

**PHÂN TÍCH QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ LOÀI LAN TẠI VIỆT NAM****Đỗ Thị Gấm<sup>1</sup>, Hoàng Đăng Hiếu<sup>2</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Trung tâm Phát triển công nghệ cao<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Chi Lan kim tuyến (*Anoectochilus*) thuộc họ Lan (Orchidaceae), có tác dụng trong việc điều trị các chứng bệnh đau bụng, tiểu đường, viêm thận, sốt, huyết áp cao, liệt dương, rối loạn gan, lá lách và chứng đau nhói ngực (Lin, 2007). Chi *Anoectochilus* có khoảng 30 - 40 loài, các loài Lan kim tuyến phân bố trên một khu vực khá rộng, từ vùng Himalaya đến Đông Nam Á, miền Nam Trung Hoa, Úc, Papua New Guinea và một số hải đảo thuộc quần đảo Thái Bình Dương. Ở Việt Nam đã thống kê được 12 loài, phân bố chủ yếu ở Lào Cai (Sapa, Văn Bàn), Hà Tĩnh (Hương Sơn), Quảng Trị, Kon Tum (núi Ngọc Linh, núi Chư Mom Ray), Đắk Lắk (Krông Bông), Lâm Đồng (núi Bidoup), (Nguyễn Tiến Bản, 2005). Do có nhiều tác dụng quý giá nên các loài Lan kim tuyến được thu mua với giá khá cao. Hiện nay Lan kim Tuyến ngoài tự nhiên đang bị suy giảm do bị khai thác tận diệt nên đã được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam và Nghị định 32/2006/NĐ-CP, xếp hạng EN A1a,c,d, bị cấm khai thác sử dụng mục đích thương mại.

Do đặc điểm bên ngoài của các loài lan này là rất giống nhau nên để phân loại chủ yếu dựa vào hoa. Trong tự nhiên, các loài Lan kim tuyến có số lượng không nhiều, mọc rải rác, khả năng tái sinh thấp, ít ra hoa, do đó việc phân loại các loài lan này bằng hình thái là rất khó. Sử dụng chỉ thị ADN cho phép chúng ta có thể phân loại chính xác các loài thực vật có mối quan hệ gần gũi một cách nhanh chóng chính xác vào bất kì giai đoạn phát triển nào. Các gen dùng làm chỉ thị DNA barcode cũng được nhiều nhà khoa học sử dụng trong việc phân loại thực vật. Hiện nay, nhiều vùng gen được nghiên cứu để làm chỉ thị DNA cho thực vật, nhưng cần nhiều vùng DNA chỉ thị để có thể phân loại chính xác các loài thực vật (Chase et. al., 2007; Kress and Erickson, 2008). Vùng ITS trong DNA ribosome đã được chứng minh có hiệu quả trong việc đánh giá mối quan hệ phát sinh loài giữa các loài trong cùng một họ (Baldwin, 1992; Chen et al, 2010). Gen matK trong DNA lục lạp là một chỉ thị được sử dụng nghiên cứu những biến đổi trong phạm vi một loài và ở mức độ thấp hơn (Aoki and Ito, 2000; Soltis et al, 2001). Gen psbA trong DNA lục lạp là chỉ thị DNA được sử dụng có hiệu quả trong việc phân tích mối quan hệ di truyền giữa các cá thể trong loài (Kress et al., 2005).

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chỉ thị là ITS, matK và psbA-trnH để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các loài lan kim tuyến và một vài loài khác trong họ lan, đồng thời so sánh giữa phương pháp phân loại bằng hình thái và di truyền phân tử.

**I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU****1. Vật liệu**

Mẫu nghiên cứu: Gồm 8 mẫu lá của 5 loài Lan nghiên cứu đã được định danh bằng hình thái (Bảng 1). Các mẫu lá được làm khô và bảo quản trong silicagel cho đến khi tách chiết DNA.

Các trình tự trên ngân hàng gen: JN166019, EU797513, EU797512, KF361656, AJ543911, JN166018, KF261998, JN166026, KJ501999, KF695167, JN166027, JN166023, KF361648, KC704364, KC704368, KC704374, KC704365, HM021626, HM021605, HM021603, EU213755, KF695176, JN166060, GQ328774, EU817408, AJ539483, JN166073, GQ396668, EU700340, JN166058, JF980331, GQ328779, AF366898, HM021601, HM021595, JN166074.

