

PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VÀ ĐỌC TRÌNH TỰ GEN ITS LOÀI LAN KIM TUYẾN (*ANOECTOCHILUS SETACEUS* BLUME.) TẠI THANH HÓA

Lê Đình Chấn¹, Nguyễn Thị Hiền²

TÓM TẮT

Lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume thuộc chi *Anoectochilus*, họ Lan - *Orchidaceae* là loài thực vật quý hiếm, nhưng đang bị đe dọa tuyệt chủng cao do khai thác quá mức. Trong bài báo này, chúng tôi miêu tả phương pháp tách chiết DNA và xác định trình tự đoạn ITS (Internal transcribed spacer) thuộc hệ gen nhân cho 4 mẫu Lan kim tuyến được thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên (KBTTN) Xuân Liên và Pù Luông, Thanh Hóa. Mục đích của bài báo nhằm cung cấp một quy trình hiệu quả cho việc xác định trình tự gen ITS loài Lan kim tuyến và có thể áp dụng cho những loài cùng chi. Đây là bước thực nghiệm quan trọng, nhằm xác định dữ liệu trong kế hoạch nghiên cứu hệ thống học phân tử và tiến hóa phân tử chi *Anoectochilus*. Kết quả, trình tự DNA vùng ITS đã được xác định thành công cho 4 mẫu nghiên cứu, kích thước thu được là 643 nucleotide. So sánh với dữ liệu vùng gen ITS cho thấy Lan kim tuyến *Anoectochilus Setaceus* Blume có mức độ tương đồng cao, tới 99% với các loài cùng chi *A.albolineatus*, *A.lylei*, *A.formossanus* và *A.koshunensis*. Kết quả nghiên cứu là lần đầu tiên cung cấp các dữ liệu phân tử cho loài Lan kim tuyến với mẫu thu ở Việt Nam. Đây cũng là một dữ liệu cho phân loại và nghiên cứu nguồn gốc phát sinh loài, cung cấp các thông tin hữu ích cho chiến lược bảo tồn.

Từ khóa: Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume), trình tự gen ITS, mã vạch DNA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan kim tuyến có số lượng ít, mọc rải rác tại một số khu rừng núi cao và bị khai thác trái phép quá mức, vì vậy Lan kim tuyến đã được đưa vào Sách đỏ Việt Nam năm 2007, xếp hạng EN A1a,c,d và được Chính phủ đưa vào Nghị định 32/2006/NĐ-CP [1] ở nhóm bị cấm khai thác sử dụng với mục đích thương mại.

Mặt khác Lan kim tuyến là cây thuốc có tác dụng tăng cường sức khỏe chữa viêm gan mãn tính, suy nhược thần kinh [3], gần đây loài này được phân tích hóa học và xác định có các chất quercetin, isoharmnetin-3-O-beta-D-glucopyranosid, kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranosid, 5-hydroxy-3'-4'-7'-trimethoxyflavonol-3-O-beta-D-rutinosid và isorhamnetin-3-O-beta-D-rutinosid... có khả năng chống ung thư [8].

Nơi sống và sinh thái của Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume.): Mọc rải rác trong rừng núi đá vôi, nơi ẩm, dọc theo khe suối, ở độ cao 250-700m, tránh nắng trực tiếp,

¹ Giảng viên khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hồng Đức

² Giáo viên Trường Trung học phổ thông Đào Duy Từ, Thanh Hóa

thân và lá màu tím, trên mỗi chiếc lá có từ 3 đến 5 sọc dọc. Lan bò trên mặt đất cao 10-20cm, phần non hơi có lông thưa; lá hình trái xoan hay hình trứng, tròn ở gốc, phiến lá dài 3-4cm, rộng 2-3cm, mặt trên màu nâu thẫm có vệt vàng ở giữa và màu hồng nhạt trên các gân, mặt dưới màu nâu nhạt, cuống lá dài 1-2cm, ở gốc rộng ra thành bẹ ôm lấy thân; từ tháng 10-12 là mùa hoa của Lan kim tuyến, cụm hoa dài 5-7cm, mang 5-10 hoa màu hồng khá to (dài cỡ 2,5cm); cánh môi dài 15mm, mang 6-8 ria mỗi bên, đầu môi chẻ đôi thành 2 thùy hình thuẫn tròn đầu; bầu dài 13mm, có lông thưa; tái sinh chủ yếu bằng chồi của thân rễ.

