

XÁC ĐỊNH MÃ VẠCH ADN PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH DÒNG LAN PHI ĐIỆP NĂM CÁNH TRẮNG MẮT NAI (*Dendrobium anosmum*)

Nguyễn Thị Hà Phượng Loan¹, Bùi Thị Mai Hương^{1*}, Phùng Thị Ly¹, Nguyễn Thị Hồng Gấm¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai là dòng lan đột biến có giá trị kinh tế cao, có đặc trưng riêng so với các loại lan Phi điệp (*Dendrobium anosmum*) về hình dạng, màu sắc hoa. Do vậy, việc xác định các đoạn Mã vạch ADN để định danh cho dòng lan này phục vụ giám định loài là cần thiết. ADN tổng số phân lập từ lá cây Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai được dùng để nhân các đoạn mã vạch ADN (*rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf*) bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR có kích thước giống với kích thước dự kiến được xác định trình tự nucleotide. Kết quả phân tích trình tự đã chỉ ra, đoạn *rbcL* có 501 nucleotide, đoạn *TrnH-psbA* có 639 nucleotide và đoạn *ycf* có 753 nucleotide. Các trình tự này sau đó được so sánh với các trình tự trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Kết quả cho thấy: dòng Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai thuộc loài *Dendrobium anosmum* với các tỷ lệ tương đồng 100% của đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và 97,16% của đoạn *ycf*. Thêm vào đó, so sánh sự khác biệt của các đoạn mã vạch ADN (*rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf*) giữa Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai và các loài Lan hoàng thảo khác (*Dendrobium* sp.) trên NCBI cho thấy sử dụng chỉ thị *ycf* làm mã vạch ADN là tốt nhất để giám định cho Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai ở Việt Nam.

Từ khóa: giám định loài, Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai, mã vạch ADN, nhân bản gen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai (*Dendrobium anosmum*) là một trong những dòng Lan Phi điệp đột biến có màu sắc hoa đẹp, đang được săn đón nhiều hiện nay. Hoa lan này có năm cánh màu trắng tinh khiết, môi hồng, mắt hồng, hoa có thể chơi được khá lâu (10 - 15 ngày) gặp điều kiện thích hợp có thể lên tới 20 ngày. Mùa hoa thường nở vào tháng 5 - 6. Ngoài ra, Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai là cây có khả năng chịu nóng và chịu lạnh khá tốt, thích hợp với nhiều vùng miền. Vì vậy, Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai mang lại hiệu quả kinh tế cao. Do đó, việc nghiên cứu xác định các đoạn mã vạch ADN cho Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai phục vụ giám định loài là cần thiết và cấp bách cho việc định danh và bảo tồn loài lan quý của Việt Nam.

Xác định các đoạn mã vạch ADN là một phương pháp định danh, sử dụng một đoạn ADN chuẩn ngắn nằm trong bộ genome của sinh vật đang nghiên cứu để phục vụ giám định loài; mang lại hiệu quả cao trong thời gian ngắn, góp phần không nhỏ vào sự định danh và

*Corresponding author: tho.huongminh21@gmail.com

bảo tồn các loài thực vật trên thế giới. Phương pháp xác định các đoạn mã vạch ADN là một công cụ hữu hiệu hỗ trợ cho phương pháp phân loại dựa vào hình thái (Aron J.F *et al.*, 2008). Ở thực vật, tốc độ tiến hóa của các đoạn gen ty thể không nhanh như ở động vật, do đó đoạn *COI* không được sử dụng. Thay vào đó, một số gen lục lạp như *matK*, *rbcL*; gen vùng nhân như *ITS*, *ITS2*; vùng xen *TrnH-psbA*, *psbK-psbI* được sử dụng kết hợp để giám định các loài thực vật (Chase M.W *et al.*, 2005; Chen S.Y.H *et al.*, 2010; Ford C.S *et al.*, 2009; Kress J.W *et al.*, 2005; Von Crautlein M.K.H. *et al.*, 2011).

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành lựa chọn ba đoạn trình tự ADN để sử dụng làm mã vạch ADN là: *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf*. Trong số đó, các đoạn *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf* là các đoạn ADN nằm ở hệ gen lục lạp. Các đoạn trình tự này đều có tính đặc trưng cao cho loài, có thể đem lại kết quả khả quan nhằm phân loại, giám định và xác định mối quan hệ di truyền, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả bảo tồn và phát triển Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai thu thập tại phòng nuôi

cây mô tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.



