

## XÁC ĐỊNH MỘT SỐ NGUỒN GEN LILY (*LILIUM*) BẢN ĐỊA Ở VIỆT NAM

Bùi Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Đồng Huy Giới  
Nguyễn Hữu Cường<sup>1</sup>, Bùi Văn Thắng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Học Viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

Lily (*Lilium*) là một trong các loài hoa đẹp, đa dạng và phong phú về chủng loại, có giá trị kinh tế cao và được ưa chuộng khắp nơi trên thế giới. Chi *Lilium* bao gồm 110 đến 120 loài thuộc họ *Liliaceae* (Tuyl J. M. V et al., 2011). Ở Việt Nam, bên cạnh những giống lily nhập nội, chúng ta đã và đang trồng một số loài lily bản địa ở đồng bằng từ lâu đời như là hoa Loa kèn trắng (còn gọi là Huệ tây), Loa kèn tứ quý (Đặng Văn Đông, 2010) và sở hữu một số loài lily đặc hữu quý mới được phát hiện mọc tự nhiên ở vùng núi phía bắc như Bách hợp (còn gọi là lily hoang dại) (Nguyễn Thị Phương Thảo, 2009). Đây là những nguồn gen quý, đang được khai thác không kiểm soát và có nguy cơ suy giảm nghiêm trọng. Như vậy, cần có những nghiên cứu đầy đủ từ sinh học mô tả như hình thái học, sinh lý học đến sinh học phân tử để phục vụ trong việc đánh giá chọn lọc, nhân giống và tạo giống mới phù hợp với điều kiện sinh thái và nhu cầu của địa phương.

Bên cạnh những phương pháp cổ điển trong đánh giá giống, loài, các phương pháp hiện đại cần được phát huy để tiết kiệm thời gian, mà lại cho kết quả chính xác, đó là các phương pháp sinh học phân tử. Chỉ thị phân tử đã được xem như công cụ hữu ích và được sử dụng rộng rãi vì thời gian từ lúc bắt đầu thí nghiệm tới khi cho ra kết quả ngắn, chính xác trong nghiên cứu di truyền. Các chỉ thị barcode (hay còn gọi là mã vạch DNA) là một phương pháp mới do Paul Hebert đưa ra lần đầu tiên vào năm 2003 (Hebert, 2003). Ưu điểm của phương pháp này là không cần phụ thuộc vào hình thái của cả cây hoàn chỉnh mà chỉ cần một lượng nhỏ mẫu vẫn có thể xác định được chính xác loài với độ chính xác cao. Công cụ này xác định loài nhanh hơn các phương pháp truyền thống khác, đồng thời cung cấp các dữ liệu trong bảo tồn sinh học như khảo sát đa dạng sinh học, phát triển nguồn gen quý.

Các loài lily đa dạng và phong phú có kích thước bộ gen rất lớn nên gặp khó khăn khi sử dụng kỹ thuật phân tử (Tuyl J. M. V et al., 2011). Chính vì vậy, quần thể *Lilium* không chỉ có ít công bố về các đặc điểm sinh thái, nông học mà còn rất ít công bố chuỗi trình tự đặc trưng phân loại của loài lily đặc hữu trong thư viện Gene Bank. Các loài lily đặc hữu Việt Nam cũng chưa có báo cáo đầy đủ về xác định loài và phân loại nào được công bố. Chính vì vậy, báo cáo này trình bày những kết quả bước đầu về xác định một số nguồn gen lily (*Lilium*) bản địa phổ biến ở Việt Nam nhằm phục vụ cho việc chọn, tạo và phát triển nguồn hoa lily quý hiếm cho Việt Nam, cũng như thế giới.

### I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu nghiên cứu:

Các mẫu lily được thu thập có tên ở bảng sau (bảng 1).

Bảng 1

Danh sách các mẫu và nguồn gốc thu thập

STT	Tên địa phương	Ký hiệu	Nơi thu thập
1	Bách hợp	LHD	SaPa, Lào Cai
2	Loa kèn tứ quý	LK	Tây Tựu, Hà Nội
3	Loa kèn trắng	LKT	Tây tựu, Hà Nội

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Phương pháp thu mẫu và đánh giá loài

Mẫu cây được thu thập và đánh giá các đặc điểm hình thái cây theo Nguyễn Nghĩa Thìn (2007).

