

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT**

**VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM**

-----

**NGUYỄN NHƯ HOA**

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU TRÌNH TỰ GEN  
ĐỂ NHẬN DIỆN NHANH VÀ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ ĐA DẠNG  
CỦA NHÓM LAN *DENDROBIUM* KHU VỰC PHÍA NAM**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS Dương Hoa Xô
2. TS. Trần Kim Định

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2021

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT**

**VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM**

-----

**NGUYỄN NHƯ HOA**

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CƠ SỞ DỮ LIỆU TRÌNH TỰ GEN  
ĐỂ NHẬN DIỆN NHANH VÀ XÁC ĐỊNH MỨC ĐỘ ĐA DẠNG CỦA  
NHÓM LAN *DENDROBIUM* KHU VỰC PHÍA NAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

Tp. Hồ Chí Minh – Năm 2021

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Dương Hoa Xô và TS. Trần Kim Định. Các số liệu kết quả được trình bày trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong công trình nào của người khác. Các kết quả cũng đã được những người tham gia thực hiện đồng ý cho phép tôi sử dụng trong luận án. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu kết quả trong luận án này.

*Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 20 tháng 2 năm 2020*

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Như Hoa

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành quá trình học tập và nghiên cứu của mình, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ từ gia đình, thầy cô, đồng nghiệp, bạn bè và sự ủng hộ, tạo điều kiện của các cơ quan và tổ chức.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Dương Hoa Xô - Giám đốc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh - thầy hướng dẫn chính luận án, đã truyền đạt ý tưởng, định hướng nghiên cứu, cũng như kiến thức và kinh nghiệm cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến TS. Trần Kim Định - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam - thầy hướng dẫn phụ, đã hướng dẫn, truyền đạt kiến thức và đóng góp nhiều ý kiến quý báu trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS. TS. Trần Hoàng Dũng đã giúp tôi tiếp cận với hướng nghiên cứu này, luôn góp ý, giúp đỡ, động viên, khích lệ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin cảm ơn TS. Huỳnh Hữu Đức đã luôn theo sát, động viên và đưa ra nhiều góp ý trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn đến:

- Ban Giám hiệu trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh, Ban chủ nhiệm khoa Sinh học trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh và các đồng nghiệp, sinh viên đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu, cũng như công tác tại trường.

- Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh, phòng Thực nghiệm cây trồng, phòng Công nghệ sinh học thực vật, TS. Hà Thị Loan, KS. Nguyễn Trường Giang đã hỗ trợ về mẫu vật, trang thiết bị, hoá chất... trong quá trình nghiên cứu của tôi tại Trung tâm.

- Ban lãnh đạo Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam đã hết sức giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

- Các cán bộ ở Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam đã hướng dẫn, góp ý, bổ sung kiến thức cũng như tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành các thủ tục, hồ sơ trong quá trình đào tạo.

- GS. TS. Bùi Chí Bửu và tất cả quý thầy cô (giảng dạy và tham gia Hội đồng báo cáo tiến độ, Hội đồng đánh giá nghiên cứu sinh) đã truyền đạt kiến thức, đóng góp nhiều ý kiến quý báu và tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

- TS. Trần Duy Dương (Viện Di truyền nông nghiệp), Th.S Vũ Thị Huyền Trang, Th.S Nguyễn Thành Công, CN Nguyễn Thanh Điềm, CN. Lê Ngọc Điệp (khoa Công nghệ sinh học Trường đại học Nguyễn Tất Thành) đã hỗ trợ tôi rất nhiều để hoàn thành luận án này.

- Quý thầy cô giáo đã giảng dạy và truyền đạt kiến thức cho tôi qua các giai đoạn học tập, các anh chị em đồng nghiệp và bạn bè thân hữu đã cùng cộng tác và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập, làm việc và nghiên cứu.

- Các nghệ nhân và nhà vườn trồng lan đã giúp đỡ tạo điều kiện tối đa cho tôi trong quá trình thu mẫu.

Cuối cùng, xin gửi lời tri ân sâu sắc và những tình cảm ấm áp nhất đến Bố, Mẹ và tất cả những người thân yêu trong gia đình đã hết lòng động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình trưởng thành, học tập và nghiên cứu.

## MỤC LỤC

	Trang
<b>LỜI CAM ĐOAN .....</b>	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN .....</b>	<b>ii</b>
<b>MỤC LỤC.....</b>	<b>iv</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>vii</b>
<b>DANH MỤC BẢNG.....</b>	<b>x</b>
<b>DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>xi</b>
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
1. Tính cấp thiết của đề tài .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	4
2.1 Mục tiêu chung.....	4
2.2 Mục tiêu cụ thể.....	4
3.. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn.....	4
3.1 Ý nghĩa khoa học .....	4
3.2 Ý nghĩa thực tiễn .....	4
4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	4
4.1 Đối tượng nghiên cứu .....	4
4.2 Phạm vi nghiên cứu.....	5
5. Những đóng góp mới của đề tài .....	5
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI.....</b>	<b>6</b>
1.1 Giới thiệu về họ Phong lan.....	6
1.2 Giới thiệu về lan <i>Dendrobium</i> .....	7
1.2.1 Vị trí phân loại .....	7
1.2.2 Sự phân bố.....	8

1.2.3 Sự đa dạng và phong phú của lan <i>Dendrobium</i> .....	9
1.2.4 Đặc điểm hình thái lan <i>Dendrobium</i> .....	13
1.3 Thực trạng bảo tồn, nhận diện các giống loài lan <i>Dendrobium</i> ở Việt Nam và trên thế giới.....	16
1.4 Một số nghiên cứu đa dạng di truyền ở chi lan <i>Dendrobium</i> .....	20
1.4.1 Các chỉ thị được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền ở chi lan <i>Dendrobium</i> .....	20
1.4.2 Các nghiên cứu đa dạng di truyền ở chi lan <i>Dendrobium</i> .....	22
1.5 Mã vạch DNA và ứng dụng trong nhận diện loài .....	27
1.5.1 Các vùng trình tự được sử dụng để xây dựng mã vạch DNA.....	27
1.5.2 Các công trình xây dựng mã vạch DNA cho họ Lan và chi <i>Dendrobium</i> .....	32
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>44</b>
2.1 Vật liệu .....	44
2.2 Nội dung nghiên cứu .....	50
2.3 Thời gian, địa điểm nghiên cứu .....	51
2.4 Hoá chất – thiết bị .....	52
2.4.1 Hoá chất .....	52
2.4.2 Thiết bị .....	52
2.5 Phương pháp nghiên cứu.....	52
2.5.1 Hệ thống hóa mẫu vật dựa trên đặc điểm hình thái .....	52
2.5.2 Xác định trình tự của 5 vùng DNA marker.....	54
2.5.3 Phân tích mức độ đa dạng di truyền của nhóm lan <i>Dendrobium</i> bằng trình tự DNA marker .....	62
2.5.4 Phân tích khả năng phân định loài của các vùng trình tự .....	64
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>66</b>

3.1 Mô tả và xây dựng cây phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái các giống lan <i>Dendrobium</i> .....	66
3.1.1 Mô tả đặc điểm hình thái sơ bộ các giống lan <i>Dendrobium</i> .....	66
3.1.2 Phân nhóm dựa vào đặc điểm hình thái của 40 mẫu lan <i>Dendrobium</i> .....	69
3.2 Xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA cho 25 loài <i>Dendrobium</i> trong nghiên cứu .....	72
3.3 Kết quả khảo sát các marker tiềm năng trong việc xác định các loài lan <i>Dendrobium</i> khu vực phía Nam.....	103
3.4 Ứng dụng hệ thống DNA để khảo sát khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ của các tổ hợp lan lai.....	108
3.4.1 Phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ dựa trên trình tự vùng ITS.....	108
3.4.2 Phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ dựa trên trình tự vùng <i>matK</i> .....	110
3.4.3 Phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ dựa trên trình tự vùng <i>trnH-psbA</i> .....	112
<b>KẾT LUẬN – ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>114</b>
Kết luận .....	114
Đề nghị.....	115
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>116</b>
<b>CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>128</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>PL-1</b>



## DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1 Các vùng hệ thực vật được chấp nhận để mô tả sự phân bố lan trong bảng trích yếu .....	9
Hình 1.2. Các dạng thân chính của lan <i>Dendrobium</i> .....	10
Hình 1.3 Các nhóm lan <i>Dendrobium</i> .....	11
Hình 1.4 Đặc điểm rễ, thân, giả hành, lá, hoa, quả và hạt ở chi lan <i>Dendrobium</i> .....	15
Hình 1.5 Cấu trúc vùng ITS của <i>Dendrobium</i> .....	31
Hình 2.1 Quy trình thực hiện các nội dung nghiên cứu .....	51
Hình 2.2 Quá trình hiệu chỉnh trình tự giải bằng môi xuôi trên SeaView .....	59
Hình 2.3 Quá trình hiệu chỉnh trình tự giải bằng môi ngược trên SeaView ...	59
Hình 2.4 Quá trình thống nhất 2 trình tự trên SeaView .....	60
Hình 2.5 Giao diện trang chủ NCBI .....	60
Hình 2.6 Giao diện BLAST .....	61
Hình 3.1 Kết quả giải phẫu và ghi nhận hình ảnh 2 mẫu giống <i>Dendrobium</i> : <i>D. anosmum</i> và <i>D. findlayanum</i> .....	68
Hình 3.2 Cây phân nhóm dựa trên 72 đặc điểm hình thái của 40 mẫu giống lan <i>Dendrobium</i> .....	69
Hình 3.3 Kết quả PCR khuếch đại vùng <i>rbcL</i> với cặp mồi aF/aR.....	72
Hình 3.4 Kết quả PCR khuếch đại vùng <i>matK</i> với cặp mồi <i>matK390F/ 1326R</i> . .....	73
Hình 3.5 Kết quả PCR khuếch đại vùng <i>trnH-psbA</i> với cặp mồi <i>trnH-psbA F/ trnH-psbA R</i> .....	74
Hình 3.6 Kết quả PCR khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1F/ITS4R. ....	74
Hình 3.7 Kết quả so sánh trình tự vùng <i>rbcL</i> của mẫu 26TT ( <i>D. venustum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank .....	78
Hình 3.8 Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 13TT ( <i>D. chrysotoxum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	79

Hình 3.9 Kết quả so sánh trình tự vùng <i>matK</i> của mẫu 13TT ( <i>D. chrysotoxum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	79
Hình 3.10 Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 14DT ( <i>D. farmeri</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	80
Hình 3.11 Kết quả so sánh trình tự vùng <i>matK</i> của mẫu 14DT ( <i>D. farmeri</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	80
Hình 3.12 Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 6DT ( <i>D. anosmum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	81
Hình 3.13 Kết quả so sánh trình tự vùng <i>matK</i> của mẫu 6DT ( <i>D. anosmum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	81
Hình 3.14 Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 28TT ( <i>D. primulinum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	81
Hình 3.15 Kết quả so sánh trình tự vùng <i>matK</i> của mẫu 28TT ( <i>D. primulinum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	82
Hình 3.16 Kết quả so sánh trình tự vùng <i>trnH-psbA</i> của mẫu 6TT ( <i>D. anosmum</i> ) với cơ sở dữ liệu GenBank.....	82
Hình 3.17 Kết quả align 9 trình tự vùng <i>rbcL</i> của các loài <i>D. crystallinum</i> ,...	83
Hình 3.18 Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự vùng <i>rbcL</i> của các loài <i>D. crystallinum</i> , <i>D. pulchellum</i> và <i>D. signatum</i> trong nghiên cứu. ....	84
Hình 3.19 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng <i>rbcL</i> của 36 mẫu lan <i>Dendrobium</i> nghiên cứu và 90 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood .....	85
Hình 3.20 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng <i>matK</i> của 69 mẫu lan <i>Dendrobium</i> nghiên cứu và 91 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood .....	87
Hình 3.21 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng <i>trnH-psbA</i> của 58 mẫu lan <i>Dendrobium</i> nghiên cứu và 13 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood .....	90

