

ĐA DẠNG SINH HỌC MỘT SỐ LOÀI LAN RỪNG THUỘC CHI DENDROBIUM BẰNG KỸ THUẬT RAPD

Nguyễn Thị Pha¹, Nguyễn Thị Liên¹, Trần Thị Xuân Mai¹,
Nguyễn Thị Hoàng Nhung² và Trần Đình Giới²

ABSTRACT

*This research study on genetic analysis and evaluation of 12 orchid accessions belong to 9 wild species and 2 hybrid species come from Thailand of *Dendrobium* using 10 random RAPD primers for breeding, exploitation and propagation of orchid species in Vietnam. Results showed that all the orchid species gave high polymorphism in all 10 primers (nearly 100% of polymorphic bands). The DNA band sizes obtained in the range of 0.15–2kb. The highest frequency of the DNA band size was 500-600bp position. In particular, the primer OPF04 amplified the most numbers of DNA band (29 bands). The medium numbers of DNA band were obtained with primers: OPF01, OPF02, OPF05, OPF08, OPR07, OPA08 and OPA12 (20-24 bands). The OPR012 primer amplified the least numbers of DNA bands (14 bands). The band sizes obtained were scored by the binary coding for genetic cluster analysis using NTSYS2.1 software with UPGMA method. Results of genetic clustering of 12 *Dendrobium* orchid accessions showed genetic differences ranged from 0 to 42%. At around 59% similarity, 12 orchids accessions can be divided into three groups: A, B, C. Group A had 7 accessions of seven species, group B was 1 accession of a species and group C included four accessions of 3 species. In the group C, the orchid species had a relationship closer than groups A and B with about 80% homologous. Seven orchid species in group A correlated approximately 61.6% similarity.*

Keywords: RAPD marker, wild orchids, *Dendrobium*, genetic clustering, biodiversity

Title: Biodiversity of wild orchid species of the *dendrobium* genus using rapid markers

TÓM TẮT

*Đề tài nghiên cứu đánh giá sự đa dạng di truyền của 12 mẫu hoa lan thuộc 9 loài lan rừng và 02 loài lan lai có nguồn gốc từ Thái Lan của chi *Dendrobium* làm cơ sở di truyền cho công tác lai tạo, khai thác và nhân giống các loài lan rừng ở Việt Nam. Kết quả phân tích di truyền bằng 10 đoạn mồi ngẫu nhiên RAPD cho thấy, tất cả đều cho tính đa hình cao (gần 100% các band đa hình). Các band thu được có kích thước nằm trong khoảng 0.15 kb – 2kb. Các band có tần số xuất hiện cao nhất ở vị trí 500bp và 600bp. Trong đó, primer OPF 04 cho sản phẩm khuếch đại DNA có số band nhiều nhất (29 band). Các primer cho sản phẩm khuếch đại DNA có số band trung bình là primer OPF 01, OPF 02, OPF 05, OPF 08, OPR 07, OPA 08, OPA 12 (20-24 band), primer OPR 012 khuếch đại số lượng band ít nhất (14 band). Các band thu được mã hóa bằng hệ nhị phân để phân nhóm di truyền sử dụng phần mềm NTSYS2.1 theo phương pháp UPGMA. Kết quả phân nhóm di truyền 12 mẫu hoa lan thuộc chi *Dendrobium* cho thấy, sự khác biệt di truyền dao động trong khoảng 0- 42%. Xét ở khoảng tương đồng 59% có thể chia làm 3 nhóm chính: A, B, C. Nhóm A có 7 mẫu lan thuộc 7 loài, nhóm B có 1 mẫu của 1 loài, nhóm C có 4 mẫu thuộc 3 loài. Trong đó nhóm C, các loài có mối quan hệ gần hơn so với nhóm A*

¹ Viện nghiên cứu và phát triển CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

và B với khoảng tương đồng là 80%, các loài trong nhóm A có quan hệ tương đồng khoảng 61,6%.

