



ISSN: 1859-3100

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP HỒ CHÍ MINH  
**TẠP CHÍ KHOA HỌC**

KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ  
Tập 15, Số 6 (2018): 149-155

HO CHI MINH CITY UNIVERSITY OF EDUCATION  
**JOURNAL OF SCIENCE**

NATURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY  
Vol. 15, No. 6 (2018): 149-155

Email: [tapchikhoahoc@hcmue.edu.vn](mailto:tapchikhoahoc@hcmue.edu.vn); Website: <http://tckh.hcmue.edu.vn>

## PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ VÙNG ITS CỦA MỘT SỐ LOÀI HOÀNG THẢO THỦY TIÊN

Nguyễn Như Hoa\*

Khoa Sinh học – Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 06-11-2017; ngày nhận bài sửa: 01-02-2018; ngày duyệt đăng: 19-6-2018

### TÓM TẮT

Nhiều loài trong nhóm lan Thủy tiên thuộc tông Kiêu, chi *Dendrobium* có giá trị thẩm mỹ và y học. Việc phân loại hình thái còn gặp khó khăn và chưa có sự thống nhất về số lượng loài thuộc nhóm này ở Việt Nam. Trình tự vùng ITS của 15 mẫu thuộc 5 loài Hoàng thảo Thủy tiên đã được xác định trong nghiên cứu. Kết quả phân tích cho thấy dữ liệu phân tử từ trình tự vùng ITS đủ sức phân định các loài thuộc nhóm Hoàng thảo Thủy tiên, đa số các mẫu thu nhận có độ đa dạng di truyền cao.

**Từ khóa:** *Dendrobium*, Hoàng thảo Thủy tiên, ITS, cây phát sinh loài.

### ABSTRACT

#### *Analyse ITS sequences of Dendrobium species*

Some *Chrysotoxae*-type *Dendrobium* are orchids whose have aesthetic and medicinal value. The morphological classification is difficult and there are conflicting views on the number of species in this group in Vietnam. The ITS sequences of 5 species were identified in the study. The results show that molecular data from the ITS region sequence are sufficient to separate species in this group, with the majority of samples possessing high genetic diversity.

**Keywords:** *Dendrobium*, *Chrysotoxae*-type *Dendrobium*, ITS, phylogeny.

### 1. Đặt vấn đề

Hoàng thảo Thủy tiên là nhóm lan *Dendrobium* thuộc tông Kiêu (*Chrysotoxae*) tổ *Callista* [1]. Ở Việt Nam, lan Thủy tiên khá được ưa chuộng do nhóm lan này có các đặc điểm như dễ chăm sóc, phát hoa to, màu sắc tươi sáng nổi bật và đặc biệt là một số loài có giá trị trong y học. Tuy nhiên, việc nhận diện, phân loại nhóm lan này hiện nay vẫn chưa thực sự thống nhất dẫn đến các quan điểm khác nhau về số lượng loài Hoàng thảo Thủy tiên ở Việt Nam. Theo Cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ, Thủy tiên vàng có hai loài khác nhau là *Dendrobium thyrsoiflorum* và *Dendrobium farmeri*, giữa *Dendrobium thyrsoiflorum* và *Dendrobium densiflorum* lại có nhiều đặc điểm khó phân biệt và vấn đề tương tự cũng xảy ra với *Dendrobium farmeri* (Thủy tiên vàng) và *Dendrobium palpebrae* (Trâm vàng) [1]. Theo Phong lan Việt Nam của Trần Hợp, bốn tên gọi này chỉ là đồng danh của 1 loài [2]. Theo Averyanov L. và cộng sự, *Dendrobium thyrsoiflorum* và

\* Email: [nhuhoa\\_sp84@yahoo.com.vn](mailto:nhuhoa_sp84@yahoo.com.vn)

*Dendrobium densiflorum* là một loài (Thủy tiên vàng), Thủy tiên trắng có 2 loài là *Dendrobium farmeri* và *Dendrobium palpebrae* [3]. Cũng có công trình cho rằng đây là 4 loài khác nhau *Dendrobium densiflorum* (Hoàng thảo Thủy Tiên mỡ gà), *Dendrobium fameri* (Hoàng thảo Thủy Tiên Vương), *Dendrobium palpebrae* (Hoàng thảo Thủy Tiên vàng), *Dendrobium thyrsoflorum* (Hoàng thảo Thủy tiên cam)...[4]

