ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN TẬP ĐOÀN HOA LAN HOÀNG THẢO PHI ĐIỆP (*DENDROBIUM ANOSMUM*) BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ VÙNG ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER)

Khuất Hữu Trung[1], Trương Quốc Chính[2], Trần Duy Dương[1],
Kiều Thị Dung[1], Trần Đăng Khánh[1*]

TÓM TẮT

Các giống hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp (*Dendrobium anosmum)* trên thị trường rất đa dạng và phức tạp, rất khó để phân biệt giữa giống này với giống khác vì đặc điểm hình thái bên ngoài của chúng rất giống nhau trước khi phát triển hoa. Trong nghiên cứu này, 118 mẫu giống Hoàng Thảo Phi Điệp (*Dendrobium anosmum*) thu thập ở các vùng khác nhau đã được khuếch đại và giải thành công vùng ITS1, 5.8S và ITS2 (Internal Transcribed Spacer) với chiều dài từ 700 - 800 bp. Dựa trên kết quả giải trình tự vùng ITS đã xác định được 02 mẫu giống khác biệt là mẫu giống L28 (Hạc vĩ - *Dendrobium aphyllum)* và mẫu giống L35 (Hoàng Thảo trầm - *Dendrobium parishii*), các mẫu giống còn lại đều thuộc loài *Dendrobium anosmum*. Qua kết quả so sánh trình tự đoạn ITS của các mẫu giống hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp bản địa Việt Nam và thế giới cho thấy chúng có độ tương đồng cao so với các mẫu của thế giới, chỉ có sự sai khác ở một số vị trí nucleotide từ đoạn 592-646 bp và được phân thành các nhóm khác nhau. Dựa vào trình tự sai khác chỉ có thể nhận dạng được một số mẫu giống trong loài. Vì vậy, muốn xác định chính xác từng giống trong cùng một loài *Dendrobium anosmum* của Việt Nam, cần tiếp tục sử dụng thêm các chỉ thị khác như SSR hoặc ISSR hoặc giải trình tự hệ gen của các giống trong nhóm.

Từ khóa: *Hoàng Thảo Phi Điệp (Dendrobium anosmum), Hoàng Thảo trầm (Dendrobium parishii), vùng ITS (internal transcribed spacer), Hạc vĩ (Dendrobium aphyllum), mã vạch DNA.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi lan Hoàng Thảo (Dendrobium) có số lượng lớn, đa dạng về hình dáng, màu sắc và kích thước với hơn 1.148 loài khác nhau, đứng thứ 2 trong họ hoa lan, sau chi lan Lọng (Bulbophyllum) (Leitch và cs., 2009). Vùng Đông Nam Á có thể coi là quê hương của chi lan Hoàng Thảo với hàng trăm loài, chúng được biết đến như loài hoa tràn đầy sức sống rất mạnh mẽ. Chúng có thể sống bám trên những thân cây hoặc trên các hốc đá trong rừng sâu. Với sự phong phú về chủng loại cũng như màu sắc, kích thước hoa nên chi Hoàng thảo có rất nhiều loài có giá trị thẩm mỹ cũng như kinh tế rất cao.

Ở Việt Nam, chi lan Hoàng Thảo có đến hơn 100 loài khác nhau xếp trong 14 tông phân biệt nhau phức tạp bằng thân, lá, hoa (Trần Hợp, 2009). Đã có một số công trình nghiên cứu bài bản về đánh giá đa dạng di truyền với chi lan Hoàng Thảo ở Việt Nam như các tác giả Tran Duy Duong và cs., 2018; Trần Hoàng Dũng và cs., 2012; Nguyễn Thị Pha và cs., 2012, tuy nhiên các tác giả này chủ yếu tập chung vào các loài thuộc chi lan Hoàng Thảo, chưa có tác giả nào nghiên cứu sâu đối với loài lan Hoàng Thảo Phi Điệp *Dendrobium anosmum.* Rất nhiều loài lan Hoàng Thảo Phi Điệp chỉ khác với loài lân cận ở một điểm hình thái rất nhỏ và tinh tế, do vậy rất khó để nhận diện chúng bằng phương pháp hình thái thông thường (Liu và cs., 2014). Trong tự nhiên *D. anosmum* có vài biến dị như biến dạng hồng nhạt, hồng thẫm hoặc cánh trắng lưỡi tím, mũi trắng (Trần Hợp, 2009). Hiện tại, trên thị trường hoa lan Việt Nam, một số giống hoa lan Phi điệp như các giống 5 cánh trắng: Bảo Duy, Vĩnh Khang, Cờ đỏ, Bướm Đại Ngàn, Bạch Tuyết… và một số giống phi điệp hồng như Tuyết Đỉnh Hồng, Hồng Mỹ Nhân, Hồng Minh Châu có giá trị rất cao và gây sốt trên thị trường hoa lan. Các giống lan Phi Điệp trên thị trường rất đa dạng và phức tạp và rất khó để phân biệt giữa giống này với giống khác vì hình dáng bên ngoài của chúng rất giống nhau trước khi phát triển hoa.

