

ĐỊNH DANH LOÀI BẰNG MÃ VẠCH DNA VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ VÙNG *ITS* VÀ ĐOẠN GEN *rpoC1* CỦA MẪU LAN KIM TUYẾN THU TẠI HUYỆN THUẬN CHÂU, TỈNH SƠN LA, VIỆT NAM

Lò Thị Mai Thu¹, Trịnh Thị Thủy², Chu Hoàng Mậu^{3*}

¹Trường Đại học Tây Bắc; ²Trường Trung học phổ thông Chuyên, Sơn La

³Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Lan Kim tuyến là loài cây dược liệu quý hiếm. Hiện nay ở nước ta được biết đến 12 loài lan Kim tuyến, trong đó có loài *Anoectochilus setaceus*. Do khai thác quá mức mà hiện nay các loài lan Kim tuyến có nguy cơ tuyệt chủng, chính vì vậy việc thu thập, định danh làm cơ sở cho việc lưu giữ, nhân giống góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen loài Lan Kim tuyến là rất cấp thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả định danh loài lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La (LKT-SL) bằng mã vạch DNA dựa trên trình tự vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1*. Vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1* phân lập từ mẫu LKT-SL có kích thước lần lượt là 666 bp và 628 bp. Trên cơ sở trình tự nucleotide của vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1*, bằng phần mềm BLAST trong NCBI, mẫu LKT-SL được xác định là loài *Anoectochilus setaceus*. Trình tự vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1* của mẫu LKT-SL và các trình tự trên GenBank có tính bảo thủ cao, chỉ sai khác ở 2 vị trí nucleotide. Khoảng cách di truyền giữa mẫu LKT-SL và các mẫu trên GenBank dựa vào trình tự vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1* thấp, ở mức 0,2%. Trình tự vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1* có thể sử dụng làm mã vạch DNA để định danh loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*).

Từ khóa: *Anoectochilus setaceus*, gen *rpoC1*, mã vạch DNA, Sơn La, vùng *ITS*.

Ngày nhận bài: 27/5/2019; Ngày hoàn thiện: 26/6/2019; Ngày đăng: 15/7/2019

THE SPECIES IDENTIFICATION WITH DNA BARCODE AND THE SEQUENCE ANALYSIS OF *ITS* AND *rpoC1* OF *Anoectochilus* SAMPLE COLLECTED AT THUAN CHAU, SON LA, VIET NAM

Lo Thi Mai Thu¹, Trinh Thi Thuy², Chu Hoang Mau^{3*}

¹Tay Bac University; ²Son La High School for Gifted Students;

³Thai Nguyen University of Education, Thai Nguyen University

ABSTRACT

Anoectochilus setaceus is a rare medicinal orchids. Currently, in Viet Nam is known 12 species of *Anoectochilus* genus, including an *Anoectochilus setaceus*. Been excessively exploited, that can result in the extinction of *Anoectochilus setaceus*. Therefore, the collection and species identification to create a basis for storage and propagation contribute to the conservation and development of the *Anoectochilus setaceus* is very urgent. In this study, we present the results of species identification of *Anoectochilus* sample collected in Thuan Chau, Son La (LKT-SL) by DNA barcodes based on the sequence of *ITS* region and *rpoC1* gene fragment. *ITS* region and *rpoC1* gene fragment isolated from genome DNA of the *Anoectochilus* sample LKT-SL are 666 bp and 628 bp in length, respectively. Based on nucleotide sequence of *ITS* region and *rpoC1* gene fragment and by BLAST software in NCBI, results showed that the *Anoectochilus* sample LKT-SL was identified as *Anoectochilus setaceus* species. The sequence of *ITS* region and the *rpoC1* gene fragment of the *Anoectochilus* sample LKT-SL and the sequences on GenBank are highly conservative, only different at two nucleotide positions. The genetic distance between the *Anoectochilus* sample LKT-SL and the samples on GenBank based on the sequence of *ITS* and *rpoC1* gene fragment was low, at 0.2%. The sequence of *ITS* region and *rpoC1* gene fragment can be used as DNA barcodes to identify *Anoectochilus setaceus* species.