Bảng 1

## Thông tin các mẫu nghiên cứu

STT	Tên khoa học	Địa điểm thu mẫu
Mẫu số 1	<i>Anoectochilus lylei</i> Rolfe ex Downiex	Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng
Mẫu số 2	<i>Anoectochilus lylei</i> Rolfe ex Downiex	Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng
Mẫu số 3	<i>Anoectochilus anamensis</i> Aver (2005)	Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng
Mẫu số 4	<i>Anoectochilus lylei</i> Rolfe ex Downiex	Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng
Mẫu số 5	<i>Goodyera hispida</i> Lindl. (1857)	Huyện Mai Châu, tỉnh Hòa Bình
Mẫu số 6	<i>Anoectochilus roxburghii</i> (Wall.) Lindl	Vườn thực nghiệm Kon Plong, tỉnh Kon Tum
Mẫu số 7	<i>Anoectochilus lylei</i> Rolfe ex Downiex	Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng
Mẫu số 8	<i>Ludisia discolor</i>	Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng

Các cặp môi sử dụng được liệt kê tại bảng 2

Bảng 2

## Thông tin của các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

Vùng gen	Chiều	Trình tự môi	Nhiệt độ gắn môi (°C)
<i>matK</i>	Xuôi	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	50
	Ngược	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	
<i>psbA-trnH</i>	Xuôi	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	52
	Ngược	CGCGCATGGTGGATTACACAATCC	
ITS	Xuôi	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	54
	Ngược	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	

## 2. Phương pháp nghiên cứu

**Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại gen đích bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen:** DNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (Doyle and Doyle 1987) và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose. Kỹ thuật PCR khuếch đại các gen đích với 3 cặp môi trên với chu trình nhiệt: 94°C/5'; 35 chu kỳ (94°C/30''; 50-54°C/60''; 72°C/50''); 72°C/10'. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% và được tinh sạch sử dụng bộ kit Qiaquick gel purification. Trình tự các đoạn DNA được xác định trên hệ thống ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) theo nguyên lý của Sanger.

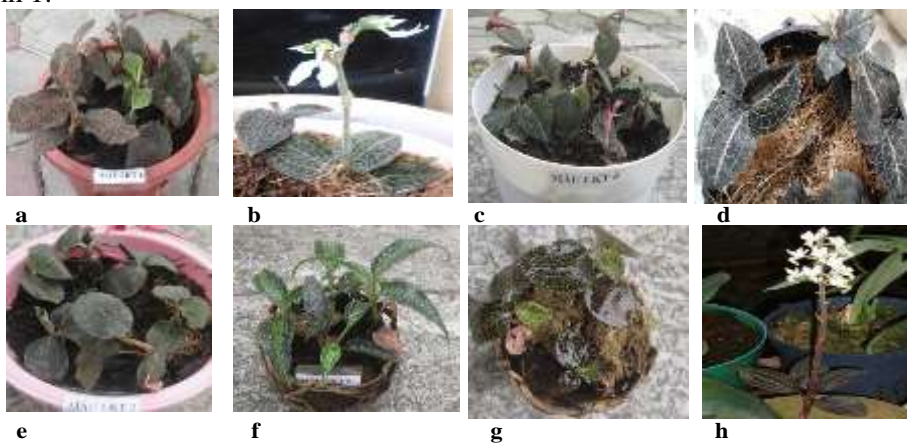
**Phân tích kết quả:** So sánh trình tự thu được với nhau và với các trình tự của các loài Lan khác bằng phần mềm BioEdit, xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm DNASTAR, giá trị bootstrap được sử dụng là 1000 lần.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Kết quả phân tích bằng hình thái

Các mẫu LKT 1, LKT 2, LKT 3, LKT 4, LKT 7, LKT 8 được thu hái tại Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng; mẫu LKT 5 được thu hái tại huyện Mai Châu, tỉnh Hòa Bình và mẫu LKT 6 thu hái tại vườn thực nghiệm Kon Plong, tỉnh Kon Tum (Bảng 1).

Tất cả các mẫu đều được xác định tên khoa học tại phòng Thực vật của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Dựa vào đặc điểm hình thái của thân, rễ, lá và hoa (theo mô tả được công bố trong “Sách Đỏ Việt Nam, phần II. Thực Vật” và phân loại các loài Lan kim tuyến trong “Cây cỏ Việt Nam” của GS. Phạm Hoàng Hộ), đã xác định được 5 loài thuộc 3 chi như thống kê tại Bảng 1, hình 1.