Với sự phát triển mạnh mẽ của các phương pháp và kỹ thuật sinh học phân tử hiện nay đã có nhiều

[1] Viện Di truyền Nông nghiệp
[2] Resort Hoa lan Chính Trương
*Email: tdkhanh@vaas.vn

ứng dụng để giúp xây dựng mã vạch (bacode) nhận diện và đánh giá đa dạng di truyền các loài sinh vật sống như các chỉ thị phân tử AFLP, ISSR, SSR, RAPD, ITS (Williams và cs., 1990; Tsai và cs., 2002; Paromik và Suman, 2014; Prattana Phuekvilai và cs., 2009; Sharma và cs., 2012; Wangvà cs., 2011; Swati Das và cs., 2014; Parab và Krishman, 2008; Liu và cs., 2014; Xu và cs., 2015). Mã vạch ADN sử dụng một trình tự ADN ngắn nằm trong genome của sinh vật như là một chuỗi ký tự duy nhất giúp phân biệt hai giống/loài sinh vật với nhau. Có rất nhiều đoạn gen nhân và gen nằm trong lục lạp của thực vật đã được sử dụng trong phân tích phân loại thực vật như: ITS1-5.8S-ITS2, 18 rRNA, *rbc*L, *atp*β, *ndh*F, intron *trn*L và *mat*K… có thể giúp phân định các loài trong họ *Dendrobium* (Takamiya và cs., 2011; Singh và cs., 2012; Trần Duy Dương và cs., 2018). Trong nghiên cứu này 118 mẫu lan Hoàng Thảo Phi Điệp (*D. anosmum*) được giải trình tự vùng ITS để định hướng xây dựng bộ chỉ thị phân tử nhận dạng chính xác các loài phi điệp bản địa quí của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Vật liệu là 118 mẫu/giống lan được thu thập tại các nhà vườn trong miền Nam, miền Trung và miền Bắc được nhà vườn Resort Hoa Lan Chính Trương thu thập và cung cấp (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các mẫu nghiên cứu

TT	Tên mẫu	Ký hiệu	TT	Tên mẫu	Ký hiệu
1	5 cánh trắng Văn Lang	L1	26	Hồng nguyên thủy 2	L26
2	Người đẹp Bình Dương	L2	27	Mắt trâu	L27
3	Bạch tuyết	L3	28	Phi điệp lá xọc	L28
4	Gái nhảy	L4	29	5 cánh trắng Củ Chi	L29
5	5 cánh trắng Phú Quý	L5	30	6 mắt	L30
6	5 cánh trắng Nghệ An	L6	31	Hồng lộc	L31
7	Hồng yên thủy	L7	32	5 cánh trắng Phú Thọ	L32
8	Thảo nguyên 2	L8	33	GSQHL	L33
9	Trầm lá bạch tạng	L9	34	5 cánh trắng HO 3	L34
10	Phi điệp lá tía	L10	35	5 cánh trắng HO 4	L35
11	Hồng gia lai	L11	36	Hồng Quý	L36
12	5 cánh trắng HO1	L12	37	Ngọc nữ Tây Nguyên	L37
13	Người đẹp không tên	L13	38	5 cánh trắng Ngọc Sơn Cước 1	L38
14	Mắt mờ Hải Dương	L14	39	Người đẹp Không tên 1	L39
15	5 cánh trắng mũi trắng	L15	40	5 cánh trắng Bảo Duy 1	L40
16	Xước Đường Lâm	L16	41	5 cánh trắng Thảo Chi	L41
17	Hồng thế hạc	L17	42	5 cánh trắng Bảo Duy 2	L42
18	5 cánh trắng HO2	L18	43	Hoa hậu Xứ Mường	L43
19	Hồng ngạc sông Đà	L19	44	Bướm đại ngàn	L44
20	5 cánh trắng Phan Giang	L20	45	5 cánh trắng Cờ Đỏ	L45
21	Hồng xòe	L21	46	5 cánh trắng Kim	L46
22	Hồng Minh Châu 1	L22	47	5 cánh trắng Cố hương	L47
23	Xước Chính Trương	L23	48	Ngọc Sơn Cước	L48
24	Tuyết đỉnh hồng	L24	49	5 cánh trắng Mắt ngọc sông Đà	L49
25	5 cánh trắng Tản Viên	L25	50	Hồng Cao Bằng	L50
51	5 cánh trắng Thủy Tinh	L51	85	Kiều Phi Yến	L85
52	Năm Hồng	L52	86	Đôi mắt Pleiku	L86
53	Hồng Điện Biên	L53	87	5 cánh trắng Nguyễn Ng Vinh	L87
54	Hồng Bình An	L54	88	5 cánh trắng Dầu Tiếng	L88
55	5 cánh trắng Bảo An	L55	89	5 cánh trắng Vô thường)	L89

