

GIẢI TRÌNH TỰ GEN *rpoB* VÀ NHÂN NHANH CÂY OẢI HƯƠNG LÁ XÈ BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY MÔ

La Việt Hồng^{1*}, Chu Đức Hà²

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,

²Viện Di truyền Nông nghiệp - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, gen *rpoB* phân lập từ loài oải hương lá xè (*Lavandula dentata*) thu thập tại Đà Lạt (Lâm Đồng) đã được giải trình tự làm cơ sở để xây dựng cây phả hệ. Nhân giống cây oải hương bằng kỹ thuật nuôi cấy mô từ đốt thân cũng được hoàn thiện. Kết quả cho thấy, gen *rpoB* của *L. dentata* có kích thước 483 bp. Phân tích sơ đồ hình cây cho thấy loài oải hương lá xè trong nghiên cứu này xếp cùng nhóm với loài *L. angustifolia*. Đốt thân của oải hương lá xè được khử trùng bề mặt bằng dung dịch javel 5% trong 10 phút. Môi trường thích hợp để tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro* là MS, agar 7 g.L⁻¹, sucrose 30 g.L⁻¹ bổ sung BAP 0,7 mg.L⁻¹. Số chồi/mẫu đạt 10,13; số lá/chồi đạt 9,66 và chiều cao chồi đạt 3,28 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường phù hợp để ra rễ *in vitro* là MS, agar 7 g.L⁻¹, sucrose 30 g.L⁻¹ bổ sung NAA 0,5 mg.L⁻¹, cho số rễ trung bình/chồi là 14,66, chiều dài rễ 1,58 cm sau 2 tuần nuôi cấy. Giá thể đất + xơ dừa (1:1) thích hợp để rèn luyện cây oải hương cấy mô, cho tỷ lệ sống đạt 65,0% sau 3 tuần rèn luyện.

Từ khóa: cấy mô, gen, oải hương, nhân nhanh, *rpoB*

Ngày nhận bài: 31/10/2019; **Ngày hoàn thiện:** 18/01/2020; **Ngày đăng:** 31/01/2020

SEQUENCING OF *rpoB* GENE AND RAPID PROPAGATION OF *Lavandula dentata* BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

La Viet Hong^{1*}, Chu Duc Ha²

¹Hanoi Pedagogical University 2,

²Agricultural Genetics Institute - Vietnam Academy of Agricultural Sciences

ABSTRACT

In this study, the *rpoB* gene of *L. dentata* which was obtained from Da Lat (Lam Dong), was sequenced. It was used to construct the phylogenetic tree. The propagation of *L. dentata* by tissue culture technique from stem segments was improved. Results showed that the *rpoB* gene of *L. dentata* was sequenced, this gene was 483 bp in the length. The analysis of phylogenetic tree expressed that lavender in this work was in the group with *L. angustifolia*. Stem segments of *L. dentata* were surface sterilized by 5% javel solution in 10 minutes. The suitable medium for shoots regeneration and multiplication was MS 7 g.L⁻¹ agar, 30 g.L⁻¹ sucrose added 0.7 mg.L⁻¹ BAP. The shoot number per explants was 10.13, the leaf number per shoot was 9.66 and the shoot length was 3.28 cm after 8 weeks of culture. The favorable medium for *in vitro* rooting was MS, 7 g.L⁻¹ agar, 30 g.L⁻¹ sucrose supplemented 0.5 mg.L⁻¹ NAA. The root number per shoot was 14.66 and the length of root was 1.58 cm after 2 weeks culture. The mixture of soil and coconut fiber (1: 1) was suitable for hardening of *in vitro* lavender, the survival rate reached 65.0% after 3 weeks of acclimatization.

