

Đánh giá đa dạng di truyền của một số loài Lan *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam

Lê Thị Ngọc Diệp¹, Nguyễn Thanh Điềm¹, Nguyễn Như Hoa², Trần Hoàng Dũng¹, Vũ Thị Huyền Trang^{1,*}

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

² Khoa Sinh học, Đại học Sư phạm Tp. Hồ Chí Minh

*vthtrang@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Chi *Dendrobium* có số lượng loài lớn, hình thái và màu sắc rất đa dạng. Đặc biệt, ở Việt Nam độ đa dạng các loài *Dendrobium* cao, với 107 loài phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển. Việc nhận dạng bằng hình thái dễ bị nhầm lẫn giữa các loài khi cây không có hoa. Từ đó đánh giá đa dạng di truyền giúp quản lý được nguồn gen đa dạng của loài *Dendrobium*, phục vụ công tác quản lý giống và lai tạo. Nghiên cứu này, thực hiện khảo sát đa dạng di truyền mẫu thuộc chi *Dendrobium* ở khu vực phía Nam Việt Nam. Kết quả nhận diện loài bằng vùng ITS và *matK* lần lượt: 16/16 loài và 10/16 loài. Vùng ITS cho tiềm năng cao hơn so với *matK* trong việc nhận diện lan *Dendrobium* với tỉ lệ nhận diện 100% tổng số loài được khảo sát. Từ đó, vùng ITS được xem là tiềm năng trong việc nhận diện nhóm Lan *Dendrobium*. Nghiên cứu này còn góp phần phục vụ cho việc phân định, chọn và lai tạo các giống mới của các loài *Dendrobium* ở Việt Nam.

Nhận 25.08.2020
Được duyệt 22.09.2020
Công bố 30.10.2020

Từ khóa
Dendrobium, ITS, *matK*,
đa dạng di truyền

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Hoa Lan là loài hoa có nhiều màu sắc, hình dáng tao nhã và hương thơm hấp dẫn nên được nhiều người yêu thích. Đặc biệt, Lan *Dendrobium* dễ trồng, đa dạng về hình dáng và kích thước, với 1148 loài khác nhau; đứng thứ 2 trong họ hoa Lan, sau chi Lan Lọng (*Bulbophyllum*) [1]. Ở Việt Nam, điều kiện môi trường tự nhiên thuận lợi, thích hợp cho việc sinh trưởng và phát triển của Lan, riêng Lan *Dendrobium* có hơn 100 loài phân bố rộng rãi trên khắp cả nước [2]. Tuy nhiên việc nhận diện *Dendrobium* bằng phương pháp truyền thống còn nhiều hạn chế vì phụ thuộc mẫu, phải nguyên vẹn ở tất cả các bộ phận. Nhờ sự ra đời của phương pháp DNA bared với khả năng phân định chính xác và nhanh chóng ở bất kỳ bộ phận nào của mẫu đều có thể tách chiết được. Hiện nay trên thế giới, để phân tích mối quan hệ di truyền ở thực vật, các trình tự thường được dùng là ITS, *matK*, *rbcL*, *trnH* - *psbA*, *rpoC1*, *rpoB*... Trong đó, vùng *matK* có khả năng phân định cao hơn *rbcL* được khảo sát trên 5 loài *Dendrobium*, được sử dụng làm thuốc như: *Dendrobium fimbriatum*, *D. moniliforme*, *D. nobile*, *D. pulchellum* và *D. Tosaense* [3]. Đồng thời, *matK* còn xác định được các loài Lan *Dendrobium*

ở Úc, dựa vào chỉ thị phân tử đã xác định các biến thể của một số nhóm Lan *Dendrobium* so với phương pháp nhận diện bằng hình thái [4]. Ngoài ra, ITS cũng là vùng được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về mức độ đa dạng của *Dendrobium* [5,6], đồng thời ITS có khả năng phân định tốt nhất (100%) so với các vùng khác [7]. Trong các nghiên cứu trong nước, vùng ITS được các nhà nghiên cứu ưu tiên lựa chọn cho việc phân định các loài *Dendrobium* của Việt Nam [8]. Từ những nghiên cứu trên, cho thấy khả năng phân định các loài thuộc chi *Dendrobium* của hai vùng trình tự ITS và *matK*. Tuy nhiên những nghiên cứu này chỉ dừng lại ở các loài *Dendrobium* của Úc, Thái Lan và Malaysia. Trong khu vực Việt Nam, Trần Duy Dương đã nghiên cứu về các nhóm Lan thuộc khu vực phía Bắc [9]. Từ đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với số lượng loài *Dendrobium* tại khu vực phía Nam.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu thí nghiệm

Mẫu lá của 30 mẫu Lan *Dendrobium* được đưa vào nghiên cứu. Các mẫu được thu từ hai nguồn: Nguồn thứ nhất là bộ sưu tập hoa Lan của Trung tâm CNSH, Tp. Hồ Chí



Minh. Nguồn thứ hai là mẫu thương mại được thu từ các vườn Lan.