Từ khóa: RAPD marker, lan rừng, *Dendrobium*, phân nhóm di truyền, đa dạng sinh học

1 GIỚI THIỆU

Hoa lan được đánh giá là loài hoa vương giả, không những đẹp do sự phối hợp hài hòa về màu sắc, mà còn thể hiện qua những đường nét của cánh hoa, từ tao nhã đến cầu kỳ, quý phái. Dáng thân, kiểu lá cũng vô cùng yêu kiều, sang trọng, tạo nên nét duyên dáng đến kỳ diệu. Hoa của các loài lan rừng không chỉ đẹp về hình thức mà hầu hết còn có hương thơm nên đang dần hấp dẫn giới hâm mộ hoa lan. Thế giới lan rừng rất phong phú với nhiều chủng loại, một trong những chi lan phổ biến nhất trên thế giới là *Dendrobium*. Chúng phân bố phổ biến ở nhiều vùng của châu Á, nhiều nhất ở Đông Nam Á và châu Úc (Nguyễn Công Nghiệp, 1998). Đây là nguồn nguyên liệu quý phục vụ công tác lai tạo để cho ra đời nhiều giống lan mới đặc sắc. Việt Nam được thiên nhiên ưu đãi, điều kiện môi trường tự nhiên thuận lợi cho sự phát triển của cây lan. Rừng Việt Nam rất phong phú với nhiều loài lan, có những loài đặc biệt chỉ có ở Việt Nam (Trần Hợp, 1998). Đánh giá nguồn gen lan rừng phục vụ cho công tác lai tạo, nhân giống để tạo ra những cây lan cho giá trị thẩm mỹ và kinh tế cao, có thể cạnh tranh với thị trường hoa trên thế giới là rất cần thiết. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) là kỹ thuật dựa trên nguyên lý hoạt động của phản ứng PCR nhằm đánh giá tính đa hình của các đoạn DNA được nhân bản ngẫu nhiên được hai nhóm nghiên cứu là Welsh và Mc Clelland (1990) và William và cộng sự (1990) đồng thời xây dựng. Khác với PCR thông thường sử dụng các đoạn môi đặc hiệu bổ sung cho các trình tự đã biết, RAPD chỉ sử dụng các môi oligonucleotid được tổng hợp ngẫu nhiên từ 9 đến 12 base. Như vậy, RAPD cho phép phát hiện tính đa hình mà không cần biết trước một trình tự nucleotide nhất định. Kỹ thuật này đã được áp dụng để nghiên cứu đa dạng di truyền trên nhiều loại cây trồng như đậu nành, cà phê, lúa... cho kết quả rất khả quan. Trong chọn tạo giống sự đa dạng có ý nghĩa hết sức quan trọng khoảng cách di truyền của cây bố mẹ càng xa nhau càng gia tăng cơ hội tạo được ưu thế lai cho các thế hệ con lai. Đề tài nghiên cứu: “Phân tích đa dạng sinh học một số loài lan rừng thuộc chi *Dendrobium* bằng kỹ thuật RAPD” được thực hiện nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của một số loài trong chi này, góp phần bảo tồn nguồn gen quý của các giống lan rừng đồng thời phục vụ cho công tác nghiên cứu lai tạo để cho ra nhiều giống lan mới có giá trị cao, thích nghi với khí hậu vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mười hai mẫu lan từ 9 loài lan rừng thuộc chi *Dendrobium* và 02 loài lan lai có nguồn gốc từ Thái Lan được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm trong đó loài *D. crumenatum* Sw. có 2 dạng có đặc điểm hình thái khác nhau được gọi tên tiếng Việt là Hoàng thảo tuyết mai lá mỏng và Hoàng thảo tuyết mai lá dày được mã hóa

ở mẫu số 9 và số 10. Danh mục các loài lan sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1 : Các loài lan rừng *Dendrobium* làm vật liệu thí nghiệm