### 2.2. Tách chiết DNA và nhân dòng gen ITS và gen lục lạp *rpoC1* bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB. DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% được nhuộm trong Ethidium Bromide. Kết quả lượng DNA được ghi nhận bằng hệ thống phân tích hình ảnh tự động GelDoc và hàm lượng DNA được đo bằng máy Nanodrop.

DNA được pha loãng về nồng độ 100 ng/μl làm nguyên liệu để tiến hành phản ứng PCR. Sản phẩm PCR thu được sau đó cũng được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose.

Bảng 2

Trình tự mỗi dòng trong phản ứng PCR

Tên mỗi	Ký hiệu	Trình tự mỗi (5' - 3')	Kích thước (bp)
ITS	ITSF	ACGAATTCATGGTC CGGTGAAGTGTTTCG	800
	ITSR	TAGAATTCCTCCGGT TCGCTCGC GTTAC	
<i>rpoC1</i>	1F	GTGGATACACTTCT TG TAATGG	550
	3R	TGAGAAAACATAA GTAAACGGGC	

Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1%, sau đó được làm sạch (thôi gel) theo bộ Kit QIAquick Gel Extraction (của hãng QIAGEN). Kiểm tra trên gel agarose 1% xem chất lượng DNA sau khi tinh sạch bằng kit.

### 2.3. Tạo plasmid tái tổ hợp

Biến nạp vector tái tổ hợp pBT vào tế bào E.coli DH5α theo phản ứng

Bảng 3

Thành phần phản ứng nối gen vào vector pBT

Thành phần	Thể tích (μl)
H <sub>2</sub> O	
Buffer T <sub>4</sub> ligase (10X)	1
Vector BT	1
Gen	5
T <sub>4</sub> DNA ligase (enzym)	1
Tổng số	10

Sản phẩm PCR được bổ trí vào giữa trình tự nucleotide của gen LacZ ở pBT, gen sản xuất β-galactosidase (chất xúc tác thủy phân X-gal màu xanh). Do đó vi khuẩn không mang plasmid tái tổ hợp sẽ cho khuẩn lạc màu xanh. Chọn khuẩn lạc có màu trắng nuôi trong LB lỏng có bổ sung carbenicilin qua đêm.

Kiểm tra plasmid bằng thực hiện phản ứng PCR: Plasmid được tách và kiểm tra plasmid bằng phản ứng PCR. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR giống với quá trình nhân gen. Sản phẩm PCR được kiểm tra điện di trên gel agarose 1%.

## 2.4. Giải trình tự

Trình tự DNA được xác định bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lí của Sanger với bộ kit BigDye Terminator v. 3.2 Cycle Sequencing (Macrogen Inc. Hàn Quốc).

## 2.5. Phương pháp phân tích số liệu

Các chuỗi DNA được xử lý bằng phần mềm DNASTar và kiểm chứng với dữ liệu từ GenBank bằng chương trình BLAST. Các trình tự được dóng hàng bằng phần mềm BioEdit. Cây phân loại được xây dựng theo phương pháp tối đa (Maximum Parsimony - MP) trên cơ sở số liệu thu được bằng phần mềm MEGA 6.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Một số đặc điểm phân bố, hình thái cây Lily ở Việt Nam

Theo Trần Duy Quý và cộng sự (2004), cây hoa lily có nguồn gốc chủ yếu từ Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, California (Mỹ) và rải rác ở một số nơi khác. Loại cây này có mặt ở hầu hết các châu lục, với một khoảng phân bố rộng từ 10° đến 60° độ bắc của những vùng có khí hậu ôn đới và lạnh hoặc ở những vùng núi cao từ 1200 m trở lên của các vùng nhiệt đới như Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Việt Nam. Ước chừng khoảng 80 loài cơ bản, chúng xuất hiện ở châu Á với khoảng 50-60 loài, châu Mỹ có 20 loài, châu Âu là 12 loài (Trần Duy Quý và cs, 2004). Ở Việt Nam, loài *L. poilanei* Gagnep đã được nhiều nhà khoa học cho rằng mọc hoang dại ở SaPa, Hoàng Liên Sơn (Nguyễn Nghĩa Thìn, Nguyễn Thị Thời, 1998; Trần Duy Quý và cs, 2004; Nguyễn Phương Thảo và cs, 2012). Các giống *L. longiflorum* đã trồng được lâu đời ở Hà Nội và một số tỉnh thành trong cả nước và đặc biệt là *L. formolongo* rất được ưa chuộng và phát triển tốt ở Việt Nam những năm gần đây ngay cả ở thời điểm mùa hè nắng nóng (Đặng Văn Đông và cs, 2010).