2.2 Tách DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự hai vùng ITS và *matK*

DNA tổng số được tách bằng bộ kit Isolate II PLant DNA kit BIO-52069 (Bioline, USA). Các vùng trình tự trong nghiên cứu gồm ITS, *matK* tương ứng với các cặp mồi thể hiện trong Bảng 1. Các thành phần có trong phản ứng

khuếch đại trình tự ITS gồm 12,5 µL Taq DNA pol 2x – premix, 1 µL mồi xuôi (5 µM – 10 µM), 1 µL mồi ngược (5 µM – 1 µM), 1 µL DNA khuôn và thêm nước cho đủ 25 µL. DNA tổng số và sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung GelRed để soi huỳnh quang. Sản phẩm PCR sẽ được giải trình tự Sanger Sequencing hai chiều tại Công ti Macrogen, Seoul, Hàn Quốc.

Bảng 1 Trình tự mồi và các chu trình nhiệt cho các phản ứng khuếch đại của các vùng ITS, *matK*

Tên vùng trình tự	Primer	Chiều dài sản phẩm dự kiến	Chu trình nhiệt	Tham khảo
ITS	ITS1F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3')	800bp - 900bp	Tiền biên tính: 94 ⁰ C/3'' Biến tính: 94 ⁰ C/30'' Bắt mồi: 55 ⁰ C /40'' Kéo dài: 72 ⁰ C /1' Kết thúc: 72 ⁰ C/5'	[10,11]
	ITS4R (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')			
<i>matK</i>	390F (5'CGATCTATTCATTCAATATTTTC3')	800bp - 1100bp	Tiền biên tính: 94 ⁰ C/90'' Biến tính: 94 ⁰ C/1' Bắt mồi: 48 ⁰ C /40'' Kéo dài: 72 ⁰ C /1' Kết thúc: 72 ⁰ C/3''	[12]
	1326R (5'TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT3')			

2.3 Định danh loài và phân tích dữ liệu trình tự

Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm FinchTV [13], SeaView [14]. Kết quả giải trình tự 2 chiều được kiểm tra các sai lệch và kết hợp thành trình tự liên ứng (consensus sequence). Mỗi trình tự được so với trình tự tương đồng có sẵn trên cơ sở dữ liệu Genbank bằng công cụ BLAST để xác định loài của mẫu nghiên cứu. Đa dạng di truyền và mối quan hệ giữa các mẫu và loài được phân tích dựa vào cây phát sinh xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0, thuật toán Maximum likelihood, theo mô hình Kimura 2 - thông số, hệ số bootstrap 1.000 lần [15].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả thu mẫu

Nghiên cứu thu thập được 30 mẫu Lan *Dendrobium* thuộc 18 loài dự kiến và 2 thứ dưới loài *D. anosmum* var. *alba* và *D. venustum* (Bảng 2). Các mẫu được thu từ 2 nguồn: mẫu thu từ bộ sưu tập Lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh và các mẫu thu từ các vườn Lan thương mại ở khu vực phía Nam Việt Nam. Đối với mẫu thu từ Trung tâm, tên khoa học do Trung tâm định danh và ghi trên bảng thông tin mẫu. Đối với các mẫu thương mại, tên khoa học dự kiến của mỗi mẫu được suy ra từ định danh sơ bộ hình thái cây và theo tên gọi của vườn Lan.

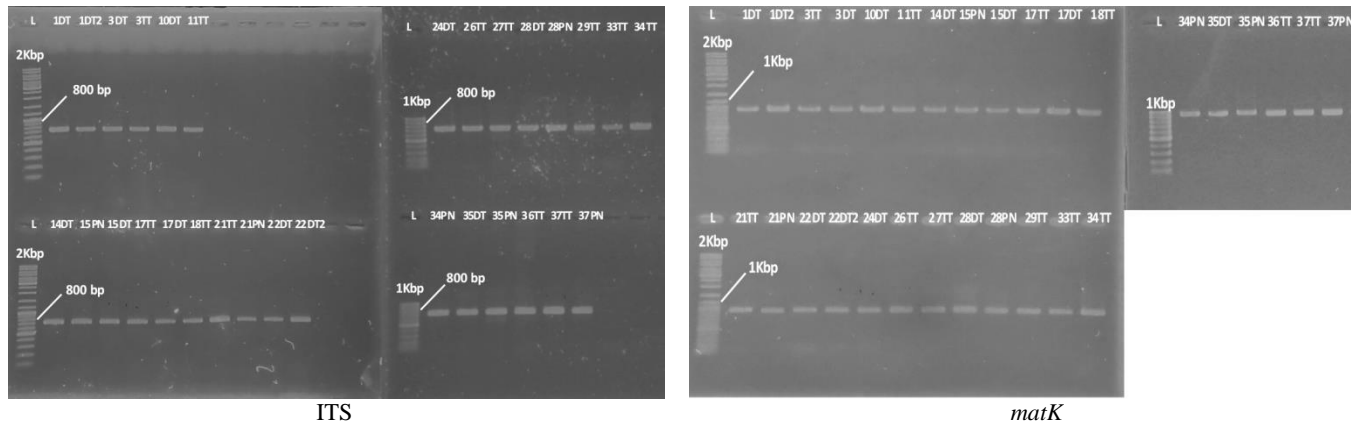
Bảng 2 Các mẫu Lan *Dendrobium* thu trong nghiên cứu