Ngoài ra, trong nhóm Thủy tiên, nhiều loài có ý nghĩa trong bảo tồn và giá trị ứng dụng. *Dendrobium amabile* là loài đặc hữu của Việt Nam có tên trong Sách đỏ Việt Nam (2007) có nguy cơ bị tuyệt chủng [5]. *Dendrobium chrysotoxum* được sử dụng làm dược liệu: Thân được dùng để làm thuốc có tác dụng ngăn ngừa bệnh tiểu đường, chống ung thư vì có chứa Erianin, ngoài ra còn có tác dụng dưỡng âm ích vị, hoa của loài này có thể dùng để ướp trà hoặc làm bánh, *Dendrobium densiflorum* có Scopoletin và Scoparone có hoạt tính ngăn chặn sự kết tụ tiểu cầu [6]. Những loài này cần được phân biệt, nhận diện nhanh chóng, chính xác, rõ ràng để phục vụ công tác bảo tồn, thu thập, sử dụng đúng mục đích. Nhưng, nếu ở giai đoạn cây chưa ra hoa hoặc mẫu vật không đầy đủ các bộ phận, dập nát thì việc nhận diện bằng hình thái khó có độ chính xác cao vì nhóm lan này có hình thái khá tương cận.

Trong các công cụ sinh học phân tử hiện nay, phương pháp sử dụng trình tự gen thể hiện nhiều ưu điểm việc trong phân loại, định danh, bảo tồn, đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các loài. Ở thực vật, để phân tích mối quan hệ di truyền các trình tự thường được dùng là ITS, *rbcL*, *matK*, *trnH - psbA*, *rpoC1*, *rpoB*... Trong đó, nhiều công trình đã chứng minh vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) chứa đựng nhiều khác biệt nên có thể dùng để phân loại các loài hoặc chủng gần nhau và nghiên cứu mối quan hệ họ hàng. [7],[8]

Nghiên cứu này, tiến hành phân tích trình tự vùng ITS nhằm phân biệt, nhận diện nhanh, chính xác, chỉ ra mối quan hệ họ hàng giữa các loài trong nhóm Thủy tiên bằng dữ liệu phân tử và tạo tiền đề cho việc xác định DNA barcode cho nhóm lan Hoàng thảo này.

## 2. Vật liệu, phương pháp

Các mẫu lá Hoàng thảo Thủy tiên (Bảng 1) được thu nhận tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh (2374, Quốc lộ 1, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, Q.12, TPHCM) – kí hiệu TT, vườn lan Tiến Hoàng (96B, Phú An, Phú Hội, Đức Trọng, Lâm Đồng) – kí hiệu DT, vườn lan Hậu (28/27/54 Phan Tây Hồ, Phú Nhuận, TPHCM) – kí hiệu PN; được tách DNA tổng số bằng phương pháp CTAB với một số cải tiến nhỏ.

**Bảng 1.** Tên và kí hiệu của 5 loài Hoàng thảo Thủy tiên nghiên cứu

Kí hiệu	Tên tiếng Việt	Tên khoa học
D1_DT, D1_TT, D1_PN	Thủy tiên hương/tím	<i>Dendrobium amabile</i> (Lour.) O'Brien
D2_DT, D2_TT, D2_PN	Thủy tiên dẹt	<i>Dendrobium sulcatum</i> Lindl.
D3_DT, D3_TT, D3_PN	Thủy tiên mỡ gà	<i>Dendrobium densiflorum</i> Lindl.
D4_DT, D4_TT, D4_PN	Hoàng thảo Hoàng lạp	<i>Dendrobium chrysotoxum</i> Lindl.
D5_DT, D5_TT, D5_PN	Thủy tiên vàng	<i>Dendrobium palpebrae</i> Lindl.

Trình tự vùng ITS sau đó được khuếch đại bằng kĩ thuật PCR với cặp môi ITS 1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) và ITS 4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Các thành phần có trong phản ứng khuếch đại trình tự ITS gồm 12,5  $\mu$ L Taq DNA pol 2x – premix, 1  $\mu$ L mỗi xuôi (5  $\mu$ M – 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L mỗi ngược (5  $\mu$ M – 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L DNA khuôn và thêm nước cho đủ 25  $\mu$ L và chu trình nhiệt: 94°C/3'; 30 x (94°C/30", 55°C/40", 72°C/1'); 72°C/5'.