Theo hình thái và đặc điểm sinh thái của các mẫu lily nghiên cứu, 2 nhóm mẫu thu thập với kí hiệu LK, LKT (thu thập tại Hà Nội) được xác định theo lần lượt là *L. formolongi*; *L. longiflorum* Thunb và LHD (thu thập tại SaPa, Lào Cai) được xác định là *L. poilanei* Gagne. Kết quả này cũng tương tự như các công bố của Nguyễn Nghĩa Thìn, Nguyễn Thị Thời (1998), Đặng Văn Đông và cs, (2010) và Nguyễn Phương Thảo và cs, (2012).

### 2. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen các vùng trình tự trong nhân và trong ty thể các mẫu lily nghiên cứu

Các vạch băng trên bản gel điện di (Hình 1) cho thấy, mẫu DNA sau khi chiết tách từ các mẫu lá tương đối rõ nét, không bị đứt gãy, chứng tỏ DNA tổng số của các mẫu đã được tách chiết thành công. Hàm lượng DNA tổng số được kiểm tra bằng máy đo Nanodrop, thể hiện ở Bảng 4.



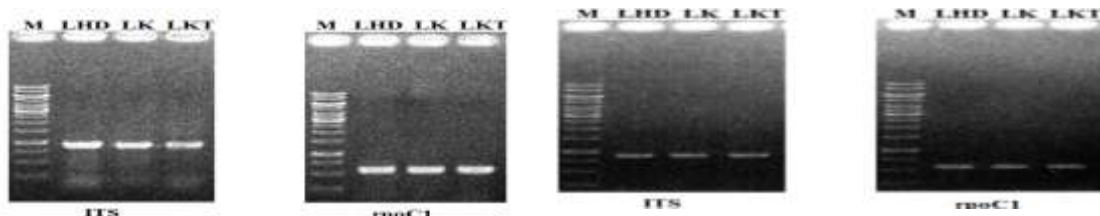
Hình 1: Ảnh điện di sản phẩm tách chiết DNA của các mẫu lily nghiên cứu.

M: thang marker 1kb

Bảng 4  
Hàm lượng DNA tổng số trong các mẫu

Tên mẫu	A260/280	Nồng độ DNA (ng/μl)
LK	2,09	1081,2
LHD	1,80	249,7
LKT	2,14	819,4

Tỷ số A260/A280 dao động khoảng 1,80 đến 2,14 cho thấy, DNA có độ tinh sạch cao và tương đối đồng đều; nồng độ khoảng từ 249 ng/μl đến 820 ng/μl, có thể sử dụng cho các phản ứng PCR. Phản ứng PCR được tiến hành với mỗi khuếch đại vùng ITS (gen trong nhân) và rpoC1 (gen lục lạp) kết quả thu được biểu diễn ở Hình 2.



Hình 2: Ảnh điện di sản phẩm PCR từ DNA các mẫu lily với các chỉ thị ITS và rpoC1  
M: thang marker1kb

Các băng vạch thu được trên hình ảnh điện di chứng minh các vùng gen trên đã được khuếch đại thành công (hình 2) và đặc hiệu (hình 3). Các vùng gen nhân và vùng gen ty thể này tiếp tục được tạo dòng (cloning) và giải trình tự.

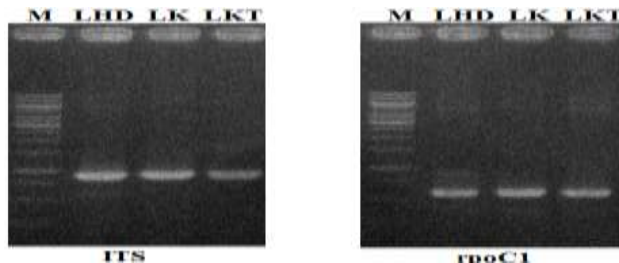
### 3. Tạo dòng các đoạn trình tự gen mục tiêu và giải trình tự nucleotid

Các đoạn gen mục tiêu được tạo dòng trong tế bào khả biến *E. coli* DH5α với vector pBT sau khi được kết hợp gen đích bằng phản ứng nối (ligation). Kết quả, một lượng lớn khuẩn lạc xanh và trắng mọc chứa vector tái tổ hợp hoặc tái khép vòng (hình 4). Một số khuẩn lạc trắng đã được kiểm tra sự có mặt của gen đích bằng phản ứng PCR-clony với mỗi đặc hiệu của các gen mục tiêu (hình 5).