Hình 3.22 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS của 71 mẫu lan <i>Dendrobium</i> nghiên cứu và 95 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood .....	92
Hình 3.23 Kết quả so sánh trình tự vùng ITS, <i>matK</i> của mẫu <i>D. salaccense</i> (24DT) với cơ sở dữ liệu.....	94
Hình 3.24 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS2 của 71 mẫu lan <i>Dendrobium</i> nghiên cứu và 95 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood .....	98
Hình 3.25 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ghép ITS- <i>rbcL</i> - <i>matK</i> - <i>trnH</i> - <i>psbA</i> của các mẫu lan <i>Dendrobium</i> nghiên cứu với thuật toán Maximum Likelihood .....	102
Hình 3.26 Vị trí In-del của <i>D. cretaceum</i> và <i>D. primulinum</i> trên vùng ITS..	106
Hình 3.27 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu lan <i>Dendrobium</i> với thuật toán Maximum Likelihood .....	109
Hình 3.28 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng <i>matK</i> của các mẫu lan <i>Dendrobium</i> với thuật toán Maximum Likelihood .....	111
Hình 3.29 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng <i>trnH</i> - <i>psbA</i> của 12 mẫu <i>Dendrobium</i> bản địa và 4 mẫu <i>Dendrobium</i> lai với thuật toán Maximum Likelihood .....	113

## DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 2.1 Danh sách 40 giống loài lan <i>Dendrobium</i> từ Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM.....	44
Bảng 2.2 Danh sách các mẫu lan <i>Dendrobium</i> được sử dụng để xây dựng mã vạch .....	46
Bảng 2.3 Danh sách một số giống lan thương mại và lan lai.....	49
Bảng 2.4 Trình tự môi và chu trình nhiệt của các trình tự .....	49
Bảng 3.1 Thống kê kết quả tỉ lệ thực hiện thành công phản ứng PCR khuếch đại các vùng trình tự nghiên cứu.....	72
Bảng 3.2 Kết quả khuếch đại các vùng trình tự trong nghiên cứu.....	75
Bảng 3.3 Thống kê kết quả giải trình tự của các vùng trong nghiên cứu .....	77
Bảng 3.4 Danh sách các loài <i>Dendrobium</i> được xác định dựa trên vùng trình tự ITS (không bao gồm các biến thể và các loài lai).....	96
Bảng 3.5 Kết quả phân tích các thông số giữa các marker ITS, ITS2, <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i> trong việc phân định loài <i>Dendrobium</i> .....	104
Bảng 3.6 Kết quả tổng hợp các vị trí in-del dựa trên marker ITS, <i>trnH-psbA</i> của các loài <i>Dendrobium</i> trong nghiên cứu.....	104
Bảng 3.7 Kết quả khảo sát khả năng phân định loài bằng phương pháp “Best Match/ Best Close Match” .....	107

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<i>Viết tắt</i>	<i>Tiếng Anh</i>	<i>Tiếng Việt</i>
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	Đa hình chiều dài các đoạn được khuếch đại
Bp	Base pairs	Cặp base
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ tìm kiếm sắp giống cột từng phần cơ bản
CBOL	Consortium for the Barcode of Life	Hiệp hội mã vạch sinh học
COI	Cytochrome c oxidase I	Tiểu phần 1 của cytochrome c oxidase
cpDNA	Chloroplast DNA	DNA lục lạp
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	
<i>D.</i>	<i>Dendrobium</i>	<i>Dendrobium</i>
In-del	insertion/deletion	Đột biến mất hoặc thêm
ITS	Internal transcribed spacer	
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat	Trình tự nằm giữa các trình tự vi vệ tinh
kb	Kilo-base pair	1000 cặp nucleotit
KH		Ký hiệu
<i>matK</i>	Maturase K	Gen maturase K
MEGA	Molecular Evolution Genetics Analysis	Phân tích di truyền tiến hóa phân tử

NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia
ORF	Open Reading Frame	Khung đọc mở
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RADP	Randomly Amplified Polymorphic DNA	Đa hình phân đoạn DNA được khuếch đại ngẫu nhiên
<i>rbcL</i>	ribulose – 1,5 – bisphosphate carboxylase	
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms	Đa hình về chiều dài của các đoạn DNA
Rpm	revolutions per minute	Số vòng/phút
<i>rpoB</i>	RNA polymerase – $\beta$	Gen RNA polymerase – $\beta$
<i>rpoC1</i>	RNA polymerase – C1	Gen RNA polymerase – C1
SSR	Simple Sequence Repeats	Trình tự lặp lại đơn giản
STT		Số thứ tự
Tp. HCM		Thành phố Hồ Chí Minh
<i>trnH-psbA</i>		Vùng nằm giữa 2 gen <i>trnH</i> và <i>psbA</i>

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài

Phong lan là thực vật có hoa đẹp, màu sắc đa dạng, phong phú, thu hút sự quan tâm yêu thích của nhiều đối tượng, đặc biệt là các nhà khoa học. Với khí hậu nhiệt đới và địa hình đa dạng khác nhau, ngày càng nhiều loài lan mới được phát hiện và bổ sung vào danh sách các loài lan phân bố ở Việt Nam. Tại Việt Nam, phong lan là một họ phong phú và đặc sắc của hệ thực vật, có giá trị tài nguyên về nhiều mặt đối với nền kinh tế, đời sống con người.

Nhiều loài lan rừng Việt Nam, trong đó có các loài thuộc chi lan *Dendrobium* cho hoa đẹp, kết hợp nhiều màu sắc phong phú, hài hòa; một số loài có hương thơm, lâu tàn, nở kéo dài từ 1 – 2 tháng [1;12;14]. Lan *Dendrobium* còn là chi lớn thứ hai trong họ Phong lan, chỉ sau chi *Bulbophyllum* và là chi có số lượng loài lớn nhất thuộc họ này trong hệ thực vật Việt Nam [1;75]. Lan *Dendrobium* không chỉ là một trong những nhóm hoa lan được yêu thích, tiêu thụ nhiều, phục vụ nhu cầu thị trường chơi lan chậu, lan cắt cành mà còn có lịch sử được sử dụng làm thảo dược trong khoảng 2000 năm nay ở các nước Đông – Nam châu Á [30]. Môi trường sống tự nhiên của các loài *Dendrobium* bản địa ở Việt Nam ngày càng bị suy giảm do biến đổi khí hậu và sự khai thác quá mức của con người, điều này có thể dẫn đến nguy cơ làm mất nguồn gen lan rừng nói chung cũng như lan *Dendrobium* nói riêng. Bên cạnh đó, việc du nhập và lai tạo ngày càng nhiều giống lan *Dendrobium* mới cũng làm cho nhiều giống bản địa dần bị lãng quên. Vì vậy, việc định danh và đánh giá đa dạng di truyền cho các loài *Dendrobium* ở Việt Nam hiện rất quan trọng để kịp thời bảo tồn nhóm lan quý này.

Từ thực tế đó, rất nhiều công trình nghiên cứu được tiến hành nhằm bảo tồn đa dạng các loài lan, trong đó có Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM [26]. Tính đến cuối năm 2019, Bộ sưu tập này đã có gần 400 mẫu giống lan các loại, trong đó có 190 mẫu giống thuộc chi lan *Dendrobium*, các mẫu này đã được định danh, phân loại trên cơ sở dựa vào hình thái của từng mẫu giống.

Thực vật nói chung muốn định danh hình thái cần phải có mẫu vật với đầy đủ các yếu tố thành phần như thân, rễ, lá, hoa... Hiện nay, quá trình nhận diện các giống lan vẫn dựa trên hình thái bên ngoài, đặc biệt cần các mẫu có hoa để cho kết quả định danh tối ưu nhất. Họ Lan là một họ thực vật được đánh giá là rất khó để nhận diện, định danh, đặc biệt là thời kỳ chúng chưa ra hoa [27]. Nhiều loài chỉ khác với loài lân cận ở một điểm hình thái rất nhỏ và tinh tế. Nhiều loài thuộc chi *Dendrobium* có hình thái ngoài khá giống nhau khi chưa có hoa, do vậy rất khó để nhận diện chúng bằng phương pháp hình thái thông thường. Trước đây, quá trình chủ động lai tạo ra các giống lan mới vẫn mang tính kinh nghiệm và cảm tính mà chưa dựa trên nền tảng di truyền nên có thể tạo ra các đặc tính giống không mong muốn hoặc các biến dị, điều đó dẫn đến việc phân loại chúng ở mức chi và loài cực kỳ khó khăn.

Mặt khác, lan chỉ có giá trị khi có hoa nên trong một số trường hợp, người ta có thể bắt gặp loài quý nhưng lại bỏ qua do hình thái của nó khó phân biệt so với các loài thông dụng khác. Một số loài đặc hữu đang có nguy cơ bị tuyệt chủng bị cấm khai thác, xuất khẩu như *D. nobile*, *D. amabile*, *D. hancockii*... [1;19] nhưng do việc kiểm tra, thẩm định tại các cửa khẩu không phải do các chuyên gia thực hiện nên chuyện cây con, cây trưởng thành chưa có hoa bị khai thác trái phép là điều khó tránh khỏi.

Trong quá trình sưu tập, định danh, lai tạo và nhân các giống lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM cũng gặp các vấn đề như mẫu thu được chưa có hoa, nhiều mẫu giống này không ra hoa trong điều kiện sống ở Tp. HCM, có thể bỏ sót các mẫu giống quý trong quá trình thu thập, việc nhân nuôi số lượng lớn các giống quý có thể bị nhầm lẫn, việc lai tạo ngẫu nhiên và khó kiểm chứng nền tảng di truyền của các tổ hợp lai.

Các kỹ thuật sinh học phân tử hiện nay được ứng dụng nhiều trong việc đánh giá đa dạng di truyền, phân định các giống, loài, thậm chí cả mức dưới loài của thực vật. Mỗi kỹ thuật đều có những ưu, nhược điểm riêng và được áp dụng cho từng trường hợp, đối tượng cụ thể khác nhau. Trong đó, mã vạch DNA được cho là một



công cụ hữu dụng trong việc định danh các loài thực vật, trong đó có các loài lan. Việc nghiên cứu ứng dụng hệ thống mã vạch DNA cho các loài hoa lan giúp cho công tác sưu tập, bảo tồn, định danh cũng như đánh giá đa dạng di truyền để tiến hành công tác lai tạo, nhân nhanh các giống hoa lan phục vụ cho sản xuất, đồng thời có thể quản lý khai thác tốt hơn nguồn gen hoa lan hiện có. Nhiều công trình đã chứng minh rằng vùng ITS (Internal transcribed spacer) thể hiện sự đa dạng cao giữa các loài nên được sử dụng để phân loại và nghiên cứu mối liên hệ di truyền giữa các loài [27;48], đặc biệt là các loài thuộc chi *Dendrobium* [35;37;64;80;89;91;110]. Vùng ITS2 đã được đánh giá là có thể phân biệt rõ ràng giữa các loài *Dendrobium* [44;67;99]. Ba vùng trình tự trong lục lạp *trnH-psbA* (vùng nằm giữa 2 gen *trnH* và *psbA*), *matK* (maturaseK) và *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) cũng đã được xác định là có giá trị trong việc phân định các loài thuộc chi *Dendrobium* [27;50;63;82;91;113;120].

Đề tài “Nghiên cứu xây dựng cơ sở dữ liệu trình tự gen để nhận diện nhanh và xác định mức độ đa dạng của nhóm lan *Dendrobium* khu vực phía Nam” nhằm hướng đến việc xác lập hệ thống mã vạch DNA để định danh và phân loại ở đối tượng lan *Dendrobium* sẽ giúp các nhà khoa học, cụ thể là Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM có thông tin đầy đủ và hệ thống hơn trong công tác sưu tập, bảo tồn, đánh giá đa dạng di truyền, từ đó đề ra các hướng lai tạo, chọn giống và nhân giống *in vitro* phục vụ Chương trình phát triển hoa, cây kiểng Tp. HCM cũng như phát triển nông nghiệp đô thị.

