

PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN GIỮA CÁC LOÀI LAN GIẢ HẠC (*D. ANOSMUM*), LONG TU (*D. PRIMULINUM*) VÀ TRÂM (*D. PARISHII*) DỰA TRÊN CHỈ THỊ PHÂN TỬ DNA BARCODE

Nguyễn Hoàng Cẩm Tú^{1,2}, Nguyễn Trường Giang¹, Dương Hoa Xô¹, Hà Thị Loan¹, Huỳnh Hữu Đức^{1*}

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

² Bộ môn Công nghệ sinh học - Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) là loài lan quý, vừa có giá trị làm cảnh vừa có giá trị kinh tế cao, tuy nhiên đặc điểm hình thái của cây và một số loài có quan hệ họ hàng gần rất giống nhau và khó phân biệt. Việc định danh phân loại và bảo tồn dựa trên đặc điểm hình thái còn một số hạn chế trong định danh và phân biệt các loài lan, đặc biệt là các loài có quan hệ gần. DNA barcode dựa trên cơ sở phân tích trình tự DNA của các vùng gen trong lục lạp và nhân đã được ứng dụng trong việc định danh và nghiên cứu đa dạng sinh học cũng như bảo tồn nguồn gen có ưu thế hơn khi sử dụng phương pháp hình thái hay sinh hóa. Trong nghiên cứu này, 10 mẫu lan Giả hạc, 4 mẫu Long tu, 1 mẫu Long tu đá và 5 mẫu Trâm được thu thập và phân tích di truyền dựa trên các vùng gen như: *rbcL*, *matK* và ITS. Kết quả khuếch đại các DNA barcode với các cặp mồi tương ứng đối với các mẫu thu thập cho kết quả thành công 100%. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài dựa trên trình tự DNA của các vùng DNA barcode cho thấy vùng ITS có khả năng phân biệt cao giữa nhóm Giả hạc và các loài gần. Cây phân nhóm di truyền dựa trên vùng ITS cũng cho tỉ lệ bootstrap của tất cả các nhánh có độ tin cậy cao. Ngoài ra, khi so sánh và phân tích trình tự DNA của vùng ITS của các mẫu nghiên cứu với các trình tự tương ứng của các loài có quan hệ gần trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy vùng ITS có thể sử dụng hiệu quả trong việc phân loại mối quan hệ giữa loài lan Giả hạc (*D. anosmum*) và một số loài có họ hàng gần như Long tu (*D. primulinum*) và Trâm (*D. parishii*).

Từ khóa: *Dendrobium*, DNA barcode, ITS, *matK*, *rbcL*.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong các quốc gia có tính đa dạng sinh học cao với nhiều loài thực vật, trong đó Phong lan được đánh giá là rất đa dạng và phong phú, với nhiều loài rất đẹp và có giá trị kinh tế. Đây là nguồn nguyên liệu quý phục vụ công tác lai tạo để tạo ra nhiều giống lan mới đặc sắc. Mặc dù đa dạng và phong phú nhưng hiện nay lại không được khai thác và bảo tồn triệt để nên phần lớn các loài lan có nguy cơ bị tiêu diệt và có thể mất đi nguồn gen quý. Việc phân loại bằng phương pháp truyền thống đối với các loài lan chủ yếu dựa vào sự khác biệt về hình thái. Tuy nhiên, phương pháp này cũng gặp rất nhiều khó khăn khi cần xác định những loài có đặc điểm tương đồng do thích nghi với cùng điều kiện môi trường hay loài chưa đến giai đoạn trưởng thành.

Dendrobium là một chi lớn trong họ Phong lan (Orchidaceae), có khoảng 1200-1500 loài phân bố rộng khắp châu Á. Việc phân loài các loài trong chi *Dendrobium* thường rất khó khăn do số lượng loài trong chi lớn và đồng thời đây là một trong những chi sinh trưởng trong điều kiện sinh thái rất đa dạng (Atwood, 1986). Trong đó, lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*) là loài lan quý, sinh trưởng nhanh, dễ dàng tái sinh thể hệ hoa mới, ra hoa quanh năm và có giá trị kinh tế cao, tuy nhiên, hình thái của cây và một số loài có quan hệ họ hàng gần giống nhau nên rất khó phân biệt.