Hình 1. Ảnh hoa Lan Phi điệp tím năm cánh trắng mắt nai

Vật liệu nghiên cứu: mẫu lá cây mô của cây Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai. Sau khi thu, mẫu được cho vào trong túi nylon có chứa hạt silicagel hút ẩm và được bảo quản ở -20°C để tách chiết ADN phục vụ nghiên cứu. Kí hiệu mẫu Phi điệp năm cánh trắng mắt nai là MN1.

Trình tự các cặp mồi *rbcL* (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC; rP1R: GTAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C ; mồi *TrnH-psbA* (trnPF1: CGCGCATGGTGGATTCACAATCC; psbPR1: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C ; mồi *yef* (*yef1b*F: TCTCGACGAAATCAGATTGTTGTGAAT; *yef1b*R: ATACATGTCAAAGTGATGGAAAA) với nhiệt độ gắn mồi 48°C . Cả 3 mồi này đều nằm ở hệ gen lục lạp.

Hóa chất: Kit tách chiết ADN tổng số (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của hãng Intron Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit) của Norgen, Canada; Hóa chất cho điện di trên gel Agarose: Agarose, ADN marker, Redsafe...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai theo hướng dẫn sử dụng Kit (Plant ADN Isolation Kit) của hãng Norgen. Nhân bản đoạn gen *rbcL*, *TrnH-psbA* và *yef* từ các mẫu ADN tổng số bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700, mỗi phản ứng PCR được thực hiện

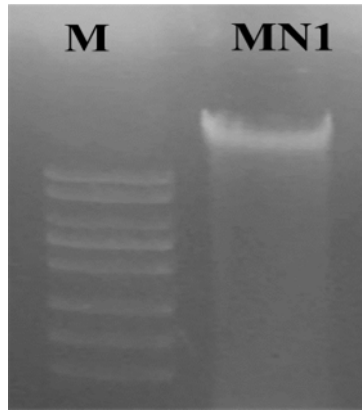
trong tổng thể tích $20\ \mu\text{l}$, bao gồm: H_2O deion ($7\ \mu\text{l}$), 2x PCR Master mix Solution ($10\ \mu\text{l}$), $10\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ mồi xuôi ($1,0\ \mu\text{l}$), $10\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ mồi ngược ($1,0\ \mu\text{l}$) và $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$ ADN khuôn ($1\ \mu\text{l}$). Chương trình phản ứng PCR: 95°C trong 5 phút; (95°C : 30 giây, $48 - 52^{\circ}\text{C}$: 30 giây, 72°C : 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 5 phút; 4°C . Nhiệt độ gắn mồi các phản ứng phụ thuộc vào cặp mồi sử dụng. Mỗi phản ứng PCR lặp lại 3 lần trên mỗi mẫu thí nghiệm. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit (PCR Purification Kit) của Canada. Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được gửi tới phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự nucleotide.

Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng phần mềm chuyên dụng (Bioedit). Trình tự nucleotide của các đoạn gen *rbcL*, *TrnH-psbA* và *yef* được so sánh trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI) để tìm ra các loài tương đồng. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng NCBI.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá cây Lan Phi điệp

ADN tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu lá cây Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai bằng Kit tách chiết của hãng Norgen được pha loãng để xác định nồng độ và độ tinh sạch. Kết quả cho thấy, dung dịch ADN tổng số có nồng độ dao động từ $300 - 500\ \text{ng}/\mu\text{l}$; Tỷ số $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ trong khoảng từ 1,7 - 2,05 chứng tỏ ADN đã được tách chiết với nồng độ cao và đảm bảo độ tinh sạch. Sau đó, tiến hành điện di để kiểm tra sự nguyên vẹn của sản phẩm ADN tách chiết được.