Đề tài đã sử dụng 40 mẫu giống *Dendrobium* để tiến hành mô tả hình thái; giải trình tự các vùng ITS (trong nhân), *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* (trong lục lạp) cho 84 mẫu giống *Dendrobium*; sử dụng công cụ tin sinh học để phân tích mức độ đa dạng, mối quan hệ phát sinh loài của nhóm lan này; ứng dụng hệ thống trình tự để phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố mẹ của một số mẫu lan lai.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

### **2.1 Mục tiêu chung**

Nghiên cứu xây dựng cơ sở dữ liệu trình tự DNA – hệ thống mã vạch DNA để kiểm chứng và đánh giá đa dạng di truyền của một số loài lan *Dendrobium* được thu thập ở miền Nam Việt Nam.

### **2.2 Mục tiêu cụ thể**

1. Xây dựng bộ dữ liệu trình tự DNA cho một số loài lan *Dendrobium* ở khu vực phía Nam dựa trên trình tự DNA của 4 marker.

2. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền dựa trên một số trình tự DNA của nhóm lan *Dendrobium* thuộc khu vực phía Nam Việt Nam đã thu được.

## **3.. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn**

### **3.1 Ý nghĩa khoa học**

Đề tài đã xác định được sự đa dạng di truyền của nhóm lan *Dendrobium* khu vực phía Nam Việt Nam dựa vào đặc điểm hình thái và DNA barcode. Những thông tin trình tự đều được đăng ký trên GenBank, góp phần làm phong phú cơ sở dữ liệu của lan *Dendrobium* từ đó làm tiền đề cho những nghiên cứu sau này. Đề xuất được các marker tiềm năng giúp xác định nhanh các loài lan *Dendrobium* nhằm bảo tồn nguồn gen quý của Việt Nam.

### **3.2 Ý nghĩa thực tiễn**

Nghiên cứu đề xuất sử dụng hệ thống trình tự mã vạch DNA nhằm phục vụ công tác nhận diện, định danh, phân loại các loài lan *Dendrobium* nhanh và chính xác hơn trong công tác bảo tồn quỹ gen.

## **4. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu**

### **4.1 Đối tượng nghiên cứu**

Lan *Dendrobium* – thu thập từ Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM, và 1 số vườn lan.

Các trình tự DNA có tiềm năng trong việc phân định loài.

#### **4.2 Phạm vi nghiên cứu**

Nguồn vật liệu mẫu lan được sử dụng từ Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM, đây là sản phẩm, kết quả thuộc đề tài “Sưu tập, nhập nội, chọn tạo và nhân nhanh các giống hoa lan phục vụ nội tiêu và xuất khẩu” của TS. Dương Hoa Xô và cộng sự đã được nghiệm thu năm 2011 [26]. Đề tài đã tiến hành:

- Phân tích và xây dựng cây phân nhóm dựa trên 72 đặc tính hình thái của 40 mẫu giống lan *Dendrobium*.
- Phân tích 4 vùng trình tự *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS của 84 mẫu giống (gồm 71 mẫu giống lan thuộc 25 loài *Dendrobium* đại diện của khu vực miền Nam Việt Nam và 13 mẫu giống lan lai).

#### **5. Những đóng góp mới của đề tài**

Đề tài cung cấp thông tin trình tự các marker (ITS, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) của các loài lan *Dendrobium* bản địa Việt Nam trong nghiên cứu vào cơ sở dữ liệu GenBank. Trong đó, có những trình tự vùng *rbcL*, *trnH-psbA* thuộc nhiều mẫu giống hiện chưa có hoặc được công bố rất hạn chế trên GenBank.

Bước đầu đánh giá đa dạng di truyền về trình tự DNA marker của các nhóm lan *Dendrobium* khu vực miền Nam Việt Nam. Đề xuất được các marker tiềm năng cho việc phân định các loài lan *Dendrobium*.

# CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VÀ CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

## 1.1 Giới thiệu về họ Phong lan

Theo Takhtajan năm 1987, họ Phong lan (Orchidaceae) là họ thực vật lớn nhất trong lớp Một lá mầm (Monocotyledoneae) và là họ lớn thứ hai (chỉ sau họ Cúc - Asteraceae) trong ngành Thực vật hạt kín (Angiospermae). Orchidaceae có tới 750 chi và hơn 25.000 loài, chính vì thế hình thái cấu tạo cũng như hệ thống phân loại họ này hết sức đa dạng và phức tạp. Không chỉ vậy, số lượng loài và chi thuộc họ này hiện không ngừng tăng lên theo thời gian. Các chi với số lượng loài lớn thuộc họ Phong lan có thể kể đến như lan Lọng (*Bulbophyllum*), lan Hoàng thảo (*Dendrobium*), lan Hài (*Paphiopedilum*), Cát lan (*Cattleya*)... [12].

Nhìn chung, họ Phong lan bao gồm các loại cây thân thảo sống lâu năm (đôi khi hóa gỗ một phần ở gốc). Chúng hoặc sống ở đất, nơi hốc, vách đá hoặc sống phụ, sống hoại... Tuy nhiên, nét độc đáo nhất của họ này là lối sống phụ (bì sinh) bám, treo lơ lửng trên vỏ các thân cây gỗ khác [12].

Phong lan phân bố rộng rãi trên Trái Đất làm cho chúng trở thành một họ toàn cầu. Họ Phong lan phân bố từ 68 độ vĩ Bắc đến 56 độ vĩ Nam, nghĩa là từ gần Cực Bắc xuống tận các đảo cuối cùng của Cực Nam. Tuy nhiên, trung tâm phân bố của họ này là ở các vùng nhiệt đới, đặc biệt là châu Mỹ và Đông Nam Á. Châu Á rất giàu các loài của chi *Dendrobium* (1400 loài), *Coelogyne* (200 loài), *Vanda* (60 loài) [12].

Theo báo cáo của Averyanov (2003), ở Việt Nam ước tính có khoảng 1000 đến 1100 loài lan thuộc 152 chi. Mười chi có số lượng loài lớn nhất là *Dendrobium* (107 loài), *Bulbophyllum* (95 loài), *Eria* (49 loài), *Liparis* (44 loài), *Habenaria* (34 loài), *Oberonia* (28 loài), *Coelogyne* (27 loài), *Cymbidium* (24 loài), *Calanthe* (20 loài) và *Cleisostoma* (20 loài). Phần lớn các loài lan đang bị tiêu diệt trong hệ thực vật Việt Nam thuộc về 25 chi trong đó có chi *Dendrobium*. Nhiều loài lan này đang bị thu hái nhiều để bán làm cây cảnh trong nước cũng như để xuất khẩu ra nước ngoài.

Nhiều loài lan đặc hữu cần được bảo tồn đặc biệt như là tài sản độc đáo nhất của quốc gia, nếu không chúng có thể bị tiêu diệt ở một tương lai gần trong đó có *D. amabile*, *D. cruentum*, *D. unicum*, *D. hancockii*...[1]

## 1.2 Giới thiệu về lan *Dendrobium*

### 1.2.1 Vị trí phân loại

*Dendrobium* là một chi lớn thuộc họ Phong lan với khoảng 800 – 1500 loài được thiết lập bởi Olof Swartz năm 1799 [105]. Các loài thuộc chi *Dendrobium* rất đa dạng về hình dáng, màu sắc, kích thước.

Giới	Plantae
Ngành	Angiospermae (Magnoliophyta)
Lớp	Monocotyledones (Liliopsida)
Bộ	Asparagales
Họ	Orchidaceae
Họ phụ	Epidendroideae
Tông	Epidendreae
Chi	<i>Dendrobium</i>

Theo Dương Đức Huyền, năm 1992, lan *Dendrobium* là một trong những chi có nhiều loài nhất của họ Orchidaceae và có đặc điểm hình thái đa dạng. Lan *Dendrobium* có những đặc điểm khác biệt với những chi lân cận như luôn mọc cụm và có phân đốt, số lượng khối phấn luôn là 4, không có lông mềm trên lá hay các bộ phận của hoa. Nhóm tác giả này đã dựa trên hệ thống của Seidenfeden (1985) và Holttum (1964) để sắp xếp 97 loài lan *Dendrobium* ở Việt Nam thành 15 mục (section) [14].

Theo tài liệu “Phong lan Việt Nam” của Trần Hợp (1998), ở Việt Nam, lan *Dendrobium* có đến 100 loài, xếp trong 14 tông, được phân biệt bằng thân (giả hành), lá và hoa [12].

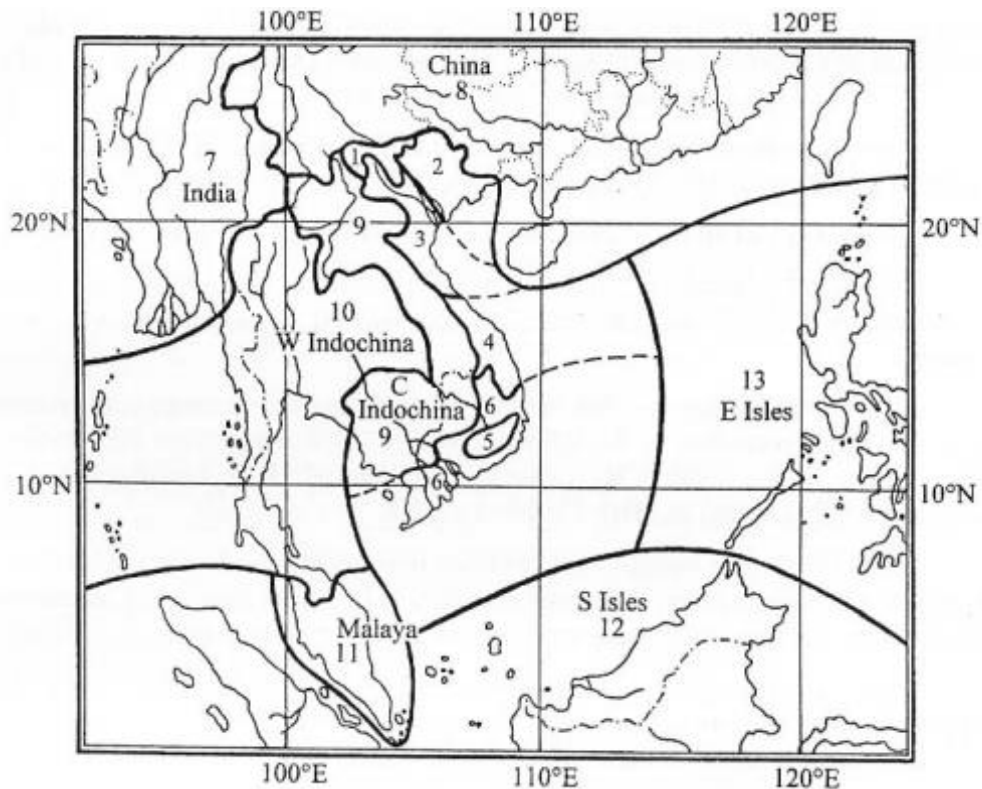
### 1.2.2 Sự phân bố

Lan *Dendrobium* chỉ được tìm thấy ở Đông bán cầu, trải dài từ Úc, xuyên suốt Nam Thái Bình Dương, Philippine, Ấn Độ, một số xuất hiện ở Nhật Bản và xuất hiện nhiều nhất ở Đông Nam Á. Trong khi các nước Nam Mỹ tự hào về các loài thuộc chi *Cattleya* tuyệt đẹp, các nước Đông Nam Á cũng hãnh diện vì có chi lan *Dendrobium* vô cùng phong phú. Theo nghiên cứu của Dressler (1981), châu Á có khoảng 1.400 loài thuộc chi lan *Dendrobium* [12].

Điều kiện sinh thái của lan *Dendrobium* cũng rất đa dạng, có nhiều loài chỉ mọc và ra hoa ở vùng lạnh, có loài ở vùng nóng, có loài trung gian, cũng có loài thích nghi với bất cứ điều kiện khí hậu nào.

Ở Việt Nam, năm 1932, các nhà thực vật người Pháp (F. Gagnepain và A. Guillaumin) đã công bố 53 loài Hoàng thảo ở Việt Nam, và sau đó đã công bố bổ sung thêm một số loài (1932 – 1964). Năm 1992, Dương Đức Huyền và cộng sự cũng đã phân loại và định danh 97 loài lan *Dendrobium* ở Việt Nam, trong đó có 48 loài có giá trị làm cảnh và 21 loài đặc hữu của Việt Nam [14]. Năm 1998, Trần Hợp mô tả 93 loài lan *Dendrobium* trong cuốn “Phong lan Việt Nam” [12]. Ở miền Nam Việt Nam, tác giả Phạm Hoàng Hộ cũng đã mô tả 56 loài Hoàng thảo trong “Cây cỏ miền Nam Việt Nam”, tập 2 [10].