DNA tổng số và sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung ethidium bromide. Sản phẩm PCR sẽ được giải trình tự hai chiều tại Công ti MacroGen, Hàn Quốc.

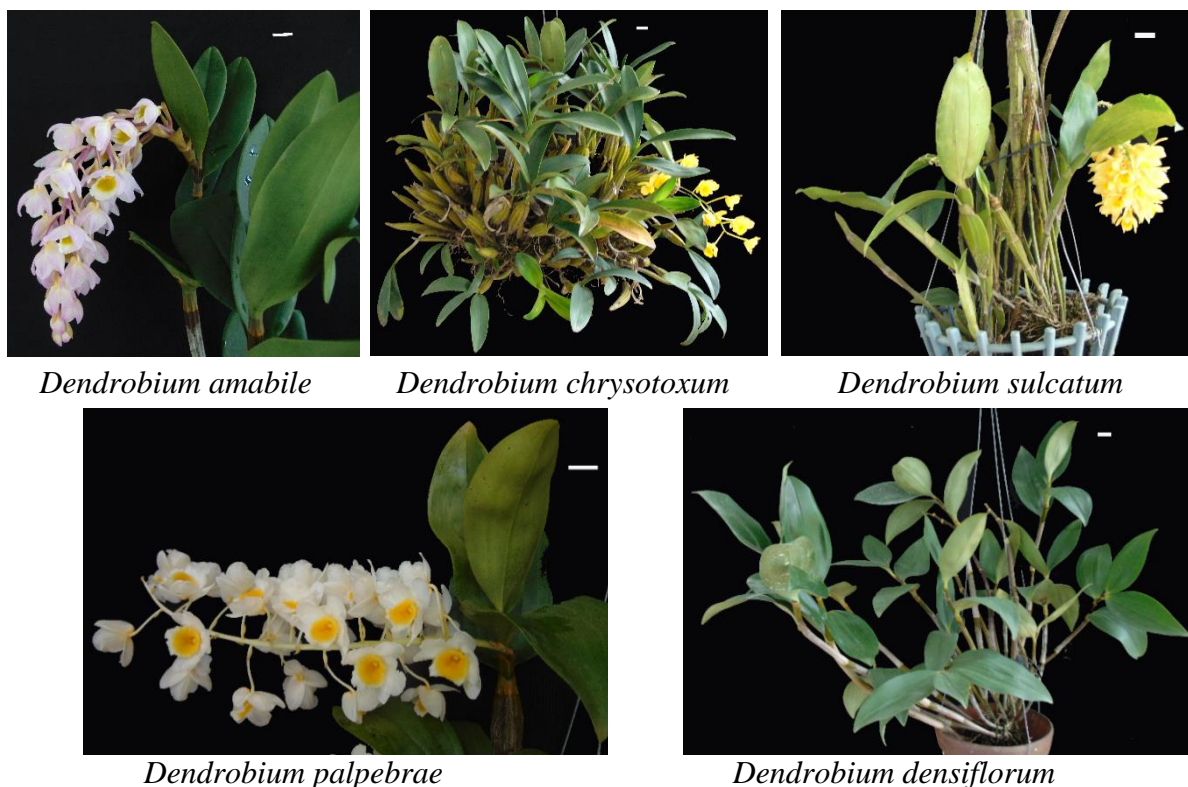
Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm FinchTV, SeaView, trình tự liên ứng (consensus sequence) được rút ra từ hai kết quả giải trình tự và kiểm tra các sai lệch. BLAST để tìm các trình tự tương đồng có sẵn trên cơ sở dữ liệu Genbank để xác nhận kết quả giải trình tự, kiểm tra sự nhiễm mẫu và đánh giá quá trình thu nhận và bảo quản mẫu.

Trình tự sau khi hiệu chỉnh sẽ được phân tích và cây phát sinh mô tả mối quan hệ giữa các loài được xây dựng dựa trên phần mềm MEGA 6.06, thuật toán Maximum likelihood, theo mô hình Kimura 2-thông số.

### 3. Kết quả - thảo luận

#### 3.1. Kết quả thu mẫu

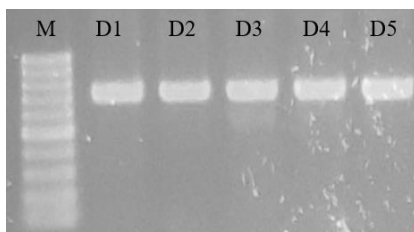
Nghiên cứu thu nhận được 5 loài Hoàng thảo Thủy tiên (mỗi loài với 3 lần lặp lại tại 3 địa điểm thu mẫu).