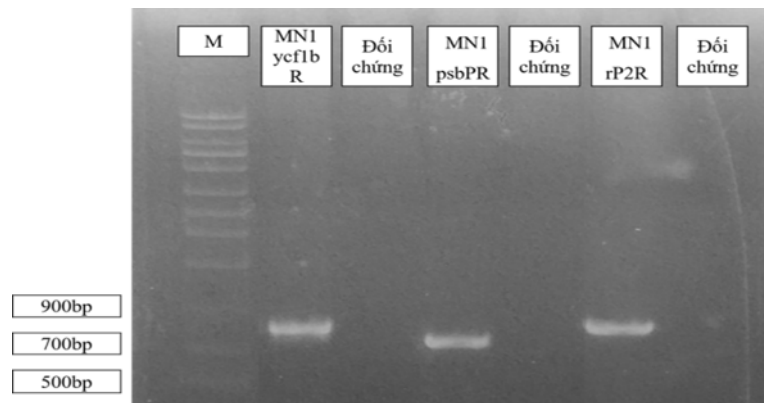


Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm ADN tổng số tách từ mẫu lá của cây Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai
(M: Marker; MN1: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai)

Kết quả điện di cho thấy băng ADN khá sắc nét, không có sản phẩm phụ, điều này khẳng định ADN tổng số còn nguyên vẹn, ít đứt gãy và sạch. Sản phẩm tách chiết ADN tổng số đảm bảo yêu cầu kỹ thuật làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

3.2. Kết quả nhân bản các đoạn mã vạch ADN bằng kỹ thuật PCR

Kết quả PCR sau khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 3) cho thấy xuất hiện băng ADN có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn mã vạch ADN dự kiến. Sản phẩm PCR các đoạn mã vạch ADN ở hình 3 cũng cho thấy không có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR rất đặc hiệu, sau khi tinh sạch có thể sử dụng trực tiếp các sản phẩm này để xác định trình tự nucleotide.



Hình 3. Kết quả PCR các đoạn gen *ycf*, *rbcL*, *trnH-psbA* từ ADN của mẫu Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai
(M: Marker; MN1 *ycf1bR*: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với môi *ycf*;
MN1 *psbPR*: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với môi *trnH-psbA*;
MN1 *rP2R*: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với môi *rP*)

3.3. Kết quả xác định và phân tích trình tự nucleotide của đoạn mã vạch ADN

3.3.1. Trình tự ADN trên đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho

thấy, đoạn gen *trnH-psbA* được nhân bản có kích thước 639 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của mẫu Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai như trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự ADN trên đoạn gen *trnH-psbA* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai

AGAATGCCAATTTAAAAAATGGAAAAAAGGAGTAATCAGCCGTGACACGTTCACTAAAAAATCC
 TTTTGTAGCTAATCATTTAGCGGGAAGAATTGAAAACTCAACAGGAGGGAGGAGAAAGAAATCATAG
 TGACTTGGTCTCGGGCATCTACCATTATACCCACAATGATTGGCCATACAATCGCTATTCATAATGGAAA
 GGAACATTTACCTATTTATATCACAGATCGTATGGTTCGGTCAAAATTGGGAGAATTTGCACCTACTCTA
 ACTTTCGTGAGACACGCGAGAAACGATAATAAATCTCGTCGTTAGTCGTTCTACTAAGTATTTCATGTGAA
 AAGCCTTATCTTAATAGTATTTCTAATAGTATTTAGACTTAAGAGTCTTTATCTTATAGTAAGAGTATAG
 GTATATTTCTTTTCTAGTATACTAATACTACTCTTTTCTGACTTATCTTATACTATACTTCACCTAGGCA
 CTTATCATTTCATTGGCGGGGAGAAGCTTTTATGATAAAGAACGAAAATTCGGATAGAGAAGCAAAAAGAC
 CCCTGAATCCGAATCCAAGAATGCAAATCCAACAAGATAGCAATCCCCCAATATCTTGTCTTAGAACA
 AGATATTGGGGGA

Các trình tự này sau đó được so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài. Một số