Theo công bố “Trích yếu được cập nhật hóa về các loài lan ở Việt Nam” [1], ở Việt Nam hiện đã biết được 897 loài lan thuộc 152 chi, chúng chiếm khoảng 75-80% trong tổng số 1.000 - 1.100 loài ước tính có ở đây. Trong đó, chi lan *Dendrobium* có số lượng loài cao nhất (107 loài), tiếp đến là *Bulbophyllum*, *Eria*, *Liparis*... Công bố này cung cấp các thông tin về tên khoa học, khu phân bố, cách sống, độ thường gặp của loài và tình trạng bị đe dọa tiêu diệt của từng loài. Theo đó, ở miền Nam Việt Nam có khoảng 88 loài thuộc chi *Dendrobium* phân bố ở vùng 4 - Tiểu vùng hệ thực vật Trung Trường Sơn (phần nằm trong lãnh thổ Việt Nam); 5 - Tiểu vùng hệ thực vật Nam Trường Sơn; 6 - Tiểu vùng hệ thực vật Nam Đông Dương (phần nằm trong lãnh thổ Việt Nam) trong Hình 1.1.



**Hình 1.1** Các vùng hệ thực vật được chấp nhận để mô tả sự phân bố lan trong bảng trích yếu [1]

### 1.2.3 Sự đa dạng và phong phú của lan *Dendrobium*

Lan *Dendrobium* là chi lan (genus) đa dạng, phong phú với hơn 1.000 loài (species) nguyên thủy được chia thành 40 nhóm (sections) thuộc dòng *Dendrobiinae* như *Phalaenanthe*, *Eleutheroglossum*, *Callista*, *Ceratobium*, *Stachyobium*...

Dựa vào đặc điểm giả hành, lan *Dendrobium* tập trung thành hai dạng chính [20]:

- Dạng đứng (*Dendrobium* loại *phalaenopsis*): thường mọc ở xứ nóng, chịu ẩm, có nhiều hoa. Tp. HCM trồng rất nhiều loại này như: Nhất điểm hồng, Nhất điểm hoàng, Báo hỉ, Ý thảo, Thủy tiên, Sonia,....
- Dạng thòng (*Dendrobium* loại *nobile*): chịu khí hậu mát mẻ ở vùng đồi núi cao như Đà Lạt, Lâm Đồng,...; lá nhạt màu hơn so với dạng thân đứng, lá rụng khi thời tiết lạnh. Có nhiều loài *Dendrobium* dạng thòng như Giả hạc, Hạc vĩ, Long tu, Phi điệp vàng,...

A



B



**Hình 1.2.** Các dạng thân chính của lan *Dendrobium*

A. *Dendrobium anosmum* - Dạng thòng

B. *Dendrobium cariniferum* - Dạng đứng

Dựa vào đặc điểm hình thái lá và hoa, lan *Dendrobium* được chia ra thành 5 nhóm:



Nhóm 1

*D. antennatum* – *D. phalaenopsis*



Nhóm 2

*D. anosmum* – *D. wardianum*





Nhóm 3

*D. chrysotoxum* – *D. farmeri*

Nhóm 4

*D. atrovioleaceum* – *D. spectabile*

Nhóm 5

*D. draconis* – *D. formosum***Hình 1.3** Các nhóm lan *Dendrobium*

- Nhóm thứ nhất có đặc điểm là lá xanh quanh năm và hoa thì thường mọc ở gần ngọn như *D. antennatum*, *D. phalaenopsis*...
- Nhóm thứ hai, lá thường rụng vào mùa đông và hoa thường mọc ở gần đốt trên thân cây như *D. anosmum*, *D. wardianum*...
- Nhóm thứ ba hay còn gọi là nhóm Callista, khi ra hoa thì hoa rủ xuống phía dưới như *D. chrysotoxum*, *D. farmeri*...
- Nhóm thứ tư là nhóm Latoura với chùm hoa mọc thẳng đứng như *D. atrovioleaceum*, *D. spectabile*...

- Nhóm thứ năm là nhóm Formosae có đặc điểm là trên thân và lá cây có lông màu đen và hoa thường là màu trắng như *D. draconis*, *D. formosum*...

Phạm Hoàng Hộ (2003) [11] phân loại chi lan *Dendrobium* gồm 13 nhóm: *Bolbidium*, *Callista*, *Apoum*, *Strongyle*, *Gastridium*, *Conostalix*, *Rhopalanthe*, *Formosae*, *Pedilonum*, *Dendrobium*, *Breviflores*, *Dischophyllum*, *Stachyobium*.

- Nhóm *Callista* gồm có: *D. chrysotosum* (Kim điệp), *D. densiflorum* Wall (Thủy Tiên), *D. farmari* Paxt (Thủy tiên trắng vàng), *D. lindleyi* Steudel (Vây rồng), *D. thrysiiflorum* Reichb (Thủy tiên vàng)...

- Nhóm *Dendrobium* gồm có: *D. anosmum* Lindl (Giả hạc), *D. fimbriatum* Hook.f. (Long nhãn), *D. heterocarpumi* Lindl. (Nhất điểm hoàng), *D. primulinum* Lindl. (Long tu), *D. moschatum* (Buch-Ham) (Thái bình)...

Chính vì sự đa dạng về chủng loại mà nhóm lan này có điều kiện sinh thái rất đa dạng, có loài hoa chỉ mọc ở vùng lạnh, có loài lại chỉ sống ở vùng có không khí nóng, cũng có loài chỉ chịu được nhiệt độ vừa phải, nhưng có một số loài lại rất dễ chịu là điều kiện khí hậu nào cũng sống được.

Lan *Dendrobium* có thể nhân nhanh giống bằng phương pháp tách giả hành thông thường. Là loại lan đa thân với nhiều giả hành, các giả hành thường mang một thân với nhiều lá mọc xen kẽ, trên thân có rất nhiều mắt ngủ. Tại những mắt ngủ này sẽ đâm chồi và cho ra một cây con mới. Hoa của lan *Dendrobium* có thể mọc từ thân thành từng chùm hay chỉ mọc một hoa duy nhất. Có một số loài lan *Dendrobium* trước khi ra hoa sẽ rụng hết lá. Đặc biệt hơn các giống lan khác, các chồi hoa của lan *Dendrobium* không những mọc trên các giả hành mới, tại các giả hành cũ cũng có thể mọc hoa, vì thế một cây lan *Dendrobium* có thể cho ra nhiều cành hoa. Mặt khác, hoa lan *Dendrobium* thường rất lâu tàn, thường là từ 2 đến hơn 3 tháng, có loài hoa có thể nở suốt quanh năm như *D. caesar Alba*, *D. caesar latin*... Tuy nhiên, có loài cũng sớm nở tối tàn như Thạch hộc (*D. crullenatum*).

Lan *Dendrobium* cũng là giống rất đa dạng về màu sắc và kiểu dáng. Chính vì thế, người Việt Nam dùng những hình tượng khác nhau để tượng trưng cho một số

loài *Dendrobium* nào đó: một con chim bồ câu trắng (lan Bạch câu), một loài hạc lẻ loi (lan Giả hạc), hay một đàn bướm vàng bay trắng gió (lan Kim điệp)... [12].

#### **1.2.4 Đặc điểm hình thái lan *Dendrobium***

Các loài trong chi lan *Dendrobium* không có một hình dạng chung nhất về hoa và dạng cây với số lượng loài quá lớn và phân bố rộng rãi.

##### **1.2.4.1 Rễ**

Cây có hệ rễ khí sinh, có một lớp hút ẩm dày bao quanh gồm những lớp tế bào chết chứa đầy không khí nên rễ ánh lên màu xanh bạc. Vì vậy, rễ hút được nước mưa chảy dọc trên vỏ cây gỗ hay nước lơ lửng trong không khí, hơi sương và hơi nước, giúp cây hút dinh dưỡng và chất khoáng, mặt khác giúp cây bám chặt vào giá thể, không bị gió cuốn. Một số loài có thân lá kém phát triển, thậm chí tiêu giảm hoàn toàn, có hệ rễ chứa diệp lục tố giúp cây hấp thụ ánh sáng cần thiết cho sự ra hoa và quang hợp [20].

Rễ của lan *Dendrobium* không chịu được lạnh, nếu bị lạnh trong thời gian dài, rễ cây sẽ bị mục nát và cây bị chết [17].

##### **1.2.4.2 Thân**

Lan *Dendrobium* thuộc nhóm đa thân (còn gọi là nhóm hợp trục), có hệ thống nhánh nằm ngang bò dài trên giá thể hoặc nằm sâu trong đất gọi là thân rễ.

Giả hành là những đoạn phình to, bên trong có các mô mềm chứa dịch nhầy làm giảm sự mất nước và dự trữ chất dinh dưỡng để nuôi cây trong điều kiện khô hạn khi cây sống bám trên cao. Ngoài ra, giả hành còn chứa diệp lục tố nên có thể quang hợp được [20]. Hình dạng và kích thước của giả hành rất đa dạng: hình cầu, thuôn dài hay hình trụ xếp chồng lên nhau tạo thành thân giả có lá mọc xen kẽ. Một số loài ở xứ lạnh, giả hành chỉ có nhiệm vụ dự trữ chất dinh dưỡng nên không có màu xanh nhưng phía trên có mang lá [17].

#### 1.2.4.3 Lá

Các lá mọc xen kẽ nhau và ôm lấy thân giả do lá có tận cùng bằng một cuốn hay thuôn dài xuống thành bẹ ôm thân, hình dạng và cấu trúc lá rất đa dạng [20].

Lá có hình kim, trụ có rãnh hay phiến mỏng. Dạng lá mềm mại mọng nước nạc, dai, có màu xanh bóng, đậm hay nhạt tùy thuộc vào vị trí sống của cây. Phiến lá trải rộng hay gấp lại theo gân vòng cung như cái quạt hay chỉ gấp lại theo gân giữa như hình chữ V. Những lá sát dưới gốc đôi khi giảm đi chỉ còn những bẹ không phát triển hay giảm hẳn thành vảy [17].

Các loài thuộc chi lan *Dendrobium* vùng nhiệt đới nói riêng và họ Orchidaceae nói chung đôi khi trút lá vào mùa khô hạn. Sau đó, cây ra hoa hay sống ẩn để khi gặp mưa thì cho chồi mới [2].

#### 1.2.4.4 Hoa

Lan *Dendrobium* thuộc nhóm phụ ra hoa ở nách lá. Chồi hoa mọc từ các mắt ngủ giữa các đọt lá trên thân gần ngọn và cả trên ngọn cây. Sự biểu hiện trước khi ra hoa khác biệt như có nhiều loài rụng hết lá trước khi ra hoa. Thời gian ra hoa là đầu mùa mưa hay đầu Tết [20].

Lan *Dendrobium* khi đủ dinh dưỡng thì cho hoa thành chùm, phát hoa dài và thời gian ra hoa trung bình 1- 2 tháng [20]. Ngoài thiên nhiên mỗi phát hoa có 6 - 7 hoa, tỉ lệ nở hoa là 85% phát triển từ lúc hình thành đến lúc một nụ nở đầu tiên là 25 - 30 ngày.

Tùy từng loài hoa có màu sắc, hình thái hoa khác nhau nhưng điểm khác cơ bản là ở cánh môi. Tùy thuộc vào dạng thân cây mà có các hình thái hoa khác nhau, có hoa màu nhạt và kích thước hoa nhỏ hơn, lá nhỏ, dài, loại thân nhỏ, hoa to đẹp hơn, lá dày căng thì hoa màu đậm, mềm mọng nước, loại thân căng mập, ngoài ra còn có một số loại trung gian có màu sắc hoa khác lạ như màu lông gà con [20].