*Dendrobium amabile**Dendrobium chrysotoxum**Dendrobium sulcatum**Dendrobium palpebrae**Dendrobium densiflorum*

**Hình 3.1.** Hình ảnh và tên khoa học của 5 loài lan Hoàng thảo Thủy tiên nghiên cứu (đoạn thẳng tương ứng 2cm)

Nhóm Thủy tiên nghiên cứu có một số đặc điểm hình thái giống nhau như: Hệ rễ khòe mọc từ gốc thân hoặc gốc giả hành; thân, giả hành phân đốt có các rãnh rõ ràng; lá ít từ 5 – 7 chiếc trên một thân, bề mặt nhẵn, mọc thành hai hàng tập trung ở đỉnh thân, không có cuống lá và không rụng lá vào mùa Đông, chùm hoa buông, màu sắc hoa phong phú, cánh môi có lông mịn, họng màu vàng hoặc vàng cam, có mùi thơm.

### 3.2. Khuếch đại vùng ITS bằng kỹ thuật PCR



**Hình 3.2.** Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng ITS các mẫu lan Hoàng thảo Thủy tiên (D1-D5)\_TT với (M) thang DNA 1kp

Phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1F và ITS4R sử dụng khuôn mẫu là DNA tổng số được tách từ các mẫu lan Hoàng thảo Thủy tiên cho sản phẩm có kích thước khoảng 700 - 800bp. Về lý thuyết đoạn khuếch đại được bao gồm một phần 18S rDNA, ITS1, 5.5S rDNA, ITS2 và một phần trình tự 28S rDNA. Kết quả điện di thể hiện các băng sáng rõ cho thấy các sản phẩm PCR này đủ điều kiện tiến hành giải trình tự.

### 3.3. Phân tích trình tự sau khi hiệu chỉnh

Kết quả giải trình tự của 12 mẫu sau khi gửi về từ MacroGen được hiệu chỉnh cho trình tự dài 674-702bp, có thể bao phủ toàn bộ trình tự ITS1, ITS2. Theo nghiên cứu của Chiang và cộng sự (2012), khi phân tích trình tự vùng ITS của 20 loài *Dendrobium*, kích thước vùng ITS của *Dendrobium* khoảng 636 – 653bp, trong đó vùng ITS1(231-236 bp) ngắn hơn ITS2 (241-254 bp) [9]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Duy Dương (2015) khi khuếch đại và giải trình tự vùng ITS của 32 mẫu lan Hoàng Thảo với tổng chiều dài thu được từ 652 đến 715bp [10].