STT	Kí hiệu mẫu	Nơi thu mẫu	Tên địa phương	Tên khoa học dự kiến
1	1DT	Đức Trọng	Thủy tiên tím	<i>D.amabile</i>
2	1DT2	Đức Trọng	Thủy tiên tím	<i>D.amabile</i>
3	3TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Già hạc hè	<i>D. superbum</i>
4	3DT	Đức Trọng	Già hạc hè	<i>D. superbum</i>
5	10DT	Đức Trọng	Thái Bình	<i>D. pulchellum</i>
6	11TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Thủy tiên mỡ gà	<i>D. densiflorum</i>
7	14DT	Đức Trọng	Thủy tiên trắng	<i>D. farmeri</i>
8	15PN	Phú Nhuận	Già hạt xuân mới = Già hạt xuân Di Linh tím	<i>D. anosmum</i> var. <i>alba</i>
9	15DT	Đức Trọng	Già hạt xuân mới = Già hạt xuân Di Linh tím	<i>D. anosmum</i> var. <i>alba</i>
10	17TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Báo hi	<i>D. secundum</i>
11	17DT	Đức Trọng	Báo hi	<i>D. secundum</i>
12	18TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Xương cá	<i>D. aloifolium</i>
13	21TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Thập nhất hoa (Thập hoa trắng = Thập hoa tím)	<i>D. hercoglossum</i>
14	21PN	Phú Nhuận	Thập nhất hoa (Thập hoa trắng = Thập hoa tím)	<i>D. hercoglossum</i>

15	22DT	Đức Trọng	Long nhãn	<i>D. fimbriatum</i>
16	22DT2	Đức Trọng	Long nhãn	<i>D. fimbriatum</i>
17	24DT	Đức Trọng	Trúc đen	<i>D. salaccense</i>
18	26TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Trường Sơn xanh	<i>D. venustum</i>
19	27TT	Trung tâm CNSH	Già hạc xuân = Già hạc Hawaii	<i>D. anosmum</i>
20	28DT	Đức Trọng	Kim điệp vàng	<i>D. capillipes</i>
21	28PN	Phú Nhuận	Kim điệp vàng	<i>D. capillipes</i>
22	29TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Trường Sơn trắng	<i>D. venustum</i>
23	33TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Hồng liên	<i>D. linguella</i>
24	34TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Hoàng thảo tuyết mai	<i>D. crumenatum</i>
25	34PN	Phú Nhuận	Hoàng thảo tuyết mai	<i>D. crumenatum</i>
26	35DT	Đức Trọng	Hoàng thảo ngọc thạch	<i>D. crystallinum</i>
27	35PN	Phú Nhuận	Hoàng thảo ngọc thạch	<i>D. crystallinum</i>
28	36TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Hoàng thảo cong	<i>D. intricatum</i>
29	37TT	Trung tâm CNSH Tp.HCM	Hoàng thảo vôi	<i>D. cretaceum</i>
30	37PN	Phú Nhuận	Hoàng thảo vôi	<i>D. cretaceum</i>

3.2 Kết quả khuếch đại, giải và hiệu chỉnh trình tự DNA tổng số tách chiết từ 30 mẫu lá được sử dụng làm khuôn để khuếch đại 2 vùng trình tự ITS và *matK*. Cả 2 vùng trình tự đều được khuếch đại thành công trên tất cả mẫu nghiên cứu; hiển thị khi điện di với băng sản phẩm

PCR sáng, rõ và không bị đa băng. Vùng ITS cho sản phẩm khuếch đại có chiều dài 700 – 800 bp, kích thước vùng *matK* ở vị trí khoảng 900 – 1.000 bp (Hình 1). Như vậy các sản phẩm PCR thu được đều có kích thước khuếch đại đúng với dự kiến (Bảng 1).



Hình 1 Kết quả điện di sản phẩm PCR của vùng ITS và *matK*

Với L: thang DNA, 1DT-1DT2: *D. amabile*, 3DT-3TT: *D. superbum*, 10DT: *D. pulchellum*, 11TT: *D. densiflorum*, 14DT: *D. farmeri*, 15PN-15DT: *D. anosmum* var. *alba*, 17TT-17DT: *D. secundum*, 18TT: *D. aloifolium*, 21TT-21PN: *D. hercoglossum*, 22DT-22DT2: *D. fimbriatum*, 24DT: *D. salaccense*, 26TT-29TT: *D. venustum*, 27TT: *D. anosmum*, 28DT-28PN: *D. capillipes*, 33TT: *D. linguella*, 34TT-34PN: *D. crumenatum*, 35DT-35PN: *D. crystallinum*, 36TT: *D. intricatum*, 37TT-37PN: *D. cretaceum*

Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự 2 chiều tại Công ty Macrogen, Hàn Quốc. Tỷ lệ giải trình tự thành công ở tất cả các vùng trình tự là 100% (Bảng 3). Dữ liệu trình tự được hiệu chỉnh bằng cách loại bỏ 2 đầu bị nhiễu và kiểm tra độ