Keywords: tissue culture, gene, lavender, rapid propagation, *rpoB*

Received: 31/10/2019; **Revised:** 18/01/2020; **Published:** 31/01/2020

* Corresponding author. Email: laviethong.sp2@gmail.com

1. Giới thiệu

Chi oải hương (*Lavandula* spp.) có 39 loài và rất nhiều giống lai, trong đó có gần 400 giống đã được đăng ký thương mại [1]. Nhiều giống oải hương có giá trị cao, được sử dụng thu nhận tinh dầu thơm, dược liệu, thức ăn, gia vị. Ngoài ra, cây oải hương còn được sử dụng làm cảnh. Các quy trình nhân giống cây oải hương hiệu quả là cần thiết để sản xuất ra số lượng lớn cây giống có giá trị cho ngành sản xuất hoa, cho vùng sản xuất nguyên liệu thu nhận hợp chất thứ cấp có giá trị cũng như làm giảm áp lực khai thác loài hoang dại trong tự nhiên [2]. Cây oải hương lá xẻ (*L. dentata*) hay còn gọi là oải hương Pháp là loài chứa nhiều hợp chất 1,8-cineole, fenchone và canphor, loài này khác so với loài *L. angustifolia* (oải hương Anh - English lavender) chứa nhiều linalil-acetate và linalool [3].

Cây oải hương thường được nhân lên chủ yếu từ hạt và nhân giống vô tính truyền thống (giâm hom, tách bụi). Nhân giống từ hạt thường dẫn đến thế hệ con cháu dị hợp, còn nhân giống vô tính truyền thống gặp những khó khăn như tỷ lệ ra rễ thấp, cây rất dễ bị nhiễm virus và bệnh. Các khó khăn trên có thể được vượt qua bằng phương pháp nuôi cấy mô, phương pháp này giúp tạo ra cây giống sạch bệnh, đồng đều, số lượng lớn. Phương pháp nuôi cấy mô đã được thực hiện thành công trên một số đối tượng thuộc chi *Lavandula* spp., chủ yếu thông qua sự phát triển của chồi nách hoặc chồi bất định và sự phát sinh phôi soma [4]. Ở Việt Nam, cây oải hương được trồng ở Đà Lạt (Lâm Đồng) để làm cây cảnh, cây giống chủ yếu được nhân lên từ hạt và giâm hom. Nhân giống cây oải hương từ hạt bằng nuôi cấy mô đã được thực hiện ở loài oải hương *L. angustifolia* [5]. Tuy nhiên, rất khó có thể kiểm soát sự đồng nhất của vật liệu khởi đầu và ở thế hệ con cháu do nguồn mẫu hạt được dùng cho nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, cây oải hương lá xẻ được thu từ Đà Lạt (Lâm Đồng) được phân

tích giải trình tự gen *rpoB*, hoàn thiện nhân nhanh bằng phương pháp nuôi cấy mô. Kết quả đề tài cung cấp chỉ thị phân tử *rpoB* và hoàn thiện quy trình nhân giống cây oải hương lá xẻ.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu cây oải hương được thu từ vườn cây giống thành phố Đà Lạt (Lâm Đồng).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số và giải trình tự gen *rpoB*

Lá của cây oải hương lá xẻ được dùng để tách chiết ADN tổng số theo phương pháp Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) [6], kiểm tra độ tinh sạch của ADN tổng số bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%. Sau đó, 0,5 mg DNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen *rpoB* với chu trình nhiệt 94°C/5 phút; 30 chu kỳ của (94°C/30 giây; 55°C/45 giây; 72°C/60 giây); 72°C/10 phút. Cặp mồi được sử dụng là P5F: 5'-AAGTGCATTGTTGGAAGTGG-3' và P5R: 5'-GATCCCAGCATCACAATTCC-3' (Macrogen, Mỹ). Sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, tinh sạch bằng bộ kit AccuPrep Gel Purification Kit (BIONEER, Hàn Quốc) và giải trình tự bằng hệ thống máy ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ) tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2. Xây dựng cây phân loại

Cây phả hệ gồm trình tự gen *rpoB* của một số loài thuộc họ Lamiaceae, bao gồm *Mentha longifolia* (LC063621.1), *Agastache rugosa* (EU590877.1), *Plectranthus mollis* (KM877412.1), *Isodon nilghericus* (KM877418.1), *Ocimum basilicum* (FR720478.1), *Salvia rutilans* (FR720511.1), *Origanum majorana* (FR720494.1) và *L. angustifolia* (KT948988.1) được xây dựng bằng MEGA 7 với thuật toán Maximum

Likelihood, mô hình Tamura-Nei model, giá trị Bootstrap với 1000 lần lặp lại [7].