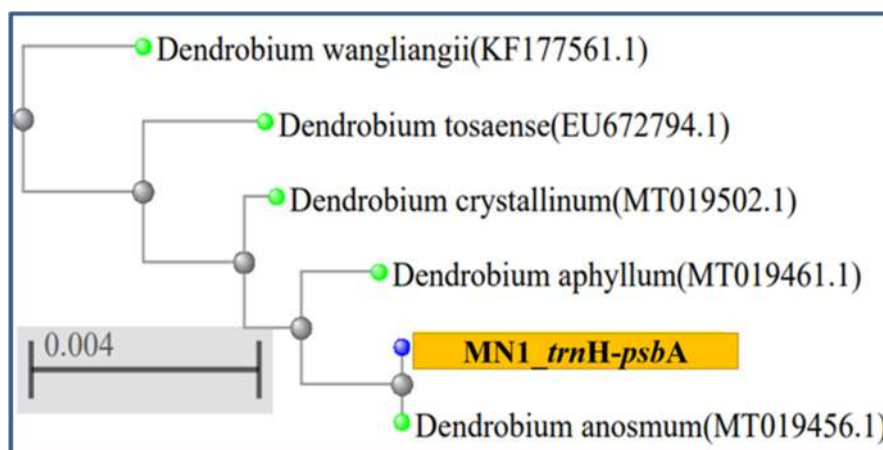
loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với Lan Phi điệp được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Một số loài Lan có trình tự đoạn *trnH-psbA* tương đồng với Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng di truyền (%)
1	<i>Dendrobium anosmum</i>	MT019456.1	100
2	<i>Dendrobium aphyllum</i>	MT019461.1	99,69
3	<i>Dendrobium crystallinum</i>	MT019503.1	99,07
4	<i>Dendrobium wangliangii</i>	KF177561.1	97,97
5	<i>Dendrobium tosaense</i>	EU672794.1	98,76

Sau đó, chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 4) tìm ra mối quan hệ của Lan

Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với các loài Lan khác ở bảng 2.



Hình 4. Cây phân loại dựa vào trình tự đoạn *trnH-psbA* của các loài Lan được xử lý bằng NCBI

Từ cây phân loại (hình 4) cho thấy loài Lan Phi điệp năm cánh trắng mà chúng tôi nghiên cứu có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của loài *Dendrobium anosmum* trong ngân hàng NCBI và có quan hệ xa nhất với loài *Dendrobium wangliangii*.

3.3.2. Trình tự ADN trên đoạn gen *rbcL*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *rbcL* được nhân bản có kích thước 501 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcL* của mẫu Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai như ở bảng 3.

Bảng 3. Trình tự ADN trên đoạn gen *rbcL* của loài Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai

CCTGACTACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTTCCG
 CCTGAAGAAGCGGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGAT
 GGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAAT
 CAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTC
 CATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTACT
 TCTTATTCCAAAACCTTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATG
 GTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAAAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGG
 TTTATGAATGTCTA

Các trình tự này sau đó được so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài. Một số

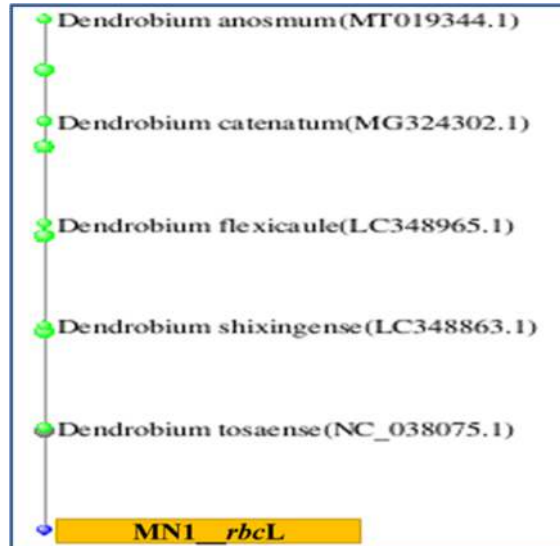
loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Một số loài Lan có trình tự đoạn *rbcL* tương đồng với Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng di truyền (%)
1	<i>Dendrobium anosmum</i>	MT019344.1	100
2	<i>Dendrobium catenatum</i>	MG324302.1	100
3	<i>Dendrobium flexicaule</i>	LC348965.1	100
4	<i>Dendrobium shixingense</i>	LC348863.1	100
5	<i>Dendrobium tosaense</i>	NC_038075.1	100

Sau đó, xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 5) tìm ra mối quan hệ của Lan Phi điệp

năm cánh trắng mắt nai với các loài Lan khác ở bảng 4.



Hình 5. Cây phân loại dựa vào trình tự đoạn *rbcL* của các loài Lan được xử lý bằng NCBI

Từ cây phân loại (hình 5) dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *rbcL* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với các loài Lan khác cho thấy: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai mà chúng tôi nghiên cứu có trình tự gen giống 100% với đoạn gen của các loài Lan Phi điệp khác trong ngân hàng NCBI.