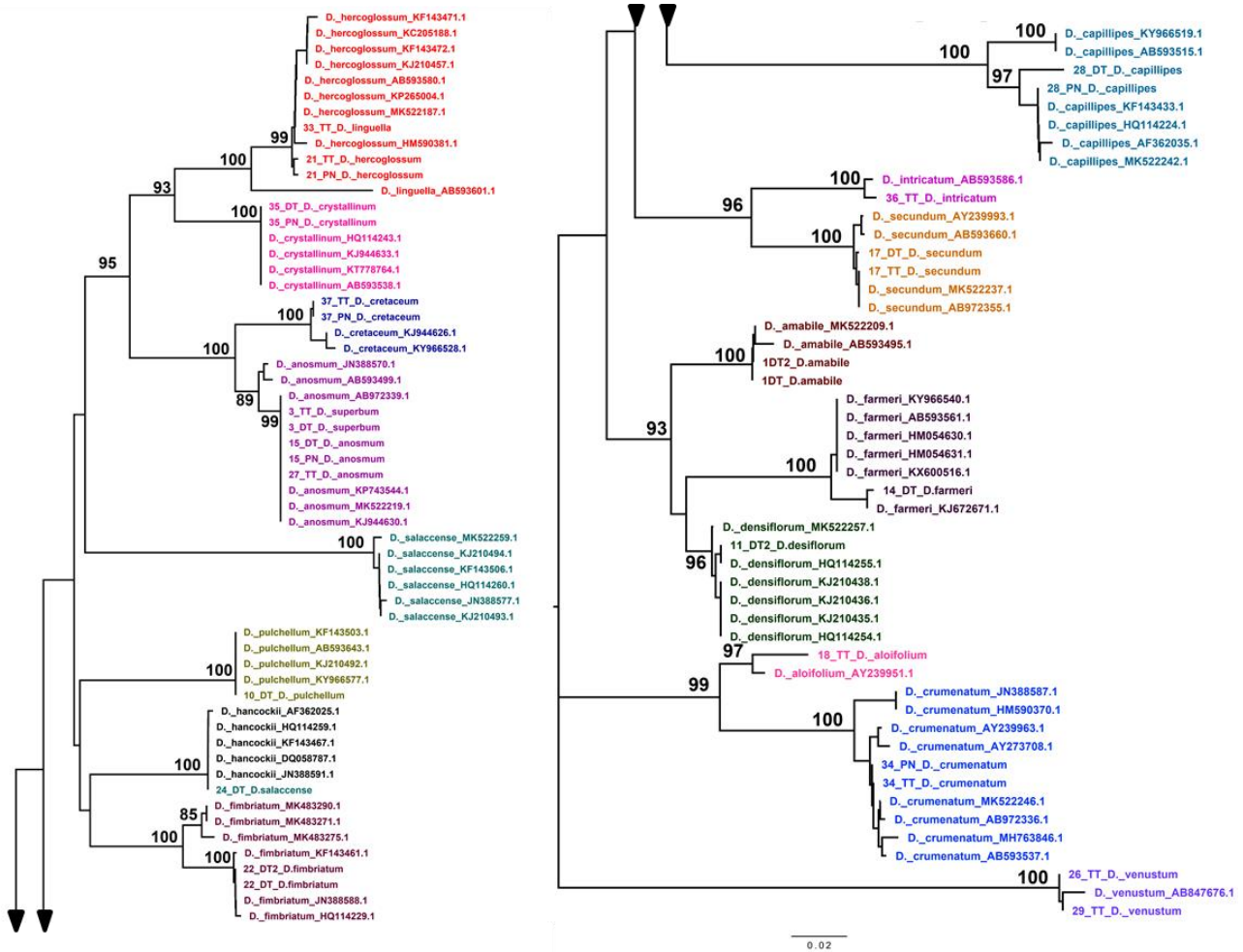
tin cậy bằng phần mềm FinchTV. Mỗi cặp trình tự 2 chiều của cùng một trình tự được hợp thành 1 trình tự thống nhất (consensus sequence) bằng phần mềm Seaview 4.0, được sử dụng cho các phân tích trình tự tiếp theo.

Bảng 3 Kết quả khuếch đại và giải trình tự 2 vùng trình tự ITS và *matK* trên các mẫu lan trong nghiên cứu

Vùng trình tự	PCR	Tỷ lệ PCR (%)	Giải trình tự	Tỷ lệ giải trình tự (%)
ITS	30/30	100.00	30/30	100.00
<i>matK</i>	30/30	100.00	30/30	100.00

3.3 Kết quả phân tích đa dạng di truyền các loài *Dendrobium* Trình tự liên ứng (consensus sequence) của mỗi mẫu được so với trình tự tương đồng của Lan *Dendrobium* trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng chương trình BLAST để xác định mức