### 3.4. Xây dựng cây phát sinh chủng loài đối với trình tự ITS

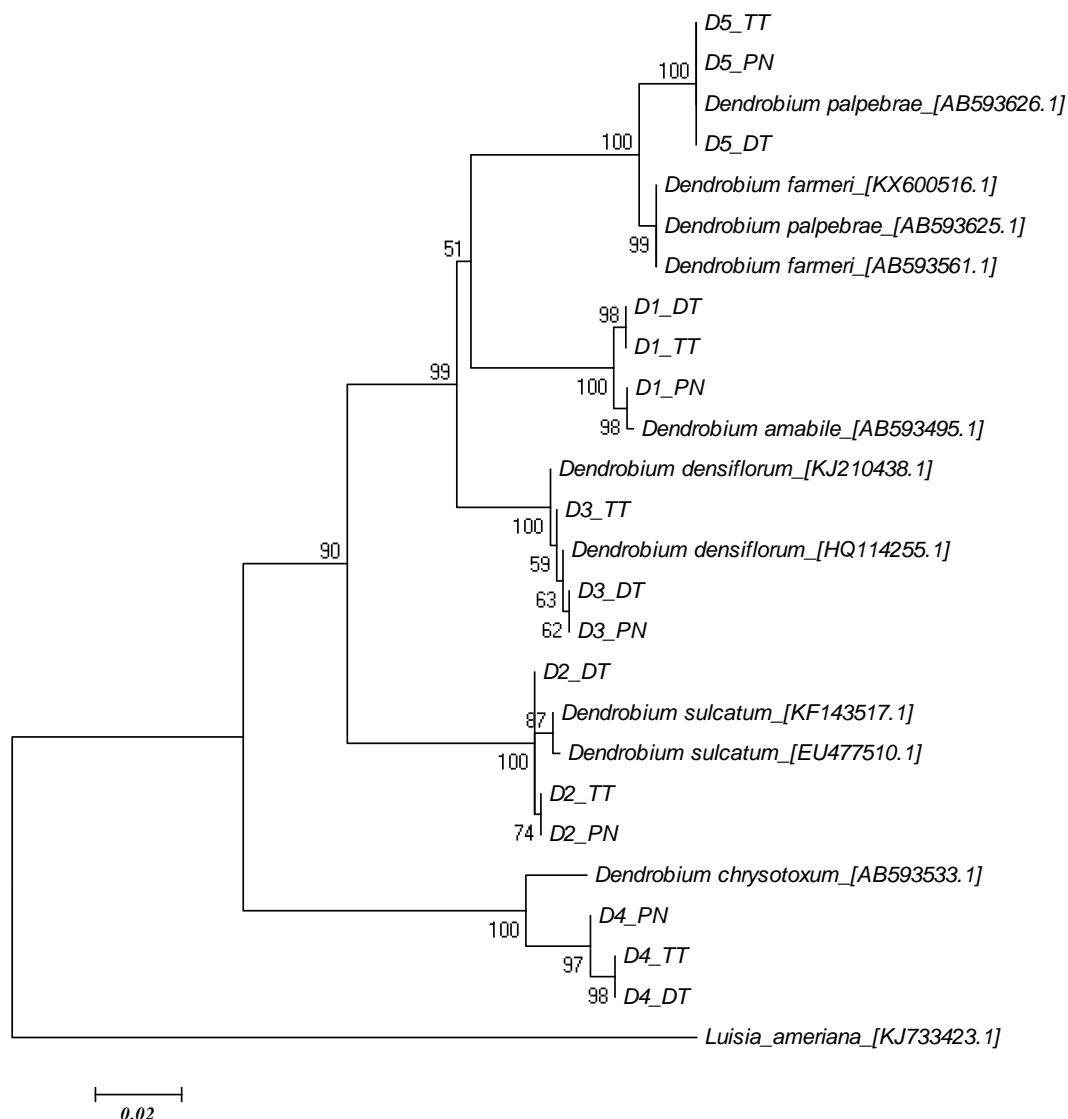
Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự vùng ITS của 15 mẫu lan Thủy tiên nghiên cứu, 10 trình tự tham khảo trên Genbank của các loài có cùng tên khoa học hoặc có mối quan hệ gần gũi và đối chứng là trình tự vùng ITS của *Luisia amesiana* (KJ733423.1, cũng thuộc họ Lan).

Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loài vùng ITS của 15 mẫu Hoàng thảo Thủy tiên nghiên cứu và các trình tự tham khảo trên Genbank (Hình 3.3) cho thấy cây phát sinh tách riêng làm 2 nhóm. Trình tự đối chứng *Luisia amesiana* (KJ733423.1) thuộc chi *Luisia* nên nằm tách biệt thành một nhánh. Nhánh còn lại đều là các trình tự của lan Thủy tiên thuộc chi *Dendrobium*.

Trong nhóm lan Thủy tiên, *D. palpebrae* có mối quan hệ gần gũi với *D. amabile*, 2 loài này có mối quan hệ gần với *D. densiflorum*, 3 loài này có chung gốc tiến hóa với *D. sulcatum* và *D. chrysotoxum* tách thành nhánh riêng với 4 loài Thủy tiên còn lại. Đây là cơ sở để chọn tạo các giống mới từ các giống lan Hoàng thảo Thủy tiên rừng Việt Nam. Kết quả này về cơ bản phù hợp với nghiên cứu của Trần Duy Dương (2015) và Takamiya và cộng sự (2014):

+ Trong kết quả nghiên cứu của Trần Duy Dương (2015): 32 mẫu giống lan Hoàng Thảo làm XVII nhóm khác nhau thì *D. chrysotoxum* thuộc nhóm X trong khi các loài thuộc nhóm Thủy tiên khác như *D. amabile*, *D. thysiflorum*, *D. farmeri* có quan hệ gần gũi và được xếp chung vào một nhóm XIII.[10]

+ Takamiya và cộng sự (2014) đã xây dựng cây phát sinh loài của 210 mẫu *Dendrobium* bằng trình tự vùng ITS và *matK*, chia các mẫu thành 13 nhóm (A-M). Trong đó *D. palpebrae* có quan hệ gần với *D. farmeri*, hai loài này chung gốc với *D. amabile*, *D. densiflorum* có cùng nguồn gốc với ba loài trên, *D. sulcatum* thuộc 1 nhánh riêng nhưng cả 5 loài này đều thuộc nhóm C. Chỉ có *D. chrysotoxum* thuộc nhóm A [4].



