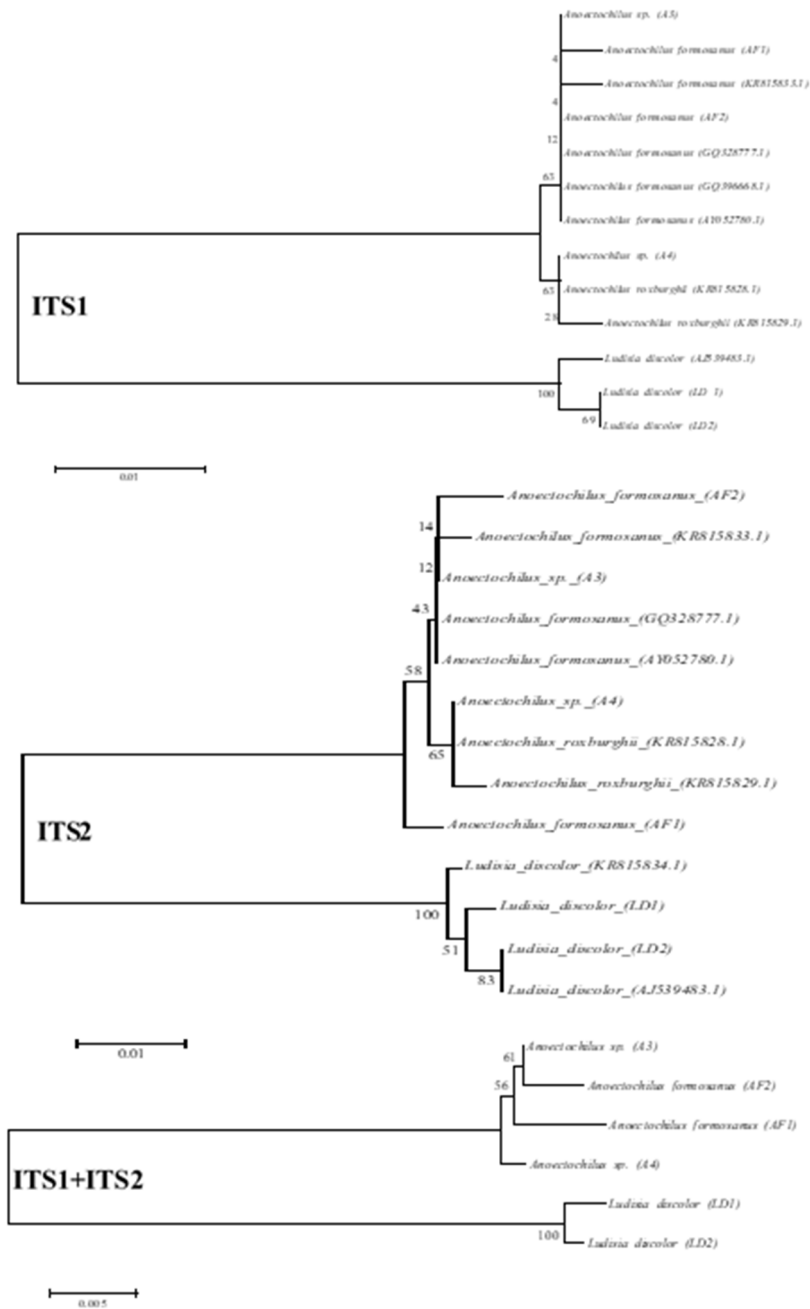
khác biệt trên trình tự DNA của 1 loài so với các loài còn lại và 25 vị trí có sự khác biệt từ 2 loài trở lên so với các loài còn lại, ITS2 là 35/477 vị trí trong đó 6 vị trí khác biệt trên trình tự DNA của 1 loài so với các loài còn lại và 29 vị trí có sự khác biệt từ 2 loài trở lên so với các loài còn lại (Bảng 5,6).

Bảng 6: Vị trí sai khác của các loài lan Kim tuyến dựa trên trình tự DNA vùng ITS2

Vị trí sai khác	Mẫu						
	AF1	AF2	A3	A4	LD1	LD2	
1	A	A	A	G	A	A	
4	C	C	C	T	C	C	
24	T	T	T	T	C	C	
32	A	A	A	A	T	T	
91	A	A	A	A	G	G	
100	G	G	G	G	A	A	
102	A	A	A	A	T	T	
109	T	T	T	T	G	G	
117	T	T	T	T	C	T	
119	G	G	G	G	A	A	
121	C	C	C	C	T	T	
122	T	T	T	T	C	C	
145	T	T	T	T	C	C	
148	A	A	A	A	G	G	
149	C	C	C	C	T	T	
160	A	A	A	C	A	A	
174	A	A	A	A	G	G	
219	A	A	A	A	T	T	
234	A	A	A	G	G	G	
249	C	C	C	T	T	T	
258	T	G	G	G	A	A	
259	G	G	G	A	A	A	
263	A	A	A	A	T	T	
264	A	A	A	G	C	C	
276	A	G	G	A	C	C	
283	T	A	A	A	T	T	
303	C	C	C	T	T	T	
309	A	A	A	G	G	G	
311	G	G	G	C	G	T	
332	A	A	A	T	T	T	
416	G	G	G	T	G	G	
457	A	C	C	A	A	A	
475	C	G	T	G	G	T	
476	A	T	C	T	T	C	
477	C	C	C	A	C	T	