*D. pendulum**D. simondii* Gagnep.*D. hercoglossum***Hình 1.4** Đặc điểm rễ, thân, giả hành, lá, hoa, quả và hạt ở chi lan *Dendrobium*

#### 1.2.4.5 Quả và hạt

Họ Orchidaceae đều có quả thuộc quả nang, khi hạt chín, các nang bung ra chỉ còn dính lại với nhau ở đỉnh và gốc. Ở một số loài, khi chín quả không nứt ra nên hạt chỉ ra khỏi quả khi quả bị mục nát.

Quả chứa 10.000 – 100.000 hạt đôi khi đến 3 triệu hạt có kích thước rất nhỏ nên phôi hạt chưa phân hoá. Sau 3 – 5 tháng hạt chín và phát tán nhờ gió [17].

Những hạt giống không chứa các chất dinh dưỡng do gió gieo vãi, để được nảy mầm cần có nấm cộng sinh hỗ trợ các chất cần thiết, đặc biệt ở đầu các giai đoạn

phát triển [13].

### **1.3 Thực trạng bảo tồn, nhận diện các giống loài lan *Dendrobium* ở Việt Nam và trên thế giới**

Bảo tồn đa dạng sinh học là biện pháp đặc biệt để duy trì, bảo vệ, phát triển các loài động vật, thực vật quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng, các quần thể và các hệ sinh thái đang tồn tại. Hiện có 2 phương pháp bảo tồn được sử dụng rộng rãi và ngày càng nhiều nơi trên thế giới hướng đến việc bảo tồn trình tự gen. Phương pháp được ưu tiên và tốt nhất là bảo tồn tại chỗ (*in-situ* conservation), là hình thức bảo tồn các hệ sinh thái, những nơi cư trú tự nhiên, duy trì và phục hồi các quần thể loài đang tồn tại trong điều kiện tự nhiên của chúng. Phương pháp thứ hai được áp dụng khá phổ biến là bảo tồn chuyên vị (*ex-situ* conservation), là hình thức bảo tồn các loài hoặc các nguyên liệu sinh học của loài bên ngoài nơi cư trú tự nhiên vốn có của chúng [22].

Trên thế giới, các hoạt động bảo tồn lan được quan tâm và tiến hành bởi nhiều trung tâm và dự án chuyên biệt. Có nhiều hướng bảo tồn như tạo bộ sưu tập ngay trong khu vực sống tự nhiên của chúng, tạo bộ sưu tập hạt giống và các dạng nấm mà chúng phụ thuộc hay dự án đưa lan vào đô thị như ở Singapore. Bắc Mỹ có hơn 200 loài phong lan và hơn một nửa số đó có nguy cơ bị đe dọa biến mất trong tự nhiên. Trung tâm Bảo tồn lan Bắc Mỹ (North American Orchid Conservation Center) được thành lập bởi Viện Smithsonian và Vườn Bách Thảo Hoa Kỳ (United States Botanic Garden) cam kết đảm bảo sự tồn tại của các loài phong lan bản địa. Theo tổ chức này, việc tạo ra một bộ sưu tập hạt giống hoa lan quốc gia và một bộ sưu tập sống các dạng nấm mà chúng phụ thuộc chính là cách tốt nhất để bảo tồn sự đa dạng di truyền của các loài lan. Tại Thái Lan, Queen Sirikit Botanic Garden được thành lập vào năm 1993 với mục đích chủ yếu là tăng cường bảo tồn các loài thực vật có giá trị của Thái Lan. Hiện nay, bảo tồn lan Thái bản địa là một trong những chương trình hoạt động mạnh nhất của Queen Sirikit Botanic Garden. Hoa lan hoang dã Thái Lan thu thập từ khắp nơi trên đất nước, định danh chính xác bởi các nhà thực vật học và nhân viên

Queen Sirikit Botanic Garden dán nhãn nhận dạng [74].

Trên thế giới, các nghiên cứu theo hướng nhân giống *in vitro* nhằm bảo tồn các loài thuộc chi lan *Dendrobium* cũng rất được các nhà khoa học quan tâm. Các công trình theo hướng nhân giống *in vitro* được mở rộng theo thời gian cả về loại mô nuôi cấy, loại mẫu được chọn, kết quả tái sinh... Các công trình gần đây thường chọn đối tượng là những loài lan lai mới có giá trị kinh tế, thẩm mỹ, những loài quý hiếm đang có nguy cơ tuyệt chủng hay các loài có giá trị dược liệu. Shiau và cộng sự (2005) đã nhân giống *in vitro* cho đối tượng *D. candidum* Wall. Ex Lindl., một nguyên liệu làm thuốc ở Trung Quốc [85]. Khatun và cộng sự (2010) tiến hành tái sinh cây con từ khối tế bào phát sinh khi hạt nảy mầm với mẫu cấy là chồi ngọn cho lan *Dendrobium* lai [62]. Someswar và cộng sự (2014) tiến hành vi nhân giống cho loài lan có nguy cơ bị tuyệt chủng *D. chrysanthum* Wall. Ex Lindl [88].

Ở Việt Nam, theo Nghị định 32/2006/ND-CP ban hành ngày 30/3/2006 về “Quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm” [19] đã quy định các loài động thực vật nguy cấp quý hiếm cần được bảo vệ. Danh mục này có 52 nhóm loài thực vật trong đó có nhóm lan Kim tuyến, lan Hải bị nghiêm cấm khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại; *D. nobile* (Thạch hộc),... thuộc nhóm hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại.

Công tác bảo tồn (tại chỗ và chuyên vị) các loài lan, đặc biệt là lan rừng quý hiếm hiện đang rất được quan tâm. Các nghiên cứu được tiến hành trên nhiều phương diện. Các trường, viện, nghệ nhân tiến hành rất nhiều công trình sưu tập, xây dựng vườn lan, đặc biệt là các loại lan rừng như Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM đã sưu tập gần 400 giống lan các loại, Viện Sinh học Tây Nguyên hiện đang chăm sóc gìn giữ nguồn gen của nhiều loài lan rừng khác nhau; hay bộ sưu tập một số loài phong lan rừng khu vực miền Trung, Tây Nguyên tại Phú Yên...

Tuy nhiên, các bộ sưu tập sau khi được hình thành với số lượng loài lớn nhưng khó được chăm sóc và phát triển tốt do thiếu điều kiện tự nhiên phù hợp, kỹ thuật chăm sóc hợp lý... Các nghiên cứu về phân loại, đặc điểm hình thái, sinh thái ngày

càng được quan tâm hơn. Nhiều nghiên cứu tập trung vào hướng tìm ra điều kiện nuôi trồng, chăm sóc để cây ra hoa tốt, nhân giống *in vitro* ở hầu hết các giống loài và ngày càng mở rộng về mặt đối tượng.

Bảo tồn, phát triển nguồn gen các loài lan ở Việt Nam không chỉ có ý nghĩa khoa học, mà đây còn là cơ sở để chúng ta tái tạo lại một nguồn tài nguyên đang bị khai thác tràn lan.

“Nghiên cứu giải pháp bảo tồn và phát triển sản xuất loài lan rừng có giá trị kinh tế cao tại Bình Phước” là đề tài được Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Phước thực hiện trong thời gian 30 tháng, từ tháng 10 năm 2008 đến tháng 3 năm 2011. Đề tài tiến hành điều tra số lượng các giống loài lan hiện hữu ở các khu rừng trên địa bàn tỉnh; nghiên cứu tìm hiểu về đặc điểm sinh thái, khả năng thích nghi với điều kiện môi trường của mỗi giống, định danh phân loại các giống; tìm kiếm, thu thập các giống lan rừng trên địa bàn tỉnh, xây dựng vườn ươm sưu tập, lưu giữ, chăm sóc, bảo tồn các giống lan đặc trưng của rừng Bình Phước; nghiên cứu thiết lập quy trình nhân nhanh các giống lan quý bằng phương pháp nuôi cấy mô. Qua quá trình điều tra, thu thập, đề tài đã thu được 2.050 cây lan trưởng thành, phân thành 38 loài có tên khoa học, phân bố tại rừng Bình Phước, trong đó có 23 loài đặc hữu Việt Nam, 7 loài có giá trị kinh tế cao được nhân giống sản xuất đại trà [23].

“Điều tra tài nguyên di truyền các loài lan rừng Vườn Quốc gia Cát Tiên và nghiên cứu các biện pháp nhân nhanh để bảo tồn” là nghiên cứu của Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ tỉnh Đồng Nai. Đề tài được thực hiện với mục tiêu sưu tập, bảo tồn các loài lan đặc hữu, quý hiếm của Vườn Quốc gia Cát Tiên và khảo sát tính đa dạng của một số loài lan rừng, đồng thời xây dựng quy trình nhân nhanh một số loại lan rừng đặc hữu của Vườn Quốc gia Cát Tiên và một số loài lan quý hiếm cần bảo tồn, có giá trị kinh tế hiện nay. Công trình đã thu thập được 35 loài lan rừng làm nguyên liệu ban đầu để bảo tồn và nghiên cứu; nuôi cấy *in vitro* các loài lan rừng bằng mẫu chồi, đốt thân, bằng hạt, và quy trình chăm sóc cây con ngoài vườn ươm.



“Nghiên cứu phương pháp nhân nhanh và bảo tồn phong lan rừng tại vườn quốc gia Ba Bể “là công trình của Nguyễn Tiến Dũng và cộng sự. Đề tài điều tra, thu thập các loài phong lan rừng tại vườn quốc gia Ba Bể, sau đó nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô từ quả lan. Kết quả điều tra, thu thập các loài phong lan rừng tại vườn quốc gia Ba Bể đã đưa về được 18 loài lan đang bị khai thác tự do và có nguy cơ tuyệt chủng. Trong đó, lan Đai châu (*Rhynchostyli gigantea*), Đuôi chồn (*Rhynchostyli retuna*) là 2 loài thuộc chi *Rhynchostyli* có giá trị thương mại rất cao và đang có nguy cơ bị tuyệt chủng trong tương lai gần đã được thu nhận và nuôi cấy *in vitro* thành công.

Các nghiên cứu nhân giống *in vitro* nhằm mục đích bảo tồn những loài quý hiếm cũng được tiến hành trên nhiều đối tượng như Hoàng thảo sấp *Dendrobium crepidatum* Lind. & Paxt. [15], Thạch học thiết bì *D. officinale* Kimura et Migo., Hoàng thảo long nhãn *D. fimbriatum* Hook. [24;25], Thạch học *D. nobile* Lind. ... [15;18;24;25].

Việc sưu tập, nhân nhanh rất có ý nghĩa trong công tác bảo tồn. Cùng với đó để công tác này thực sự có hiệu quả thì việc định danh chính xác mẫu vật là công đoạn hết sức quan trọng. Khi sưu tập, định danh đúng giúp các nhà nghiên cứu không bỏ sót, thu thập trùng lặp các mẫu vật. Trong công tác nhân giống, phải định danh đúng các mẫu giống cây gốc để tránh trường hợp sau khi nhân giống, đưa ra môi trường nuôi trồng, chờ cây ra hoa mới phát hiện không phải giống mong muốn.

Phương pháp phân loại hình thái có lịch sử phát triển lâu đời và đã xây dựng được một hệ thống phân loại sinh vật nói chung và thực vật nói riêng tương đối đầy đủ và toàn diện. Phương pháp phân loại này chủ yếu dựa vào sự khác biệt về đặc điểm hình thái sinh học giữa hai hay nhiều cá thể. Tuy nhiên, phương pháp này cũng gặp rất nhiều khó khăn khi cần xác định những mẫu vật có đặc điểm giống nhau do cùng thích nghi với điều kiện môi trường, hoặc khó nhận biết do có nhiều điểm tương đồng ở bậc phân loại thấp như loài và dưới loài. Hiện nay, phương pháp phân loại hình thái vẫn được áp dụng phổ biến cho đại đa số các bộ sưu tập ở Việt Nam. Trong nhiều

trường hợp, nếu thiếu các chuyên gia phân loại hình thái, thiếu các tài liệu định danh hình thái chuẩn thì việc định danh một loài sẽ gặp rất nhiều khó khăn.