Hình 4: Đĩa petri nuôi khuẩn *E. coli* DH5α sau biến nạp.

Vòng tròn màu trắng chỉ khuẩn lạc trắng;  
vòng tròn màu xanh chỉ khuẩn lạc xanh



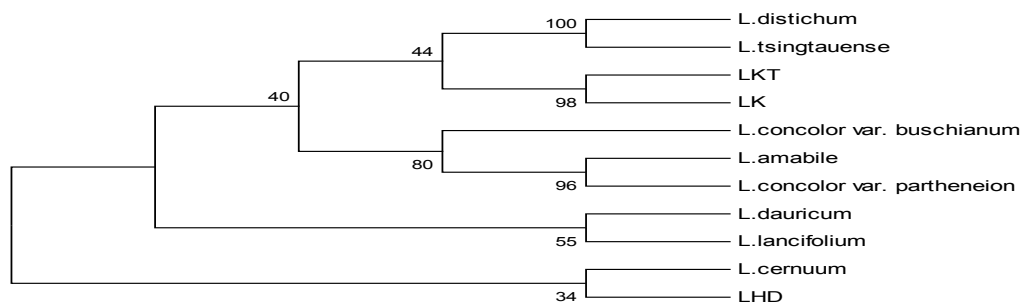
Hình 5: Sản phẩm PCR của plasmid với cặp môi ITS và rpoC1

M: thang marker1kb

Hình 5 cho thấy sản phẩm PCR trên genome có kích thước theo tính toán lý thuyết khoảng 800 bp (với đoạn gen ITS) và 550bp (với đoạn gen rpoC1), chứng tỏ đoạn gen mong muốn đã được tạo dòng thành công trong vi khuẩn *E. coli*.

Các đoạn DNA sau khi được tách dòng thành công được đọc trình tự và được xử lý bằng phần mềm Bioedit và DNASTAR và đối chiếu với những trình tự đã được công bố trên ngân hàng GenBank. Kết quả Blast trên ngân hàng gen NCBI cho thấy, trình tự ITS của cả 3 mẫu có mức độ tương đồng với trình tự ITS1 – 5,8S – ITS2 các loài thuộc chi *Lilium* trên thế giới đã công bố từ 92 - 98% với độ bao phủ từ 74 - 96%. Đó là các loài *L. dauricum* (HQ724821.1); *L. concolor* var. *buschianum* (HQ724819.1); *L. concolor* var. *Partheneion* (HQ724820.1); *L. amabile* (HQ724816.1); *L. cernuum* (HQ724818.1); *L. distichum* (HQ724822.1); *L. tsingtauense* (HQ724827.1) và *L. lancifolium* (HQ724825.1) (Sultana S. et al., 2010).

Ngoài ra, kết quả phân tích bằng phần mềm Bioedit cho thấy, có 117 điểm sai khác giữa các loài, chiếm 13,5% trên toàn bộ trình tự. Trong đó 64 vị trí trên vùng ITS1, 42 vị trí trên vùng ITS2, 11 vị trí khác nhau trên vùng cuối gen 5.8S. Vùng 5,8S là vùng nằm giữa ITS1 và ITS2. Kết quả phân tích vùng 5,8S của các mẫu cho thấy đây là vùng ít biến động, tương đối bảo tồn và chỉ có 14 điểm sai khác tập trung chủ yếu ở cuối vùng 5,8S. Từ việc phân tích trình tự 3 vùng ITS1, ITS2 và 5,8S cho thấy, các mẫu có càng ít điểm sai khác với các mẫu còn lại thì có quan hệ họ hàng càng gần. Kết quả này thể hiện ở hình 6.