Hiện nay, việc ứng dụng sinh học phân tử trong định danh, đánh giá sự đa dạng và mối quan hệ di truyền của các loài sinh vật đã và đang phát triển mạnh. DNA barcode là một trong những kỹ thuật mới đang được ứng dụng rộng rãi trên thế giới, dựa trên sự tiến hóa và bản chất di truyền cho phép phân loại và định danh chính xác, nhanh chóng và hiệu quả. 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 được liệu cũng đã được sử dụng chỉ thị phân tử DNA barcode để xác định giống (Kim *et al.*, 2014). Các trình tự gen *rbcL*, *matK* đã được sử dụng để xác định loài trong *Dendrobium*, đồng thời đánh giá mối quan hệ di truyền của nhóm *Dendrobium* dựa trên cây phát sinh chủng loài của *Dendrobium fimbriatum*, *D. moniliforme*, *D. nobile*, *D. pulchellum*, và *D. tosaense*. để ứng dụng trong y học (Asahina *et al.*, 2010). Ngoài ra, một số vùng DNA barcode khác đã được ứng dụng để xác định loài, đánh giá mối quan hệ họ hàng của loài lan trong chi *Dendrobium* như *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* trong bộ gen lục lạp và vùng ITS của nhân (Singh *et al.*, 2012). Vùng *psbK-trnH* và ITS đã được phân tích và đánh giá trên *D. officinale*, *D. moniliforme*, *D. huoshanense* và *D. tosaense* cho thấy chúng thuộc 4 nhóm độc lập mặc dù hình thái tương tự nhau (Li *et al.*, 2013). Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích đánh giá được sự đa dạng của các mẫu giống trong loài lan Giả hạc và các loài gần như Long tu, Trâm,... dựa trên chỉ thị phân tử DNA barcode.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

20 mẫu giống được thu thập ở các địa điểm khác nhau gồm 10 mẫu giống Giả hạc (*Dendrobium anosmum*) thu tại Đắk Lắk, Di Linh, Gia Lai, Hòa Bình, Phú Thọ và Nha Trang; 4 mẫu giống Long tu (*Dendrobium primulinum*) thu tại Kon Tum và Đắk Lắk, 1 mẫu giống Long tu đá (*Dendrobium crepidatum*) ở Kon Tum xác nhận outgroup; 5 mẫu giống Trầm (*Dendrobium parishii*) trong đó có 4 mẫu giống trong nước ở Bến Tre, Đắk Lắk, Điện Biên và 1 mẫu giống ở Myanmar dùng để so sánh.

Bảng 1. Danh sách các giống *D. anosmum*, *D. primulinum*, *D. crepidatum* và *D. parishii* thu thập

Ký hiệu	Giống	Tên khoa học	Nguồn gốc	Ký hiệu	Giống	Tên khoa học	Nguồn gốc
GH1	Giả hạc 1	<i>D. anosmum</i>	Đắk Lắk	LT1	Long tu 1	<i>D. primulinum</i>	Kon Tum
GH2	Giả hạc 2	<i>D. anosmum</i>	Di Linh	LT2	Long tu 2	<i>D. primulinum</i>	Kon Tum
GH3	Giả hạc 3	<i>D. anosmum</i>	Gia Lai	LTD	Long tu đá	<i>D. crepidatum</i>	Kon Tum
GH4	Giả hạc 4	<i>D. anosmum</i>	Hòa Bình	LT4	Long tu 4	<i>D. primulinum</i>	Đắk Lắk
GH5	Giả hạc 5	<i>D. anosmum</i>	Nha Trang	LT5	Long tu 5	<i>D. primulinum</i>	Kon Tum
GH6	Giả hạc 6	<i>D. anosmum</i>	Phú Thọ	T1	Trầm 1	<i>D. parishii</i>	Bến Tre
GH7	Giả hạc 7	<i>D. anosmum</i>	Phú Thọ	T2	Trầm 2	<i>D. parishii</i>	Myanmar
GH8	Giả hạc 8	<i>D. anosmum</i>	Di Linh	T3	Trầm 3	<i>D. parishii</i>	Đắk Lắk
GH9	Giả hạc 9	<i>D. anosmum</i>	Hòa Bình	T4	Trầm 4	<i>D. parishii</i>	Bến Tre
GH10	Giả hạc 10	<i>D. anosmum</i>	Di Linh	T5	Trầm 5	<i>D. parishii</i>	Điện Biên

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.