Ký hiệu mẫu	Tên Việt Nam	Tên khoa Học	Tên viết tắt
1	Lan lai có nguồn gốc từ Thái Lan	<i>Dendrobium sp</i>	<i>Thongchai-gold</i>
2	Lan lai có nguồn gốc từ Thái Lan	<i>Dendrobium sp</i>	<i>Sonia</i>
3	Lan Hoàng thảo báo hi	<i>D.secundum</i> (Bl.) Lindl.	<i>Baohi</i>
4	Lan Hoàng thảo thủy tiên trắng	<i>D.palpebrae</i> Lindl.	<i>Thuytientrang</i>
5	Lan Hoàng thảo hương duyên	<i>D.ellipsophyllum</i> Tang et Wang.	<i>Huongduyen</i>
6	Lan Hoàng thảo thái bình	<i>D.moschatum</i> (Buchd – Hamd) Sw.	<i>Thaibinh</i>
7	Lan Hoàng thảo kim điệp	<i>D.chrysotoxum</i> Lindl.	<i>Kimdiep</i>
8	Lan Hoàng thảo trúc	<i>D.salaccense</i> (Bl.) Lindl.	<i>Truclan</i>
9	Lan Hoàng thảo tuyết mai lá mỏng	<i>D.crumenatum</i> Sw.	<i>Tuyetmailamong</i>
10	Lan Hoàng thảo tuyết mai lá dày	<i>D.crumenatum</i> Sw.	<i>Tuyetmailaday</i>
11	Lan Hoàng thảo nhất điểm hồng	<i>D.draconis</i> Rehb.f.	<i>Nhatdiemhong</i>
12	Lan Hoàng thảo Nhất điểm hoàng	<i>D.heterocarpum</i> Lindl.	<i>Nhatdiemhoang</i>

Nghiên cứu sử dụng 10 môi (primer) RAPD mỗi môi gồm 10 nucleotide được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: 10 môi RAPD được sử dụng trong thí nghiệm

STT	Tên primer	Trình tự
1	OPF01	5'-ACGGATCCTG-3'
2	OPF02	5'-GAGGATCCCT-3'
3	OPF04	5'-GGTGATCAGG-3'
4	OPF05	5'-CCGAATCCCC-3'
5	OPF07	5'-CCGATATCCC-3'
6	OPF08	5'-GGGATATCGG-3'
7	OPR07	5'-ACTGGCCTGA-3'
8	OPR012	5'-ACAGGTGCGT-3'
9	OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'
10	OPA012	5'-TCGGCGATAG-3'

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu lá non sau khi thu thập được ly trích DNA theo phương pháp mô tả của Rogers và Bendich (1988). Các mẫu DNA được phân tích kiểu gen bằng 10 đoạn môi ngẫu nhiên RAPD theo phương pháp của Williams *et al.* (1990) như trong bảng 2. Phản ứng PCR được thực hiện trong các tube nhỏ khoảng 200 μ l với hỗn hợp gồm có 10mM buffer [Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2.0mM MgCl₂], 0.5U Taq polymerase, 200 μ M mỗi loại dNTP, 15ng mỗi và 25-50ng genomic DNA trong tổng thể tích 25 μ l. Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, theo sau là 40 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: biến tính DNA ở 94°C trong 15 giây, gắn mồi ở 35°C trong 15 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút 20 giây và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 10 phút và lưu trữ ở 4°C. Sản phẩm PCR của các mẫu DNA ly trích được chạy điện di trên agarose gel 2% ở hiệu điện thế 60V trong 4 giờ với thang chuẩn 100bp plus của Fermentas. Các band DNA thu được sau khi điện di được mã hóa bằng hệ nhị phân để phân nhóm di truyền sử dụng phần mềm NTSYS2.1 theo phương pháp UPGMA (Rohlf, 2000).