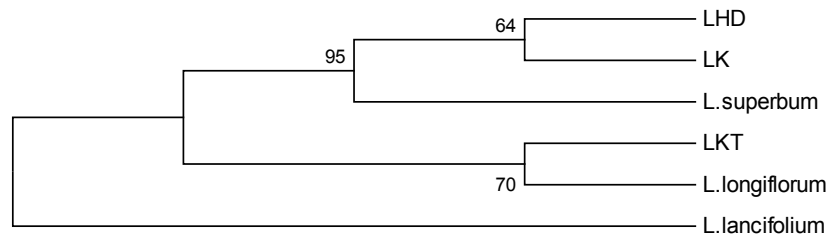
Hình 6: Cây phân loại mối quan hệ di truyền của nguồn gen lily bản địa Việt Nam và các nguồn gen lily trên thế giới dựa trên trình tự gen ITS1 – 5,8S – ITS2

Quan sát cây phân loại xây dựng trên cơ sở so sánh trình tự của đoạn gen ITS1 – 5.8S – ITS2, ta nhận thấy rằng: Các giống LK (*L. formolongi*) và LKT (*L. longiflorum* Thunb) nằm trong cùng một nhánh nhỏ chứng tỏ chúng có quan hệ gần gũi với nhau (với độ tin cậy cao, chỉ số bootstrap 98%). Có thể nói, 2 giống này còn có quan hệ gần gũi với loài *L. tsingtauense*, *L. distichum* (thuộc nhóm Martagon) mặc dù chỉ số bootstrap thấp (44%). Giống LHD (*L. poilanei* Gagnep) có quan hệ gần với loài *L. cernuum* (thuộc nhóm Asiatic) nên nằm cùng trên một nhánh nhỏ nhưng có chỉ số bootstrap thấp 34% - độ tin cậy thấp. Như vậy, ta có thể sơ bộ kết luận chỉ thị ITS cho phép phân biệt được 3 mẫu nghiên cứu này (*L. poilanei* Gagnep, *L. formolongi*, *L. longiflorum* Thunb) với các loài khác trong cùng chi *Lilium*.

Kết quả Blast trên ngân hàng gen NCBI với trình tự rpoC1 cho thấy, trình tự rpoC1 của cả 3 mẫu có mức độ tương đồng với trình tự của các loài thuộc chi *Lilium* trên thế giới ở mức 99% với độ bao phủ từ 90 - 95%. Đó là các loài *L. longiflorum* (KC968977.1) (Kim J. S. and Kim J. .; 2013); *L. superbum* (KP462883.1) (Lam V. K. Y. and Graham S. W., 2015); *L. lancifolium* (JF972827.1) (Kim D. K. and Kim J. H., 2011).

Theo kết quả phân tích vùng gen rpoC1 của 3 mẫu nghiên cứu cùng với 3 trình tự DNA vùng gen này của các loài thuộc chi *Lilium* (2 loài) đã được công bố trên GenBank bên trên bằng phần mềm Bioedit (bảng 6), cho thấy có 12 điểm sai khác giữa các loài, chiếm 2,3% trên toàn bộ trình tự. Có thể thấy được sự đa hình trong trình tự rpoC1 thấp hơn nhiều so với vùng gen ITS.

Từ hình 7, ta nhận thấy cây phân loại gồm 2 nhánh lớn. Quan sát các nhánh nhỏ, ta thấy 2 mẫu nghiên cứu LHD (*L. poilanei* Gagnep) và LK (*L. formolongi*) có mối quan hệ di truyền của gen rpoC1 gần nhau (với chỉ số bootstrap là 64%), 2 mẫu này cũng có quan hệ gần với loài *L. superbum* thuộc nhóm Oriental (95%). Còn mẫu nghiên cứu LKT (*L. longiflorum* Thunb) thì có quan hệ gần nhau với *L. longiflorum* thuộc nhóm Trumpet (chỉ số bootstrap 70%). Chỉ thị rpoC1 cho phép phân biệt các mẫu với chỉ số bootstrap cao nhưng hiện nay các trình tự rpoC1 của các loài *Lilium* được công bố trên ngân hàng GenBank chưa nhiều, đây có thể được xem là chỉ thị tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về định danh và phân các loài thuộc chi *Lilium*.



Hình 7: Cây phân loại mối quan hệ di truyền của nguồn gen lily bản địa Việt Nam và các nguồn gen lily trên thế giới dựa trên trình tự gen *rpoC1*

### III. KẾT LUẬN

1. Loa kèn trắng, Loa kèn tứ quý và Bách hợp được thu thập tại các vị trí phân bố được xác định lần lượt là *L. longiflorum* Thunb, *L. formolongi* và *L. poilanei* Gagnep.