PCR

Khuếch đại vùng ITS, *rbcl* và *matK* với các cặp primer tương ứng (Bảng 2). Thành phần cho 1 phản ứng PCR 20 µl chứa 10 µl Dream Taq Green PCR Master Mix; 0,4 µl primer xuôi; 0,4 µl primer ngược; nước cất 2 lần khử trùng; 1 µl mẫu. Chu kỳ PCR tiền biến 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 100 V; thời gian 30–40 phút; nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It@2315 imager UVP-Mỹ).

Bảng 2. Vùng gen DNA barcode và primer được sử dụng trong nghiên cứu

Vùng gen	Tên primer	Trình tự (5'-3')	T _a (°C)
<i>matK</i>	<i>matK</i> -KIM3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	56
	<i>matK</i> -KIM1R	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
ITS	ITS-F	ACGAATTCATGGTC CGGTGAAGTGTTCG	50
	ITS-R	TAGAATTCCCCGGT TCGCTCGC GTTAC	
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> -1F	ATGTCACCACAAACAGAAAC	53
	<i>rbcl</i> -724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	

Nguồn tham khảo: (Costion *et al.*, 2011; Bafeel *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015)

Giải trình tự và phân tích mối quan hệ di truyền

Sản phẩm PCR vùng *matK*, ITS và *rbcl* được chọn tiến hành giải trình tự tại công ty Macrogen (10F, 254 Beotkkot-ro geumcheon-gu, Soul 08511, Rep. of Korea).

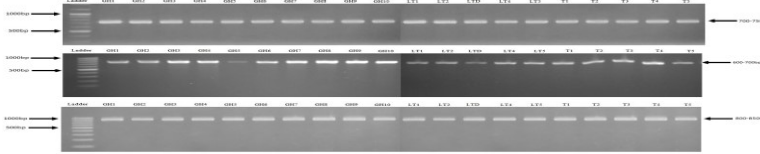
Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC và kiểm tra các sai lệch. Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.0 (The Molecular Evolution Genetics Analysis) với hệ số bootstrap 1000.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

DNA tổng số sau khi tách chiết được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch, kết quả thu được tỉ lệ OD260/OD280 của 20 mẫu nằm trong khoảng 1,6 - 1,9, nồng độ DNA tổng số ở các mẫu nằm trong khoảng 109,2 – 273,7 ng/µl cho thấy DNA tổng số thu được là tinh sạch đảm bảo cho các bước tiếp theo.

PCR

Kết quả khuếch đại vùng *rbcL*, *matK* và ITS trên 20 mẫu lan cho thấy tỷ lệ khuếch đại đạt 100%. Sản phẩm khuếch đại 3 vùng gen có kích thước lần lượt là *rbcL* (700-750bp), ITS (600-700bp) và *matK* (800-850bp) khi phân tích trên gel agarose 1,2%.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR của 3 vùng DNA barcode: a/ *rbcL*, b/ ITS, c/ *matK* trên gel agarose 1,2%

Đánh giá, phân tích mối quan hệ di truyền của lan Giả hạc và một số loài có họ hàng gần

Sản phẩm PCR của vùng gen *rbcL*, *matK* và ITS sau khi giải trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC và sử dụng để phân tích mối di truyền của các mẫu lan cho kết quả như sau:

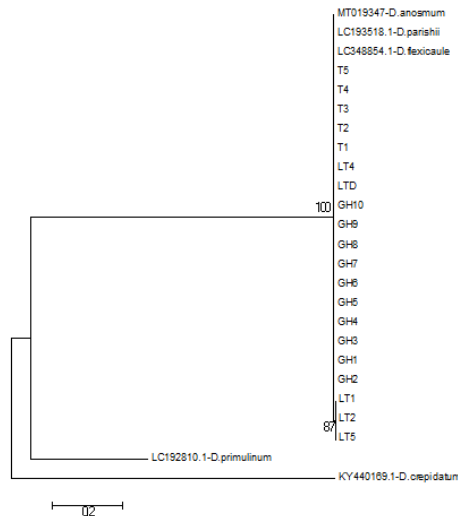
Vùng gen *rbcL*

So sánh trình tự vùng gen *rbcL* của 20 mẫu giống lan nghiên cứu với các trình tự có sẵn trên NCBI cho thấy mức độ tương đồng đạt từ 98,88 - 99,86; mức độ bao phủ đạt 99 - 100%.

Bảng 3. Đánh giá mức độ tương đồng và bao phủ của trình tự DNA vùng *rbcL* của các mẫu nghiên cứu với trình tự tương ứng trên NCBI

Mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)
1	LC348965.1	99	99,58	11	LC348965.1	100	98,88
2	LC348965.1	100	99,58	12	LC348965.1	99	99,44
3	LC348965.1	99	99,72	13	LC348965.1	99	99,72
4	LC348965.1	99	99,44	14	LC348965.1	99	99,72
5	LC348965.1	99	99,86	15	LC348965.1	99	99,58
6	LC348965.1	100	99,02	16	LC193518.1	99	99,44
7	LC348965.1	99	99,72	17	LC348965.1	99	99,72
8	LC348965.1	100	99,17	18	LC348965.1	99	99,72
9	LC348965.1	99	99,86	19	LC348965.1	99	99,72
10	LC348965.1	99	99,72	20	LC348965.1	99	99,58

Các trình tự DNA sau khi hiệu chỉnh được phân tích bằng phần mềm MEGA 6.0 với hệ số bootstrap 1.000 cho kết quả vùng bảo tồn là 707/730 vị trí, vùng biến đổi là 14/730 vị trí. Tuy nhiên, khi kết hợp với các trình tự trên NCBI cho thấy vị trí sai khác nhỏ hơn với vị trí bảo tồn là 164/730, vị trí biến đổi là 545/730.



Hình 2. Cây phát sinh loài của 10 giống Giả hạc, 4 giống Long tu, 1 giống Long tu đá và 5 giống Trầm dựa trên trình tự *rbcL* của trình tự nghiên cứu và các trình tự tham chiếu trên NCBI

Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng *rbcl* của 10 giống lan Giả hạc, 4 giống Long tu và 5 giống Trầm gần như không thể chia nhóm. Dựa trên hình 2, các mẫu đều có sự đồng nhất về khoảng cách di truyền và gần như tương đồng với nhau về mặt di truyền. Tuy nhiên, trong số 4 mẫu Long tu thì 3 mẫu LT1, LT2, LT5 có phần khác biệt khi có khoảng cách di truyền lớn hơn khi so sánh với nguồn gốc xuất phát của các mẫu còn lại. So sánh với các trình tự tham chiếu vùng *rbcl* của các giống *Dendrobium* trên NCBI, ta nhận thấy các mẫu nghiên cứu có trình tự vùng *rbcl* tương đồng với *D. anosmum*, *D. parishii* và *D. flexicaule*. Tuy vậy, trình tự tham chiếu vùng *rbcl* của *D. primulinum* lại được nhận định là outgroup và không được phân loại cùng với các mẫu Long tu. Điều này có thể do các mẫu phân tích đã trải qua quá trình đột biến và phát triển qua nhiều thế hệ, nên trình tự vùng *rbcl* đã bị biến đổi rất nhiều so với trình tự ban đầu và tương đồng với loài *D. anosmum* hơn. Asahina và đồng tác giả (2010), đã nhận định rằng khi phân biệt 5 loài *Dendrobium* thì vùng gen *matK* có khả năng tốt hơn *rbcl*; do vùng gen *rbcl* có ít vùng biến đổi dẫn đến khó khăn trong phân biệt loài. Cũng trong năm 2019, CBOL khuyến khích kết hợp 2 locus *rbcl* và *matK* như là DNA barcode thực vật; những gen này khác nhau rất nhiều giữa các loài nhưng hầu như không có sự khác biệt bên trong loài (Group et al., 2009). Qua đó, ở các giống *Dendrobium* được phân tích, trình tự vùng *rbcl* có tính bảo toàn cao nên gần như không có sự khác biệt trong trình tự, vì thế khả năng phân loại các loài gần là rất thấp và gần như không thể phân loại.