Ngày nay, những trở ngại trong việc phân loại này tồn tại ngay trong nhiều nhà hệ thống học, sinh thái học và tiến hóa đa dạng sinh học... Vì vậy, việc nhận diện chính xác bất cứ mẫu động, thực vật nào một cách nhanh chóng và tin cậy, là một thực tế mà tất cả chúng ta đều quan tâm. Những vấn đề về phân loại là lý do chính để phát triển một phương pháp mới để phát hiện nhanh bất cứ loài nào dựa trên trình tự DNA từ mẫu mô của sinh vật. Được gọi là “mã vạch DNA” vì nó giống như nhãn hiệu UPC (Universal Product Code) mà người ta có thể tìm thấy trên các sản phẩm thương mại. Trình tự của chuỗi DNA được tiêu chuẩn hóa thành các chuỗi ngắn có kích thước từ 400 – 800 bp (base pairs) gọi là mã vạch DNA [58]. Trên lý thuyết, chúng có thể dễ dàng được xác định và đặc trưng cho hầu hết các loài trên địa cầu. Bằng cách khai thác những tiến bộ của di truyền học phân tử, công nghệ giải trình tự nucleotide và tin sinh học, mã vạch DNA cho phép nhận diện một cách nhanh chóng và chính xác những giống loài đã biết và lấy thông tin từ chúng. Đây cũng là tiềm năng cho việc thúc đẩy sự khám phá hàng ngàn loài khác. Mã vạch DNA là công cụ chính đối với các nhà phân loại học trong việc lưu trữ và quản lý những dữ liệu về sự phong phú và những biến đổi trong sinh giới.

#### **1.4 Một số nghiên cứu đa dạng di truyền ở chi lan *Dendrobium***

##### ***1.4.1 Các chỉ thị được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền ở chi lan *Dendrobium****

Rất nhiều loại chỉ thị đã được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền cho các quần thể, loài sinh vật. Chỉ thị hình thái là những dấu hiệu dễ sử dụng, nhưng có nhược điểm là giới hạn về số lượng, bị ảnh hưởng bởi các giai đoạn tăng trưởng của cây và các yếu tố môi trường. Các chỉ thị tế bào học với các dấu hiệu liên quan đến vị trí, trật tự, kích thước, hình dạng của các nhiễm sắc thể, các vị trí đồng nhiễm sắc, dị nhiễm sắc và các băng trong kỹ thuật nhuộm băng hiện nay không còn được sử dụng. Trước khi các chỉ thị DNA được phát triển, các chỉ thị hóa sinh như isozyme,

allozyme... là những công cụ phổ biến được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền. Tuy nhiên, những dấu hiệu sinh hóa này chỉ là biểu hiện của một phần nhỏ trong bộ gen và thể hiện sự đa hình thấp nên hiện nay cũng ít được sử dụng [60].

Ngày nay, các chỉ thị phân tử được xem là công cụ đánh giá đa dạng di truyền hiệu quả hơn cả vì chúng không bị ảnh hưởng bởi điều kiện môi trường, kiểu hình. Chỉ thị phân tử (chỉ thị di truyền) là các dấu hiệu hoặc các đặc trưng dựa trên sự khác biệt về trình tự DNA của mỗi sinh vật, từ đó có thể phân biệt giữa các cá thể. Các chỉ thị phân tử cung cấp một lượng lớn thông tin, mô tả về các mẫu giống nghiên cứu. Có nhiều kỹ thuật, loại chỉ thị phân tử khác nhau, một số chỉ thị đã được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền cho họ Lan như AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphism DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), SSR (Microsatellite or Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)... và phương pháp sử dụng dữ liệu trình tự DNA.

RFLP là chỉ thị đa hình về chiều dài của các đoạn DNA do enzym giới hạn tạo nên. Kỹ thuật này được ứng dụng để lập bản đồ gen, đánh giá đa dạng di truyền của các loài.

AFLP - đa hình chiều dài các đoạn được khuếch đại – là kỹ thuật dựa vào enzym giới hạn, phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction), có khả năng tạo ra một lượng lớn các vị trí đa hình mà không cần biết trước thông tin về trình tự DNA của chúng. Kỹ thuật này có ưu điểm là nhanh chóng trong việc phân tích đa dạng di truyền, không cần dùng nhiều loại môi. Tuy nhiên, AFLP là một chỉ thị trội, quá trình thao tác dài, phức tạp, tốn thời gian và lệ thuộc vào thao tác của người thực hiện [71].

RADP (Randomly Amplified Polymorphic DNA) – đa hình phân đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên – là kỹ thuật dựa vào phản ứng với các môi ngẫu nhiên, không tốn kém và dễ sử dụng. Các môi kết hợp với các trình tự DNA bổ sung, kết quả được thể hiện trên băng điện di, sự đa hình được phát hiện dựa trên sự hiện diện hay vắng mặt của một băng có trọng lượng phân tử nhất định. Ưu điểm của kỹ thuật này là

không cần biết trước trình tự DNA để thiết kế mồi, một bộ mồi có thể được dùng để đánh giá đa dạng di truyền cho nhiều loài khác nhau. Tuy nhiên, nhược điểm của kỹ thuật này là khó lặp lại, cùng một băng DNA trên gel điện di nhưng có phải cùng trình tự hay không thì không thể phát hiện được. Kỹ thuật này được ứng dụng để đánh giá đa dạng di truyền giữa các cá thể trong cùng một loài và giữa các loài khác nhau, xây dựng cây phát sinh chủng loại, lập bản đồ di truyền, xác định các gen cần tìm [51].

SSRs – Trình tự lặp lại đơn giản – là kỹ thuật sử dụng phản ứng PCR để nhân bản các đoạn DNA trên gen chứa các trình tự lặp lại (số base trong 1 đơn vị lặp lại nhỏ hơn 5). Ưu điểm của kỹ thuật này là có tính đặc hiệu, độ chính xác cao, đơn giản, dễ thực hiện, độ lặp lại rất cao. Tuy nhiên, kỹ thuật này yêu cầu phải thiết kế mồi chính xác. Kỹ thuật này được ứng dụng nhiều trong việc xác định huyết thống, đánh giá đa dạng di truyền và phân loại [51].

ISSR – trình tự nằm giữa các trình tự vệ tinh - là kỹ thuật ứng dụng phản ứng PCR để nhân đoạn gen nằm giữa 2 vùng lặp lại giống hệt nhau và ngược chiều nhau. Kỹ thuật này có ưu điểm là nhanh, dễ thực hiện, không cần thông tin về trình tự gen, cung cấp nhiều thông tin và có thể lặp lại. ISSR được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền, đánh dấu gen, phân tích nguồn gốc, xác định sự thay đổi genome và đánh giá con lai [51].

#### ***1.4.2 Các nghiên cứu đa dạng di truyền ở chi lan *Dendrobium****

Peng và cộng sự (2004) đã phân định các loài lan *Dendrobium* bằng kỹ thuật RAPD. Kết quả của nghiên cứu đã đề xuất 10 mồi decanucleotide (10 bp) từ 70 mồi và thu được 99 sản phẩm khuếch đại [79].

Yu và cộng sự (2004) đã tiến hành kỹ thuật AFLP trên 5 loài *Dendrobium*. Kết quả cho thấy 4 trong 5 loài lan *Dendrobium* được tập hợp thành một nhóm lớn và được phân định một cách rõ ràng. Đồng thời đề xuất các mồi AFLP từ 64 mồi được kết hợp [115].

Ding và cộng sự (2005) đã đánh giá sự khác biệt di truyền và sự đa dạng di

truyền rộng rãi giữa các quần thể lan *D. officinale* trong tự nhiên. Các phát hiện chỉ ra rằng kỹ thuật RAPD là công cụ hữu ích để đánh giá sự đa dạng di truyền, đánh giá và xác định các quần thể hoang dã của lan *D. officinale* [39].

Li và cộng sự (2005) đã tiến hành thiết kế các đoạn dò (probe) đặc hiệu từ DNA bộ gen của các loài lan *Dendrobium* có quan hệ chặt chẽ với nhau. Việc xác định được thực hiện dựa trên kỹ thuật DNA array hybridization. Mười bốn đoạn dò đặc hiệu đã được đề xuất từ 5 loài lan *Dendrobium*: *D. aurantiacum* Kerr, *D. officinale* Kimura et Migo, *D. nobile* Lindl., *D. chrysotoxum* Lindl. và *D. fimbriatum* Hook [65].

Shen và cộng sự (2006) xác định 8 quần thể lan *D. officinale* bằng cách sử dụng 10 cặp mồi được chọn từ 76 cặp mồi ISSR. Tổng cộng có 127 băng DNA được khuếch đại, trong đó 115 là đa hình. Nhằm tăng hiệu quả xác định, các marker ISSR được thiết kế dựa trên 6 băng đa hình trong việc xác định 8 quần thể lan *D. officinale* [84].

Wang và cộng sự (2006) đã sử dụng 10 cặp mồi RAPD và khuếch đại tổng cộng 188 băng DNA trong đó 180 là đa hình và 8 đơn hình khi nghiên cứu với 13 loài *Dendrobium*. Mức độ đa hình trung bình là 95,74%. Phân tích các mối quan hệ di truyền bằng phương pháp UPGMA cho thấy 13 kiểu gen có thể được phân thành ba loại với khoảng cách di truyền là 0,63 [98].

Với kỹ thuật công nghệ sinh học phát triển mạnh, các nhà khoa học Singapore, Đài Loan, Thái Lan đã đẩy mạnh nghiên cứu về đối tượng lan *Dendrobium*. Nghiên cứu “Phát hiện chỉ thị SSR và ứng dụng trong xác định giống lan *Dendrobium*” của Yue, Lam-Chanl và Hong là công trình gây được nhiều sự chú ý. Các tác giả đã xây dựng được 14 mồi SSR cho các giống lan *Dendrobium* và bước đầu thử nghiệm thành công trên 42 dòng lan *Dendrobium* lai. Ngoài ra, công trình còn đề cập đến việc phân tích mối quan hệ gần gũi của các giống có cùng nguồn gốc để xác minh lại nguồn gốc các giống hiện có ở Singapore [119].

Các marker vùng DNA tiểu vệ tinh được thiết kế bởi Gu và cộng sự năm 2007

cho đối tượng lan *D. officinale*. Tác giả đã tiến hành phân lập 12 vùng vị trí tiêu vệ tinh từ cơ sở dữ liệu. Những vị trí này hiển thị 3 – 12 alen trong mỗi vị trí. Tỷ lệ dị hợp tử dự kiến 0,162 – 0,605 và tỷ lệ dị hợp tử thu được 0,150 – 0,624 [46].

Yu và cộng sự (2007) đã tiến hành kiểm tra bộ gen của 10 loài lan *Dendrobium* với 17 cặp mồi RAPD. Tổng cộng có 200 băng RAPD đa hình thu được từ nghiên cứu. Số lượng băng đa hình trung bình trên mỗi mồi là 11,8. Mức độ tương đồng di truyền dựa trên RAPD nằm trong khoảng từ 0,336 đến 0,676. Phân tích UPGMA dựa trên dữ liệu đánh dấu phân tử RAPD chia 10 loài thành bốn nhóm [116].

Zang và cộng sự (2007) khuếch đại tổng cộng 142 băng, trong đó có 118 băng là băng đa hình (83,1% của tất cả các vị trí được khuếch đại). Kết quả phân tích cây phát sinh cho thấy rằng hệ thống các loài lan *Dendrobium* trong nghiên cứu được xây dựng dựa trên kỹ thuật RAPD tương đồng với hệ thống phân loại cổ điển trước đó [121].

Jing và cộng sự (2008) đã ứng dụng kỹ thuật RAPD để nghiên cứu sự đa dạng di truyền của lan *Dendrobium*. Tổng cộng có 70 mồi RAPD được sàng lọc trong số 103 mồi ngẫu nhiên được áp dụng trong khuếch đại ngẫu nhiên. Tổng cộng có 520 băng DNA được phát hiện, trong đó 471 băng DNA đa hình với tỷ lệ đa hình trung bình là 94,42%. Kết quả phân tích bằng UPGMA cho thấy 9 kiểu gen có thể được phân loại thành hai loại với khoảng cách di truyền là 0,44 [52].