Kết quả phân tích trên trình tự DNA của vùng ITS1, ITS2 cho thấy có sự khác biệt giữa hai chi *Anoetochilus* và *Lusidia*. Khi dựa trên trình tự DNA vùng gen ITS1 để phân tích cho thấy giữa các loài thuộc chi *Anoetochilus* chỉ có hai vị trí khác biệt điều này cho thấy việc xác định các loài khác nhau thuộc chi này gặp nhiều khó khăn khi chỉ dựa trên trình tự này. Tuy nhiên, khi phân tích các loài

thuộc chi *Anoetochilus* dựa trên trình tự DNA vùng gen ITS2 cho thấy vị trí biến đổi cao hơn là 20 vị trí. Và đối với hai loài thuộc chi *Lusidia* có 5 vị trí khác biệt. Điều này cũng cho thấy đặc điểm hình thái có thể tương tự nhau nhưng khi xét về di truyền phân tử thì có sự khác nhau. Kết quả này chứng tỏ có thể sử dụng vùng gen ITS1 và ITS2 để đánh giá mối quan hệ di truyền và xác định hai loài *Anoetochilus roxburhii*, *Anoetochilus formosanus*.



Hình 3: Cây phát sinh loài của 6 mẫu *Anoectochilus* sp (2), *Anoectochilus formosanus* (2), *Lusidia discolor* (2) dựa trên trình tự vùng gen ITS1, ITS2, ITS1+ITS2 và các trình tự tham chiếu đã công bố trên genbank

Kết quả phân tích dựa trên trình tự DNA vùng ITS1 cho thấy hai chi *Anoectochilus* và *Lusidia* phân làm 2 nhánh khác nhau. Hai loài nghiên cứu thuộc chi *Lusidia* được thu thập từ hai nguồn khác nhau một loài được thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh và một loài thu thập tại Quảng Nam có mối quan hệ di truyền gần nhau. Khi phân tích các loài *Anoectochilus roxburhii*, *Anoectochilus formosanus*

thuộc chi *Anoectochilus* chia làm 2 nhánh nhỏ. Mẫu A4 và KR815828.1 (*Anoectochilus roxburhii*) cùng một nhánh. Mẫu A3, loài *Anoectochilus formosanus* và các trình tự tham chiếu trên genbank thuộc loài này nằm trong cùng một nhánh. Từ kết quả trên cho thấy mẫu A4 chưa xác định loài thuộc loài *Anoectochilus roxburhii* và mẫu A3 thuộc loài *Anoectochilus formosanus*.

Kết quả phân tích dựa trên trình tự DNA vùng ITS2 cho thấy sự phân nhánh cây di truyền tương tự như vùng ITS1 nhưng có sự phân tách rõ ràng hơn. Đối với loài *Anoectochilus formosanus* (AF) nằm riêng một nhánh so với loài này và loài *Anoectochilus roxburhii*. Dựa trên trình tự nucleotide của loài này so với các trình tự cùng loài có 4 vị trí sai khác. Dựa trên cây phân loại di truyền của vùng ITS2 cho thấy *Anoectochilus* sp. (A4) và KR815828.1 (*Anoectochilus roxburhii*) nằm cùng một nhánh; *Anoectochilus formosanus*, *Anoectochilus* sp. (A3) và GQ328777.1 (*Anoectochilus formosanus*) nằm chung một nhóm. Khi so sánh với các trình tự trên genbank cho thấy *Anoectochilus* sp. (A3) thuộc loài *Anoectochilus formosanus* với mức độ tương đồng 100%. Điều này cho thấy trình tự DNA vùng ITS2 bước đầu có thể phân biệt được các loài nghiên cứu thuộc chi *Anoectochilus*.

Kết quả phân tích dựa trên sự kết hợp hai vùng gen ITS1 và ITS2 để phân tích nhằm đánh giá mức độ xác định so với việc đánh giá từng gen riêng lẻ. Kết quả cho thấy loài *Anoectochilus formosanus* nằm trong một nhóm và *Anoectochilus roxburhii* nằm riêng một nhánh.