2. Đã khuếch đại vùng ITS, *rpoC1* và giải trình tự thành công các vùng này của 3 mẫu lily nghiên cứu. Từ thông tin của gen *rpoC1* đã xác định rằng cây Loa kèn trắng (*L. longiflorum* Thunb) thuộc nhóm Trumpet; cây Loa kèn tứ quý (*L. formolongi*) và Bách hợp (*L. poilanei* Gagnep) có mối quan hệ di truyền gần nhau, 2 mẫu này cũng có quan hệ gần với loài *L. superbum* thuộc nhóm Oriental.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Văn Đông, Nguyễn Thị Thanh Tuyền, Trịnh Khắc Quang, Lê Thu Hương,** 2010. Ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo và nhân giống cây hoa lily, loa kèn. Nhà xuất bản Hà Nội. 118 trang
2. **Hebert P. D. N., Cywinska A, Ball S. L., deWaard J. R.,** 2003. *Biological identifications through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 270:313-322
3. **Kim D. K. and Kim J. H.,** 2011. *Lilium lancifolium* RNA polymerase C (*rpoC1*) gene, partial cds; chloroplast. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. **Nguyễn Nghĩa Thìn,** 2007. Các phương pháp nghiên cứu thực vật. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội - 171 trang
5. **Nguyễn Nghĩa Thìn, Nguyễn Thị Thời,** 1998. Đa dạng thực vật có mạch vùng núi cao Sapa- Phansipan. NXB. ĐHQG Hà Nội -.115 trang.
6. **Nguyễn Thi Phương Thảo, Vũ Quang Khánh, Cao Việt Anh,** 2009. Đánh giá sự đa dạng hình thái và đặc điểm nông sinh học của cây lily bản địa *Lilium poilanei* Gagn. Tạp chí Khoa học và Phát triển: Tập 7, số 4: 460 – 467.
7. **Lam V. K. Y. and Graham S. W.,** 2015. *Lilium superbum* voucher NCU: Chase, M. W.:112 chloroplast, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. **Sultana, S., Choi, H. W. and Bang, J. W.,** Molecular phylogeny of ITS region in Korean *Lilium*. *Lilium amabile*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
9. **Trần Duy Quý, Đặng Văn Đông, Đinh Thế Lộc,** 2004. Giới thiệu một số giống hoa Lily mới được nhập vào Việt Nam và khả năng phát triển của chúng. Bản tin Nông nghiệp- Giống công nghệ cao, Hà Nội. Nxb. Nông nghiệp, Vol. 6, 10-15.
10. **Tuyl J. M. V, Arens P., Ramanna M. S ,Shahin A., Khan N , Xie S., A., Marasek Ciolakowska A., Lim K. B. and R. Barba- Gonzalez,** 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Springer pub. pp 161-183.





*L. longiflorum* Thunb



*L. formolongi*



*L. poilanei* Gagnep



*L. lancifolium*



*L. superbum*



*L. dauricum*



*L. tsingtauense*



*L. distichum*



*L. cernuum*

Hình 8: Hình ảnh một số loài hoa lily Việt Nam và trên thế giới

## IDENTIFICATION OF SOME GENETIC RESOURCES OF INDIGENOUS LILY (LILIUM) IN VIETNAM

Bui Thi Thu Huong, Dong Huy Gioi  
Nguyen Huu Cuong, Bui Van Thang

### SUMMARY

*Lilium longiflorum* Thunb, *L. formolongi* and *L. poilanei* Gagnep identified based on morphology studies are precious species belong to *Lilium* genus, are being uncontrollably exploited and are at risk of severe decline. There are now limit of general database and the specific molecular information. So, they were collected, their ITS and rpoC1 genes were amplified and studied. The ITS & rpoC1 sequences were analyzed and compared with other lilies species in GenBank. The results showed that these two DNA regions of the three lilies species were amplified and successfully sequenced. Taxonomy trees of the three lilies and some other ones in the world were constructed based on ITS and rpoC1 sequences. In particular, the results from the rpoC1 gene were confirmed that *L. longiflorum* Thunb belonged to the Trumpet group while *L. formolongi* and *L. poilanei* Gagnep had close genetic relationship. These two lilies species were closely genetic relationship to *L. superbum*, a species of the Oriental group.