Keywords: *Anoectochilus setaceus*, DNA barcode, *ITS* region, *rpoC1* gene, Son La.

Received: 27/5/2019; **Revised:** 26/6/2019; **Published:** 15/7/2019

* Corresponding author. Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

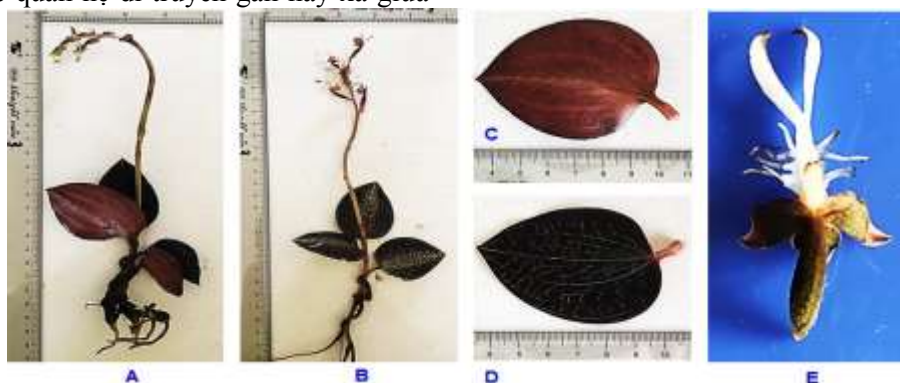
Lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) hay lan Gấm là thảo dược đặc biệt quý hiếm của vùng núi phía Bắc, Việt Nam. Lan kim tuyến được biết đến do có nhiều ứng dụng trong y dược học và là dược liệu quý được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền của các dân tộc. Lan Kim tuyến chứa hợp chất chuyển hoá thứ cấp có tác dụng kháng virus, chống viêm, bảo vệ gan, chống tăng lipase máu và liên quan đến chức năng tim mạch [1-4]. Lan Kim tuyến có số lượng ít, phân bố rộng, rải rác; nhưng do khai thác quá mức cho nên Lan Kim tuyến có nguy cơ bị tuyệt chủng. Hiện nay, Lan Kim tuyến được đưa vào danh mục các loài nguy cấp (*EN A1 a,c,d*) trong Sách Đỏ Việt Nam 2007 [5]. Theo Phạm Hoàng Hộ (2000) [6], ở Việt Nam, lan Kim tuyến có 12 loài, trong đó loài lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume; tên khác *Anoectochilus roxburghii* Wall. ex Lindl). Loài lan Kim tuyến là thảo dược quý đang được quan tâm nghiên cứu, chính vì vậy việc thu thập, định danh làm cơ sở cho việc lưu giữ, nhân giống góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen loài Lan Kim tuyến là vấn đề cấp thiết. Phân loại học phân tử dựa trên các dữ liệu DNA, đặc biệt là các gen hoặc đoạn DNA có tính bảo thủ cao. Căn cứ vào mức độ đột biến phân tử mà có thể xác định được quan hệ di truyền gần hay xa giữa

các mẫu nghiên cứu. Hebert (2003) đã đề xuất "mã vạch DNA" (DNA Barcode) như là một phương pháp để định danh loài [7]. Các gen *rDNA* mã hóa các phân tử RNA ribosome, có tính bảo thủ và tính đa dạng thích hợp để phân biệt các loài gần gũi. Trong tế bào, *rDNA* được sắp xếp như các đơn vị được lặp lại ngẫu nhiên bao gồm DNA mã hóa ribosome 18S; 5,8S; 28S và xen giữa các trình tự không mã hóa *ITS1*, *ITS2* (internal transcribed spacers) nằm ở hai bên của gen 5,8S; trong đó vùng mã hóa của ba gen *rDNA* có mức độ bảo thủ cao hơn *ITS1*, *ITS2*. DNA lục lạp ở thực vật bậc cao chứa các gen có tính bảo thủ cao, trong đó có gen *rpoC1* mã hóa tiểu đơn vị của RNA polymerase lục lạp cũng được cho là thích hợp để nghiên cứu phát sinh loài thực vật bậc cao [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập, giải trình tự và sử dụng vùng *ITS*, đoạn gen *rpoC1* để định danh loài lan Kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) thu tại huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La, Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lan Kim tuyến thu tại xã Co Mạ, huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La (Hình 1) là vật liệu để tách chiết DNA, phân lập vùng *ITS* và gen *rpoC1* và định danh loài bằng mã vạch DNA.