Gần đây trong các nghiên cứu phân loại thực vật ở mức độ loài, vùng ITS là locus được giải mã phổ biến nhất. Vùng ITS có hiệu quả cao trong nghiên cứu phân loại nhiều đối tượng thực vật và nấm (ngoại trừ dương xỉ), và đây là một locus được sử dụng độc trình tự với DNA ngắn (Stoeckle et al, 2003) [11]. Ở mức độ loài, vùng ITS có mức độ đa dạng cao (khoảng 13,6% giữa các loài gần gũi) và đã được chứng minh trong hầu hết các nghiên cứu. Thuận lợi của vùng ITS là có thể nhân bản theo hai đoạn nhỏ hơn (ITS1 và ITS2) nằm hai bên với locus 5,8S, điều này rất có ý nghĩa khi nhân bản các mẫu bị hư hại. Vùng ITS cũng đã được chứng minh có mức độ biến đổi thấp bên trong loài (Baldwin et al, 1995) [5].

Ngày nay với sự hiện diện của trên 100.000 trình tự ITS (tính đến 12/2016) được công bố trên ngân hàng Genbank, đây là nguồn tư liệu có giá trị, mở ra những triển vọng lớn cho nghiên cứu giám định loài, số lượng các trình tự vẫn tiếp tục được bổ sung hàng ngày.

Với những lý do trên chúng tôi phân lập và đọc trình tự vùng gen ITS cho 4 mẫu Lan kim tuyến ở Thanh Hóa. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở cho việc sử dụng quy trình để phân lập vùng gen ITS và các vùng gen khác cho các loài thuộc chi *Anoectochilus*. Đây sẽ là nguồn dữ liệu để cho chúng tôi thực hiện một phân tích tổng thể về nguồn gốc phát sinh loài phân tử (molecular phylogeny) cho chi *Anoectochilus*.

2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Khảo sát thực địa được tiến hành từ tháng 6/2016 đến tháng 8/2016 tại Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên và Pù Luông. Mẫu lá non thu tại thực địa được cho vào trong túi bảo quản có chứa hạt hút ẩm silicagel, tại phòng thí nghiệm mẫu được bảo quản ở -20°C trước khi mang tách chiết DNA. Bốn mẫu được nhận định hình thái là loài Lan kim tuyến, thông tin mẫu nghiên cứu chi tiết bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các mẫu sử dụng trong nghiên cứu phân tử

TT	Ký hiệu mẫu	Tọa độ		Độ cao	Địa điểm
		Vĩ độ (N)	Kinh độ (E)		
1	XL1	19 ⁰ 052'	104 ⁰ 058'	650	KBTTN Xuân liên
2	XL2	19 ⁰ 052'	104 ⁰ 058'	650	KBTTN Xuân liên
3	PL1	20 ⁰ 21'	105 ⁰ 02'	570	KBTTN Pù Luông
4	PL2	20 ⁰ 21'	105 ⁰ 02'	570	KBTTN Pù Luông

Trình tự cặp mồi ITS, chi tiết bảng 2.

Bảng 2. Trình tự cặp mồi ITSF và ITS R

Tên mồi		Trình tự mồi (5' - 3')	Kích thước theo lý thuyết	Nguồn
ITS	ITSF	AGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC	700 bp	Sun et al., 1994 [9]
	ITSR	GATATGCTTAAACTCAGCGGGTC		

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ lá non của các mẫu Lan kim tuyến thực hiện theo phương pháp CTAB của Doyle 1987 [7] có cải tiến.

Bước 1. Lấy 1g lá non nghiền trong nitơ lỏng thành bột mịn. Thu 75mg mẫu đã nghiền mịn vào eppendorf 1,7ml.

Bước 2. Thêm vào mỗi ống 500 μ l đệm chiết (bao gồm các thành phần: Tris - HCl 100mM; EDTA 20mM; CTAB 2%; NaCl 1,4M; nước với pH =8,0), mix nhẹ, ủ ở nhiệt độ 60°C trong vòng 2 giờ (30 phút đảo nhẹ ống 1 lần). Sau khi ủ xong, lấy ra để ở nhiệt độ phòng 5 phút.