3.3.3. Trình tự DNA của đoạn gen *ycf*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *ycf* được nhân bản có kích thước 753 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *ycf* của mẫu Phi điệp năm cánh trắng mắt nai như trong bảng 5.

Bảng 5. Trình tự ADN trên đoạn gen *yef* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai trên NCBI

TTGATCATCGTTTTATCATTGTTACTAGTATTTTGAATACTAGAAATAGAATTGGTATTCTGATCATTATCGTTATAAATTACCACAAGTTTGGCTCTTCTTGAATTAATCTCATGATCGTCTTCCTCCAATTCTTCTTCA TTTTCTTCTTCCTCTTCTTCAAAATTCTCGGTTAATTTGTATGACCATCGAGAAACCTTTTTACTTACTTCT TCTATTCTAATCCAATAGATTTTTTTTTTCATTGTTTTTGTATGTTTGTATGTGTTGTAATTACATCAAAAT ACAAATTGCAAATATTTTGCTTGACTTTCTGAATCAATTCCTTTTTCTTCTTTAGAATTCAAAAATGATTG ACGGTGGAGTTCTACGGAATCATTATAAGTAGATCATGAATCTTATTTATAAAAAAAGATTCTACTAA ATCTTCTGTATCTGTATCTGTATAAGTATTCATGATTGCGCGTGAATCTAATTCTTTTCTCGTTCCTCGAT ATGGTCCGTTGAAAAAAGGATCATATGCTTTTGGCAAGCATTTTTTTTTTTTTTCTTCATCCCATAATAGG GTTTTTTTTTCAACCATACCCAACAAGGGGATCCCCCTTTTTTTTCTAAAATTGGAATTCGGTTTTTTCAT TTCTTTGTTCAAATTGCATTTTTTTTTTTCTTTATTATAATTCCAAAATTTATAAAAATCTCCCCGAATNT TTTTCTNNTATGTATAAAAAAATTCTTTGTTCTACCTTCC

Các trình tự này sau đó được so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen quốc tế NCBI để tìm ra sự khác biệt ở cấp độ loài. Một số

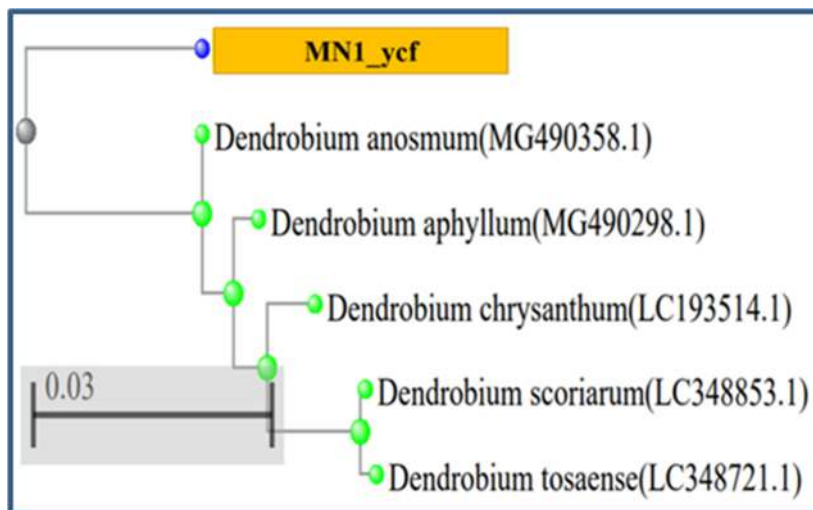
loài có trình tự gen tương đồng dùng so sánh với Phi điệp được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Một số loài Lan có trình tự đoạn *yef* tương đồng với Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai trên NCBI

STT	Tên loài	Mã số	Hệ số tương đồng di truyền (%)
1	<i>Dendrobium anosmum</i>	MG490358.1	97,16
2	<i>Dendrobium aphyllum</i>	LC192953.1	95,41
3	<i>Dendrobium chrysanthum</i>	LC193514.1	94,54
4	<i>Dendrobium scoriarum</i>	LC348853.1	94,53
5	<i>Dendrobium tosaense</i>	LC348721.1	94,09

Sau đó, chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 6) tìm ra mối quan hệ của Lan

Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với một số loài lan khác ở bảng 6.