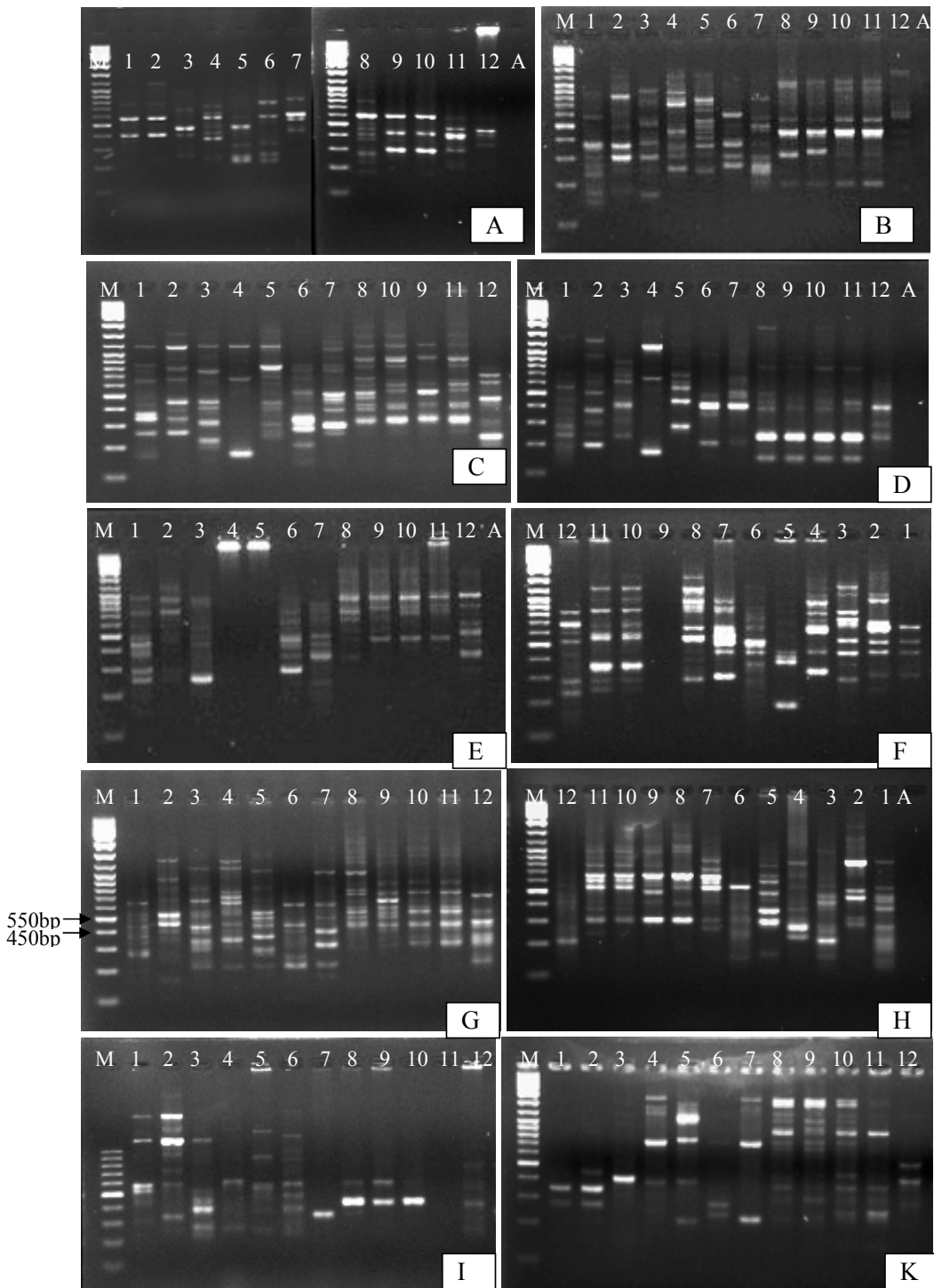
3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Nhìn chung các primer đều cho sản phẩm khuếch đại DNA ở hầu hết các mẫu, số lượng band DNA đa hình cao (gần 100%). Các band thu được có kích thước nằm trong khoảng 0,15 kb – 2kb. Band có tần số xuất hiện cao nhất ở vị trí 500bp và 600bp. Trong đó, primer OPF04 cho sản phẩm khuếch đại DNA có số band nhiều nhất (29 band). Các primer cho sản phẩm khuếch đại DNA có số band trung bình là primer OPF01, OPF02, OPF05, OPF07, OPF08, OPR07, OPA08, OPA12 (20-24 band). Primer OPR012 khuếch đại số lượng band DNA ít nhất (14 band). Hầu hết các primer cho số lượng band DNA nhiều cho thấy chúng có nhiều vị trí khuếch đại trên bộ gen của các loài lan khảo sát.

Các mẫu số 8, 9, 10,11 có một số vị trí band khuếch đại giống nhau ở 2 primer: OPF02 và OPF05 (Hình 1B và 1D), điều này cho thấy chúng có thể có quan hệ di truyền gần nhau.