56	Hồng Hà My	L56	90	5 cánh trắng 3 mũi	L90
57	5 cánh trắng Mắt Phương	L57	91	5 cánh trắng Xuân Phúc	L91
58	5 cánh trắng Trường Sa	L58	92	Tiên xa	L92
59	5 cánh trắng Mẹ tôi	L59	93	5 cánh trắng Hai Phụng	L93
60	5 cánh trắng Khánh Ngọc	L60	94	5 cánh trắng Sơn nữ	L94
61	Hồng Bích Quyết	L61	95	Hồng Hờn	L95
62	Hồng Nhật Hạ	L62	96	Không tên	L96
63	Ngọc nữ thác mơ	L63	97	5 cánh trắng Lạp Bảo	L97
64	Bạch trà	L64	98	5 cánh trắng Cát Tường	L98
65	5 cánh trắng Thanh Hóa	L65	99	5 cánh trắng Euro	L99
66	Hồng Như ý	L66	100	5 cánh trắng Ngọc Hiền	L100
67	Hồng Á hậu	L67	101	Da vàng	L101
68	5 cánh trắng Lê Chăm	L68	102	Ngọc Minh Tâm	L102
69	5 cánh trắng ướt mi	L69	103	5 cánh trắng Như ý	L103
70	Hồng mỹ nhân	L70	104	Vô thường	L104
71	5 cánh trắng Thiên Thi	L71	105	Pleiku xanh	L105
72	Hồng Lâm Hải	L72	106	5 cánh trắng SH	L106
73	5 cánh trắng Thuận Thiên	L73	107	5 cánh trắng Vĩnh Khang 2	L107
74	5 cánh trắng Thảo Chi	L74	108	5 cánh trắng cố hương	L108
75	5 cánh trắng Vĩnh Khang 1	L75	109	5 cánh trắng Cờ Đỏ	L109
76	5 cánh trắng Mắt Trâu	L76	110	5 cánh trắng vọng xưa	L110
77	Người đẹp không tên 2	L77	111	Hồng ngọc	L111
78	Hồng Diệp	L78	112	Mắt ngọc Bạch Đằng	L112
79	Hồng Sao Hỏa	L79	113	Ngọc Lan 68	L113
80	Hồng Dầu Tiếng	L80	114	Hồng	L114
81	Hồng Minh Châu 2	L81	115	5 cánh trắng Vĩnh Khang 3	L115
82	5 cánh trắng Mày ngài	L82	116	5 cánh trắng Ngọc Nam Kinh	L116
83	5 cánh trắng Mắt lệ	L83	117	5 cánh trắng Dream Hiếu Hoàng	L117
84	5 cánh trắng Kinh Bắc	L84	118	Kiều Phi Yến	L118

2.2. Phương pháp nghiên cứu

ADN tổng số được tách chiết theo kit Thermo (GeneJet Plant genomic DNA purification mini kit) và kiểm tra nồng độ bằng phương pháp điện di gel agarose 1%.

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cycler. Tổng thể tích phản ứng là 15 µl, bao gồm: 5 µl ADN; 0,15 µM cặp mồi ITS1/ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATT GATATGC) **(Vilgalys và cs., 1994)**; 0,2 mM dNTPs; 1X Buffer PCR; 2,5 mM $MgCl_2$ và 0,25 U Taq polymerase. Chu trình nhiệt phản ứng PCR gồm: 94°C (5 phút), 36 chu kỳ [94°C (1 phút), 56°C (45 giây), 72°C (50 giây)] và kết thúc ở 72°C (7 phút), giữ ở 4°C.

- Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% sử dụng đệm TAE (1X). Gel được nhuộm Ethidium Bromide 0,5 mg/ml và soi trên máy Alpha Imager 1220 (Alpha Innotech, CA, USA).

- Sản phẩm PCR được thôi gel theo quy trình hướng dẫn của bộ kit Qiagen.

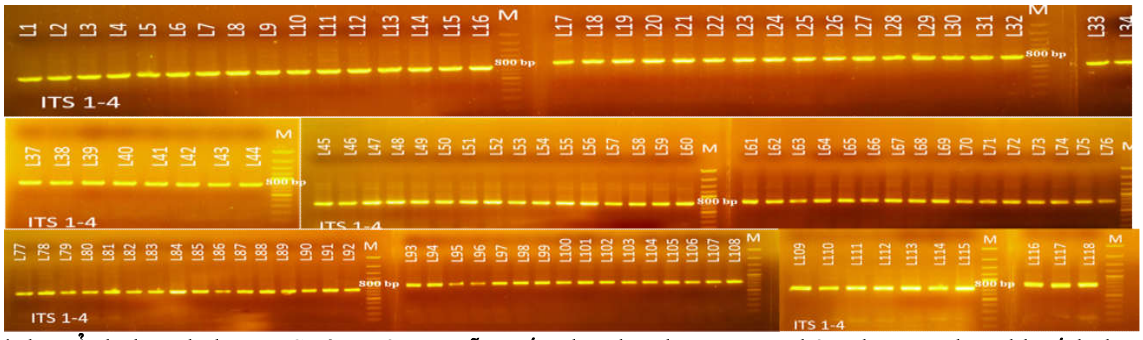
- Giải trình tự: Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch, được giải trình tự tại Công ty Apical Scientific (Malaysia).