Bước 3. Bổ sung dung dịch hỗn hợp chloroform-isoamylalcohol (24:1) vào mẫu theo tỷ lệ 1:1, đảo đều ống trong 15 phút. Li tâm trong 15 phút, với tốc độ 12000 vòng/phút ở 4°C. Hút cẩn thận dịch trong ở pha trên sang ống eppendorf 1,7 μ l mới.

Bước 4. Lặp lại bước 3.

Bước 5. Thêm isopropanol lạnh vào mẫu theo tỷ lệ 1:1, mix nhẹ, tủa DNA ở -20°C cho 1 giờ. Sau đó li tâm trong 15 phút, với tốc độ 12000 vòng/phút ở 4°C, loại dịch thu tủa.

Bước 6. Bổ sung 600 μ l cồn 70%. Li tâm 10 phút, 12000 vòng/phút ở 4°C, loại bỏ dịch thu tủa (lặp lại 2-3 lần), làm khô ở nhiệt độ phòng 30 phút (hoặc bằng máy nhiệt ở 50°C trong 10 phút) rồi hòa tan DNA trong 100 μ l đệm TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA). Bảo quản ở tủ -20°C đến khi sử dụng.

Nhân gen ITS bằng kỹ thuật PCR

Đoạn gen ITS được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu ITSF/ITSR được thực hiện trên máy PCR T100 thermal Cycler Bio-Rad. Phản ứng được thực hiện với tổng thể tích 25 μ , bao gồm các thành phần: 12,5 μ l Maxter Mix 2X (Thermo -Scientific), 1 μ l mồi mỗi loại, 1 μ l DNA khuôn và 9,5 μ l nước đề ion. Chu trình phản ứng PCR được thực hiện bao gồm: Biến tính khởi động ở 94°C trong 4 phút; lặp lại 35 chu kì bao gồm: biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 40 giây, tổng hợp và kéo dài ở 72°C trong 40 giây; phản ứng kết thúc ở 72°C trong 10 phút và bảo quản mẫu ở 4°C.

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR-ITS

Sản phẩm PCR được điện di trên agarose 0,8% và sau đó ngâm trong Ethidium bromide trong 10 phút trước khi quan sát dưới máy soi UV và chụp ảnh.

Tinh sạch sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit GenJET PCR Purification của hãng Thermo Scientific.

Phân tích số liệu

Các trình tự ITS thu được của mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự trong ngân hàng gen bằng công cụ tìm kiếm BLAST. Do 4 mẫu có trình tự DNA vùng ITS tương đồng 100% nên chúng tôi chỉ thực hiện một lần tìm kiếm.

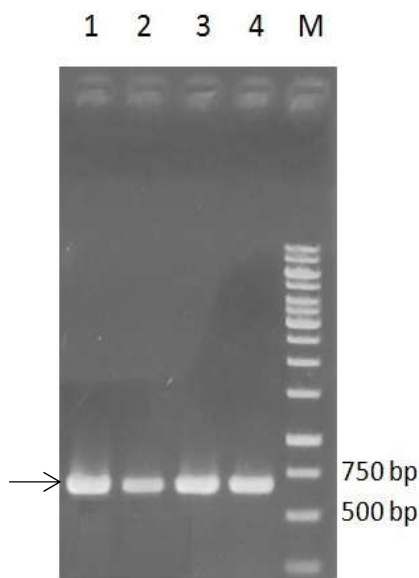
Trình tự ITS của 4 mẫu nghiên cứu cùng với trình tự ITS lấy từ Genbank của các loài có mức độ tương đồng cao nhất trong kết quả tìm kiếm bằng BLAST, được sắp xếp lại (Alignment) bằng chương trình Clustal v1.8 trong Bioedit và tạo cây phát sinh loài Neighbor -Joining bằng phần mềm MEGA5.2.2.

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Kết quả

Chúng tôi đã tách chiết DNA tổng số và thực hiện thành công phản ứng PCR cho 4 mẫu nghiên cứu theo quy trình nêu trên. DNA tổng số không có màu và hòa tan hoàn toàn trong dung dịch TE.

Sản phẩm PCR có hàm lượng cao và cho 1 băng sắc nét (hình 1). Kích thước ước lượng vào khoảng 700bp so với thang chuẩn DNA.