Đối với 2 mẫu DNA của loài Hoàng thảo tuyết mai (mẫu số 9 và số 10), qua kết quả phân tích chỉ cho sản phẩm khuếch đại giống nhau ở primer OPF01 (Hình 1A), ở những primer khác chỉ giống nhau ở một số vị trí band. Tuy nhiên, đối với 2 mẫu DNA số 10 và 11 của 2 loài lan khác nhau (có kiểu hình khác nhau) lại thu nhận được vị trí band DNA được khuếch đại gần như giống nhau hoàn toàn ở hầu hết các primer như: OPF02, OPF04, OPF05, OPF07, OPR07, OPA08 và OPA12 (hình 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G và 1H). Điều này cho thấy chỉ dựa vào đặc điểm kiểu hình để đánh giá sự đa dạng di truyền có thể gây ra sự sai lệch.

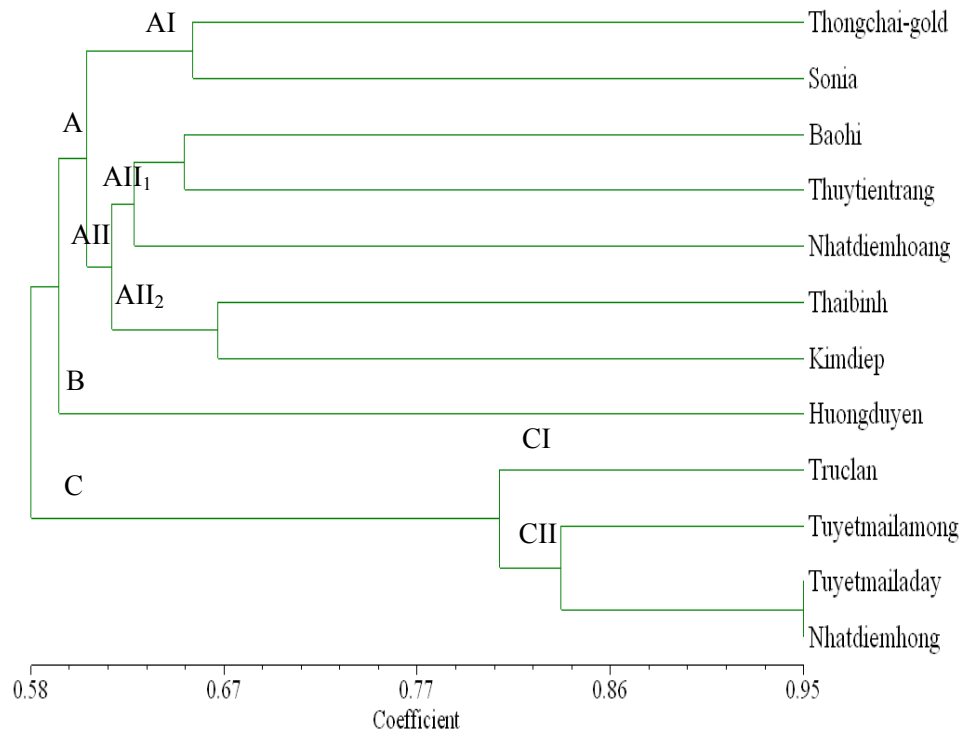
Ở phản ứng PCR với primer OPA12 kết quả khuếch đại thu được những dãy band DNA có kích thước bằng nhau cho cả 10 loài lan rừng và 2 loài lan lai, có thể đây là những alen đặc trưng điển hình trong bộ gen của chi *Dendrobium* như vị trí band 450bp, 550bp (Hình 1H).



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng các Primer: (A) OPF01, (B) OPF02, (C) OPF04, (D) OPF05, (E) OPF07, (F) OPR07, (G) OPA12, (H) OPA08, (I) OPF8 và (K) OPR12 với M là thang chuẩn 100bp và lane A là đối chứng âm không có DNA