- Phương pháp xử lí số liệu: Dữ liệu trình tự nucleotid được xác định mô hình tiến hóa tối ưu bằng cách sử dụng chuẩn thông tin Akaie được hiệu chỉnh (corrected AICc – Akaike Information Criterion) trong phần mềm jModelTest 0.1 (Posada, 2008) chạy trên nền Java. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự tham chiếu trên NCBI và được phân tích bằng chương trình MEGA v6.06.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khuếch đại vùng ITS bằng PCR

Kết quả cặp mồi ITS1 và ITS4 đã khuếch đại thành công đoạn ITS, sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi mẫu giống lan Hoàng Thảo Phi Điệp trên gel agarose sau khi điện di. Các băng có kích thước khoảng 700–800 bp. Kết quả này cũng khá phù hợp với các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác khi khuếch đại vùng ITS trên cây lan Hoàng Thảo (Xu và cs., 2015; Chiang và cs., 2012; Trần Hoàng Dũng và cs., 2012; Liu và cs., 2014; Tran Duy Duong và cs., 2018). Sản phẩm đoạn ITS sau khi khuếch đại bằng PCR được tinh sạch bằng Qiagen Kit. Chất lượng ADN được kiểm tra trên gel agarose 0,8% sau đó được gửi đi giải trình tự. Kết quả đọc trình tự của 118 mẫu giống lan Hoàng Thảo Phi Điệp rõ ở hai trình tự xuôi và trình tự ngược. Sau khi đã có trình tự, kết quả của mỗi mẫu giống trình tự được đem so sánh với các trình tự của hoa lan Hoàng Thảo trên thế giới dựa trên ngân hàng GenBank bằng công cụ BLAST.



Hình 1. Ảnh điện di đoạn ITS của quả 118 mẫu giống hoa hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4

L1-L118: Các mẫu giống lan Phi điệp. M: 100b ladder

3.2. Kết quả phân tích trình tự các mẫu giống hoa lan Hoàng thảo dựa trên trình tự vùng ITS

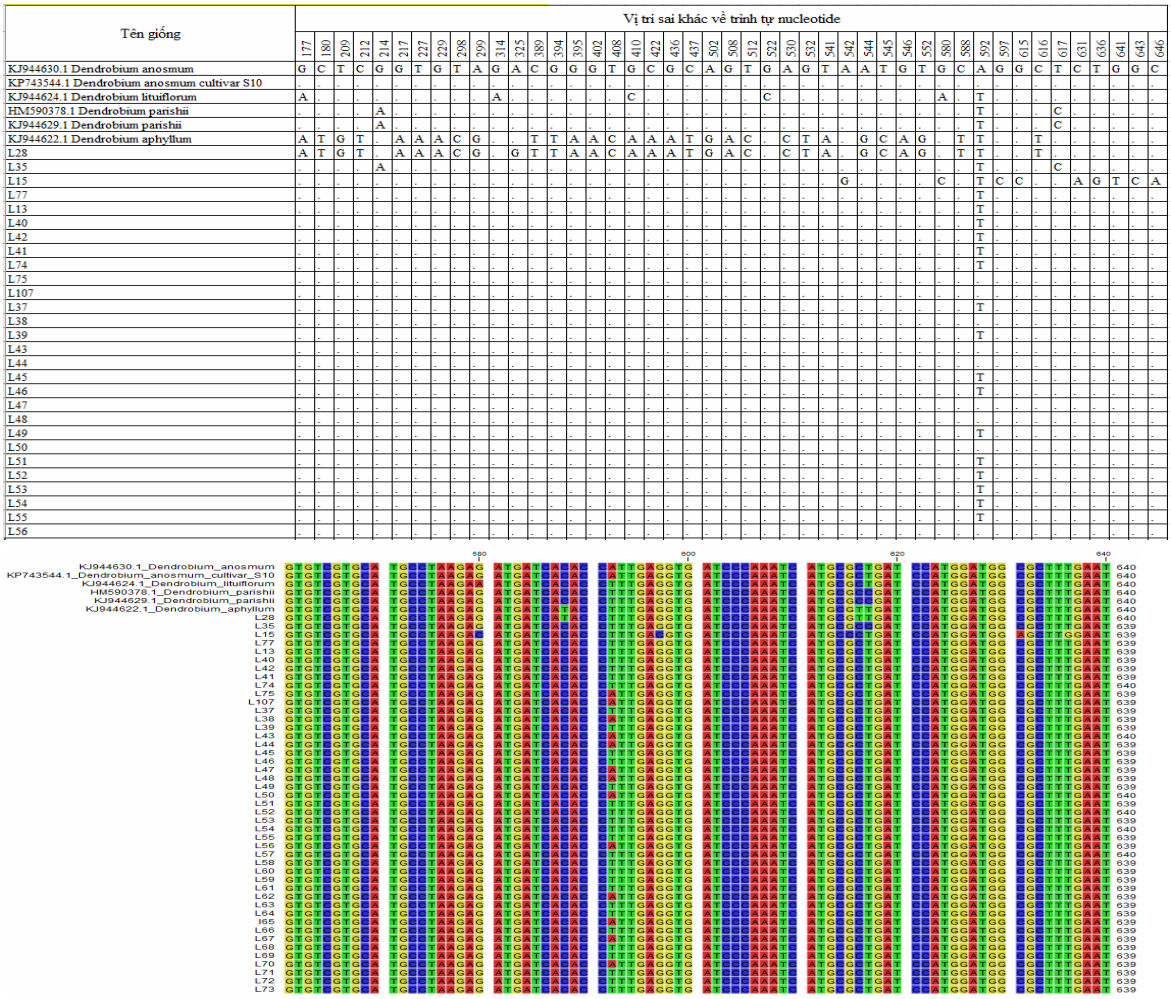
Trình tự của các mẫu phân tích được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy tất cả các trình tự nói trên đều tương đồng với trình tự vùng ITS của các loài *Dendrobium*, độ bao phủ và tương đồng đạt 99-100%. Điều này cho thấy mẫu thu thập ngoài thực địa không bị lẫn tạp các mẫu khác, quá trình bảo quản mẫu tốt, quy trình tách chiết DNA, giải trình tự đạt độ tin cậy cao. Trình tự của mẫu phân tích đang được đệ trình lên ngân hàng GenBank để xác nhận chỉ số gia nhập/truy cập (acession number).