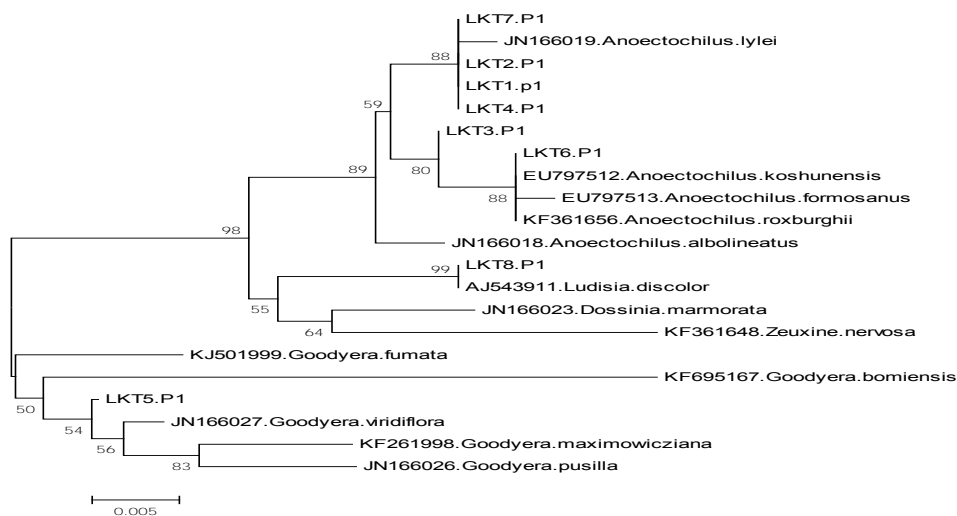
Hình 1: Hình ảnh của 8 mẫu lan nghiên cứu  
a, b, c, d, e, f, g, h: tương ứng với các mẫu LKT 1, LKT2, LKT4, LKT7, LKT3, LKT5, LKT6, LKT8

### 2. Kết quả phân tích trình tự gen và xây dựng hệ thống phân cây phát sinh chủng loại

#### *Gen matK*

Đoạn gen matK đem phân tích trình tự có kích thước 900 bp, nhưng khi tiến hành so sánh với các trình tự ADN tương đồng từ các loài lan có trong ngân hàng trình tự ADN của Genbank, chúng tôi chỉ có thể so sánh được đoạn gen có kích thước 455 bp. Trong 5 loài nghiên cứu, chỉ tìm thấy trình tự của 3 loài là: *Anoectochilus lylei*, *Anoectochilus roxburghii*, *Ludisia discolor*. Hệ số tương đồng của mẫu LKT1, LKT2, LKT4, LKT7 là 100% và tương đồng 99,8% so với loài *Anoectochilus lylei*, mẫu LKT6 có hệ số tương đồng di truyền 100% so với 2 loài *Anoectochilus roxburghii*, *Anoectochilus koshunensis* và có hệ số tương đồng di truyền với *Anoectochilus formosanus*, LKT3 lần lượt là 99,8% và 99,6%. Mẫu LKT8 có hệ số tương đồng 100% so với loài *Ludisia discolor* trong khi mẫu LKT5 có mức độ tương đồng di truyền cao nhất 99,6% khi so sánh với loài *Goodyera viriflora*. Hệ số K2P cho thấy 2 loài có khoảng cách di truyền xa nhất ở vùng gen matK là *Goodyera bomensis* và *Zeuxine nervosa* với khoảng cách là 7,6%.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên vùng gen matK theo phương pháp Maximum Likelihood. Đoạn trình tự được sử dụng để xây dựng cây phân loại gồm 455 bp. Các vị trí chứa khoảng trống và thiếu dữ liệu đều được loại bỏ. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự của 8 mẫu nghiên cứu và 13 trình tự của các loài Lan khác trên ngân hàng Genbank.