Hình 6. Cây phân loại dựa vào trình tự đoạn *yef* của các loài Lan được xử lý bằng NCBI

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *yef* của cây Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với các loài Lan khác cho thấy: Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai mà chúng tôi nghiên cứu có quan hệ gần với loài *Dendrobium anosmum* với hệ số tương đồng

97,16%, có quan hệ xa với loài *Dendrobium tosaense* với hệ số tương đồng 94,09%. Bởi mẫu Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai mà chúng tôi sử dụng để phân tích là loài lan đột biến nên nó có sự phân nhánh khác biệt trên cây phân loại.

4. THẢO LUẬN

Theo kết quả phân tích của 3 đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf* của dòng Phi điệp năm cánh trắng mắt nai (*Dendrobium anosmum*) với trình tự gen của loài Phi điệp khác (*Dendrobium anosmum*) trên ngân hàng gen quốc tế cho thấy: Đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* cho tỷ lệ tương đồng 100% giữa 2 loài, đoạn *ycf* cho tỷ lệ tương đồng là 97,16% giữa dòng Phi điệp năm cánh trắng mắt nai và loài Phi điệp khác trên ngân hàng gen quốc tế với mã số MG490358.1. Như vậy, đoạn gen *ycf* có khả

năng phân biệt cao hơn so với đoạn *trnH-psbA* và *rbcL* khi so sánh Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai (*Dendrobium anosmum*) với loài Phi điệp khác (*Dendrobium anosmum*) trên ngân hàng gen quốc tế.

Dựa vào kết quả so sánh trình tự 3 đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với trình tự gen của loài *Dendrobium tosaense* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI ta lập được bảng so sánh đoạn trình tự như bảng 7.

Bảng 7. Bảng so sánh khả năng phân biệt của các đoạn trình tự *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf*

Tên đoạn gen	<i>ycf</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rbcL</i>
Số điểm sai khác	54	13	0
Kích thước trình tự	753	639	501
Tỷ lệ sai khác	7,31%	1,24%	0%

Kết quả phân tích cho thấy khi so sánh trình tự các đoạn gen *ycf*, *trnH-psbA* và *rbcL* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai (*Dendrobium anosmum*) với loài *Dendrobium tosaense* công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI, trình tự đoạn gen *ycf* có 54 điểm sai khác, trình tự đoạn gen *trnH-psbA* có 13 điểm sai khác và trình tự đoạn gen *rbcL* có 0 điểm sai khác. Tỷ lệ sai khác của trình tự *ycf* là cao nhất (7,31%) do đó khả năng phân biệt loài của gen *ycf* cũng là tốt nhất và tỷ lệ sai khác của trình tự *rbcL* là thấp nhất (0%) đồng nghĩa với khả năng định danh loài tốt nhất. Như vậy, đoạn gen *ycf* có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *trnH-psbA* và *rbcL* khi so sánh Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai (*Dendrobium anosmum*) với loài *Dendrobium tosaense*.

Như vậy kết quả so sánh 3 đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai (*Dendrobium anosmum*) với trình tự gen của cùng loài Phi điệp khác (*Dendrobium anosmum*) và loài Lan *Dendrobium tosaense* đều cho thấy đoạn gen *ycf* có khả năng phân biệt cao hơn so với đoạn *trnH-psbA* và *rbcL*.

Các kết quả so sánh trình tự 3 đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf* của Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với trình tự gen của một số

loài Lan khác đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI cũng cho kết quả tương tự.

Songzhi Xu và cộng sự vào năm 2015 đã sử dụng đoạn gen lục lạp *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* phân loại thành công 184 loài *Dendrobium* của vùng Châu Á (Songzhi Xu et al., 2015). Nhóm tác giả đã xác định dùng tổ hợp *ITS* và *matK* cho kết quả phân loại tốt nhất. Các đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf* cũng đã được sử dụng định danh thành công cho loài Phi điệp tím Hòa Bình (Bùi Thị Mai Hương và cộng sự, 2021). Như vậy, đối với các loài thuộc chi *Dendrobium* thì các chỉ thị ADN mã vạch của các đoạn gen ở lục lạp như *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* và *ycf* là hoàn toàn tin cậy và có độ phân loại cao.