Hình 1. Kết quả PCR 4 mẫu với cặp mồi ITS

(Giếng 1: XL1, giếng 2: XL2; giếng 3: PL1; giếng 4: PL2, M: Marker 1kb)

Trình tự DNA vùng ITS của 4 mẫu nghiên cứu đã được giải trình tự thành công với kích thước thu được là 643bp. Sơ đồ điện di giải trình tự cho các đỉnh huỳnh quang rõ ràng, không có đột biến poly nucleotide (sự lặp lại trên 10 nucleotide cùng loại liên tiếp có thể làm phản ứng

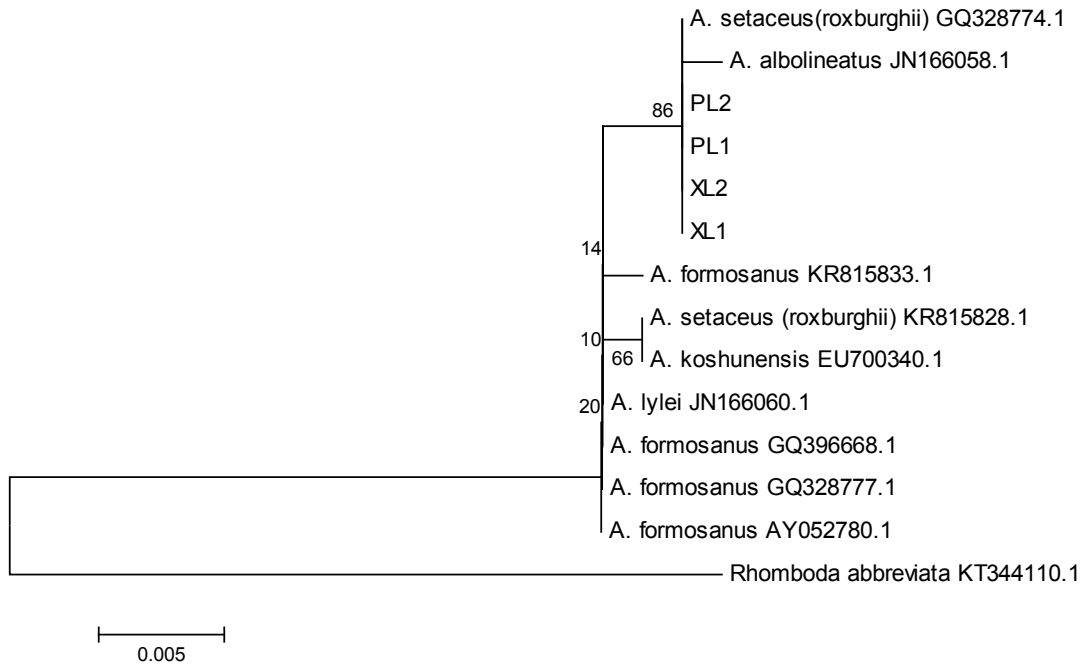
PCR bị dừng lại, trong trường hợp này phải đọc trình tự 2 chiều để thu được độ dài đầy đủ của đoạn sản phẩm). Bốn mẫu nghiên cứu thu được có trình tự DNA tương đồng 100%.

Trình tự gen ITS được BLAST trên ngân hàng GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Do trình tự 4 mẫu tương đồng 100%, do đó chúng tôi chỉ thực hiện một lần tìm kiếm BLAST. Kết quả tìm kiếm thu được mức độ tương đồng di truyền giữa Lan kim tuyến thu ở Thanh Hóa và trình tự Genbank: 1) Từ 99 - 100% với loài Lan kim tuyến *A.setaceus* (tên đồng nghĩa là *A.Roxburghii*); 2) 99% với các loài *Anoectochilus albolineatus*, *Anoectochilus formosanus*, *Anoectochilus koshunensis*.