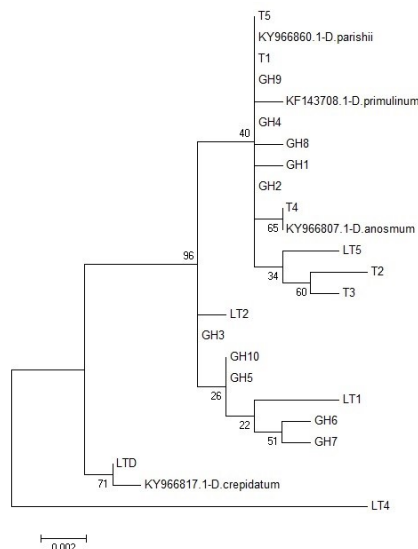
Vùng gen *matK*

So sánh trình tự vùng gen *matK* của 20 mẫu giống lan nghiên cứu với các trình tự có sẵn trên NCBI cho thấy mức độ tương đồng đạt từ 98,16 - 99,77; mức độ bao phủ đạt 99 - 100%.

Bảng 4. Đánh giá mức độ tương đồng và bao phủ của trình tự DNA vùng *matK* của các mẫu nghiên cứu với trình tự tương ứng trên NCBI

Mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)
1	KY966860.1	99	99,65	11	KF143708.1	98	99,03
2	KY966860.1	99	99,77	12	KF143708.1	99	99,19
3	KY966860.1	100	99,65	13	KY966817.1	99	99,18
4	KY966860.1	100	99,76	14	KF143708.1	100	97,60
5	KY966860.1	99	99,53	15	KF143708.1	99	98,72
6	KY966860.1	100	99,18	16	KY966860.1	99	99,77
7	KY966860.1	99	99,72	17	KY966860.1	99	98,16
8	KY966860.1	100	99,42	18	KY966860.1	99	98,26
9	KY966860.1	100	99,65	19	KY966807.1	99	99,88
10	KY966860.1	100	99,30	20	KY966860.1	99	99,30

Các trình tự DNA sau khi hiệu chỉnh được phân tích bằng phần mềm MEGA 6.0 với hệ số bootstrap 1.000 cho kết quả vùng bảo tồn là 801/858 vị trí, vùng biến đổi là 45/858. Tuy nhiên, khi kết hợp với các trình tự trên NCBI cho thấy vị trí sai khác lớn hơn với vị trí bảo tồn là 802/858, vị trí biến đổi là 46/858.



Hình 3. Cây phát sinh loài của 10 giống Giả hạc, 4 giống Long tu, 1 giống Long tu đá và 5 giống Trầm dựa trên trình tự *matK* của trình tự nghiên cứu và các trình tự tham chiếu trên NCBI