Hình 1. Mẫu lan Kim tuyến thu tại xã Co Mạ, huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La
A, B: Cây lan Kim tuyến; C, D: Mặt trên và mặt dưới lá lan Kim tuyến; E: Hoa lan Kim tuyến
(Ảnh chụp của nhóm tác giả)

2.2. Phương pháp

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Shanghai Maroof và cộng sự (1984) [9] và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, bằng quang phổ hấp thụ. Nhân bản vùng *ITS* và gen *rpoC1* bằng PCR với các cặp mồi *ITS-F/ITS-R*, *rpoC1-F/rpoC1-R* (Bảng 1) được tổng hợp theo Kress và cộng sự (2005) [10].

Chu trình nhiệt của PCR đối với hai cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R* là 94° trong 1 phút, lặp lại 40 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 53°C trong 40 giây và tổng hợp ở 72°C trong 40 giây; sau 40 chu kỳ là bước kết thúc ở 72°C trong 5 phút, lưu giữ ở 4°C. Đối với cặp mồi *ITS-F/ITS-R*, chu trình nhiệt của PCR là 94° trong 5 phút, lặp lại 40 chu kỳ và ở mỗi chu kỳ, biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn mồi ở 58°C trong 1 phút và tổng hợp ở 72°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Sản phẩm PCR trên gel agarose được tinh sạch theo bộ Kit QIAquick Gel Extraction (của hãng QIAGEN). Trình tự DNA được xác định bằng máy phân tích trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye Terminator v. 3.2 Cycle Sequencing (Macrogen Inc. Hàn Quốc).

Trình tự DNA thu được xử lý và phân tích bằng phần mềm DNASTAR. Nhận diện vùng *ITS*, đoạn gen *rpoC1* và định danh loài lan Kim tuyến bằng BLAST trong NCBI; phân tích vùng *ITS* và đoạn gen *rpoC1* bằng phần mềm BioEdit; thiết lập sơ đồ hình cây bằng phần mềm DNASTAR.

3. Kết quả và thảo luận

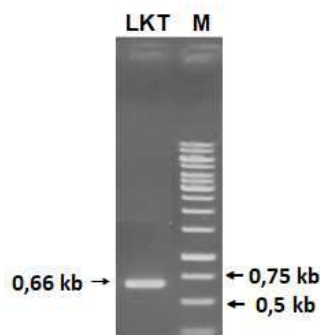
Bảng 1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR sử dụng trong nhân bản các đoạn DNA

Cặp mồi	Trình tự nucleotide 5' → 3'	Kích thước đoạn DNA (bp) dự kiến
<i>ITS-F/ITS-R</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTACT	660
<i>rpoC1-F/rpoC1-R</i>	GTGGATACACTTCTTGATAATGG TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	600

3.1. Định danh loài lan Kim tuyến bằng mã vạch DNA dựa trên trình tự vùng *ITS*

DNA tổng số tách chiết từ mẫu lan Kim tuyến được điện di trên gel agarose 0,8% và xác định độ sạch bằng máy đo NanoDrop (Thermo Scientific), kết quả DNA tổng số đảm bảo chất lượng cho phản ứng PCR và các phân tích DNA khác.

Kết quả nhân bản vùng *ITS* từ DNA tách từ mẫu lan Kim tuyến bằng PCR với cặp mồi *ITS-F/ITS-R* thu được băng DNA có kích thước ước tính hơn 0,65 kb, đúng như kích thước dự kiến của vùng *ITS* (Hình 2).



Hình 2. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản vùng *ITS* từ mẫu lan Kim tuyến.