2.2.3. Nhân nhanh cây oải hương bằng phương pháp nuôi cấy mô

Tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*: Đốt thân (chiều dài 3-4 cm), rửa sạch dưới vòi nước chảy bằng xà phòng, lắ mẫ bằng etanol 70% (v/v) trong 5 phút, rửa lại bằng nước cất khử trùng 2-3 lần, cuối cùng khử trùng bề mặt bằng dung dịch javen (dạng thương mại chứa 5,3% NaClO) 5,0% (v/v) trong 10 phút. Chồi tái sinh 4-5 tuần tuổi có chiều dài 2 cm chứa mắt ngủ cấy lên môi trường Murashige and Skoog (MS) [8], 7 g.L⁻¹ agar, 30 g.L⁻¹ sucrose (pH 5,8) bổ sung 6-Benzylaminopurine (BAP), kí hiệu công thức T1-T5 tương ứng dải nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 0,9 (mg.L⁻¹) hoặc kinetin (KI), kí hiệu T6-T10 tương ứng dải nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 (mg.L⁻¹). Công thức đối chứng (T0) là môi trường nền không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Các chỉ tiêu, số chồi/mẫ, số lá/chồi và chiều cao chồi (cm) được xác định sau 8 tuần nuôi cấy.

Ra rễ và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh: sử dụng chồi có chiều dài 3 cm cấy lên môi trường nền bổ sung riêng lẻ NAA (α -Naphthaleneacetic acid), kí hiệu công thức R1-R5; IAA (indole-3-acetic acid), kí hiệu từ R6-R10, NAA và IAA bổ sung gồm nồng độ: 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 (mg.L⁻¹). Công thức đối chứng (R0) là môi trường nền không bổ sung NAA, IAA. Xác định các chỉ tiêu: số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm) sau 2 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây *in vitro* ở giai đoạn rèn luyện: Cây hoa oải hương *in vitro* hoàn chỉnh được đưa ra rèn luyện thích nghi với điều kiện tự nhiên trên các giá thể: xơ dừa; đất + xơ dừa (1:1); đất + xơ dừa + trấu hun (1:1:1). Theo dõi tỷ lệ cây sống (%) sau 3 tuần rèn luyện.

2.2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Số

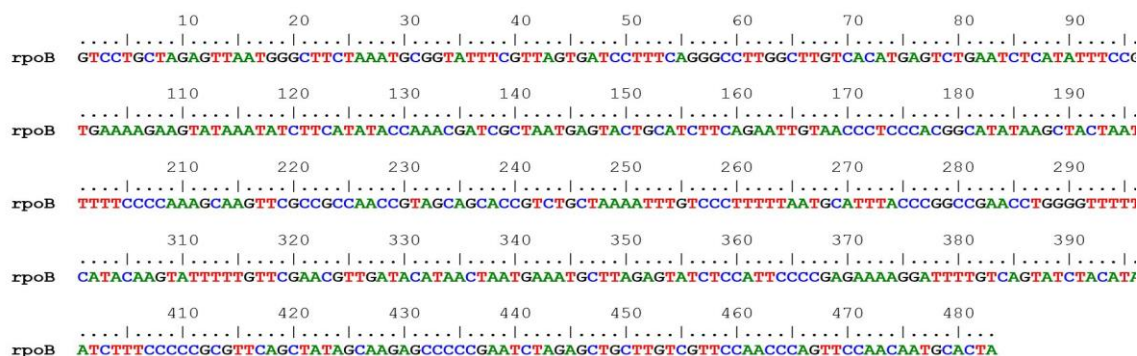
liệu được phân tích theo các tham số thống kê: giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng chương trình Excel [9]. So sánh giữa các giá trị trung bình bằng thuật toán giới hạn sai khác nhỏ nhất LSD_{0,05}.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Giải trình tự gen *rpoB* và xây dựng cây phả hệ

Cây oải hương được trồng ở nhiều nơi trên thế giới với nhiều loài khác nhau như *L. angustifolia*, *L. stoechas*, *L. latifolia*, *L. dentata*... Ở Việt Nam, cây oải hương được trồng chủ yếu ở Đà Lạt, Lâm Đồng. Dựa trên đặc điểm hình thái so sánh, mẫu dùng trong nghiên cứu này được xác định là oải hương lá xẻ - *Lavendula dentata*. Tuy nhiên, để khẳng định kết quả này, chúng tôi đã xác định thêm dẫn liệu phân tử của loài này để làm cơ sở phân loại. Phương pháp DNA barcoding sử dụng các đoạn trình tự DNA ngắn như locus chuẩn để nhận diện loài [10]. Gen *rpoB* là một trong những locus từ hệ gen lục lạp thường được sử dụng trong DNA barcoding [11]. Kết quả phân lập và giải trình tự gen *rpoB* của mẫu oải hương lá xẻ cho thấy gen *rpoB* có kích thước 483 bp (Hình 1).