Phân nhóm di truyền dựa trên sự hiện diện của các band DNA được khuếch đại thể hiện trên gel (Hình 2), cho thấy 12 mẫu của 10 loài lan rừng và 2 loài lan lai thuộc chi *Dendrobium* nhìn chung có sự đa dạng, khác biệt di truyền dao động trong khoảng 0- 42%. Xét ở khoảng tương đồng 59% có thể chia làm 3 nhóm chính: A, B, C. Nhóm A có 7 loài, nhóm B có 1 loài, nhóm C có 3 loài. Trong đó nhóm C, các loài có mối quan hệ gần hơn so với nhóm A và B với khoảng tương đồng là 80%, còn các loài trong nhóm A có quan hệ tương đồng xa hơn khoảng 61,6%

Trong nhóm A được chia thành 2 phân nhóm nhỏ là AI và AII. Phân nhóm AI gồm 2 loài lan lai nhập nội từ Thái Lan là *thongchai-gold* và *sonia* có độ tương đồng khoảng 65.2%. Nhóm AII được chia thành 2 phân nhóm nhỏ hơn là AII1 và AII2, phân nhóm AII1 gồm có 3 loài lan rừng. Phân nhóm AII2 có 2 loài là Hoàng thảo thái bình và Hoàng thảo kim điệp. Hai loài này có hệ số tương quan di truyền khoảng 67% và có một số đặc điểm hình thái giống nhau như: hoa dạng chùm, màu vàng, có vết đỏ tròn ở giữa, môi có rìa mịn.



Hình 2: Cây phả hệ (phylogenetic tree) của 11 loài *Dendrobium*

Nhóm B chỉ có một loài là Hoàng thảo hương duyên, với đặc điểm hoa mọc đơn độc ở nách lá, và có mùi thơm.

Nhóm C chia làm 2 phân nhóm là CI và CII, nhóm CI có một loài là Hoàng thảo trúc lan, phân nhóm CII gồm 2 mẫu lan thuộc loài Hoàng thảo tuyết mai và 1 mẫu thuộc loài Hoàng thảo nhất điểm hồng. Trong đó, 2 mẫu lan của Hoàng thảo tuyết mai có nhiều nét kiểu hình giống nhau như: kiểu hoa, kiểu thân giống nhau hoàn toàn chỉ có khác biệt về kiểu lá, nhưng qua phân tích về kiểu gen, 2 mẫu này chỉ có

quan hệ tương đồng di truyền trong khoảng gần 84%. Trong khi đó, mẫu lan có kiểu lá ngắn và dày hơn thì có quan hệ tương đồng rất gần với loài Hoàng thảo nhất điểm hồng và phần trăm tương đồng của chúng đạt gần 95%, mặc dù đặc điểm kiểu hình của chúng hoàn toàn khác.

4 KẾT LUẬN

Kết quả phân tích 12 mẫu của 9 loài lan rừng *Dendrobium* và 2 loài lan lai bằng kỹ thuật RAPD cho thấy 10 primer đều thể hiện tính đa hình cao và ghi nhận được 214 dấu phân tử.

- Mười hai mẫu của 11 loài lan được phân nhóm di truyền thành 3 nhóm chính, trong đó nhóm A lớn nhất gồm 7 loài, nhóm B nhỏ nhất là 1 loài. Mức độ tương đồng trong khoảng 58–95%, nhóm C gồm 4 mẫu của 3 loài lan rừng có tương quan di truyền cao nhất đạt 80%.
- Hai mẫu lan của loài *D. crumenatum* Sw. là Hoàng thảo tuyết mai lá mỏng và Hoàng thảo tuyết mai lá dày có kiểu hình gần giống nhau, tuy nhiên khoảng tương đồng của chúng chỉ đạt 84%.
- Mẫu lan Hoàng thảo tuyết mai lá dày và loài Hoàng thảo nhất điểm hồng tuy có đặc điểm hình thái khác nhau nhưng lại có hệ số tương quan di truyền cao nhất đạt gần 95%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Công Nghiệp. 1998. Trồng Hoa Lan. Nhà xuất bản trẻ, thành phố Hồ Chí Minh. p50-p61
- Rogers SO and Bendich AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) Plant Molecular Biology Manual, pp A6:1-10. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Rohlf EJ. 2000. NTSYSpc- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1). Exeter Software, Setauket, New York.
- Trần Hợp. 1998. Phong lan Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213–7218
- Williams. J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak and J.A. Rafalkski. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acid Res.* 18: 6531-6535.