tên loài (hai chữ đầu tiên)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Anoectochilus sp. HH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1.5.	1188	1188	100%	0.0	100%	GQ328776.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus roxburghii isolate FJ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribe	1188	1188	100%	0.0	100%	GQ328774.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus albolineatus voucher SM003 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S rri	1182	1182	100%	0.0	99%	JN166058.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus lylei voucher SM011 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal	1177	1177	100%	0.0	99%	JN166060.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus formosanus voucher SCMR9412004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: in	1177	1177	100%	0.0	99%	GQ396668.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus formosanus isolate TW 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri	1177	1177	100%	0.0	99%	GQ328777.1
<input type="checkbox"/>	Anoectochilus sp. GX 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1.5.	1177	1177	100%	0.0	99%	GQ328775.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus formosanus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer	1177	1177	100%	0.0	99%	AY052780.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus formosanus cultivar Miaoli 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tran	1171	1171	100%	0.0	99%	KR815833.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus roxburghii cultivar Qingyuan 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tra	1171	1171	100%	0.0	99%	KR815828.1
<input type="checkbox"/>	Anoectochilus sp. WS 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1.5	1171	1171	100%	0.0	99%	GQ328778.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anoectochilus koshunensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed space	1171	1171	100%	0.0	99%	EU700340.1
<input type="checkbox"/>	Anoectochilus sp. 22-ZZ-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer	1168	1168	98%	0.0	99%	KF425504.1
<input type="checkbox"/>	Anoectochilus roxburghii cultivar Wencheng 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tr	1166	1166	100%	0.0	99%	KR815829.1

Hình 2. Kết quả tìm kiếm BLAST trên ngân hàng dữ liệu quốc tế của mẫu nghiên cứu

Thông tin từ kết quả tìm kiếm BLAST cho thấy, đoạn trình DNA mà chúng tôi phân lập được chính xác là vùng ITS. Mức độ trùng khớp trình tự là 100% trong các trình tự được lựa chọn để so sánh (các trình tự tích chữ ✓ hình 2). Kết quả cũng cho thấy, sự giống nhau về mặt di truyền giữa các loài họ hàng gần với Lan kim tuyến *A.setaceus* là khá cao. Mức tương đồng cao lên đến 99% cho thấy khó có thể tách biệt được riêng rẽ các loài trong nhóm này nếu chỉ dựa vào dữ liệu trình tự vùng ITS. Kết quả thể hiện tương tự trên cây tiến hóa suy luận theo phương pháp NJ (hình 3). Cây NJ không tách biệt được các loài. Bốn mẫu Lan kim tuyến thu được ở Thanh Hóa và mẫu Lan kim tuyến có mã số Genbank GQ328774.1 cùng tạo một nhóm với giá trị bootstraps cao (86%), tuy nhiên nhóm này cũng chứa loài *Anoectochilus albolineatus* (JN166058.1). Các trình tự còn lại của các loài *A.formosanus*, *A.lylei*, *A.koshunensis* và kể cả trình tự KR815828.1 của Lan kim tuyến *A.setaceus* đều nằm trên một đường thẳng đứng và không tách biệt được với nhau thành các nhóm rõ ràng. Giá trị bootstraps nhỏ, không có ý nghĩa (do nhỏ hơn 50%) cho thấy chỉ dữ liệu DNA vùng ITS chưa đủ để bộc lộ được mối quan hệ phát sinh giữa các loài của nhóm này.



Hình 3. Cây phát sinh loài suy luận theo phương pháp NJ với số lần lặp lại bootraps là 1000. Loài *Rhomboda abbreviata* được sử dụng làm outgroup. Cây NJ không phân tách được Lan kim tuyến và các loài gần gũi

	10	20	30	40	50	60
XL1	GGATGACTTT	GGATAACACG	TGAACATTTG			
ACGGCGGTTG	CTGTCTATAA	ACACCATCCA				
XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828
A.albolineatus JN166058.1
A.lylei JN166060.1
A.formosanus GQ396668.1
A.formosanus GQ328777.1
A.formosanus AY052780.1
A.formosanus KR815833.1
A.koshunensis EU700340.1
	70	80	90	100	110	120
XL1	TCTATTGGCC	CCTCTTGATT	GAGGCAACAA			
TAAAAAGATG	GAGGGAAAAA	CAACTCGGGC				

XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828
A.albolineatus JN166058.1
A.lylei JN166060.1
A.formosanus GQ396668.1
A.formosanus GQ328777.1
A.formosanus AY052780.1
A.formosanus KR815833.1
A.koshunensis EU700340.1
	130 140 150 160 170 180
XL1	GCAGTTGTGC GCCAAGGAAG TATGTTGCAT
	TGGCATCGAT GACTATTCGC CAAAGCCTGT
XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828
A.albolineatus JN166058.1
A.lylei JN166060.1
A.formosanus GQ396668.1
A.formosanus GQ328777.1
A.formosanus AY052780.1
A.formosanus KR815833.1
A.koshunensis EU700340.1
	190 200 210 220 230 240
XL1	CGTGCTTAGC GGAGTGTTGT TGTTGCTTCT
	TAAGTATTGT ATGACTCTCG GCAATGGATA
XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828
A.albolineatus JN166058.1
A.lylei JN166060.1
A.formosanus GQ396668.1
A.formosanus GQ328777.1
A.formosanus AY052780.1