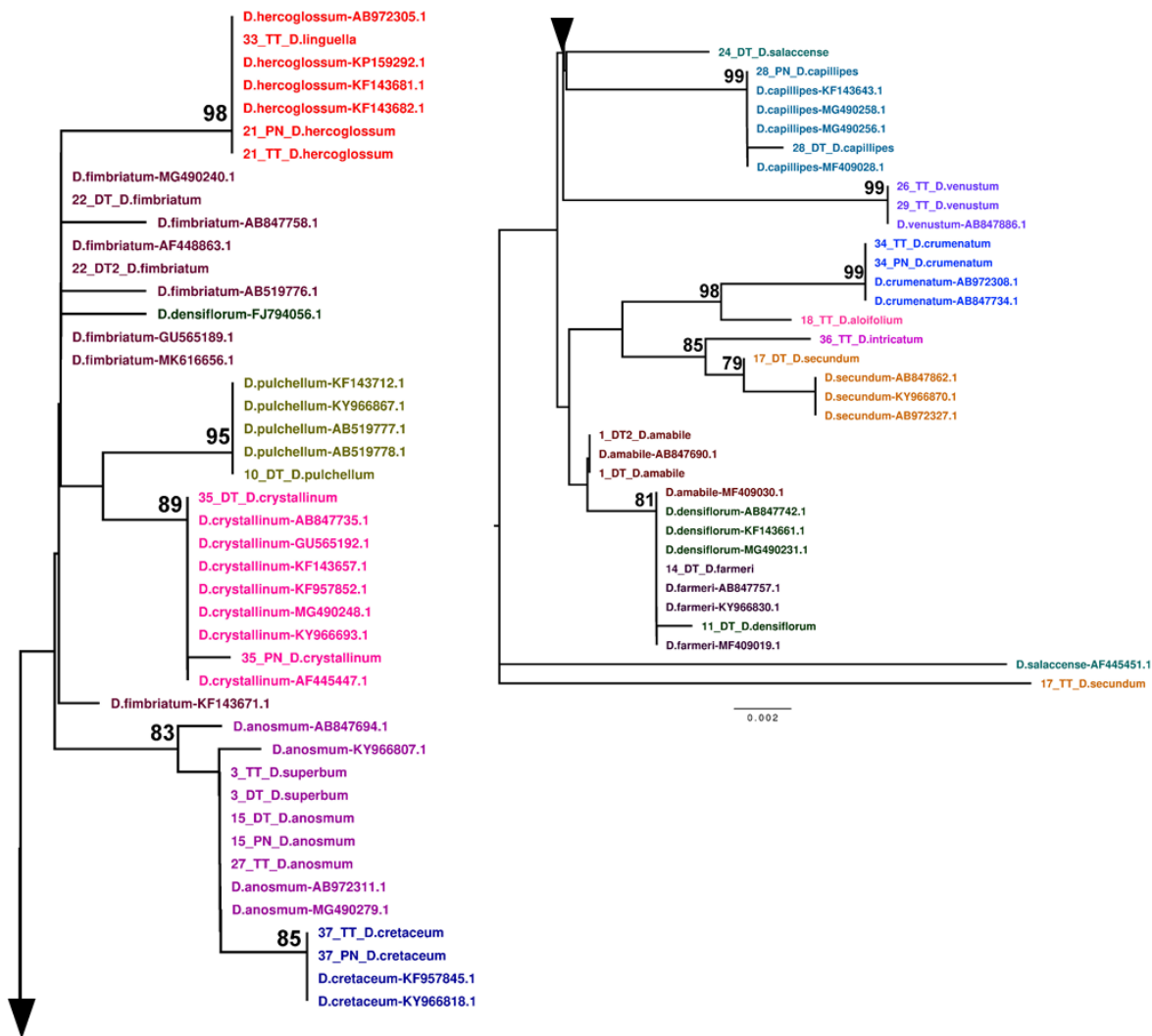
độ tương đồng và đánh giá sơ bộ định danh mẫu. Loài được phân loại rõ ràng trên cây phát sinh khi các mẫu của loài đó nằm chung với nhau trên một nhánh và chung với các trình tự GenBank của cùng loài.



Hình 2 Cây phát sinh 30 mẫu trình tự được xây dựng bằng trình tự ITS

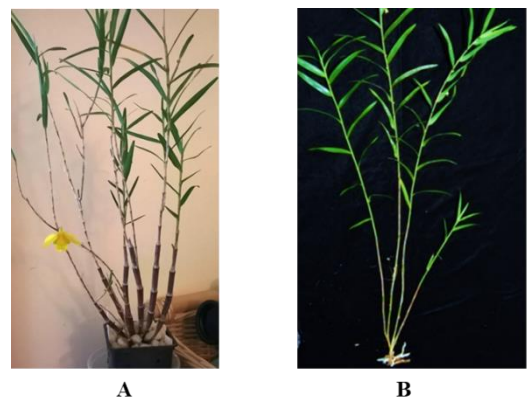
Trên cây ITS, 13 loài *D. aloifolium*, *D. amabile*, *D. capillipes*, *D. cretaceum*, *D. crumenatum*, *D. crystallinum*, *D. densiflorum*, *D. farmeri*, *D. intricatum*, *D. secundum*, *D. fimbriatum*, *D. pulchellum* và *D. venustum* được phân định rõ ràng (Hình 2). Riêng các mẫu của loài *D. superbum* lại nằm chung với *D. anosmum* trên cùng một nhánh và các mẫu của *D. hercoglossum* nằm chung với *D. linguella*. Qua nghiên cứu các tài liệu phân loại hình thái Lan, được biết *D.*

superbum là tên đồng danh của *D. Anosmum* [16]. Tương tự *D. hercoglossum* và *D. linguella* là 2 tên đồng danh của cùng một loài [17]. Vì vậy, việc 2 loài đồng danh nằm trên cùng một nhánh phát sinh là hoàn toàn hợp lý và bởi vì các mẫu này không bị nằm lẫn trên nhánh nào khác (monophyletic) nên 2 loài *D. anosmum* và *D. hercoglossum* được xem là phân định rõ ràng với các loài còn lại (Hình 2).