Kết quả phân tích sắp cột thẳng hàng (alignments) còn cho thấy vùng ITS1 ở các mẫu phân tích có chiều dài 270-277 bp. Vùng 5.8S và ITS2 có chiều dài không đổi ở tất cả các mẫu lần lượt là 164 và 244 bp. Hơn nữa vùng 18S, 23S và 5.8 S có mức độ bảo tồn khá cao. Trong khi đó vùng ITS1 và ITS2 lại có sự biến thiên khá lớn. Các kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhiều công bố về vùng ITS của chi *Dendrobium* (Takamiya và cs., 2011; Singh và cs., 2012; Xu và cs., 2015).

Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Kết quả BLAST cho thấy các mẫu được thu thập có 116 mẫu thuộc loài *Dendrobium anosmum*, chỉ có 02 mẫu là L28 là thuộc loài *Dendrobium aphyllum* (Hạc vĩ) và L35 thuộc loài *Dendrobium parishii* (Hoàng Thảo Trầm). Xét về hình thái, hai mẫu giống này về thân là rất giống các mẫu giống Phi điệp nhưng hoa của chúng có điểm khác biệt là có mùi thơm đặc trưng. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Trần Hoàng Dũng và cs, 2012 khi sử dụng trình tự vùng ITS và phương pháp xây dựng cây tiến hóa đã xác lập vị trí tiến hóa của hai loài *D. Parishii* và *D. anosmum* cho thấy *D. anosmum* và *D. parishii* tiến hóa từ một tổ tiên chung, trong đó *D. parishii* phân kỳ sớm hơn *D. anosum*. Quá trình tiến hóa này có vẻ chỉ mới gần đây do vậy các đặc tính hình thái ngoài của hai loài này chưa có sự khác biệt rõ rệt. Cũng dựa trên vị trí trong cây phát sinh chủng loài, một số mẫu được định danh hình thái là *D. parsihii* được xác lập lại tên khoa học là *D. anosmum*. Ngoài ra dựa trên tốc độ tiến hóa, phân tích trình tự và quan sát hình thái, một gợi ý thấy sự đột biến màu sắc hương thơm diễn ra độc lập ở các gen hoặc nhóm gen liên quan chứ không liên quan đến vùng ITS (Trần Hoàng Dũng và cs., 2012).

3.3. Kết quả so sánh trình tự đoạn ITS một số mẫu giống hoa lan Hoàng Thảo bản địa Việt Nam và thế giới

Để so sánh sự khác biệt các trình tự của các mẫu giống hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp (*D. anosmum)* của Việt Nam và thế giới, đã tiến hành phân tích trình tự của các mẫu giống lan Hoàng Thảo Phi Điệp của Việt Nam và thế giới dựa trên sự phân tích sắp cột thẳng hàng (Hình 2).