Cây phát sinh loài của các giống lan Giả Hạc, Long tu và Trầm xây dựng dựa trên trình tự vùng *matK* được chia thành 2 nhóm chính: nhóm 1 gồm hầu hết các mẫu lan Giả Hạc, các mẫu Trầm và các mẫu Long tu 1,2,5; nhóm 2 có mẫu Long tu đá và mẫu Long tu 4 được phân loại thành outgroup. Ở nhóm 2, ta nhận thấy mẫu Long tu đá có trình tự khá tương đồng với trình tự vùng *matK* của *Dendrobium crepidatum*, tuy nhiên vẫn có khoảng cách di truyền khá lớn. Ở nhóm 1, có tỉ lệ bootstrap khá cao khoảng 96%; tuy nhiên các nhánh còn lại có tỉ lệ thấp từ 26% đến 40%. Bootstrap là một phương pháp thống kê dùng để đánh giá mức độ tin cậy của cây phả hệ (Zharkikh, Li, 1995). Trong trường hợp cây phả hệ của vùng *matK*, tỉ lệ bootstrap khá thấp (nhỏ hơn 50%) cho thấy kết quả này không đáng tin cậy. Bên cạnh đó, cách phân loại mẫu trong nhóm 1 cũng có tính bất kỳ khi phân loại Long tu 1 có quan hệ gần nằm giữa với mẫu Giả hạc 6,7 và Giả hạc 5,10. Tuy nhiên, ở những nhánh nhỏ hơn, có 2 nhánh có độ tin cậy cao là mẫu T4 và trình tự tham chiếu *D. anosmum*; mẫu T2 và mẫu T3. Điều này cho thấy trình tự vùng *matK* ở các mẫu Trầm có tính tương đồng với nhau khi mẫu T2 và T3 được chia vào cùng một nhóm và có mối quan hệ gần với nhau. Theo nghiên cứu của Xu và đồng tác giả (2015), trình tự vùng *matK* ở các giống *Dendrobium* chỉ có khả năng phân biệt loài vào khoảng 10,48% và ở *rbcL* vào khoảng 5,56% thấp hơn nhiều so với vùng ITS (khoảng 31,93%) hay khi dùng các vùng kép có khả năng phân loại vào khoảng 24-25% (vùng *matK-rbcL* và *matK-trnH-psbA*) và cao nhất là vùng ITS-*matK* đạt khả năng phân loại tới 76,92%. Vì vậy, nghiên cứu trên cho thấy khả năng phân biệt loài khá thấp khi so sánh các loài với nhau và thấp hơn nữa khi so sánh các loài có quan hệ gần nhau. Điều này giải thích được việc cây phả hệ của các mẫu nghiên cứu không có trật tự nhất định và có tỉ lệ bootstrap thấp; qua đó cho thấy trình tự vùng *matK* không thích hợp để phân loại loài lan Giả Hạc và các loài gần.

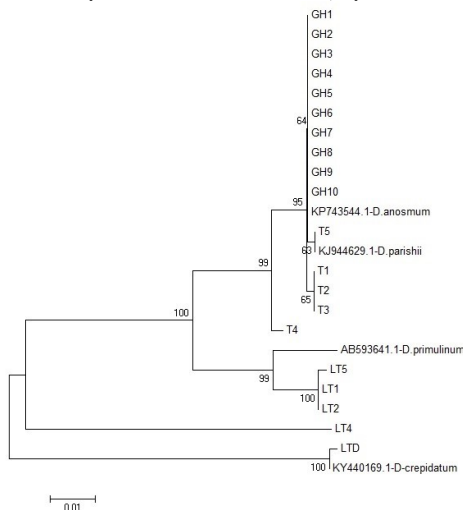
Vùng gen ITS

So sánh trình tự vùng gen ITS của 20 mẫu giống lan nghiên cứu với các trình tự có sẵn trên NCBI cho thấy mức độ tương đồng đạt từ 97,32 - 100%; mức độ bao phủ đạt 99 - 100%

Bảng 5. Đánh giá mức độ tương đồng và bao phủ của trình tự DNA vùng ITS của các mẫu nghiên cứu với trình tự tương ứng trên NCBI

Mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)	Mẫu	Trình tự tham chiếu	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)
1	KP743544.1	99	99,86	11	AB593641.1	100	97,33
2	KP743544.1	100	99,86	12	AB593641.1	100	97,32
3	KP743544.1	100	99,86	13	KY440169.1	99	99,86
4	KP743544.1	100	100	14	AB593641.1	99	86,73
5	KP743544.1	100	100	15	AB593641.1	100	97,03
6	KP743544.1	100	99,86	16	KJ944629.1	100	99,55
7	KP743544.1	100	99,86	17	KJ944629.1	96	99,27
8	KP743544.1	100	99,86	18	KJ944629.1	95	99,27
9	KP743544.1	100	100	19	KJ944629.1	96	98,10
10	KP743544.1	100	99,86	20	KJ944629.1	96	99,71

Các trình tự DNA sau khi hiệu chỉnh được phân tích bằng phần mềm MEGA 6.0 với hệ số bootstrap 1.000 cho kết quả vùng bảo tồn là 565/723 vị trí, vùng biến đổi là 149/723 vị trí. Tuy nhiên, khi kết hợp với các trình tự trên NCBI cho thấy vị trí sai khác nhỏ hơn với vị trí bảo tồn là 495/723, vị trí biến đổi là 85/723.