Hình 3 Cây phát sinh 30 mẫu trình tự được xây dựng bằng trình tự *matK*

Đáng chú ý, trên cả hai cây phát sinh ITS và *matK*, mẫu *D. salaccense* 24DT nằm tách biệt với các trình tự cùng loài *D. salaccense* từ GenBank (JN388577.1, KJ210494.1, KF143506.1, HQ114260.1, MK522259.1 và KJ210493.1). Để kiểm tra sự khác biệt này, chúng tôi tìm trình tự tương đồng của mẫu 24DT từ GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả cho thấy trình tự của mẫu 24DT tương đồng với *D. hancockii* 99,71% dựa vào dữ liệu ITS và 100% dựa vào dữ liệu *matK* (Hình 5-6). Kết quả này cho thấy mẫu 24DT đã được định danh khoa học chưa chính xác. Việc này có thể lí giải được là do 2 loài này có cùng tên tiếng Việt là “Hoàng thảo trúc” và hình thái cây khi không có hoa cũng khá giống nhau dẫn đến sự nhầm lẫn (Hình 4). Từ kết quả này, tên khoa học của mẫu 24DT được sửa thành *D. hancockii* (Lan Hoàng thảo trúc đen) (Bảng 4).



Hình 4 Hình thái thân và lá của 2 loài *D. hancockii* và loài *D. salaccense* giống nhau

Với A: *D. hancockii* (nguồn <https://www.reddit.com/r/orchids>),
B: *D. salaccense* (nguồn <http://tropical.theferns.info>)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Dendrobium hancockii voucher 24DT internal transcribed spacer 1, partial sequ	1131	1131	100%	0.0	100.00%	MT004891.1
Dendrobium hancockii isolate_TKM2014DB01 18S ribosomal RNA gene, partial	1123	1123	100%	0.0	99.84%	KP159297.1
Dendrobium hancockii voucher Jin X-H 13492 18S ribosomal RNA gene, partial	1123	1123	100%	0.0	99.84%	KF143467.1
Dendrobium hancockii isolate_D25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: j	1123	1123	100%	0.0	99.84%	JN388591.1
Dendrobium hancockii voucher PS2533MT01 18S ribosomal RNA gene, partial	1123	1123	100%	0.0	99.84%	HQ114259.1
Dendrobium hancockii genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rR	1123	1123	100%	0.0	99.84%	AB593575.1

Hình 5 Kết quả BLAST trình tự ITS mẫu 24DT tương đồng với *D. hancockii*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Dendrobium hancockii voucher 24DT maturase K (matK) gene, partial cds: chl	1506	1506	100%	0.0	100.00%	MT019433.1
Dendrobium pendulum voucher Jin X-H s.n. 6 tRNA-Lys (trnK) gene, partial se	1506	1506	100%	0.0	100.00%	KF143705.1
Dendrobium hancockii voucher Jin X-H 13492 tRNA-Lys (trnK) gene, partial se	1506	1506	100%	0.0	100.00%	KF143677.1
Dendrobium hancockii isolate vmt35 maturase K (matK) gene, partial cds: chl	1500	1500	100%	0.0	99.88%	MG490241.1
Dendrobium hainanense isolate vmt33 maturase K (matK) gene, partial cds: ch	1500	1500	100%	0.0	99.88%	MG490239.1
Dendrobium hancockii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, bio_r	1500	1500	100%	0.0	99.88%	AB847771.1

Hình 6 Kết quả BLAST trình tự matK mẫu 24DT tương đồng với *D. hancockii*

Hai mẫu 15DT và 15PN là biến thể hoa trắng của loài *D. anosmum*, được định danh tên khoa học *D. anosmum* var. *alba* là một thứ dưới loài và nằm cùng nhánh với các mẫu loài *D. anosmum*. Như vậy, tuy không phân định được ở mức độ dưới loài, cây phát sinh ITS vẫn nhận diện được 2 mẫu này là loài *D. anosmum*. Như vậy cây ITS nhận diện đa dạng được tất cả các mẫu, thuộc 16 loài *Dendrobium*.

Trong khi đó, cây phát sinh loài dựa vào trình tự *matK* chỉ nhận diện được 10 loài, gồm *D. pulchellum*, *D. crystallinum*, *D. venustum*, *D. intricatum*, *D. cretaceum*, *D. crumenatum*, *D. hercoglossum* (đồng danh *D. linguella*), *D. anosmum* (đồng danh *D. superbum*), *D. capillipes* và *D. aloifolium* (Hình 3). 6 loài còn lại *D. fimbriatum*, *D. densiflorum*, *D. amabile*, *D. farmeri*, *D. secundum* và *D. salaccense* bị nằm lẫn với loài khác trên các nhánh khác nhau của cây phát sinh (hiện tượng paraphyletic) nên không phân định được.

Bảng 4 Kết quả định danh đa dạng loài *Dendrobium* trong nghiên cứu

Kí hiệu mẫu	Tên khoa học dự kiến	Tên khoa học chính xác
1DT	<i>D. amabile</i>	<i>D. amabile</i>
1DT2	<i>D. amabile</i>	<i>D. amabile</i>
3TT	<i>D. superbum</i>	<i>D. superbum</i> (đồng danh với <i>D. anosmum</i>)
3DT	<i>D. superbum</i>	<i>D. superbum</i> (đồng danh với <i>D. anosmum</i>)
10DT	<i>D. pulchellum</i>	<i>D. pulchellum</i>
11TT	<i>D. densiflorum</i>	<i>D. densiflorum</i>
14DT	<i>D. farmeri</i>	<i>D. farmeri</i>
15PN	<i>D. anosmum</i> var. <i>alba</i>	<i>D. anosmum</i> var. <i>alba</i>
15DT	<i>D. anosmum</i> var. <i>alba</i>	<i>D. anosmum</i> var. <i>alba</i>
17TT	<i>D. secundum</i>	<i>D. secundum</i>
17DT	<i>D. secundum</i>	<i>D. secundum</i>
18TT	<i>D. aloifolium</i>	<i>D. aloifolium</i>
21TT	<i>D. hercoglossum</i>	<i>D. hercoglossum</i> (đồng danh với <i>D. linguella</i>)
21PN	<i>D. hercoglossum</i>	<i>D. hercoglossum</i> (đồng danh với <i>D. linguella</i>)