Hình 2. Kết quả phân tích sắp cột thẳng hàng (alignments) trình tự vùng ITS của mẫu giống hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp với các mẫu giống trên thế giới

Qua kết quả phân tích cho thấy các mẫu hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp của Việt Nam có độ tương đồng cao so với các mẫu của thế giới, chỉ có sự sai khác ở một số vị trí nucleotide từ đoạn 592-646 bp nên vì vậy rất khó để phân biệt được sự khác biệt ở các mẫu giống trong cùng một loài. Chính vì vậy, việc sử dụng chỉ thị ITS chỉ nhận dạng được các loài với nhau trong cùng một chi, khó có thể nhận dạng được hết các cá thể (các giống) với nhau trong cùng một loài.

3.4. Xây dựng cây phát sinh chủng loài

Để tạo cơ sở dữ liệu vùng ITS cần thiết để xây dựng cây phát sinh chủng loài của các mẫu giống lan Hoàng Thảo Phi Điệp (*Dendrobium anosmum*) trong nghiên cứu này, đã thu thập thêm 2 trình tự trình tự vùng ITS của các loài *Dendrobium anosmum* (KJ944630.1; KP743544.1), *Dendrobium parishii* (HM 590378.1; KJ944629.1) có quan hệ gần với *D. anosmum* và *D. parishii* và 1 loài *Dendrobium aphyllum.* Ngoài ra 01 trình tự ITS của loài *Dendroium lituiflorum* (KJ944624.1) cũng được thu thập để làm nhóm đối chứng ngoại (outgroup) (Hình 3).

Dựa trên sơ đồ hình cây phát sinh loài cho thấy, các mẫu giống hoa lan Phi điệp được chia ra làm 5 nhóm khác nhau.

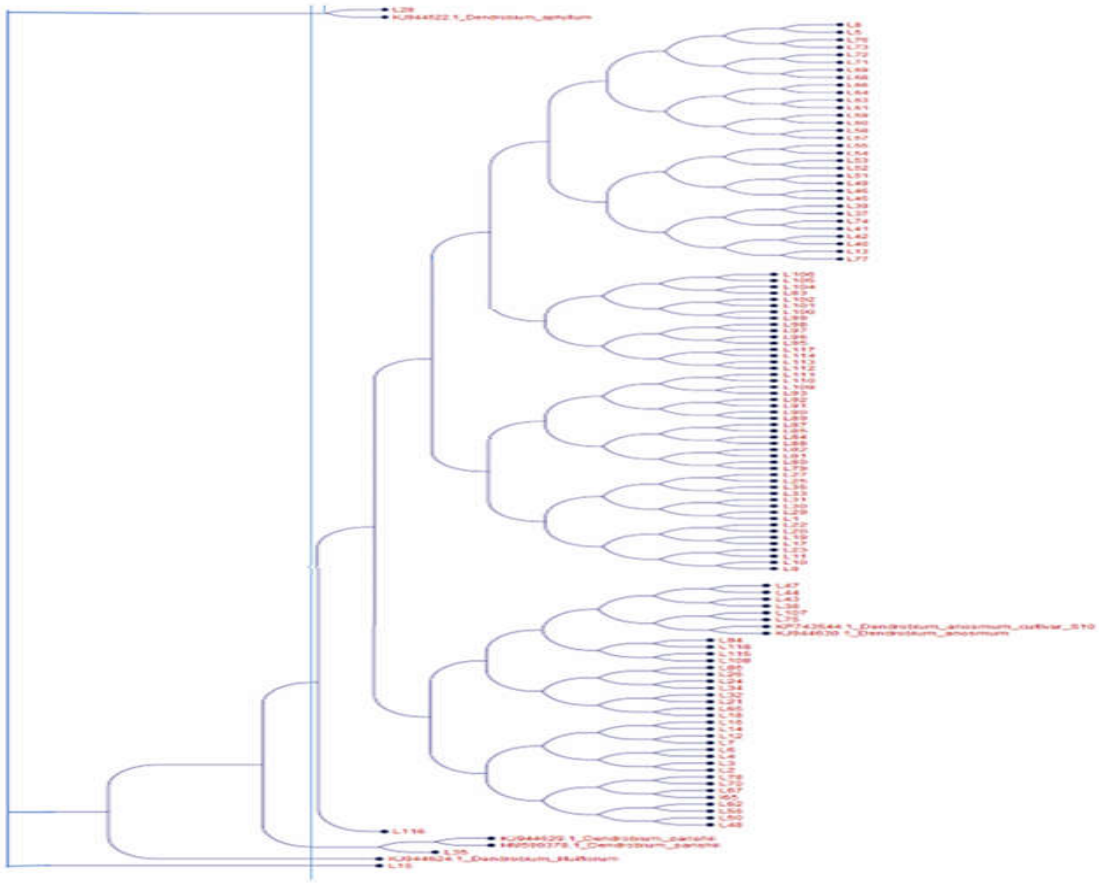
Nhóm thứ 1 gồm 1 mẫu giống L28 (Phi điệp lá xọc) nhưng lại tách riêng ra một nhóm cùng với mẫu giống *Dendrobium aphyllum* (KJ944622.1) của thế giới nên có thể khẳng định rằng mẫu L28 là *Dendrobium aphyllum* chứ không phải là phi điệp.