A.formosanus KR815833.1
A.koshunensis EU700340.1
	250 260 270 280 290 300
XL1	TCTTGGCTCT TGCATCGATG AAGAGCGCAG CGAAATGCGA TACGTGGTGT GAATTGCAGA
XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828
A.albolineatus JN166058.1
A.lylei JN166060.1
A.formosanus GQ396668.1
A.formosanus GQ328777.1
A.formosanus AY052780.1
A.formosanus KR815833.1
A.koshunensis EU700340.1
	310 320 330 340 350 360
XL1	ATCCCGTGAA CCATCAAATC TTTGAACGCA AGTTGCGCCT GAGGCCAATT GGCTAAGGGC
XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828
A.albolineatus JN166058.1
A.lylei JN166060.1
A.formosanus GQ396668.1
A.formosanus GQ328777.1
A.formosanus AY052780.1
A.formosanus KR815833.1
A.koshunensis EU700340.1
	370 380 390 400 410 420
XL1	ACGTCCGCCT GGGCGTCAAG CATTACATCG CTTCATTCGA CACCAATTGC CCAGTATTTT
XL2
PL1
PL2
A.setaceus(roxburghii)GQ328774
A.setaceus(roxburghii)KR815828G.

A.albolineatus JN166058.1
 A.lylei JN166060.1G.
 A.formosanus GQ396668.1G.
 A.formosanus GQ328777.1G.
 A.formosanus AY052780.1G.
 A.formosanus KR815833.1G.
 A.koshunensis EU700340.1G.

430 440 450 460 470 480

XL1 GCTGTGGTGC TGGTCTGAAT GCGGAGAGTG
 GCCCTTCGTG CACACTTGTG CGACGGGTTG

XL2

PL1

PL2

A.setaceus(roxburghii)GQ328774

A.setaceus(roxburghii)KR815828

A.albolineatus JN166058.1 T.....

A.lylei JN166060.1

A.formosanus GQ396668.1

A.formosanus GQ328777.1

A.formosanus AY052780.1

A.formosanus KR815833.1 C.....

A.koshunensis EU700340.1

490 500 510 520 530 540

XL1 AAGAACAATT TGCTTTCCTC TGGCCATGTT
 TTGATAAAGG GGTGGTGTAT GCAGCCATTA

XL2

PL1

PL2

A.setaceus(roxburghii)GQ328774

A.setaceus(roxburghii)KR815828T

A.albolineatus JN166058.1

A.lylei JN166060.1T

A.formosanus GQ396668.1T

A.formosanus GQ328777.1T

A.formosanus AY052780.1T

A.formosanus KR815833.1T

A.koshunensis EU700340.1T

550 560 570 580 590 600

XL1 GGCCCACT ATCATTCAT TGCCTTGAGG
 AGGATAAATG TACACATTCG TGGCTGATCA

XL2				
PL1				
PL2				
A.setaceus(roxburghii)GQ328774				
A.setaceus(roxburghii)KR815828				A
A.albolineatus JN166058.1				
A.lylei JN166060.1				
A.formosanus GQ396668.1				
A.formosanus GQ328777.1				
A.formosanus AY052780.1				
A.formosanus KR815833.1				
A.koshunensis EU700340.1				A
		610	620	630	640
XL1	CCCGATATAA ATGTCGCAGG TGACGCCCTG				
AAATGCGACC CCA					
XL2				
PL1				
PL2				
A.setaceus(roxburghii)GQ328774				
A.setaceus(roxburghii)KR815828				
A.albolineatus JN166058.1				
A.lylei JN166060.1				
A.formosanus GQ396668.1				
A.formosanus GQ328777.1				
A.formosanus AY052780.1				
A.formosanus KR815833.1				
A.koshunensis EU700340.1				

Hình 4. Kết quả đối chiếu trình tự 4 mẫu nghiên cứu với trình tự Lan kim tuyến trên GenBank và các loài gần gũi. Trình tự ITS của các loài có ít vị trí nucleotide khác nhau

Các kết quả sắp xếp lại trình tự (alignment) bằng Clustal W cho thấy, có rất ít vị trí đa hình trên vùng ITS trong số các loài được so sánh ở trên. Trên tổng chiều dài 643pb được so sánh chỉ có 5 vị trí biến đổi, số lượng các vị trí nucleotide mang thông tin tiến hóa (Parsimony information) còn ít hơn với số lượng là 3.