22DT	<i>D. fimbriatum</i>	<i>D. fimbriatum</i>
22DT2	<i>D. fimbriatum</i>	<i>D. fimbriatum</i>
24DT	<i>D. salaccense</i>	→ <i>D. hancockii</i>
26TT	<i>D. venustum</i>	<i>D. venustum</i>
27TT	<i>D. anosmum</i>	<i>D. anosmum</i> (đồng danh với <i>D. superbum</i>)
28DT	<i>D. capillipes</i>	<i>D. capillipes</i>
28PN	<i>D. capillipes</i>	<i>D. capillipes</i>
29TT	<i>D. venustum</i>	<i>D. venustum</i>
33TT	<i>D. linguella</i>	<i>D. linguella</i> (đồng danh với <i>D. hercoglossum</i>)
34TT	<i>D. crumenatum</i>	<i>D. crumenatum</i>
34PN	<i>D. crumenatum</i>	<i>D. crumenatum</i>
35DT	<i>D. crystallinum</i>	<i>D. crystallinum</i>
35PN	<i>D. crystallinum</i>	<i>D. crystallinum</i>
36TT	<i>D. intricatum</i>	<i>D. intricatum</i>
37TT	<i>D. cretaceum</i>	<i>D. cretaceum</i>
37PN	<i>D. cretaceum</i>	<i>D. cretaceum</i>
30 mẫu		16 loài

4 Thảo luận

ITS cũng đã được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây về việc xác định các loài *Dendrobium*, trong đó một số nghiên cứu tập trung vào các loài được liệt kê để phân biệt thảo dược và các chất ngoại lai của nó [18,19]. Tại Trung Quốc, Hongmei Liu và cộng sự (2019) sử dụng vùng ITS nhận diện được 15 trong số 43 loài *Dendrobium* hoang dã và trồng trọt [19]. Cũng trên ITS, Kornsorn Srikulnath và cộng sự đã phân định được 27/27 loài *Dendrobium* tại Thái Lan [20] và nhiều nghiên cứu khác thì ITS được sử dụng phổ biến nhất cho việc phân định về nhận diện loài Lan *Dendrobium* [5,21].

Năm 2018, Trần Duy Dương và các cộng sự đã thu thập các mẫu *Dendrobium* Việt Nam với nhiều loài thuộc khu vực Bắc bộ Việt Nam. Trong đó, tác giả cũng sử dụng vùng trình tự ITS và phân định được 19 trên tổng số 23 loài *Dendrobium* nghiên cứu, tỉ lệ phân định 82,61% [9]. Trong nghiên cứu này, 16 loài được thu thập chủ yếu từ các khu vực phía Nam. Tất cả loài nghiên cứu đều được phân định rõ ràng dựa trên dữ liệu ITS và cả 16 loài này đều được thảo luận mới, chưa có trong nghiên cứu trước đó của Trần Duy Dương và cộng sự (2018). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không mâu thuẫn với công bố của Trần Duy Dương (2018) mà bổ sung bộ dữ liệu cho

nhau và đóng góp đáng kể vào thư viện trình tự đa dạng *Dendrobium* bản địa Việt Nam.

5 Kết luận

Vùng ITS có mức độ đa dạng di truyền cao nhất trong 2 vùng được khảo sát, do đó có tiềm năng nhất để đánh giá sự đa dạng di truyền và xác định các loài *Dendrobium* ở phía Nam Việt Nam. Kết quả nghiên cứu một lần nữa khẳng định ảnh hưởng của ITS trong việc đánh giá sự đa dạng di truyền và việc xác định các loài *Dendrobium* không chỉ ở phía Nam Việt Nam mà còn ở các môi trường sống khác.