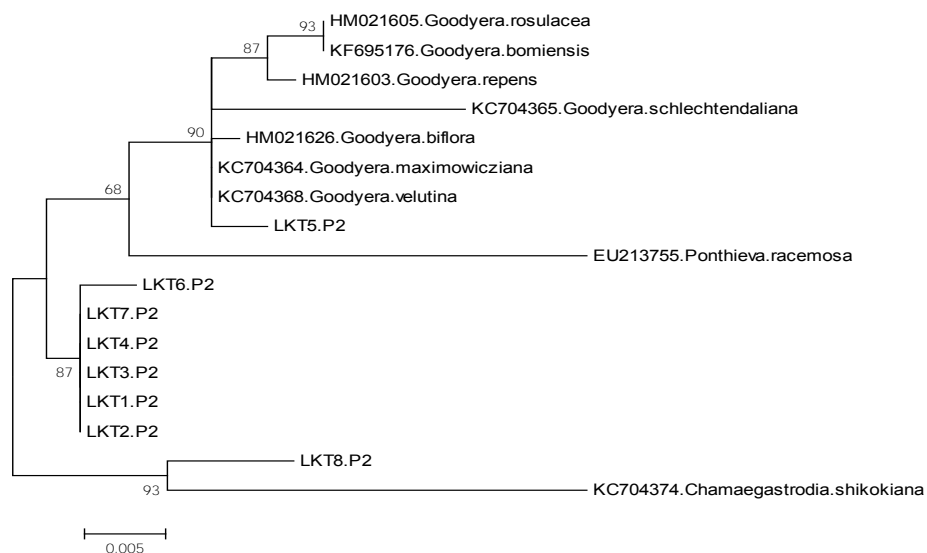


Hình 2: Cây phát sinh chủng loại một số loài Lan sử dụng vùng gen matK

### Gen psbA-trnH

So sánh 733 bp trong 800 bp trình tự thu được ở vùng gen psbA-trnH với các trình tự ADN tương đồng từ các loài lan có trong ngân hàng trình tự ADN của Genbank, nhưng trong 3 chi được quan tâm là *Anoectochilus*, *Ludisia* và *Goodyera*, chỉ tìm thấy các trình tự của một số loài thuộc chi *Goodyera*.

Kết quả phân tích cho thấy 5 mẫu LKT1, LKT2, LKT3, LKT4, LKT7 có hệ số tương đồng là 100% và có hệ số tương đồng di truyền với 3 mẫu LKT5, LKT6, LKT8 lần lượt là 98,5%, 99,7% và 98,5%. Mẫu LKT5 tương đồng di truyền cao nhất với loài *Goodyera maximowicziana* mức độ tương đồng lên tới 99,5%. Khoảng cách di truyền xa nhất là 5,1% giữa 2 loài *Goodyera schlechtendaliana* và *Chamaegastrodia shikokiana*.

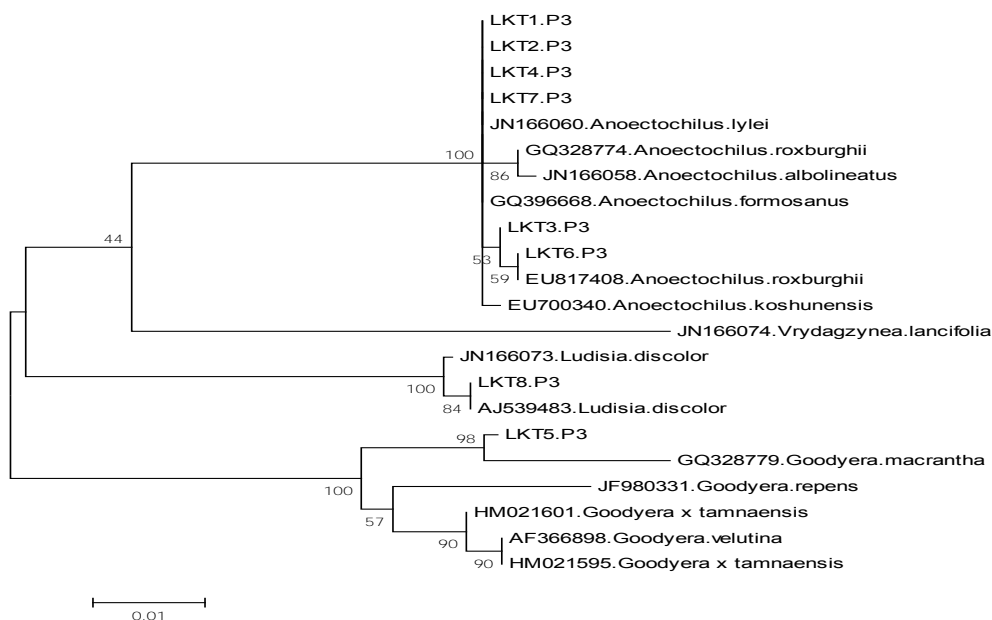


Hình 3: Cây phát sinh chủng loại một số loài Lan sử dụng vùng gen psbA-trnH

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên vùng gen psbA-trnH theo phương pháp Maximum Likelihood. Đoạn trình tự được sử dụng để xây dựng cây phân loại gồm 733 bp. Các vị trí chứa khoảng trống và thiếu dữ liệu đều được loại bỏ. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự của 8 mẫu nghiên cứu và 9 trình tự của các loài Lan khác trên ngân hàng Genbank thông qua MEGA5.