Sử dụng trình tự *rpoB* cùng với một số trình tự gen *rpoB* của các loài khác thuộc họ Lamiaceae được thu từ NCBI để xây dựng cây di truyền, trong đó trình tự gen *rpoB* của *L.dentata* chưa có công bố trên NCBI. Trong cùng chi *Lavandula* cũng chỉ có trình tự đầy đủ gen lục lạp của loài *L.angustifolia*, từ dữ liệu này, chúng tôi đã xác định trình tự, kích thước gen *rpoB* của loài *L.angustifolia* có chiều dài 518 (bp). Sơ đồ hình cây dựa trên trình tự nucleotide của gen *rpoB* cho thấy trình tự gen *rpoB* của mẫu cây oải hương nằm cùng nhánh với trình tự gen *rpoB* của loài *L. angustifolia* (KT948988.1). Kết quả phân tích cũng cho thấy chi oải hương (gồm *L.dentata* và *L.angustifolia*) tạo thành nhóm khác biệt so với các chi khác trong cùng họ Hoa môi.



Hình 1. Trình tự gen *rpoB* từ cây oải hương lá xẻ (*L. dentata*) mẫu thu tại Đà Lạt (Lâm Đồng)

3.2. Nhân nhanh cây oải hương lá xẻ từ đốt thân bằng phương pháp nuôi cấy mô

3.2.1. Tái sinh và nhân nhanh chồi in vitro

Trong nghiên cứu này, đốt thân cây oải hương được khử trùng bề mặt bằng javen 5% (v/v)/10 phút đạt, mẫu sạch cho nuôi cấy *in vitro* được thể hiện ở Hình 3 a, b. Phân tích Bảng 1 cho thấy BAP và KI có ảnh hưởng đến khả năng tái sinh chồi của oải hương lá xẻ. Tuy nhiên, KI không ảnh hưởng tốt đối với quá trình tạo chồi như BAP. Đối với công thức T4 có bổ sung BAP 0,7 mg.L⁻¹ cho chất lượng cả về số lượng chồi (10,13 chồi/ mẫu), số lá/chồi (đạt 9,66) và chiều cao chồi (đạt 3,28 cm) (Hình 3c). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Jordan et al. (1998) [12].

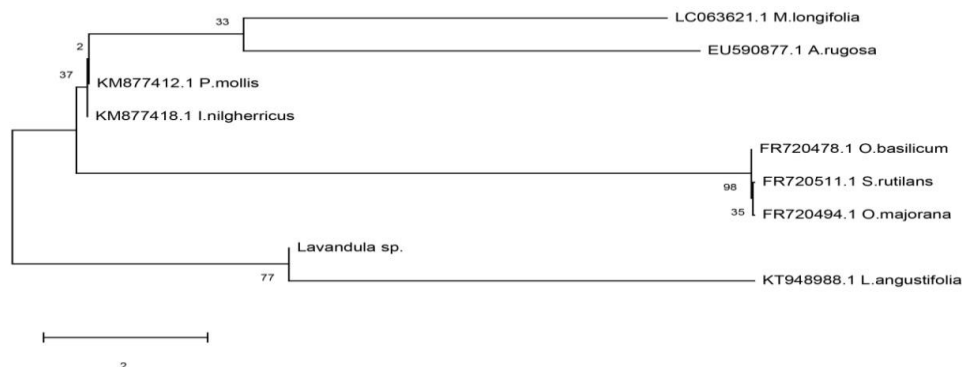
3.2.2. Ra rễ - tạo in vitro cây hoàn chỉnh

Ở một số loài như *L. vera*, *L. viridis* và cây oải hương lá xẻ, việc bổ sung NAA là cần thiết để cảm ứng chồi ra rễ *in vitro* [3, 12].