**Hình 3.3.** Mô hình cây phát sinh phân tích bằng trình tự vùng ITS của nhóm *Dendrobium* nghiên cứu

Vùng ITS cho phép phân biệt giữa các mẫu ở mức loài và dưới loài, nên các mẫu nghiên cứu và các mẫu tham khảo nằm ở các vị trí riêng, không trùng lặp lên nhau, 5 loài nghiên cứu thuộc về 5 nhánh rõ rệt. Kết quả phân nhánh đồng thời cũng cho thấy độ đa dạng của các mẫu trong nghiên cứu. Ba mẫu *D. palpebrae* (D5) được chọn có thể cùng xuất phát từ một nguồn gốc chung nên không có sự khác biệt với giá trị bootstrap 100. Trong khi đó, ba mẫu *D. densiflorum* thu thập lại thể hiện được sự tách biệt ở mức dưới loài.

#### 4. Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu cho thấy việc sử dụng trình tự vùng ITS có thể giúp phân tách rõ ràng các loài trong nhóm Hoàng thảo Thủy tiên, khắc phục được vấn đề của phân loại hình thái. Cây phát sinh từ trình tự vùng ITS của 15 mẫu Thủy tiên nghiên cứu còn thể hiện mối quan

hệ họ hàng giữa các loài, là cơ sở cho việc kết hợp các cặp quan lai trong các nghiên cứu chọn tạo giống mới từ các giống lan Hoàng thảo Thủy tiên rừng Việt Nam. Các mẫu thuộc loài *D. amabile*, *D. chrysotoxum*, *D. sulcatum*, *D. densiflorum* thể hiện sự đa dạng, có sự tách biệt trong cây phát sinh, 3 mẫu thuộc loài *D. palpebrae* có thể xuất phát từ một nguồn chung.

Tuy nhiên, việc phân tích trình tự của các vùng khác như *rbcL*, *matK*, *psbA – trnH*... cần được tiếp tục nghiên cứu để có thể xây dựng hệ thống mã vạch DNA (DNA barcode) cho các loài Hoàng thảo này.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, tập 3, NXB Trẻ, 1999, tr. 815-816.
2. Trần Hợp, *Phong lan Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, 1998.
3. L. V. Averyanov, Phan Ke Loc, Nguyen Tien Hiep, D. K. Harder, “Phytogeographic review of Vietnam and adjacent areas of Eastern Indochina,” *Komarovia, Saint Petersburg*, (3), p.66, 2003.
4. T. Takamiya, P. Wongsawad, A. Sathapattayanon, N. Tajima, S. Suzuki, S. Kitamura, N. Shioda, T. Handa, S. Kitanaka, H. Iijima, T. Yukawa, “Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, *Dendrobium* section *Dendrobium* and allies,” *AoB PLANTS*, 6: plu045, 2014.
5. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công Nghệ Việt Nam, *Sách đỏ Việt Nam tập II*, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 2007, tr.421.
6. Y. Lam, T. B. Ng, R. M. Yao, J. Shi, K. Xu, S. C. W. Sze, K. Y. Zhang, “Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in *Dendrobium* plants,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol 2015, 2015 .
7. B. G. Baldwin, “Phylogentic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Composita,” *Mol Phylogenet Evol*, 1(1): 3 – 16, 1992.
8. M. W. Chase, R. S. Cowan, “A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants,” *Taxon*, pp.295-298, 2007.
9. C. Chiang, T. Yu, S. Lo, C. Kuo, W. Peng, H. Tsay, “Molecular authentication of *Dendrobium* species by multiplex polymerase chain reaction and amplification refractory mutation system analysis,” *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol.137 pp.438-444, 2012.
10. Trần Duy Dương, *Nghiên cứu đa dạng di truyền và xác định chỉ thị nhận dạng một số nguồn gen hoa lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) bản địa của Việt Nam*, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2015.