### Gen ITS

So sánh có đoạn gen kích thước 647 bp trong tổng số 800 bp đoạn gen ITS ở các mẫu nghiên cứu thu được, với các trình tự ADN tương đồng của 3 loài là *Anoectochilus lylei*, *Anoectochilus roxburghii*, *Ludisia discolor* có trong ngân hàng trình tự ADN của Genbank, cho thấy: Hệ số tương đồng di truyền của 4 mẫu LKT1, LKT2, LKT4, LKT7 là 100% và 99,8% so với mẫu LKT3. Mẫu LKT6 có hệ số tương đồng di truyền 100% so với loài *Anoectochilus roxburghii* và LKT8 tương đồng 100% so với loài *Ludisia discolor*. Mẫu LKT5 có hệ số tương đồng di truyền cao nhất là 98,3% với loài *Goodyera macrantha*. Khoảng cách K2P lớn nhất là 10,6 % được tìm thấy ở hai loài *Goodyera repens* và *Vrydagzynea lancifolia*.



Hình 4: Cây phát sinh chủng loại một số loài Lan sử dụng vùng gen ITS

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên vùng gen ITS bằng phương pháp Maximum Likelihood. Đoạn trình tự được sử dụng để xây dựng cây phân loại gồm 647 bp. Các vị trí chứa khoảng trống và thiếu dữ liệu đều được loại bỏ. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự của 8 mẫu nghiên cứu và 14 trình tự của các loài Lan khác trên ngân hàng Genbank.

### 3. Đánh giá sự phân nhánh các loài Lan nghiên cứu

Với cây phát sinh chủng loại của vùng gen psbA-trnH do chúng tôi không tìm thấy trình tự của chi *Anoectochilus* và *Ludisia* mà chỉ tìm được một số trình tự thuộc chi *Goodyera* nên không nhận diện chính xác 8 mẫu nghiên cứu tuy nhiên có thể thấy rằng 8 mẫu này được chia làm 3 nhóm chính, với nhóm 1 là mẫu LKT5 với các loài thuộc chi *Goodyera*, nhóm 2 là mẫu LKT8 và loài *Chamaegastrodia shikokiana* nhóm thứ 3 là 6 mẫu còn lại, có thể 6 mẫu này thuộc cùng một chi phân loại.

Với 2 cây phát sinh chủng loại matK và ITS cũng cho kết quả tương tự, nhóm 1 là mẫu LKT5 với các loài thuộc chi *Goodyera* (bootstrap 90-100), nhóm 2 là mẫu LKT8 và loài *Ludisia discolor* (bootstrap 99-100), độ tương đồng di truyền của 2 loài này là 100%, do đó mẫu LKT8 là loài *Ludisia discolor*, 6 mẫu còn lại thuộc cùng 1 nhánh phân loại với với các loài thuộc chi *Anoetochilus* (bootstrap 98-100), trong đó mẫu LKT6 cùng nhóm phân loại với loài *Anoetochilus roxburghii*, với độ tương đồng di truyền là 100%, do đó có thể kết luận mẫu LKT6 là loài *Anoetochilus roxburghii*. Mẫu LKT1, LKT2, LKT4, LKT7 cùng một nhóm phân loại với loài *Anoetochilus lylei* và có 99,8% ở vùng gen matK, 100% ở vùng gen ITS, nên có thể định danh các mẫu LKT1, LKT2, LKT4, LKT7 là loài *Anoetochilus lylei*. Mẫu LKT3 không tìm thấy được trình tự tương đồng 100%, tuy nhiên có thể xếp loài này thuộc chi *Anoetochilus*.

Sự sai khác ở vùng gen matK của các LKT1, LKT2, LKT4, LKT7 so với *Anoetochilus lylei* được tìm thấy là ở vị trí nucleotide 228. Trong khi 4 mẫu Lan kim tuyến nghiên cứu có trình tự G còn *Anoetochilus lylei* là C, do sự khác biệt về vị trí địa lí.