M: thang DNA 1 kb; LKT: mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, tỉnh Sơn La, Việt Nam

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide được xử lý, phân tích bằng phần mềm DNASTAR và BLAST trong NCBI, kết quả đã xác định được đoạn DNA có kích thước 666 bp. Sử dụng chương trình BLAST trong NCBI để so sánh tương đồng, kết quả đã xác định được đoạn DNA phân lập được là vùng *ITS* và mẫu lan Kim tuyến thu thập tại xã Co Mạ, huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La, Việt Nam là loài *Anoectochilus setaceus* (Hình 3)

Select: All None Selected:0

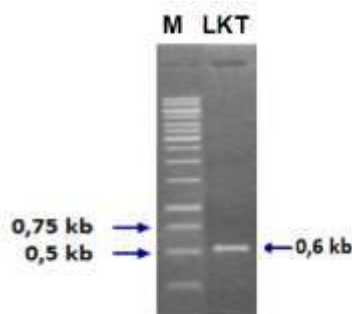
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus setaceus</i> genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 26S rRNA gene	1219	1219	100%	0.0	99.70%	LT899899.1
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus</i> sp. HH 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gen	1201	1201	98%	0.0	99.55%	Show report for
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus roxburghii</i> isolate FJ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso	1201	1201	98%	0.0	99.55%	GQ328774.1
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus formosanus</i> voucher SCMR9412004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spao	1190	1190	98%	0.0	99.24%	GQ396668.1

Hình 3. Kết quả xác định vùng ITS và định danh loài *Anoectochilus setaceus* từ mẫu lan Kim tuyến bằng BLAST trong NCBI

3.2. Định danh loài lan Kim tuyến bằng mã vạch DNA dựa trên trình tự vùng *rpoC1*

Kết quả khuếch đại đoạn gen *rpoC1* từ DNA của mẫu lan Kim tuyến bằng PCR với cặp mồi *rpoC1-F/rpoC1-R* có kích thước ước tính hơn 0,6 kb (Hình 4). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự nucleotide, kết quả thu được đoạn DNA có kích thước 628 bp. Sử dụng chương trình BLAST trong NCBI đã xác định được trình tự đoạn DNA là đoạn gen *rpoC1* và mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, tỉnh Sơn La, Việt Nam là loài *Anoectochilus setaceus* (Hình 5).



Hình 4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *rpoC1* từ mẫu lan Kim tuyến
M: thang DNA 1 kb; LKT: mẫu lan Kim tuyến thu tại huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La, Việt Nam

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus setaceus</i> plastid:chloroplast genomic DNA containing RNA polymerase C (<i>rpoC1</i>) region	1149	1149	100%	0.0	99.68%	LT900534.1
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus setaceus</i> plastid:chloroplast genomic DNA containing RNA polymerase C (<i>rpoC1</i>) region	1149	1149	100%	0.0	99.68%	LT900533.1
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus setaceus</i> plastid:chloroplast genomic DNA containing RNA polymerase C (<i>rpoC1</i>) region	1149	1149	100%	0.0	99.68%	LT900532.1
<input type="checkbox"/> <i>Anoectochilus setaceus</i> plastid:chloroplast genomic DNA containing RNA polymerase C (<i>rpoC1</i>) region	1149	1149	100%	0.0	99.68%	LT900531.1

Hình 5. Kết quả xác định đoạn gen *rpoC1* và định danh loài *Anoectochilus setaceus* từ mẫu lan Kim tuyến bằng BLAST trong NCBI

3.3. Đặc điểm của vùng ITS và đoạn gen *rpoC1* phân lập từ loài lan Kim tuyến thu tại thuận châu, Sơn La

Phân tích bằng BLAST trong NCBI thấy có 5 trình tự vùng ITS và 4 trình tự gen *rpoC1* đã đăng ký trên GenBank, trong đó chỉ có một trình tự vùng ITS của mẫu lan Kim tuyến phân lập từ Indonesia, còn lại các trình tự ITS và *rpoC1* phân lập từ mẫu lan Kim tuyến thu thập tại Thanh Hóa, Việt Nam (Bảng 2).