Nhóm thứ 2 bao gồm 115 mẫu giống và chia thành các nhóm phụ khác nhau và nằm chung cùng 1 nhóm với 02 mẫu giống thuộc *Dendrobium anosmum* (KJ944630.1; KP743544.1) của thế giới. Riêng mẫu giống L116 (5 cánh trắng Ngọc Nam Kinh) nằm khá xa so với các mẫu giống khác.

Nhóm thứ 3 là mẫu giống L35 (HO4) được xác định trên BlAST là *Dendrobium parishii* nằm chung một nhóm với 02 mẫu giống *Dendrobium parishii* HM 590378.1; KJ944629.1).

Nhóm thứ 4 là *Dendroium lituiflorum* (KJ944624.1) là nhóm đối chứng ngoại.

Nhóm thứ 5 là mẫu giống 5 cánh trắng mũi trắng (L15) nằm riêng biệt một nhóm.



Hình 3. Sơ đồ cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

- Kết quả nghiên cứu giải trình tự vùng ITS của 118 mẫu giống hoa lan Hoàng Thảo đã xác định được 02 mẫu giống khác biệt, mẫu giống L28 thuộc loài *Dendrobium aphyllum* - Hạc vĩ và mẫu giống L35 thuộc loài *Dendrobium parishii* - Hoàng Thảo trầm. 116 mẫu giống còn lại đều thuộc loài *Dendrobium anosmum*.

- Dựa trên kết quả so sánh trình tự đoạn ITS của các mẫu giống lan Hoàng Thảo Phi Điệp cho thấy các mẫu hoa lan Hoàng Thảo Phi Điệp của Việt Nam có độ tương đồng cao so với các mẫu của thế giới, chỉ có sự sai khác ở một số vị trí nucleoide từ đoạn 592-646.

- Kết quả đánh giá đa dạng di truyền cho thấy, hầu hết các mẫu giống của Việt Nam tập chung vào một nhóm với nhau và có độ tương đồng di truyền cao. Có hai mẫu giống là L35 và L15 nằm riêng biệt thành 02 nhóm khác nhau trong đó mẫu giống là L35 nằm chung một nhóm với 02 mẫu giống *Dendrobium parishii* HM 590378.1; KJ944629.1 của thế giới.

4.2. Kiến nghị

Để xây dựng bộ tiêu bản ADN (barcode) nhận dạng chính xác từng giống trong cùng một loài *Dendrobium anosmum* của Việt Nam, cần tiếp tục sử dụng thêm các chỉ thị khác như SSR hoặc ISSR hoặc giải trình tự hệ gen của các mẫu giống trong nhóm.

LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn Resort Hoa lan Chính Trương đã cung cấp mẫu vật và tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Hoàng Dũng, Trần Lệ trúc Hà, Vũ Thị Huyền Trang, Đỗ Thành Trí, Trần Duy Dương (2012). Ứng dụng công nghệ ADN để phân loại và nhận diện lan Hoàng Thảo trầm rừng (*Dendrobium parishii*) và Phi điệp (*Dendrobium anosmum*) tại Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* số (18), tr.3 -9.

2. Trần Hợp (2009). *Phong lan Việt Nam.* NXB Khoa học Kỹ thuật.

3. Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Liên, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Hoàng Nhung và Trần Đình Giỏi (2012). Đa dạng sinh học một số loài lan rừng thuộc chi Dendrobium bằng kỹ thuật RAPD. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ, (22a), trang 186-192.

4. Chiang C. H., Tsong A. Y., Shu F. L, Chao L. K., and Wen H. P (2012). Molecular Authentication of Dendrobium Species by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Amplification Refractory Mutation System Analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 137(6), p. 438–444.

5. Leitch I. J., Kahandawala I., Suda J., Hanson L., Ingrouille M. J., Chase, M. W., and Fay M.F (2009). Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany,* (104), pp. 469-481.

6. Liu Y. T., Chen R. K., Lin S. J., L, Chen Y. C., Chin S. W., Chen F. C., and Lee C. Y (2014). Analysis of sequence diversity through internal transcribed spacers and simple sequence repeats to identify *Dendrobium* species. *Gentics and Molecular Research* 13 (2): 2709-2717.

7. Paromik B and Suman K (2014). Molecular characterization of *Dendrobium nobile Lindl.*, an endangered medicinal orchid, based on randomly amplified polymorphic DNA. *Plant Syst Evol.* DOI 10.1007/s00606-014-1065-1.