Như vậy, các kết quả thu được cho thấy: chỉ thị *psbA-trnH* không có khả năng phân biệt 5 loài lan nghiên cứu, chỉ thị *matK* có thể phân biệt 3 trong số 5 loài nghiên cứu, còn chỉ thị ITS cho phép phân biệt cả 5 loài nghiên cứu với nhau. Qua đó có thể khẳng định chỉ thị ITS là công cụ phân loại hiệu quả các loài lan kim tuyến với nhau. Tuy nhiên nếu kết hợp giữa chỉ thị *matK* và ITS sẽ cho phép phân loại các loài lan kim tuyến một cách chính xác hơn điều này cũng đã được khẳng định qua nghiên cứu của TS. Vũ Huyền Trang và cộng sự vào năm 2013 (Vũ Huyền Trang và cộng sự, 2013).

### III. KẾT LUẬN

Trong 8 mẫu Lan được nghiên cứu, có 6 mẫu thuộc có 3 loài: *Anoetochilus lylei*, *Anoetochilus roxburghii* và loài *Ludisia discolor*, 1 mẫu thuộc chi *Anoetochilus* và 1 mẫu thuộc chi *Goodyera*.

Trong 3 gen được sử dụng trong nghiên cứu, gen ITS phân tách tốt nhất các loài Lan với nhau, ưu thế hơn gen *psbA-trnH* và *matK*.

Chi *Anoetochilus* có mức độ gần gũi về mặt di truyền với chi *Ludisia* hơn là chi *Goodyera*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aoki S., Ito M.**, 2000. Molecular phylogeny of *Nicotiana* (Solanaceae) based on the nucleotide sequence of the *matK* gene. *Plant Biology* 2: 253-378.
2. **Baldwin B. G.**, 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Mol Phylogenet Evol* 1(1): 3-16.
3. **Chase M. W., Cowan R. S., Hollingsworth P. M., van den Berg C., Madrinan S., Petersen G., Seberg O., Jorgensen T., Cameron K. M., Carine M., Pedersen N., Hedderson T. A. J., Conrad F., Salazar G. A., Richardson J. E., Hollingsworth M. L., Barraclough T. G., Kelly L., Wilkinson M.**, 2007. A proposal for a standard protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295-299.
4. **Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C.**, 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5(1): e8613
5. **Kress W. J., Erickson D. L.**, 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 2761-2762.

6. **Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weighr L. A., Janzen D. H.**, 2005. Use of DNA barcodes to indentify flowering plans. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8369-8374.
7. **Lin W. C.**, 2007. Study of health keeping effects of *anoectochilus formosanus* Hayata. *Agriculture World*. Vol. 288, 8-13.
8. **Nguyễn Tiến Bản** (chủ biên), 2005. *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*. Tập III, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 1247 trang.
9. **Soltis D. E., Tago-Nakazawa M., Xiang Q. Y., Kawano S., Murata J., Wakabayashi M., Hibsich-Jetter C.**, 2001. Phylogenetic relationships and evolution in Chrysosplenium (Saxifragaceae) based on matK sequence data. *Am J Bot* 88(5): 883-893.
10. **Vũ Huyền Trang, Chu Hoàng Hà, Hoàng Đăng Hiếu, Phạm Bích Ngọc, Lâm Đại Nhân, Trương Nam Hải**, 2013. Nghiên cứu sử dụng chỉ thị DNA mã vạch trong nhận dạng loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii*). *Tạp chí Công nghệ sinh học* 11(1): 121-129.

## GENETIC ANALYSIS OF SOME ORCHID SPECIES FROM VIETNAM

Do Thi Gam, Hoang Dang Hieu, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha

### SUMMARY

Members of the genus *Anoectochilus* share similar morphological characteristics (stem, leaf or root). Curently, they are identified mainly based on flower characteristics. In the nature, *Anoectochilus* populations are small, separately distributed with low reproducibility. In addition, over-exploitation has significantly damaged to the flower, leading to the difficulty in identification of these medicinal orchids through morphology. In this study, the genetic relationships between five species (*Anoectochilus* species: *Anoectochilus lylei*, *Anoectochilus anamensis*, *Anoectochilus roxburghii* and two species from another genus: *Goodyera hispida* and *Ludisia discolor*) were analyzed using three barcode sequences: matK, psbA-trnH, and ITS. The results showed that the psbA-trnH could not distinguish these species. On the other hand, the matK could identify three of five species, while the ITS could effectively identify all of the five species. Furthermore, the combination of matK and ITS could classified these species much more accurately.