Bảng 2. Các trình tự vùng ITS và đoạn gen *rpoC1* sử dụng trong phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu lan Kim tuyến

TT	Trình tự vùng ITS và đoạn gen <i>rpoC1</i> của mẫu/mã số trên GenBank	Địa danh thu mẫu	Tác giả	Năm công bố
Vùng ITS				
1	LKT-SL	Sơn La, Việt Nam	Thu và cs	2019
2	KC237323.1	Indonesia	Juswara et al	2015
3	LT899899.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
4	LT899900.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
5	LT899901.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
6	LT899902.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
Đoạn gen <i>rpoC1</i>				
1	LKT-SL	Sơn La, Việt Nam	Thu và cs	2019
2	LT900531.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
3	LT900532.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
4	LT900533.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017
5	LT900534.1	Thanh Hóa, Việt Nam	Le,C.D. and Nguyen,H.T.	2017

Ở bảng 2, trình tự vùng ITS mang mã số KC237323.1 trên GenBank [11] phân lập từ mẫu Lan Kim tuyến ở Indonesia chỉ có 498 bp, trong khi đó các trình tự còn lại đều có 666 bp. Do vậy chúng tôi chỉ so sánh trình tự vùng ITS phân lập từ loài lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La với 4 trình tự mang mã số LT899899, LT899900, LT899901, LT899902 [12-15]. Kết quả ở hình 6 cho thấy trình tự nucleotide của vùng ITS của mẫu Lan Kim tuyến Sơn La có 2 vị trí nucleotide sai khác, đó là vị trí 31 (T → C) và 133 (A → C). Các trình tự mang mã số LT899899, LT899900, LT899901, LT899902 trên GenBank được phân lập từ loài lan Kim tuyến thu tại Thanh Hóa (Việt Nam) đều có 666 bp và giống nhau hoàn toàn; còn trình tự ITS của mẫu lan Kim tuyến thu ở Thuận Châu (Sơn La) chỉ sai khác ở 2 vị trí nucleotide. Như vậy có thể nhận xét sơ bộ là vùng ITS của lan Kim tuyến thể hiện tính bảo thủ cao, có thể sử dụng để định danh loài lan Kim tuyến *Anoectochilus setaceus*.

So sánh trình tự đoạn gen *rpoC1* phân lập từ mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La với 4 trình tự mang mã số LT900532.1; LT900531.1; LT900533.1; LT900534.1 [16-19] trên GenBank ở hình 7 cho thấy có 2 vị trí nucleotide sai khác, đó là vị trí 56 (A → C) và vị trí 326 (T → A). Như vậy, các trình tự

vùng gen *rpoC1* cũng có tính bảo thủ cao và có thể sử dụng để định danh loài lan Kim tuyến ở Việt Nam.

Các trình tự nucleotide của vùng ITS và của đoạn gen *rpoC1* được sử dụng để thiết lập sơ đồ hình cây làm cơ sở phân tích mối quan hệ di truyền của mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La với các mẫu có trình tự ITS và *rpoC1* trên Gen Bank.

Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu lan Kim tuyến dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS được thể hiện ở hình 8. Các mẫu lan Kim tuyến phân bố ở hai nhánh, nhánh thứ nhất chỉ có trình tự ITS của mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La, nhánh thứ hai gồm 4 trình tự mang mã số LT899899, LT899900, LT899901, LT899902. Khoảng cách di truyền giữa hai nhánh chính là 0,2%.

Phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu lan Kim tuyến dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1* cho thấy 5 mẫu lan kim tuyến phân bố ở hai nhánh, nhánh thứ nhất chỉ có mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La và nhánh thứ hai có 4 mẫu thu tại Thanh Hóa có mã số LT900532.1; LT900531.1; LT900533.1; LT900534.1 trên GenBank. Khoảng cách di truyền giữa hai nhánh là 0,2% (Hình 9).

```

      10      20      30      40      50      60      70
LT899899.1  GGGAAAAGA CCTAAAGAG GATGGATGAC TTTGGATAAC ACGTGACAT TTGACGGCGG TTGCTGTCTA
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      80      90      100     110     120     130     140
LT899899.1  TAAACACCAT CCATCTATTG GCOOCTCTTG ATTGAGGCAA CAAATAAAAG ATGGAGGGAA AAACACTCG
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      150     160     170     180     190     200     210
LT899899.1  GGCGCAGTTG TGCGCCAGG AAGTATGTTG CATTGGCATC GATGACTATT CGCCAAAGCC TGTCTGTCTT
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      220     230     240     250     260     270     280
LT899899.1  AGCGGAGTGT TGTTGTTGCT TCTTAAAGTAT TGTATGACTC TCGGCAATGG ATATCTTGGC TCTTGCATCG
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      290     300     310     320     330     340     350
LT899899.1  ATGAGAGGCG CAGCGAAATG CGATACGTTG TGTGAATTGC AGAATCCCGT GAACCTCAR ATCTTTGAC
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      360     370     380     390     400     410     420
LT899899.1  GCAAGTTGCG CCTGAGGCCA ATTGGCTAAG GGCAGTCCG CCTGGGGGTC AAGCATTACK TCGCTTCATT
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      430     440     450     460     470     480     490
LT899899.1  CGACACCAAT TGCCAGTAT TTTGCTGTGG TGCTGGTCTG AATGGGAGA GTGGCCCTTC GTGCACACTT
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      500     510     520     530     540     550     560
LT899899.1  GTGCGACGGG TTGAAGNACA ATTTGCTTTC CTCTGGCCAT GTTTTGATAA AGGGGTGGTG TATGAGCCA
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      570     580     590     600     610     620     630
LT899899.1  TTAGGCCAC ACTATCATCT CATTGCCCTG AGGAGGATAA ATGTACACAT TCGTGGGTGA TCACCCGATA
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

      640     650     660
LT899899.1  TAAATGTCGC AGGTGACGCC CTGAAATGCG ACCCCA
LT899900.1  .....
LT899901.1  .....
LT899902.1  .....
ITS-LKT-SL  .....