Hình 4. Cây phát sinh loài của 10 giống Giả hạc, 4 giống Long tu, 1 giống Long tu đá và 5 giống Trầm dựa trên trình tự ITS của trình tự nghiên cứu và các trình tự tham chiếu trên NCBI

Cây phát sinh loài xây dựng dựa trên trình tự vùng ITS của các giống lan Giả hạc, Long tu và Trầm được chia thành 3 nhóm chính: nhóm 1 gồm phần lớn các mẫu Giả hạc, các mẫu Trầm và các mẫu Long tu 1,2,5; nhóm 2 gồm mẫu Long tu 4 và nhóm 3 gồm mẫu Long tu đá và trình tự tham chiếu của *Dendrobium crepidatum*. Cây phát sinh loài này có độ tin cậy cao vì tỉ lệ bootstrap của tất cả các nhánh trên 50% và cao nhất đạt tới 100%. Theo như cây phát sinh loài ở hình 4, các mẫu Trầm có trình tự vùng ITS gần như tương đồng với trình tự ITS của *D. parishii* với mẫu Trầm 5 và có cùng gốc với các mẫu Trầm 1,2 và 3. Các mẫu Giả hạc có trình tự vùng ITS tương đồng với trình tự vùng của *D. anosmum* và khá gần với Trầm (*D. parishii*). Các mẫu Long tu 1,2,5 có trình tự vùng ITS tương đồng với *D. primulinum*. Mẫu LTD được phân loại có quan hệ di truyền với *D. crepidatum* (Long tu đá) và mẫu này có quan hệ gần với nguồn gốc hơn so với các mẫu Long tu còn lại. Mẫu LT4 mặc dù được phân thành một nhánh riêng, tuy nhiên khi xét về nguồn gốc phát sinh, ta nhận thấy mẫu LT4 có quan hệ di truyền gần với mẫu LTD (*D. crepidatum*) khi có phát sinh loài từ gốc gần với mẫu LTD nhất. Nhìn chung, khi sử dụng trình tự vùng ITS để phân biệt các mẫu, cho khả năng phân biệt rõ rệt nhất trong phân loại các loài có quan hệ gần với nhau. Theo nghiên cứu của Moudi và Go (2015), vùng gen ITS có khả năng phân biệt loài rõ nét hơn so với *matK*, *rbcL*. Kết quả của nghiên cứu này cũng ủng hộ nhận định trên khi cây phát sinh loài dựa trên vùng ITS có thể phân loại các loài có quan hệ gần một cách cụ thể và rõ nét. Qua đó có thể kết luận, vùng ITS thích hợp nhất để phân loại giữa các giống Giả Hạc, Trầm và Long tu.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở phân tích di truyền và xây dựng cây phát sinh loài từ 3 vùng *rbcL*, *matK*, ITS cho thấy vùng ITS thích hợp nhất để phân biệt giữa loài Giả hạc (*D. anosmum*) và các loài gần như Long tu (*D. primulinum*) và Trầm (*D. parishii*). Qua nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy khi xây dựng cây phát sinh loài dựa trên vùng *rbcL* và *matK* không thể phân biệt giữa các loài lân cận với nhau; vì thế không thích hợp để sử dụng cho việc phân biệt giữa các loài Giả hạc (*D. anosmum*) và các loài gần. Ngoài ra, khi so sánh trình tự của các vùng của Giả hạc (*D. anosmum*) với các trình tự tương ứng khác và các trình tự tương ứng của các loài có quan hệ gần với chúng trên cơ sở dữ liệu Genbank cũng cho thấy rằng vùng ITS cho kết quả phân biệt rõ ràng hơn so với các vùng còn lại.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp kinh phí theo hợp đồng số 12/2019/HĐ-QPTKHCN để thực hiện nghiên cứu trên. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asahina H, Shinozaki J, Masuda K, Morimitsu Y, Satake M (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences. *J Nat Med*, 64: 133-138.
- Atwood JT (1986). The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*, 171-186.
- Bafeel S, Arif I, Bakir M, Al Homaidan A, Al Farhan A, Khan H (2012). DNA barcoding of arid wild plants using *rbcL* gene sequences. *Genet Mol Res*, 11: 1934-1941.
- Costion C, Ford A, Cross H, Crayn D, Harrington M, Lowe A (2011). Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. *PLoS one*, 6: e26841.
- Doyle JJ (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.
- Group CPW, Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Chase MW, Cowan RS, Erickson DL (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 12794-12797.
- Kim HM, Oh SH, Bhandari GS, Kim CS, Park CW (2014). DNA barcoding of Orchidaceae in Korea. *Mol Ecol Resour*, 14: 499-507.
- Li G, Zhang J, Zeng S, Wu K, Duan J (2013). Systematic position of *Dendrobium huoshanense* inferred from ITS, Nad intron2 and *psbA-trnH* DNA sequences. *Guangdong Agric Sci*, 13: 145-147.
- Moudi M, Go R (2015). Phylogenetic analysis among four sections of the genus *dendrobium* sw.(orchidaceae) based on low copy nuclear gene (*xdh*) sequences in peninsular malaysia. *Iran J Bot*, 21(2): 169-178.
- Singh HK, Parveen I, Raghuvanshi S, Babbar SB (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 Res Notes*, 5: 42.
- Xu S, Li D, Li J, Xiang X, Jin W, Huang W, Jin X, Huang L (2015). Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia. *PLoS one*, 10: e0115168.
- Zharkikh A, Li W-H (1995). Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique. *Mol Phylogenet Evol*, 4: 44-63.

