

**ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA LOÀI *DENDROBIUM CHAPAENSE* Aver.
(ORCHIDACEAE) VÀ QUAN HỆ HỌ HÀNG VỚI MỘT SỐ LOÀI
TRONG CHI *DENDROBIUM* Ở VIỆT NAM**

PHAN KẾ LONG, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG TRANG
NGUYỄN MINH TÂM, PHAN KẾ LỘC

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Khu hệ Lan của Việt Nam rất phong phú đa dạng với 897 loài thuộc 152 chi trong đó chi *Dendrobium* là lớn nhất với 107 loài [1]. *Dendrobium chapaense* Aver. là loài mới được mô tả và chỉ mới gặp ở Sa Pa trên độ cao 1500-2000 m [2]. Về hình thái, loài này gần giống với loài *D. longicornu* khá phổ biến ở miền Bắc Việt Nam, miền Đông Ấn Độ, miền Nam Trung Quốc chỉ khác ở một số đặc điểm như cành ngắn và dày; hoa nhỏ, môi màu cam-đỏ chia thành 3 thùy rõ ràng, thùy giữa có khía răng cưa [2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích thông tin di truyền và nghiên cứu mối quan hệ họ hàng của *D. chapaense* với một số loài trong chi *Dendrobium* đã được ghi nhận ở Việt Nam [1] trên cơ sở giải mã đoạn ITS.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu lá non của *D. chapaense* được thu từ đợt thực địa ở Sa Pa và được bảo quản trong silicagen. DNA tổng số được tách từ lá bằng kit Dneasy plant mini của hãng Qiagen. Phản ứng PCR bao gồm 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% Triton X-100, 0.2 mM của mỗi dNTR, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 µg/0.1 ml of genomic DNA và 0.05 đơn vị *Taq* DNA polymerase. Cặp mồi tổng hợp đoạn ITS như sau: IT1 5'-TCG TAA CAA GGT TTC CGT AGG T-3' và IT2 5'-GTA AGT TTC TTC TCC TCC GCT-3' [4]. Chu trình PCR sẽ được thực hiện trên máy Eppendorf Mastercycler theo các bước: biến tính ở 95°C trong 4 phút tiếp theo là 30 chu kỳ của 95°C trong 1 phút, 60°C trong 45 giây và 72°C trong 45 giây, cuối cùng chu trình kết thúc ở 72°C trong 10 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, điện di 5 µl sản phẩm PCR trên agarose gel 1% để kiểm tra, phần còn lại bảo quản ở -20°C.

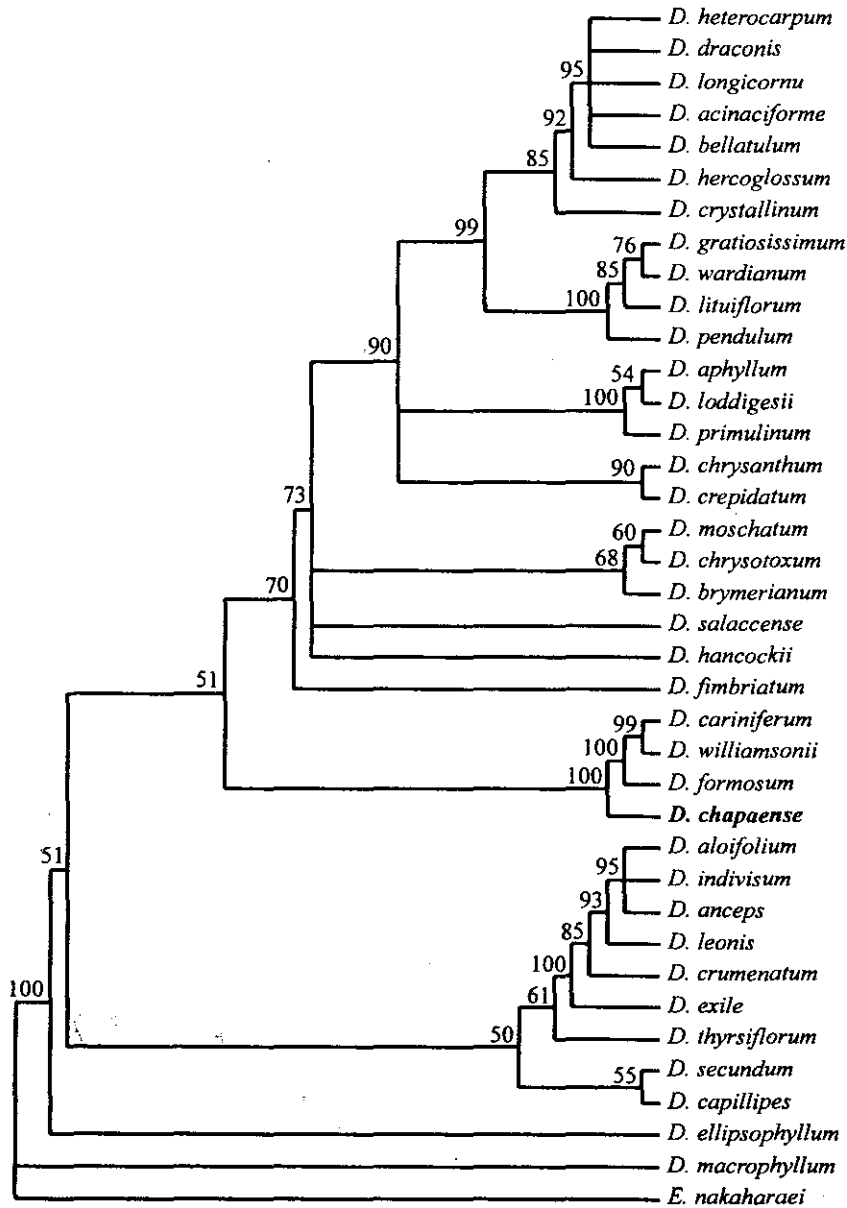
Tinh sạch DNA và giải mã: Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick Gel Extraxtion Kit. Giải mã các đoạn DNA bằng Dye Terminator Cycle Sequencing Kit và đọc trình tự trên máy BeckmanCoulter CEQ 8000 Genetic Analysis System. Kết quả giải mã được gửi lên ngân hàng dữ liệu thông tin di truyền Genbank với số truy cập là EF641112.