```

Hình 6. Trình tự nucleotide vùng ITS của mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La và các trình tự mang mã số LT899899, LT899900, LT899901, LT899902 trên GenBank

```

          10      20      30      40      50      60      70
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            CCAATAAGCA TATCTTGAGT TGGTACGGAA ACGGGATCCC CAATAGCTGG AGACAAGAGA TTCATATGAG
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          80      90      100     110     120     130     140
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            AAAACATAAG TAAACGAGCC TCTGCTTGAG CTTCCAAAGA TAAAGGTACG TGAACAGCCA TTTGATCCCC
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          150     160     170     180     190     200     210
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            ATCAAAGTCT GCGTTGAAGC CCTTACAAAC TAATGGGTGT AAACAATAG CACGCCCTC CACTAAAATG
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          220     230     240     250     260     270     280
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            GGTGGAAACG CCTGTATACC TAATCTATGC AGGGTAGGCG CTCTATTCAA CAATACAGGA TGCCCTGCA
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          290     300     310     320     330     340     350
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            TAACTTCTTG AAGGATTCC CATAAATGG GTTCTTTTC CCGAATTTT CTTTATAGCA TTCCCGTGT
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          360     370     380     390     400     410     420
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            AGAAGCAAAA TCTTGTCTGA TTAGACCCCG AATTACAAAT GTTTGGAAGA GCTCTATTGC TATTTCTCGA
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          430     440     450     460     470     480     490
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            GGTAAATCCGC ATTGATGTAA TGAAAGCAAA GGACCCACGA CAATGACGGA ACGCCCCGAA TAATCAACCC
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

          500     510     520     530     540     550     560
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            GTTACCRAAG CAGAGTCTCA CGAAATCTTC CCTCTTTGCC CTCAATTACA TCAGAAAATG ACTTGTA AAC
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

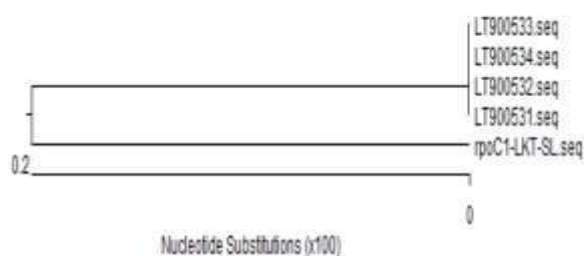
          570     580     590     600     610     620
LT900531.1  ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
            TTTATTATGA CCATCTCTCA TGGGTGTCC GCGAATCCCA TTATCAAAA GTGTATCCAC GGCTTCTT
LT900532.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900533.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LT900534.1  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
rpoC1-LKT-SL .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
            .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```

Hình 7. Trình tự nucleotide đoạn gen *rpoC1* của mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La và các trình tự mang mã số LT900532.1; LT900531.1; LT900533.1; LT900534.1 trên GenBank



Hình 8. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu thuộc loài lan Kim tuyến dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS



Hình 9. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các mẫu thuộc loài lan Kim tuyến dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen *rpoC1*

4. Kết luận

Vùng ITS và đoạn gen *rpoC1* phân lập từ mẫu lan Kim tuyến tại huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La có kích thước lần lượt là 666 bp và 628 bp. Dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS và đoạn gen *rpoC1*, bằng BLAST trong NCBI đã xác định mẫu lan Kim tuyến thu tại huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La thuộc loài *Anoectochilus setaceus*. Trình tự vùng ITS và đoạn gen *rpoC1* phân lập từ mẫu lan Kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La và các trình tự trên GenBank được sử dụng phân tích có tính bảo thủ cao, chỉ sai khác ở 2 vị trí nucleotide. Khoảng cách di truyền dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS và của đoạn gen *rpoC1* đều là 0,2%. Trình tự vùng ITS và đoạn gen *rpoC1* là mã vạch DNA có thể sử dụng để định danh loài Lan kim tuyến.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. O. T. Mak, D. D. Huang and R. C. S. Law, "A. *formosanus* Hay. contains substances that affect arachidonic acid metabolism", *Phyt. Res.*, Vol 4, pp. 45-48, 1990.

[2]. D. D. Huang, R. C. S. Law and O. T. Mak, "Effects of tissue cultured *A. formosanus* Hay. Extracts on the arachidonate metabolism", *Bot. Bull. Acad. Sin.*, Vol. 32, pp. 113-119, 1991.

[3]. J. M. Lin, C. C. Lin, H. F. Chiu, J. J. Yang and S. G. Lee, "Evaluation of the anti-inflammatory and liver protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats", *Amer. J. Chin. Med.*, Vol. 21, pp. 59-69, 1993

[4]. X. M. Du, T. Yoshizawa, T. Tamura, A. Mohri, M. Sugiura, T. Yoshizawa, N. Irino, J. Hayashi and Y. Shoyama, "Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its antihyperliposis effect", *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 24, pp. 65-69, 2001.

[5]. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách Đỏ Việt Nam, Phần II. Thực Vật*, Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 2007.

[6]. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam III*, Nxb Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh, 2000.

[7]. P. D. N. Hebert, C. Alina, L. B. Shelley, R. Jeremy, "Biological identifications through DNA barcodes", *Proc. R. Soc. Lond. B*, Vol. 270, pp. 313-321, 2003.

[8]. P. Madesis, I. Ganopoulos, P. Ralli, A. Tsafaris, "Barcoding the major Mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and nuclear DNA sequence targets", *Genet Mol Res.*, Vol. 11, pp. 2548-58, 2012.

[9]. M. A. Shaghai-Marooof, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, R. W. Allard, "Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 81, pp. 8014-8019, 1984.

[10]. J. W. Kress, K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Wei, D. H. Janzen, "Use of DNA barcodes identify flowering plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 102, pp. 8369-8374, 2005.

[11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC237323.1>

[12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT899899.1>

[13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT899900.1>

[14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT899901.1>

[15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT899902.1>

[16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT900532.1>

[17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT900531.1>

[18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT900533.1>

[19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT900534.1>