Xiao và cộng sự (2008) đã tiến hành nghiên cứu các loài lan *Dendrobium* và một số loài lan khác bằng kỹ thuật RAPD. Khoảng cách di truyền của các loài lan *Dendrobium* nằm trong khoảng 0,0762 đến 0,68421 với giá trị trung bình 0,4438. Đồng thời khoảng cách di truyền trung bình giữa các loài lan *Dendrobium* và *Pholidota chinensis* là 0,71734 [108].

Verma và cộng sự (2009) đã phân tích mối quan hệ giữa các loài *Vanilla* được trồng, hoang dã và lai tạo bằng các kỹ thuật ISSR và RAPD. Kết quả đã phát hiện một số lượng đáng kể về sự đa dạng di truyền ở cả 2 kỹ thuật [95]. Ngoài ra, Ding và cộng sự (2009) đã sử dụng các marker ISSR và RAPD để nghiên cứu sự đa dạng

trong quần thể lan *D. officinale*. Cả hai marker phân tử đều cho tỷ lệ các băng đa hình cao (> 89%) và các marker ISSR đã phát hiện sự đa dạng hơn so với các marker RAPD trong 9 quần thể lan *D. officinale* tự nhiên. Phân tích AMOVA cho kết quả về sự biến đổi được phân vùng giữa các cá thể và các quần thể là 78,84% (ISSR) và 78,88% (RAPD). Cấu trúc di truyền này có thể là do sự thay đổi lớn về dòng gen do việc phân chia môi trường sống và sự khai thác quá mức của con người kể từ những năm 1950. Đồng thời nghiên cứu còn chỉ ra không có sự liên quan đáng kể giữa khoảng cách di truyền và địa lý ( $r = 0,276$ ;  $p > 0,05$ ) trong quần thể lan *D. officinale* [40].

Fan và cộng sự (2009) đã phát triển và thiết kế mười 10 vị trí tiểu vệ tinh (trong số 15 cặp môi) được sử dụng trong phân tích đa dạng ở lan *D. fimbriatum*. Các vị trí này được sử dụng để sàng lọc 25 cá thể. Trong số các vị trí, 10 vị trí là đa hình với 2 – 19 alen, ba vị trí là đơn hình, và phần còn lại không tạo ra các sản phẩm khuếch đại [43].

Xie và cộng sự (2010) đã sàng lọc tổng cộng 60 cặp môi cho việc nghiên cứu tính đa dạng di truyền của 48 mẫu lan *D. officinale*. Tỷ lệ dị hợp tử thu được và dự kiến lần lượt từ 0,60 - 0,85 và 0,49 - 0,85. Giá trị PIC của mỗi vị trí SSR thay đổi từ 0,437 - 0,829 với giá trị trung bình là 0,702. Kết quả cho thấy SSR là một kỹ thuật khả thi để xác định các cá thể *D. officinale* trong nuôi cấy mô [109].

Sử dụng kỹ thuật RADP, nhóm tác giả Bhattacharyya, Kumaria (Ấn Độ) đã mô tả đặc điểm phân tử và phân tích mối quan hệ di truyền của 60 mẫu *D. nobile* Lindl. thu nhận từ 6 quần thể trong tự nhiên. Kết quả cho thấy chỉ thị RADP có khả năng phân biệt về mặt di truyền và chia các mẫu trong nghiên cứu thành 2 nhóm chính [29].

Wang và cộng sự (2009) đã sử dụng 17 chỉ thị ISSR để đánh giá đa dạng di truyền của 31 loài hoa lan Hoàng Thảo được thu thập ở Trung Quốc. Kết quả cho thấy, trong số tổng 2368 băng được khuếch đại, có 278 vị trí ISSR có độ đa hình là 100% [100].

Peyachoknagul và cộng sự (2014) đã sử dụng kỹ thuật RFLP của vùng ITS và cpDNA (chloroplast DNA) để xác định 25 giống hoa lan Hoàng Thảo bản địa của Thái Lan [80].

Liu và cộng sự (2014) đã thiết kế 53 cặp mồi SSR, trong đó có 7 cặp đa hình và có thể dùng để phân biệt các loài lan *Dendrobium* trong nghiên cứu [68]. Kang và cộng sự (2015) cũng đưa ra kết luận các cặp mồi SSR có ứng dụng tốt trong phân tích đa dạng di truyền và phát sinh loài ở nhóm lan *Dendrobium* [54].

Tóm lại, trong giai đoạn 2004 – 2014, các chỉ thị phân tử như AFLP, RFLP, RAPD, SSR, ISSR... đều đã được sử dụng để phân tích đa dạng di truyền cho các loài thuộc nhóm lan *Dendrobium*. Các nghiên cứu đều đã đưa ra các chỉ thị có độ đa hình cao, trong đó các chỉ thị như RAPD, SSR, ISSR cho kết quả số lượng băng đa hình tốt nhất. Kết quả của các nghiên cứu này một lần nữa khẳng định mức độ đa dạng của nhóm lan *Dendrobium*, sự đa dạng này không chỉ thể hiện ở mức độ loài [54;65;79;98;100;108;116;119;121] mà còn ở cả mức dưới loài [29;39;40;43;46;84].

Ở Việt Nam, một số công trình nghiên cứu tiến hành phân tích đa dạng sinh học các loài thuộc chi *Dendrobium* chủ yếu sử dụng chỉ thị hình thái và RADP.

Nguyễn Thị Pha và cộng sự (2012) nghiên cứu đánh giá sự đa dạng di truyền của 12 mẫu hoa lan gồm 9 loài lan rừng và 02 loài lan lai có nguồn gốc từ Thái Lan của chi lan *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), kết quả phân nhóm di truyền 12 mẫu hoa lan thuộc chi *Dendrobium* có thể chia làm 3 nhóm chính [21].

Nguyễn Thị Mỹ Duyên và cộng sự (2012) với đề tài “Quan hệ giữa các giống, loài hoa lan (Orchidaceae) dựa trên đặc điểm hình thái” đã phân tích mối quan hệ của 37 loài hoa lan thuộc hai họ phụ là Cyripedioideae và Orchidioideae thông qua các chỉ tiêu hình thái và nông học. Trong đó, với đối tượng *Dendrobium*, kết quả nghiên cứu đã tìm ra được ba loài *D. pulchellum*, *D. Gatton Sunray* và *D. moschatum* có mối



quan hệ rất gần nhau, mức tương đồng lần lượt là 96,5% và 95%. *D. anosmum* 'Alba' và *D. parishii* 'Alba' có mối quan hệ rất gần nhau, mức tương đồng 98%. Tương tự, *D. anosmum* (Hawaii) và *D. parishii* giống nhau đến 95% [7].

### 1.5 Mã vạch DNA và ứng dụng trong nhận diện loài

Định nghĩa đơn giản nhất của mã vạch DNA là một hoặc nhiều trình tự gen được lấy từ mẫu gen đã được chuẩn hóa của bộ gen, dùng để xác định loài. Năm 2003, Herbert và các đồng nghiệp lần đầu tiên đã đề xuất việc sử dụng những trình tự thu gọn cho mục đích xác định nhanh chóng và chính xác “vị trí phân loại của loài” thông qua tất cả các dạng sống từ động vật cho đến thực vật... và trên những mẫu mô nhỏ. Việc phổ biến thông tin về mã vạch DNA được ứng dụng để nhận dạng các loài và được áp dụng đầu tiên trên động vật. Tuy nhiên, tiêu chuẩn thiết lập mã vạch DNA cho thực vật không được hội đồng các nhà thực vật học chấp nhận cho đến 6 năm sau khi tài liệu đầu tiên về mã vạch DNA trên động vật được công bố [34;49;58;59].

#### 1.5.1 Các vùng trình tự được sử dụng để xây dựng mã vạch DNA

Ở thực vật, DNA nhân, lục lạp và ty thể đều được nghiên cứu để sử dụng trong định danh phân tử.

Các trình tự trong ty thể có chỉ số đa dạng thấp giữa trình tự các loài; sự đa dạng của vùng mã hóa COI (Cytochrome c oxidase I) giữa các họ thực vật đã được ghi nhận là chỉ vài cặp base trên đoạn trình tự dài khoảng 1,4 kilo-base pair (kb) nên không thể sử dụng để làm DNA barcode cho thực vật.

DNA lục lạp là DNA sợi đôi, có chiều dài trong khoảng 35 - 217 kb tùy loài thực vật, trong đó phần lớn các loài có DNA dài khoảng 115 - 165 kb. Trong mỗi tế bào thực vật có chứa 1.000 – 10.000 bản sao cpDNA. Sự hiện diện của nhiều bản sao của gen lục lạp ở mỗi lục lạp, cùng với sự hiện diện của nhiều lục lạp trong mỗi tế bào lá tạo điều kiện khuếch đại vùng cpDNA cụ thể.

DNA lục lạp là cấu trúc ổn định, đơn bội, không tái tổ hợp và thường không thừa kế từ cha hoặc mẹ. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng các phân tử cpDNA được bảo

tồn về trình tự và sự sắp xếp các gen được ổn định cấu trúc trên quy mô tiến hóa lớn, đặc biệt là thể mẹ trong các loài có quan hệ gần gũi (Olmstead và Palmer 1994). Khi tăng phân kỳ tiến hóa, đột biến cấu trúc trở nên rõ ràng hơn, nhưng trình tự và trật tự gen tổng thể vẫn còn nhất quán. Sự ổn định cấu trúc này đã tạo điều kiện cho việc thiết kế các môi PCR 'phổ thông' và đầu dò cpDNA [77].

Nói chung, trong các tế bào, bộ gen ty thể tiến hóa với tốc độ chậm nhất, bộ gen của lục lạp với tốc độ nhanh hơn và hệ gen nhân với tốc độ nhanh nhất.

Các trình tự DNA trong lục lạp tham gia vào việc phân tích phân loại thực vật như: 16S-rRNA, *rbcL*, *atpβ*, *ndhF*, intron *trnL* và *matK*... trải rộng từ bộ cho đến mức dưới loài. Vùng 16S phù hợp ở mức bộ, trong khi *rbcL*, *atpβ* và *ndhF* phù hợp từ mức bộ đến mức loài. Vùng intron *trnL*, spacer *trnL-trnF* và *matK* có thể áp dụng trong một biên độ rộng từ bộ cho tới dưới loài. Vùng *atpβ-rbcL* có thể được sử dụng từ mức chi đến mức dưới loài [49].

Để khắc phục những hạn chế của cpDNA, cũng như để có được thông tin bổ sung và độc lập trong phân tích phát sinh loài, rDNA đã được áp dụng rộng rãi như một công cụ trong hệ thống học thực vật, và hiện nay trở thành marker thông dụng như cpDNA.

Trong tế bào rDNA được tổ chức thành hai phần riêng biệt: 5S và 18S-5.8S-26S. Cả hai phần của rDNA đều đã được sử dụng trong các nghiên cứu phát sinh loài, trong đó, vùng 18S-5.8S-26S được sử dụng thường xuyên hơn so với vùng 5S. Gen ribosome gồm hàng trăm đến hàng ngàn bản sao cho mỗi phần [28].

Việc sử dụng các gen trong nhân có ít bản sao cho phát sinh học vẫn còn trong giai đoạn đầu. Các gen trong nhân tiến hóa nhanh hơn so với các trình tự gen trong các bào quan (5 lần so với các gen lục lạp và 20 lần so với các gen ty thể), sự hiện diện của nhiều vùng độc lập và thừa kế từ cha mẹ. Tuy nhiên, nhược điểm của gen nhân chủ yếu từ các cấu trúc di truyền và động lực tiến hóa của bộ gen nhân phức tạp hơn và khó thu nhận và xác định [122].