8. Parab G. V and KrishmanS (2008). Assessment of gentic variation among populations of *Rhynchostylis retusa*, an epiphytic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD. *Indian Journal of Biotechnology*, (7), pp. 313-319.

9. Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7), 1253-1256.

10. Prattana Phuekvilai, Pradit Pongtongkam and Surin Peyachoknagul (2009). Development of Microsatellite Markers for *Vanda* Orchid. *Kasetsart J.* (*Nat. Sci.),* (43), pp. 1-10.

11. Sharma S. K., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., and Rao S. R (2012). Assessment of phylogentic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA. *Gen*, 495(1), pp.10-15.

12. Singh, H. K., Parveen, I., Raghuvanshi, S. & Babbar, S. B. (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC Res Notes* 5, 42.

13. Swati Das (Sur)., Surya S. D., and Parthadeb G (2014). Analysis of gentic diversity in some black gram cultivars using ISSR. *European Journal of Experimental Biology* 4(2), pp. 30-34.

14. Takamiya, T., Wongsawad, P., Tajima, N., Shioda, N., Lu, J. F., Wen, C. L., Wu, J. B., Handa, T., Iijima, H., Kitanaka, S. & Yukawa, T. (2011). Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. *Biol Pharm Bull* 34(5), 779-82.

15. Tran Duy Duong, Khuat Huu Trung, La Tuan Nghia, Nguyen Thi Thanh Thuy, Pham Bich Hien, Nguyen Truong Khoa, Tran Hoang Dung, Do

Van Trung and Tran Dang Khanh (2018). Identification of Vietnamese Native *Dendrobium* Species Based on Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequence. Advanced Studies in Biology, Vol. 10, 2018, no. 1, 1 – 12.

16. Tsai C. C., Huang S. C., Huang P. L., Chen Y. S., and Chou C. H (2002). Phylogenetic relationship and identification of subtribe Onchidiinae genotypes by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Sci. Hort*, (96), pp. 303-312.

17. Wang F., Wang L. J., Zhou. Y., and Sun. H (2011). Gentic Diversity of the Selected 64 Potato Germplasms Revealed by AFLP Markers. *Mol Plant Breeding*, 2 (4), pp. 22-29.

18. Williams J. G. K, Kubelik A. R, Livak K. J, Rafalski J. A., and Tingey S. V (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as gentic markers. *Nucleic Acids Res*, (18), pp.6531-6535.

19. Vilgalys, R., J. S. Hopple, Jr., and D. S. Hibbett, 1994. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: the impact of molecular systematic studies. Mycol. Helv. 6:73-91

20. Xu, S., Li, D., Li, J., et al., 2015. Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia. PloS one. 10 (1) 1-12.

21. Zhang, K. Y. B., Ngan F. N., Wang Z. T., But P. P. H., Shaw P. C, and Wang J (1999). Random primed polymerase chain reaction differentiates Codonopsis pilosula from different localities. *Planta Med.*(65), pp. 157- 160.

MOLECULAR DIVERSITY OF *DENDROBIUM ANOSMUM* SPECIES BY INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) SEQUENCING

Khuat Huu Trung[1], Truong Quoc Chinh[2], Tran Duy Duong[1], Kieu Thi Dung[1], Tran Dang Khanh[1*]

[1]Institute of Agricultural Genetics (AGI)

[2]Chinh Truong Orchid Resort

[*]Email: tdkhanh@vaas.vn

Summary

The *Dendrobium anosmum* orchids available on the market are very diverse and complex and it is difficult to distinguish between one variety and another because their appearance is very similar before flowering. In this study, 118 samples of *Dendrobium anosmum from* were collected from different regions were amplified and successfully resolved for ITS1, 5.8S and ITS2 (Internal Transcribed Spacer) regions with lengths from 700 to 800 bp. Based on the attained results of the sequencing, ITS has identified two distinct varieties, L28 (*Dendrobium aphyllum*) and L35 (*Dendrobium parishii*) varieties and other varieties belong to the *Dendrobium anosmum* species. Comparing the ITS segments, most Vietnamese native *Dendroium anosmum* have high similarity to compare with the world's samples. Some different nucleotide positions ranged from the 592-646 segments, so it is difficult to distinguish the differences between the cultivars within the same species. Therefore, in order to accurately identify each variety in the same species of *Dendrobium anosmum* in Vietnam, it is necessary to continue to use other advanced techniques such as SSR or ISSR marker or whole-genome sequencing of varieties in the group.

Keywords: *Orchids, Dendrobium parishii*, *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium aphyllum,* ITS (Internal Transcribed Spacer), DNA barcoding.

Người phản biện: PGS.TS. Lã Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 22/01/2021

Ngày thông qua phản biện: 22/02/2021

Ngày duyệt đăng: 01/3/2021