Trong nghiên cứu này, 30 mẫu *Dendrobium* được phân loại về 16 loài và 2 thứ dưới loài. *D. superbum* là đồng danh của *D. anosmum* và *D. hercoglossum* là đồng danh của *D. linguella*. Mẫu DT24 đã được xác định lại tên khoa học là *D. hancockii*. Dữ liệu của 12 mẫu thu từ Trung tâm Công nghệ Sinh học được phản hồi về tên khoa học chính xác dựa vào định danh phân tử. Dữ liệu trình tự *Dendrobium* trong nghiên cứu này góp phần vào bộ dữ liệu trong thư viện trình tự *Dendrobium* của Việt Nam và thế giới.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.99/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. I. J. Leitch, I. Kahandawala, J. Suda, L. Hanson, M. J. Ingrouille, M. W. Chase, M. F. Fay, *Genome size diversity in orchids: consequences and evolution*, *Annals of botany* 104 (2009) 469.
2. Trần Hợp, *Phong lan Việt Nam*, Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà Nội, 1998.
3. H. Asahina, J. Shinozaki, K. Masuda, Y. Morimitsu, M. Satake, *Identification of medicinal Dendrobium species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences*, *Journal of natural medicines* 64 (2010).
4. T. Yukawa, K. Kita, T. Handa, *DNA phylogeny and morphological diversification of Australian Dendrobium (Orchidaceae)*, *Monocots: systematics and evolution*. Collingwood: CSIRO (2000) 465.
5. D. Li, Z. Li, P. Mao, X. Yan, Z. Chun, X. Ma, *Phylogenetic analysis and identification of Dendrobium species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequence*, *Acta Horticulturae Sinica* 39 (2012).
6. S. Peyachoknagul, C. Mongkolsiriwatana, S. Wannapinpong, P. S. Huehne, K. Srikulnath, *Identification of native Dendrobium species in Thailand by PCR-RFLP of rDNA-ITS and chloroplast DNA*, *ScienceAsia* 40 (2014) 113.
7. H. K. Singh, I. Parveen, S. Raghuvanshi, S. B. Babbar, *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 research notes* 5 (2012) 42.
8. Trần Duy Dương, *Nghiên cứu đa dạng di truyền và xác định chỉ thị nhận dạng một số nguồn gen hoa lan Hoàng Thảo (Dendrobium) bản địa của Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ nông nghiệp (2015)
9. T. D. Duong, K. H. Trung, T. Nghia, N. Thuy, P. Hien, N. Khoa, T. Dung, D. Trung, T. Khanh, *Identification of Vietnamese native Dendrobium Species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence*, *Adv. Stud. Biol* 10 (2018) 1.
10. M. Waud, P. Busschaert, S. Ruyters, H. Jacquemyn, B. Lievens, *Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing*, *Molecular Ecology Resources* 14 (2014) 679.
11. Nguyễn Như Hoa, *Phân tích trình tự vùng ITS của một số loài Hoàng thảo thủy tiên*, Tạp chí Khoa học - Đại học Sư phạm 15 (2018).
12. T. Kyndt, B. Van Droogenbroeck, E. Romeijn-Peeters, J. P. Romero-Motochi, X. Scheldeman, P. Goetghebeur, P. Van Damme, G. Gheysen, *Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data*, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37 (2005) 442.
13. Geospiza Inc. FinchTV. (2015); Internet: Available at: <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>.
14. M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel, *SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building*, *Molecular biology and evolution* 27 (2010) 221.
15. Kumar S, Stecher G, Tamura K, *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets*, *Molecular Biology and Evolution* 33 (2016) 1870.
16. Bùi Xuân Đáng. *Lan rừng Việt Nam: Dendrobium*. Truy cập tại: http://www.hoalanvietnam.org/6B1_lrvnaz/lrvnd/lan-rung-vn-Dendrobium-ac.html.
17. UNEP-WCMC. *Checklist of CITES species*. Truy cập tại: <http://checklist.cites.org>.
18. H. Wang, L. Shi, J. Zhou, G. Zhu, *DNA barcoding identification of Dendrobium huoshanense and its adulterants*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 43 (2018) 4055.
19. H. Liu, C. Fang, T. Zhang, L. Guo, Q. Ye, *Molecular authentication and differentiation of Dendrobium species by rDNA ITS region sequence analysis*, *AMB Express* 9 (2019).
20. K. Srikulnath, S. Sawasdichai, T. K. Jantapanon, P. Pongtongkam, S. Peyachoknagul, *Phylogenetic relationship of Dendrobium species in Thailand inferred from chloroplast matK gene and nuclear rDNA ITS region*, *The Horticulture Journal* (2015).
21. X. Wang, X. Chen, P. Yang, L. Wang, J. Han, *Barcoding the Dendrobium (Orchidaceae) species and analysis of the intragenomic variation based on the internal transcribed spacer 2*, *BioMed research international* 2017 (2017).

Evaluation of genetic diversity of some *Dendrobium* orchids in Southern Vietnam

Ngoc-Diep Le¹, Thanh-Diem Nguyen¹, Nhu-Hoa Nguyen², Hoang-Dung Tran¹, Huyen-Trang Vu^{1,*}

¹Faculty of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

²Faculty of Biology, Ho Chi Minh City University of Education

vthtrang@ntt.edu.vn

Abstract *Dendrobium* is the genus with large number of species and diversity in morphology and colors. In Vietnam, there are about 107 *Dendrobium* species, widely distributed in mountainous areas from North to South and even on some coastal islands. Due to this diversity, morphological recognition of *Dendrobium* taxa is still in challenges and misidentified among species. Because of that, diversity assessment based on molecular genetic features will help with the conservation of the species, management of seed breeding, and serving hybridization for creating new valuable variations. In this study, we conducted a genetic diversity survey of 30 *Dendrobium* samples in Southern Vietnam. The results identified the exact scientific names of 16 over 16 species using ITS and 10 over 16 species using *matK*. ITS gave higher resolution in comparison with *matK*. Hence this locus was recommended as a potential marker for the identification of *Dendrobium* species. This study also contributes to the identification, selection and breeding of new varieties of *Dendrobium* species in Vietnam.

Keywords *Dendrobium*, ITS, *matK*, genetic diversity