Phân tích kết quả: so sánh kết quả giải mã vùng ITS loài *D. chapaense* với 37 loài trong chi *Dendrobium* đã được ghi nhận ở Việt Nam từ dữ liệu trên Genbank và loài ngoài nhóm *Epigeneium nakaharaei* [3] bằng phần mềm ClustalX 1.81. Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp maximum parsimony (MP) và phân tích kết quả bằng phần mềm PAUP 4.0.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Đoạn ITS của *D. chapaense* có chiều dài 640 bp bao gồm 24,4% A, 24,2% C, 29,8% G và 21,6% T. Trong cây phát sinh chủng loại, *D. chapaense* cùng chung nhánh với *D. cariniferum*, *D. williamsonii* và *D. formosum* với giá trị bootstrap cao (100%) và khá xa với loài *D. longicornu* (hình 1).

Tỷ lệ sai khác giữa các loài trong cùng nhánh ít nhất 5% đối với các loài *D. cariniferum*, *D. williamsonii* và *D. formosum*. Tỷ lệ sai khác giữa *D. chapaense* và *D. longicornu* là 24%. *Dendrobium chapaense* khác biệt với các loài trong cùng nhánh và loài *D. longicornu* bởi 18 nucleotide (hình 2).



Hình 1: Mối quan hệ họ hàng giữa *Dendrobium chapaense* với một số loài trong chi *Dendrobium* ở Việt Nam. (*E. nakaharaei* là loài ngoài nhóm)

* 20 * 40 *

<i>D. chapaense</i> :.....A.....	: 50
<i>D. cariniferum</i> :.....	: 50
<i>D. williamsonii</i> :.....	: 50
<i>D. formosum</i> :.....G.....	: 50
<i>D. longicornu</i> :.....A.A.A.....TT.....T.....T.....A.....A	: 50

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT LẦN THỨ HAI

60 * 80 * 100

<i>D. chapaense</i> : G...G...--...T.....	: 97
<i>D. cariniferum</i> :...-.....--.....-.....	: 96
<i>D. williamsonii</i> :...-.....--.....-.....	: 96
<i>D. formosum</i> :...-.....--...C.....-.....	: 96
<i>D. longicornu</i> :...-...-C.C...C..T..A.....-TGG.....C.....T..	: 96

* 120 * 140 *

<i>D. chapaense</i> :...-.....A.A.T...-.....A.....C.....	: 145
<i>D. cariniferum</i> :...-.....A.A.T...-.....A.....C.....	: 144
<i>D. williamsonii</i> :...-.....A.A.T...-.....A.....C.....	: 144
<i>D. formosum</i> :...-.....A.A.T...-.....A.....C.....	: 144
<i>D. longicornu</i> :...TT...G.....CCAT.....AC.A.A.....C..A...T...	: 146

160 * 180 * 200

<i>D. chapaense</i> :...C.....T...T.C.....	: 195
<i>D. cariniferum</i> :...C.....T...T.C.....	: 194
<i>D. williamsonii</i> :...C.....T...T.C.....	: 194
<i>D. formosum</i> :...C.....T...T.C.....	: 194
<i>D. longicornu</i> :...C...G.A.....G.A.CTAA..G.ACA...AA.....T...	: 196

* 220 * 240 *

<i>D. chapaense</i> :...CA.....	: 245
<i>D. cariniferum</i> :...CA.....	: 244
<i>D. williamsonii</i> :...CA.....	: 244
<i>D. formosum</i> :...CA.....	: 244
<i>D. longicornu</i> :...A...G.....T.G.C...TT.....TA.....T.....	: 246

260 * 280 * 300

<i>D. chapaense</i> :...T.....	: 295
<i>D. cariniferum</i> :...T.....	: 294
<i>D. williamsonii</i> :...T.....	: 294
<i>D. formosum</i> :...T.....	: 294
<i>D. longicornu</i> :...T.....	: 296