4 KẾT LUẬN

Kết quả khảo sát các vùng gen ITS1, ITS2, ITS, *rbcl*, *matK*, *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC1*, *rpoC2* trên 06 mẫu lan thuộc chi *Anoectochilus*, *Lusidia* cho tỷ lệ khuếch đại thành công từ 50 - 100%. Trong nghiên cứu này đã đánh giá và chọn lọc được vùng gen ITS1, ITS2 thích hợp cho việc phân tích và xác định loài của một số loài lan thuộc hai chi này. Dựa trên kết quả khuếch đại của các vùng gen DNA barcode, sản phẩm PCR vùng gen ITS1 và gen ITS2 được giải trình tự để phân tích mối quan hệ di truyền, xác định được loài. Kết quả phân tích trình tự DNA của vùng gen ITS1 và ITS2 có thể dùng để định danh được hai mẫu chưa xác định được loài. Dựa trên kết quả BLAST trên genbank và cây phát sinh chủng loài của hai vùng ITS1, ITS2 và ITS1+ITS2 cho thấy mẫu A3 thuộc loài *Anoectochilus formosanus* và mẫu A4 thuộc loài *Anoectochilus roxburhii*. Các kết quả trên, chứng tỏ có thể sử dụng vùng ITS1 và ITS2 để đánh giá mối quan hệ di truyền và xác định một số loài thuộc chi *Anoectochilus* cụ thể là *Anoectochilus formosanus* và *Anoectochilus roxburhii*.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ một phần kinh phí và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y., and Satake, M., 2010. "Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcl* sequences." *Journal of Natural Medicines*. 64(2): 133-138.
- Cameron, K. M., 2006. "A comparison and combination of plastid *atpB* and *rbcl* gene sequences for inferring phylogenetic relationships within *Orchidaceae*." *Aliso*. 22: 447-464.
- Cameron, K. M., Chase, M. W., Whitten, W. M., Kores, P. J., et al., 1999. "A phylogenetic analysis of the *Orchidaceae*: evidence from *rbcl* nucleotide sequences." *American Journal of Botany*. 86(2): 208-224.
- Chen, J.-R. and Y.-J. Shiao., 2015. "Application of internal transcribed spacers and maturase K markers for identifying *Anoectochilus*, *Lusidia*, and *Ludochilus*." *Biologia plantarum*. 59(3): 485-490.
- Đỗ Thị Gấm, Hoàng Đăng Hiếu., Phạm Bích Ngọc và Chu Hoàng Hà., 2017. "Phân tích quan hệ di truyền của một số loài lan tại Việt Nam". Trong: Báo cáo khoa học về sinh thái và tài nguyên thực vật. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên thực vật lần 7. Hà Nội, ngày 20/10/2017. NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ. Hà nội, trang 133-139.
- Doyle, J. J., 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Du, X. M., Sun, N. Y., Hayashi, J., Chen, Y., Sugiura, M., and Shoyama, Y., 2003. "Hepatoprotective and antihyperliposis activities of in vitro cultured *Anoectochilus formosanus*." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 17(1): 30-33.
- Fang, H. L., Wu, J. B., Lin, W. L., Ho, H. Y. and Lin, W. C., 2008. "Further studies on the hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus*." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 22(3): 291-296.
- Freudenstein, J. V. and M. W. Chase., 2015. "Phylogenetic relationships in *Epidendroideae* (*Orchidaceae*), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification." *Annals of botany*. 115(4): 665-681.
- Group, C. P. B., Li, D. Z., Gao, L. M., et al., 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.

- Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., et al., 2009. "A DNA barcode for land plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(31): 12794-12797.
- Kim, H. M., Oh, S. H., Bhandari, G. S., Kim, C. S. and Park, C. W., 2014. "DNA barcoding of Orchidaceae in Korea." *Molecular Ecology Resources*. 14(3): 499-507.
- Lee, N., 2011. "Illustrated flora of Korean orchids." Seoul (South Korea): Ewha Womans University Press (in Korean). 290-299.
- Lv, T., Teng, R., Shao, Q., Wang, H., Zhang, W., Li, M., and Zhang, L., 2015. "DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants." *Planta*. 242(5): 1167-1174.
- Teuscher, H., 1978. "Collector's item: *Erythrodes*, *Goodyera*, *Haemaria* and *Macodes*, with *Anoectochilus*." *Amer. Orchid Soc. Bull.* 47(2): 121-129.
- Phạm Hoàng Hộ., 2010. *Cây cỏ Việt Nam III*. Nhà xuất bản Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh, 789 pages.
- Sinclair, E.A., Pérez-Losada, M and Crandall, K.A., 2005. Molecular phylogenetics for conservation biology. *Phylogeny and conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 19-56.
- Singh, H.K., Parveen, I., Raghuvanshi, S and Babbar, S.B., 2012. The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC research notes*. 5 (1): 42.
- Siripiyasing, P., Kaenratana, K., Mookamul, P., Tanee, T., Sudmoon, R and Chaveerach, A., 2012. DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand. *African Journal of Agricultural Research*. 7: 393-404.
- Srikulnath, K., Sawasichai, S., Jantapanon, T.K., Pongtongkam, P and Peyachoknagul, S., 2015. Phylogenetic relationship of *Dendrobium* species in Thailand inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *The Horticulture Journal*. 84: 243-252.
- Xu, S., Li, D., Li, J., et al., 2015. Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia. *PloS one*. 10 (1) 1-12.