Vùng ITS có mức độ đa dạng thấp giữa các loài của *Anoectochilus*. Để làm rõ trạng thái taxon và mối quan hệ di truyền trong chi *Anoectochilus*, chúng tôi có kế hoạch phân lập và giải trình tự các vùng gen khác thuộc hệ gen lục lạp như *rbcL*, *matK*, khoảng trống *trnH-psbA*, những vùng gen thường được sử dụng trong nghiên cứu tiến hóa phân tử. Các kết quả nghiên cứu chi tiết hơn về mối quan hệ phát sinh loài của chi *Anoectochilus*, sẽ được trình bày trong các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Một số nhận xét từ quá trình tách chiết DNA

Với quy trình nêu trên, chúng tôi có thể hoàn tất quá trình phân lập trình tự trong vòng 2 ngày. Ngày thứ nhất thực hiện tách chiết DNA với thời gian từ 5 - 6 tiếng; ngày thứ 2 thực hiện phản ứng PCR khuếch đại trình tự đoạn gen đích. Quy trình tách chiết DNA tổng số cho chất lượng tốt; bằng chứng là phản ứng PCR cho hàm lượng sản phẩm rất cao, được thể hiện bằng 1 băng đậm trên bản điện di kiểm tra. Tất cả quá trình thực nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử - Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam.

Phân lập và xác định trình tự DNA của các đoạn gen là công việc đầu tiên trong nghiên cứu nguồn gốc phát sinh loài phân tử. Quá trình này rất quan trọng bởi nó cung cấp dữ liệu đầu vào cho các phân tích tiến hóa phân tử. Sự chính xác của dữ liệu giải trình tự sẽ cho kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài được chính xác. Do đặc tính có độ nhạy cao, phản ứng PCR có thể khuếch đại đoạn gen đích từ hàm lượng DNA khuôn rất nhỏ. Việc lây nhiễm DNA ngoại lai vào DNA khuôn có thể dẫn tới kết quả trình tự thu được không chính xác, trình tự không phải của loài được nghiên cứu, từ đó dẫn đến những nhận định và đánh giá nhầm về trạng thái taxon và nguồn gốc phát sinh loài. Sự nhiễm DNA ngoại lai có thể đến từ nhiều khâu: nó có thể bị nhiễm từ giai đoạn thu mẫu ban đầu, hoặc giai đoạn tách chiết DNA hoặc thậm chí khi thực hiện phản ứng PCR. Do đó quy trình cần thực hiện nghiêm túc và cẩn thận ngay từ bước ban đầu. Mẫu thực vật được thu đúng cách là điều rất cần thiết cho tối ưu phản ứng PCR và đọc trình tự thành công. Chìa khóa đối với quy trình này là lá để tách chiết DNA phải được làm khô một cách nhanh chóng nhằm bảo vệ khỏi hư hại DNA. Mẫu thu ngoài thực địa ngay lập tức cần được lấy mẫu cho nghiên cứu DNA. Mẫu cho nghiên cứu DNA phải được bỏ vào túi đựng silica gel ngay sau khi hái. Trong trường hợp không thể, mẫu cho tách DNA nên được lấy ở cuối ngày. Việc chậm trễ làm khô nguyên liệu trong silica gel có thể dẫn tới kết quả làm giảm chất lượng DNA và sự thành công PCR thấp hơn. Các mẫu lá tươi nên được giữ trong các túi riêng biệt vì các mẫu để cùng nhau có thể làm tăng khả năng bị nhiễm với nhau. Loại túi nhựa 10 x 15cm có chứa silica là dụng cụ thích hợp chứa mẫu phân tích DNA. Trong quá trình tách chiết DNA, mẫu sau khi được xay mịn bằng nitor lỏng yêu cầu cần được lấy một cách cẩn thận vào các eppendorf sạch. Việc mở nắp để cho đệm chiết vào mẫu cần được tiến hành một cách cẩn thận do mẫu đang ở trạng thái lạnh có thể sẽ dính ở nắp của eppendorf. Lượng mẫu tối ưu cho tách chiết DNA trong nghiên cứu của chúng là 60mg - 100mg. Việc lấy quá nhiều mẫu có thể làm DNA tổng số bị bẩn, chứa nhiều màu và dẫn tới phản ứng PCR không thành công. Để hạn chế được sự lây nhiễm DNA ngoại lai trong quá trình PCR, chúng tôi gợi ý các phản ứng PCR nên được thực hiện trong buồng thực nghiệm các laminar chuyên biệt.

3. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập và đọc trình tự thành công vùng gen ITS các mẫu của Lan kim tuyến *Anoectochilus Setaceus* thu ở Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên và Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Luông - Thanh Hóa. Kích thước vùng gen ITS chúng tôi thu được là 643bp.

Trình tự vùng gen ITS của các mẫu Lan kim tuyến thu ở Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên và Pù Luông độ tương đồng với nhau là 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bách khoa toàn thư mở Wikipedia, Lan kim tuyến, https://vi.wikipedia.org/wiki/Lan_kim_tuy%E1%BA%BFn
- [2] Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb. Trẻ, TP. Hồ Chí Minh, 3: 474-475.
- [3] Hội dược liệu Việt Nam (2013), *Tạp chí cây thuốc quý toàn tập*, Nxb. Hiệp hội dược liệu Việt Nam, tr.13-15.
- [4] Chu Hoàng Mậu (2008), *Phương pháp phân tích di truyền hiện đại trong chọn giống cây trồng*, Nxb. Đại học Thái Nguyên.
- [5] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J., (1995), *The ITS region of nuclear ribosomal DNA-A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny*, Ann. Mo. Bot. Gard. 82, 247-277.
- [6] Cai JY¹, Gong LM, Zhang YH, Ruan HL, Pi HF, Wu JZ (2008), *Studies on chemical constituents from Anoectochilus roxburghii*, Zhong Yao Cai. 31(3), pp. 370-372.
- [7] Doyle J (1987), *A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue*, Phytochem Bull. 19: 11-15.
- [8] He CN¹, Wang CL, Guo SX, Yang JS, Xiao PG (2005), *Study on chemical constituents in herbs of Anoectochilus roxburghii II*, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. May; 30(10),pp. 761-763.
- [9] Kress JW, Wurdack KJ, Zimmer EA, Wei LA, Janzen DH (2005), *Use of DNA barcodes to identify flowering plants*, Proc.Natl.Acad.Sci USA 102: 8369-8374.
- [10] Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989), *Molecular cloning I, II, III, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [11] Stoeckle M (2003), *Taxonomy, DNA and the bar code of life*, BioScience 53: 2-3.
- [12] Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H., Hulbert, S.H., (1994), *Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA*. Theor. Appl. Genet. 89, 26-32.

METHOD OF FILING AND GENETIC GENERATORS OF KIM LONG SPECIES (*ANOECTOCHILUS SETACEUS* BLUME.) IN THANH HOA

Le Dinh Chac, Nguyen Thi Hien

ABSTRACT

Orchid gills Anoectochilus setaceus Blume is a rare plant of the genus Anoectochilus, Orchidaceae. This species is highly endangered due to overexploitation. A full understanding

of the location and diversity of orchid and neighboring species is essential, providing useful information for the conservation strategy. In this paper, we describe the method of DNA extraction and sequencing of the internal transcribed spacer segment of the human genome for four samplings obtained at Xuan Lien Nature reserve and Pu Luong Nature reserve Thanh Hoa province. The purpose of this paper is to provide an effective procedure for identifying the ITS genus orchid and may be applicable to the same species. This is an important experimental step in identifying the data in our molecule molecular evolutionary anoectochilus and molecular system study. As a result, ITS DNA sequences have been successfully identified from the four samples. The resulting size is 643 nucleotides. Compared to the ITS genomic data, Anoectochilus Setaceus Blume has a high degree of homologation, up to 99% with the same species of A.albolineatus, A.lylei, A.formossanus and A.koshunensis. The results of the study are also the first to provide molecular data for orchid species in Vietnam. This is also a data for classification and study of phylogenetic origin.

Keywords: *Anoectochilus Setaceus Blume, gen ITS, DNA barcoding.*