* 320 * 340 *

<i>D. chapaense</i> :...T.....	: 345
<i>D. cariniferum</i> :...T.....	: 344
<i>D. williamsonii</i> :...T.....	: 344
<i>D. formosum</i> :...T.....	: 344
<i>D. longicornu</i> : T.....	: 346

360 * 380 * 400

<i>D. chapaense</i> :...C.....T..	: 395
<i>D. cariniferum</i> :...C.....T..	: 394
<i>D. williamsonii</i> :...C.....T..	: 394
<i>D. formosum</i> :...C.....T..	: 394
<i>D. longicornu</i> :...C.....C.....T.A	: 396

* 420 * 440 *

<i>D. chapaense</i> :...A.....C.....T.....T..C.....	: 445
<i>D. cariniferum</i> :...A.....C.....T.....T..C.....	: 444
<i>D. williamsonii</i> :...A.....C.....T.....T..C.....	: 444
<i>D. formosum</i> :...A.....C.....T.....T..C.....	: 444
<i>D. longicornu</i> :...TTT..G.....T.A...-C.....T...T.TT.CGA.G-	: 443

460 * 480 * 500

<i>D. chapaense</i> :.....C..	: 493
<i>D. cariniferum</i> :.....	: 492
<i>D. williamsonii</i> :.....	: 492
<i>D. formosum</i> :.....	: 492
<i>D. longicornu</i> :...T.....C.TTA.....A.....C...CC.....C.C	: 492

* 520 * 540 *

<i>D. chapaense</i> :.....C.....	: 543
<i>D. cariniferum</i> :.....A....	: 542
<i>D. williamsonii</i> :.....A....	: 542
<i>D. formosum</i> :.....	: 542
<i>D. longicornu</i> :...G.C.....T.....GC..G.....	: 542

560 * 580 * 600

<i>D. chapaense</i> :.C.....G.T-....	: 592
<i>D. cariniferum</i> :.....	: 588
<i>D. williamsonii</i> :.....	: 588
<i>D. formosum</i> :.C.....	: 588
<i>D. longicornu</i> : AAA..C.....CC.....ATAA.C.....A.....TT.GT..T.TT..	: 592

* 620 * 640

<i>D. chapaense</i> :.....AT.....C..-....	: 640
<i>D. cariniferum</i> :.....	: 636
<i>D. williamsonii</i> :.....	: 636
<i>D. formosum</i> :.....	: 636
<i>D. longicornu</i> : T.-.....C...TA.....G.C.....	: 638

Hình 2: So sánh thông tin di truyền trên đoạn ITS của *Dendrobium chapaense* với các loài trong cùng nhánh: *D. cariniferum*, *D. williamsonii*, *D. formosum* và loài gần giống về hình thái, *D. longicornu*. Chữ đậm là các nucleotide sai khác

III. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích thông tin di truyền trên đoạn ITS của *D. chapaense* cho thấy loài này có quan hệ gần gũi với các loài *D. cariniferum*, *D. williamsonii*, *D. formosum* phân bố chủ yếu trong các kiểu rừng nguyên sinh ở núi thấp và trung bình có độ cao 1000-2500 m nhưng khá xa với loài gần giống về mặt hình thái, *D. longicornu*. *Dendrobium* là một chi lớn thuộc họ Orchidaceae với 107 loài của Việt Nam và phân bố ở các vùng địa lý khác nhau. Hiện nay có sở dữ liệu về thông tin di truyền của các loài trong chi này còn rất hạn chế nên rất cần xây dựng cơ sở dữ liệu đó của các loài trong chi *Dendrobium* nói riêng và các loài Lan nói chung để phục vụ công tác bảo tồn và phát triển bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Averyanov L. V., A. L. Averyanov, 2003: Updated checklist of the orchids of Vietnam. Vietnam National University Publishing House, Hanoi.
2. Averyanov L. V., P. G. Efimov, 2006: Rheedea, 16: 15-28.
3. Tsai C. C., C. I. Peng, S. C. Huang, P. L. Huang, C. H. Chou, 2004: Scientia Horticulturae, 101: 315-325.

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF *DENDROBIUM CHAPAENSE* Aver.
(ORCHIDACEAE) AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP WITH OTHER
DENDROBIUM SPECIES IN VIETNAM**

*Phan Ke Long, Nguyen Thi Phuong Trang,
Nguyen Minh Tam, Phan Ke Loc*

SUMMARY

The genetic relationship of *Dendrobium chapaense* Aver. with other *Dendrobium* species in Vietnam was determined by sequence analysis of the ITS region. The ITS length of *D. chapaense* is 640 bp. The nucleotide base composition is: A = 24.4%, C = 24.2%, G = 29.8% and T = 21.6%. In the phylogenetic tree, *D. chapaense* clusters with *D. cariniferum*, *D. williamsonii* and *D. formosum* with strong bootstrap support but differs from those species as well as the morphologically similar species, *D. longicornu*, in 18 autapomorphies.