ANALYSIS OF GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN *DENDROBIUM ANOSMUM*, *DENDROBIUM PRIMULINUM* AND *DENDROBIUM PARISHII* SPECIES BASED ON DNA BARCODE MARKER

Nguyen Hoang Cam Tu^{1,2}, Nguyen Truong Giang¹, Duong Hoa Xo¹, Ha Thi Loan¹, Huynh Huu Duc^{1*}

¹ Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

² Nong Lam University Ho Chi Minh city

SUMMARY

Dendrobium species are valuable orchids with high ornamental and economic values. However, it is difficult to distinguished between these closed species due to their similarity of morphological characteristics and therefore is difficult to identify and conserve proper species. Identification and conservation based on morphological characteristics still have some limitations in identifying and distinguishing orchid species, especially for closely related species. DNA barcode method based on DNA sequencing analysis of genomic regions in the chloroplasts and nuclei have been applied in identifying and studying biodiversity as well as conserving superior genetic resources in comparison to using the morphological or biochemical methods. In this study, 10 samples of *D. anosmum*, 4 samples of *D. primulinum*, 1 sample of *D. crepidatum*, and 5 samples of *D. parishii* were collected for genetic analysis of *rbcL*, *matK* and ITS regions. The results showed that the amplification of these DNA regions for all collections with proper primers have successful rate of 100%. For genetic relationships among and within these species, ITS had the highest discriminating ability among *D. anosmum* species and between this species to its closely related species. Phylogenetic tree constructed based on ITS region showed high bootstrap value of all branches with high confidence level in comparison to the *rbcL* and *matK* regions. In addition, when compare ITS sequences of the to published sequence from NCBI showed that ITS can be used as an effective DNA barcode to analyze genetic relationships between *D. anosmum* and some closely related species such as *D. primulinum* and *D. parishii*.

Keywords: *Dendrobium*, DNA barcode, ITS, *matK*, *rbcL*.

* Author for correspondence: Tel: +84-967137046; Email: huuduchuyh82@gmail.com