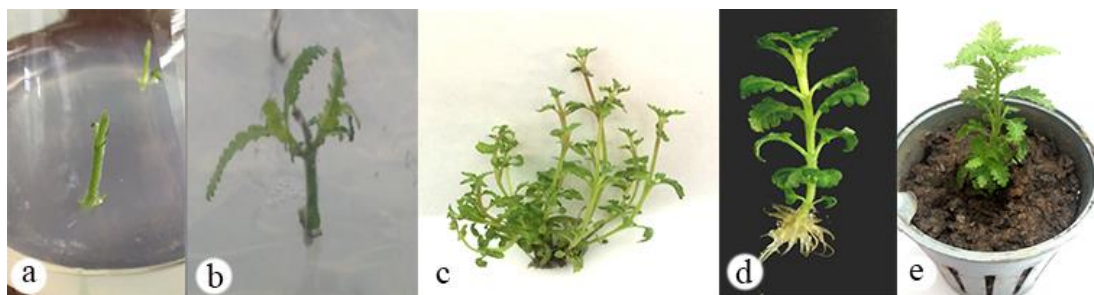
Kết quả ra rễ của chồi oải hương trong môi trường có bổ sung NAA và IAA được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 3d cho thấy việc bổ sung NAA và IAA vào môi trường có tác động tốt đến sự hình thành chồi *in vitro*. Cụ thể công thức R3 (NAA 0,5 mg.L⁻¹) là tốt nhất thể hiện số rễ trung bình/chồi đạt 14,66 và chiều dài rễ là 1,58 cm.

3.2.3. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây oải hương cấy mô giai đoạn rèn luyện

Tỷ lệ sống phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nhiệt độ, độ ẩm, giá thể... của điều kiện rèn luyện. Tỷ lệ sống của cây oải hương cấy mô đã được công bố rất khác nhau từ 50-55% [12] hoặc 87% [3]. Trong nghiên cứu này, 3 loại giá thể gồm: đất, đất + xơ dừa (1:1), đất + trấu (1:1) tỷ lệ sống lần lượt là: 12,0; 65,0 và 26,0 (%). Như vậy, giá thể đất + trấu (1:1) là phù hợp để rèn luyện cây oải hương cấy mô, tỷ lệ sống đạt 65%, cây sinh trưởng khá tốt (Hình 3e).



Hình 2. Cây phả hệ được xây dựng từ trình tự gen *rpoB* kết hợp với tập hợp các trình tự *RpoB* đã công bố của các loài thuộc họ Hoa môi (*Lamiaceae*). Sử dụng phần mềm MEGA 5.2 (12), với các tham biến: thuật toán Maximum Likelihood, mô hình Tamura-Nei model (JTT), phương pháp Bootstrap với 1000 lần lặp lại.



Hình 3. Các bước nhân nhanh cây oải hương lá xẻ bằng nuôi cấy mô. a, b. Đốt thân oải hương ở thời điểm mới khử trùng bề mặt và sau nuôi cấy 3 tuần. c. Cụm chồi oải hương in vitro trên môi trường bổ sung BAP $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ sau 8 tuần nuôi cấy. d. cây in vitro hoàn chỉnh trên môi trường bổ sung NAA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. e. Cây oải hương trên giá thể đất + xơ dừa (1:1) sau 3 tuần được rèn luyện

Bảng 1. Kết quả tái sinh và nhân nhanh chồi oải hương sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Chất điều hòa (mg.L^{-1})		Số chồi/ mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao chồi (cm)
	BAP	Kinetin			
ĐC	-	-	1,73 ^{ef}	10,26 ^a	1,61 ^{bcd}
T1	0,1	-	2,73 ^{de}	8,60 ^{abc}	2,83 ^{ab}
T2	0,3	-	4,13 ^d	10,46 ^a	1,66 ^{bcd}
T3	0,5	-	5,86 ^c	6,93 ^{cd}	3,17 ^a
T4	0,7	-	10,13 ^a	9,66 ^{ab}	3,28 ^a
T5	0,9	-	8,26 ^b	6,00 ^d	1,95 ^{abc}
T6	-	0,1	1,60 ^{ef}	9,66 ^{ab}	1,75 ^{bcd}
T7	-	0,2	2,33 ^{de}	10,40 ^a	2,60 ^{ab}
T8	-	0,3	2,26 ^e	7,93 ^{bcd}	1,06 ^{cd}
T9	-	0,4	0,4 ^f	2,80 ^e	0,44 ^d
	LSD _{0,05}		1,72	1,89	1,27