5. KẾT LUẬN

Đã nhân gen thành công các đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA* và *ycf* bằng kỹ thuật PCR. Trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch đã được xác định: Đoạn *rbcL* là 501 bp, *trnH-psbA* là 639 bp, *ycf* là 753 bp. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch ADN (*rbcL*, *TrnH-psbA* và *ycf*) của dòng Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của các dòng lan khác trên NCBI đã chỉ ra dòng Phi điệp năm cánh trắng mắt nai thuộc loài *Dendrobium anosmum*.

Đoạn *ycf* làm mã vạch ADN có khả năng phân biệt dòng Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai với các dòng lan khác cao hơn so với đoạn *rbcL* và *trnH-psbA*. Vì vậy, sử dụng chỉ thị *ycf* là tốt nhất làm mã vạch ADN để giám định dòng Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai ở Việt Nam. Tuy nhiên, để chính xác nhất nên sử dụng cả 3 chỉ thị để định danh dòng Lan Phi điệp năm cánh trắng mắt nai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aron J.F, Kevin S.B, Prasad R.K, Kevin S. Burgess, Prasad R. Kesanakurti, Sean W. Graham, Steven G. Newmaster, Brian C. Husband, Diana M. Percy, Mehrdad Hajibabaei, Spencer C. H. Barrett. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*. 3(7): e2802.
2. Bùi Thị Mai Hương, Nguyễn Văn Việt, Hà Văn Huân (2021). Xác định mã vạch ADN phục vụ giám định loài Phi điệp tím Hòa Bình (*Dendrobium sp.*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. ISSN: 1859-4581. 8:40-45.
3. Chase M.W, Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J.M., Kesanakurthi R.P., Haider N., Savolainen V. (2005). Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360:1889-1895.
4. Chen S.Y.H, Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao X., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Leon C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcodes for identifying medicinal plant species. *Plos one* 5: e8613.
5. Ford C.S, Ayres K.L, Toomey N., Haider N., Stahl J.V.A., Kelly L.J., Wikström N., Hollingsworth P.M., Duff R.J., Hoot S.B., Cowan R.S., Chase M.W., Wilkinson M.J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on ADN plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 159 (1): 1-11.
6. Kress J.W, Wurdack K.J, Zimmer E.A, Weigt L.A, Janzen D.H. (2005). Use of ADN barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (23): 8369 - 74.
7. Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huệ, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thơ (2013), “Nhân giống *in vitro* Lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp số 3 (kỳ I)*, Tr.16-21.
8. Songzhi Xu, Dezhu Li, Jianwu Li, Xiaoguo Xiang, Weitao Jin, Weichang Huang, Xiaohua Jin, Luqi Huang (2015). Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *Plos one*. doi.org/10.1371/journal.pone.0115168.
9. Von Cräutlein M. Pietiläinen M., Korpelainen H., Rikkinen J. (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and conservation* 20: 373-389.

IDENTIFICATION OF DNA BARCODING SEQUENCES TO CHARACTERIZE *Dendrobium anosmum* WITH FIVE PETALS AND PINK-EYE

Nguyen Thi Ha Phuong Loan¹, Bui Thi Mai Huong^{1*}, Phung Thi Ly¹, Nguyen Thi Hong Gam¹
¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Dendrobium anosmum with white five petals and pink-eye is a mutant line, which has a high economic value, has its own characteristics compared to other types of *Dendrobium sp.* in terms of flower shape and color. Therefore, it is necessary to identify the DNA Barcode sequences to identify this species. The total DNA extracted from leaves tissue of this species was used to PCR amplify the DNA Barcoding sequences of plant markers (*rbcL*, *TrnH-psbA* and *ycf*). The PCR products had the expected size. The sequencing results showed that the *rbcL* fragment had 501 nucleotides, the *TrnH-psbA* fragment had 639 nucleotides and the *ycf* fragment had 753 nucleotides. These sequences of were compared with those on the International Gene Bank (NCBI). The results showed that the studied species was *Dendrobium anosmum* with the percentage identity was 100% of the *rbcL*, *trnH-psbA* and was 97.16% of the *ycf*. In addition, the results also indicated that the *ycf* marker is the best DNA barcode to identify the studied specie among another *Dendrobium sp.* in Vietnam.

Keywords: DNA barcoding, *Dendrobium anosmum*, PCR, species identification.

Ngày nhận bài : 29/6/2021
Ngày phản biện : 30/7/2021
Ngày quyết định đăng : 06/8/2021