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của NAA và IAA đến khả năng ra rễ của chồi oải hương sau 2 tuần nuôi cấy

Công thức	Chất điều hòa (mg.L^{-1})		Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
	NAA	IAA		
R0 (ĐC)	-	-	3,66 ^c	0,72 ^{def}
R1	0,1	-	6,63 ^c	1,15 ^{bc}
R2	0,3	-	5,46 ^c	0,92 ^{cde}
R3	0,5	-	14,66 ^a	1,58 ^a
R4	0,7	-	10,26 ^b	0,96 ^{cd}
R5	0,9	-	6,80 ^c	0,65 ^{efg}
R6	-	0,1	11,20 ^b	0,90 ^{cde}
R7	-	0,3	12,40 ^{ab}	1,35 ^{ab}
R8	-	0,5	10,95 ^b	0,69 ^{defg}
R9	-	0,7	10,16 ^b	0,54 ^{fg}
R10	-	0,9	9,91 ^b	0,41 ^g
	LSD _{0,05}		3,06	0,27

4. Kết luận

Trình tự gen *rpoB* của cây oải hương lá xẻ thu tại Đà Lạt, Lâm Đồng có chiều dài 483 bp, phân tích cây di truyền cho thấy loài oải hương lá xẻ cùng nhóm với loài *L. angustifolia* với độ tương đồng 77%.

Đốt thân cây oải được khử trùng bề mặt bằng javen 5% (v/v)/10 phút; môi trường MS, agar

7 g.L^{-1} , sucrose 30 g.L^{-1} bổ sung BAP $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ cho thích hợp cho tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*.

Môi trường thích hợp nhất để ra rễ cho chồi hoa oải hương *in vitro* là MS, agar 7 g.L^{-1} , sucrose 30 g.L^{-1} có bổ sung NAA $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Cây *in vitro* được chuyển ra giá thể đất + xơ dừa (1:1) để rèn luyện có tỷ lệ sống đạt 65,0%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. T. Upson, S. Andrews, G. Harriott, C. King, and J. Langhorne, *The genus Lavandula*. Portland: Timber Press, 2004.
- [2]. H. Chawla, *Introduction to plant biotechnology*, 3rd, editor. Enfield: Science Publishers, 2009.
- [3]. S. Echeverrigaray, R. Basso, and L. Andrade, "Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants," *Biologia Plantarum*, vol. 49, pp. 439-442, 2005.
- [4]. S. Goncalves, and A. Romano, "Micro propagation of *Lavandula* spp.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 11013, pp. 189-198, 2013.
- [5]. T. V. Do, T. P. H. Mai, C. K. Pham, and V. M. Tran, "Micropropagation of lavender (*Lavandula angustifolia*)," *J. Innov Pharmaceut Biol Sci.*, vol. 4, no. 2, p. 11, 2017.
- [6]. A. Borges, M. S. Rosa, G. H. Recchia, J. Queiroz-Silva, E. Bressan, and E. A. Veasey, "CTAB methods for DNA extraction of sweet potato for microsatellite analysis," *Scientia Agricola*, vol. 66, pp. 529-534, 2009.
- [7]. K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 28, no. 10, pp. 2731-2739, 2011.
- [8]. T. Murashige, and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497, 1962.
- [9]. V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, *Methods in plant physiology*. Vietnam National University Press, Hanoi, 2013.
- [10]. P. D. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Proceedings Biological sciences*, vol. 7, no. 270(1512), pp. 313-321, 2003.
- [11]. P. M. Hollingsworth, S. W. Graham, and D. P. Little, "Choosing and Using a Plant DNA Barcode," *PLOS ONE*, vol. 6, no. 5, p. e19254, 2011.
- [12]. M. A. Jordan, C. M. Calvo, and J. Segura, "Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants," *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 73, pp. 93-96, 1998.