Vùng ITS trong nhân có khả năng phân định loài rất cao nên nhiều nghiên cứu trước đây vẫn sử dụng vùng DNA này làm marker cho DNA barcode. Tuy nhiên vùng ITS là vùng phổ quát có ở hầu hết các sinh vật kể cả nấm, vi khuẩn nên việc giải trình tự dễ bị nhiễm, vùng này hiện nay được khuyến cáo là phải sử dụng kết hợp với các marker khác. Đặc biệt, các gen trong lục lạp lại được lựa chọn làm marker nhiều hơn cả vì tính chất di truyền theo dòng mẹ nên không có hiện tượng tái tổ hợp, cấu trúc gen bền vững và số lượng lục lạp nhiều nên số lượng bộ DNA thu được cũng nhiều. Trong khi các gen mã hóa có khả năng phân biệt ở mức độ loài trở lên, thì các vùng không mã hóa lại có độ biến thiên cao hơn nên cho phép phân định ở mức độ dưới loài. Hệ gen lục lạp được các nhà phân loại học phân tử đánh giá chúng là sự tích lũy các đột biến theo thời gian, do vậy sẽ phản ánh đúng mức độ tiến hoá giữa các loài. Cho tới nay, nhiều nghiên cứu tìm kiếm DNA barcode cho thực vật đã được tiến hành nhưng vẫn chưa có mã vạch nào là có khả năng nhận diện hầu hết các loài một cách hiệu quả tương tự như vùng COI cho động vật. Hơn thế, thực vật thường thay đổi nhanh chóng cấu trúc bộ gen ty thể của chúng. Vì thế các nghiên cứu tìm kiếm vẫn còn tiếp tục và còn được đề nghị là kết hợp nhiều đoạn trình tự với nhau để làm các DNA barcode ở thực vật.

Trong nghiên cứu của Kress và cộng sự (2005), hai vùng DNA được đề xuất là ứng viên tiềm năng cho ứng dụng mã vạch DNA ở thực vật có hoa, đó là vùng ITS (internal transcribed spacer region) ở nhân và vùng giữa các gen *trnH-psbA* ở lục lạp. Vùng ITS là vùng trình tự được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về phát sinh loài ở thực vật và nó thể hiện sự đa dạng cao giữa các loài. Trong khi đó, vùng *trnH-psbA* mặc dù khá ngắn (khoảng 450 bp) nhưng lại là vùng trình tự trong lục lạp, biến hóa nhất ở thực vật hạt kín và nó dễ dàng được khuếch đại ở hầu hết thực vật ở cạn. Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự so sánh bộ gen lục lạp của *Atropa belladonna*, *Nicotiana tabacum* và thí nghiệm trên 7 họ thực vật hạt kín có quan hệ gần với nhau và một nhóm các loài được lấy mẫu từ thực vật địa phương gồm 50 họ thực vật gồm 99 loài thuộc 80 chi [58].

Tổ chức Kew, Royal Botanic Gardens, ở Anh, một trong các viện khoa học tiên phong và dẫn đầu về lĩnh vực khoa học thực vật và bảo tồn lớn nhất thế giới cũng đã và đang thực hiện một dự án lớn để tìm ra mã vạch DNA chung cho tất cả các loài thực vật. Công trình đã tiến hành thiết kế các cặp môi phổ quát cho hơn 100 vị trí trên bộ gen lục lạp của thực vật. Những kết quả và nhận xét cho thấy các chú ý được tập trung vào các vùng gen mã hóa, và có 5 ứng cử viên được chọn làm mã vạch DNA cho thực vật đó là các vùng gen *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, *accD* và *YCF5*. Các nghiên cứu tiếp theo của dự án đề nghị có sự phối hợp các gen *rpoC1 + rpoB + matK* hoặc *rpoC1 + matK + trnH-psbA* với nhau để mã vạch DNA hiệu quả hơn.

Tổ chức CBOL (Consortium for the Barcode of Life) đánh giá bảy vùng gen lục lạp trên khắp bộ gen thực vật và đề xuất một sự kết hợp của *matK* và *rbcL* như mã vạch cho thực vật (2009).

Tổ chức China Plant BOL Group đề xuất việc bổ sung vùng ITS trong nhân (Internal Transcribed Spacer) kết hợp với *matK + rbcL* như mã vạch cho thực vật để có thể xác định tối đa các loài, thậm chí giúp phân định các loài có liên quan chặt chẽ (2011).

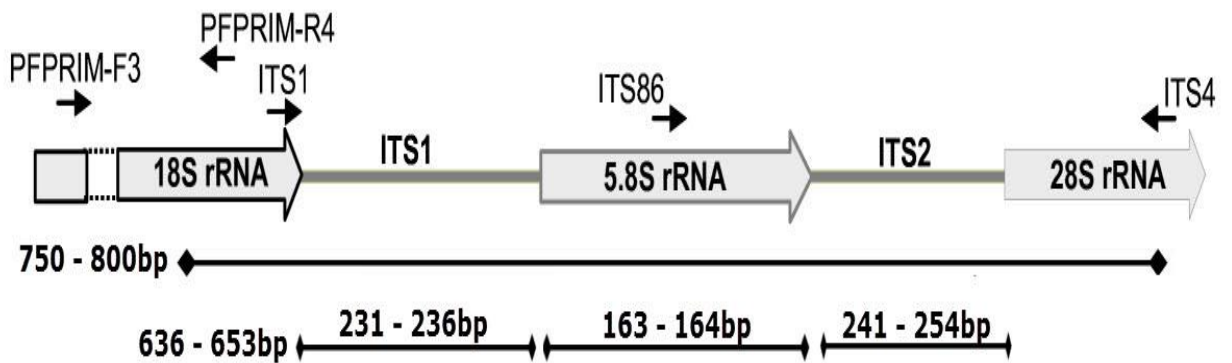
Hội thảo quốc tế lần thứ 4 về mã vạch cho sự sống đề nghị sử dụng 3 trình tự để làm mã vạch cho thực vật *matK + rbcL + psbA-trnH* [93].

*Kế thừa các kết quả nghiên cứu trên, đề tài quyết định chọn 4 trình tự để phân định, phân tích đa dạng di truyền cho các loài Dendrobium trong nghiên cứu.*

ITS (internal transcribed spacer) là một đoạn DNA mã hóa cho RNA không có chức năng, nằm giữa các RNA cấu trúc của ribosome thường được dịch mã. ITS là vùng không bảo tồn, nó nằm giữa các vùng DNA rất được bảo tồn là 18S, 5.8S và 28S. Để đảm bảo cho quá trình sinh tổng hợp protein diễn ra bình thường, sai sót ở các gen này luôn được sửa chữa kịp thời. Có thể nói rằng do các vùng xung quanh được bảo tồn nên vùng ITS là vùng hứng đột biến. Do vậy, vùng ITS được chọn để so sánh phân biệt các sinh vật với nhau. Một lợi thế của vùng ITS là nó bao gồm 2 trình tự riêng biệt (ITS1 và ITS2) được nối với nhau qua trình tự 5.8S. Vùng 5.8S khá

bảo tồn, trên thực tế có đủ tín hiệu phát sinh loài phân biệt ở mức bộ và ngành. Do đó các vị trí 5.8S có thể phục vụ như là một điểm neo liên kết quan trọng để so sánh trình tự trong cả phát sinh loài và nhận diện. Tiềm ích của vùng bảo tồn như 5.8S tạo thuận lợi cho việc so sánh cơ sở dữ liệu, đặc biệt là khi so sánh một chuỗi không tương đồng với thư viện trình tự. Trong quá trình trưởng thành của rRNA, phần ITS bị cắt và nhanh chóng phân hủy.

Vùng ITS là vùng có rất nhiều biến đổi. Mặc dù, vùng ITS thường được sử dụng trong nghiên cứu tiến hóa của sinh vật; tuy nhiên, phần lớn các so sánh trên vùng này thường sử dụng để xác định các biệt hóa trong cùng một loài [28]. Trình tự vùng ITS của lan *Dendrobium* đã được nhiều nghiên cứu phân tích và kết luận kích thước cụ thể của từng vùng (Hình 1.5).



**Hình 1.5** Cấu trúc vùng ITS của *Dendrobium*. [38]

*Gen rbcL* (Ribulose – 1,5 – Bisphosphate Carboxylase). Ribulose – 1,5 – Bisphosphate Carboxylase/oxygenase (Rubisco) là protein đệm trong lục lạp. Protein này có 8 tiểu phần lớn (55 kDa) và 8 tiểu phần nhỏ (12 kDa) giống nhau. Các tiểu phần lớn được mã hoá bằng gen lục lạp (*rbcL*), còn các tiểu phần nhỏ mã hoá bằng gen nhân. Các gen *rbcL* ở thực vật bậc cao không có intron. Các gen này được dùng nhiều trong nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại được sử dụng nhiều để dựng cây phát sinh loài ở các hạt. Tuy nhiên, đối với mối quan hệ di truyền ở mức dưới loài thì sự phân tích trên gen này gặp nhiều hạn chế. Vì vậy, việc cần phải tìm một

vùng DNA khác tiến hóa nhanh hơn gen *rbcL* để xây dựng cây phát sinh loài ở mức dưới loài và gen *matK* là một gen đầy hứa hẹn cho mục tiêu này [69].

Vùng *matK* (gen mã hóa cho maturase K) được phát hiện đầu tiên trên cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) khi giải trình tự vùng gen *trnK* mã hóa cho *trnALys* (UUU) của lục lạp. Nó gồm 1 đoạn ORF (Open Reading Frame) chứa 509 codon nằm trong intron của gen *trnK* và dường như chưa rõ chức năng. Các nghiên cứu sử dụng trình tự gen *matK* để xây dựng cây phát sinh loài như cho thấy gen *matK* có tính đa dạng hơn những gen khác có trong lục lạp và do vậy gen *matK* trở thành gen marker quan trọng để giúp phân loại thực vật. Gen *matK* cùng với vùng đệm *psbA - trnH* đã được đề xuất làm DNA barcoding cho nhóm thực vật có hoa. Kết quả sử dụng gen *matK* cho phân loại đã thu được sự tương đồng rất cao với phân loại hình thái và cho giá trị bootstrap từ 92 – 100% [69].

Vùng đệm *psbA - trnH*: thường được sử dụng cho nghiên cứu phân loại. Vùng này có kích thước xấp xỉ 450bp, xác suất nhân bản thành công rất cao (100% với các loài đã được nghiên cứu). Mức độ khác biệt trình tự nucleotide giữa các loài là 1,24% và sự khác biệt bên trong loài rất thấp từ 0,00% – 0,08% . Trình tự *psbA - trnH* cũng đã được công bố trên ngân hàng gen với nhiều loài khác nhau thuộc thực vật hạt trần, dương xỉ, rêu và rêu tản [69].

### **1.5.2 Các công trình xây dựng mã vạch DNA cho họ Lan và chi *Dendrobium***

Ngay sau khi khái niệm mã vạch DNA ra đời, nhiều công trình trên thế giới đã tập trung vào việc thiết lập bộ dữ liệu DNA cho sinh vật bản địa. Hoa Lan đã nhanh chóng là một đối tượng được các nhà khoa học quan tâm do những đặc tính độc đáo về mặt sinh học và giá trị về mặt kinh tế, y học ... của chúng. Họ hoa lan là một họ thực vật được đánh giá là rất khó để nhận diện, định danh đặc biệt là thời kỳ chúng chưa ra hoa. Nhiều loài 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. Hơn nữa, do họ Phong lan rất dễ lai tạo cả ngoài thiên nhiên lẫn trong nhà trồng do vậy có rất nhiều dạng trung gian hoặc các biến dị điều đó dẫn đến việc phân loại chúng ở

mức chi và loài cực kỳ khó khăn. Do vậy khi kỹ thuật phân loại bằng trình tự DNA ra đời, nó nhanh chóng trở thành công cụ hữu dụng trong việc định danh các loài, nhất là các loài Lan.

Theo báo cáo của Ding và cộng sự 2002, lan *D. officinale* có thể được nhận diện nhờ trình tự vùng ITS. Nghiên cứu tiến hành giải trình tự vùng ITS của 5 loài lan *Dendrobium* trong đó có *D. officinale* và 4 loài khác có hình thái tương tự. Vùng ITS sau khi xử lý có chiều dài 644 bp gồm 235 bp ITS1, 163 bp 5,8S và 264 bp ITS2. Khi so sánh 5 trình tự ITS của 5 loài thì lan *D. officinale* có thể dễ dàng được phân biệt với 4 loài còn lại ở 11 vị trí (7 trong ITS1, 1 trong 5,8S, 3 trong ITS2). Theo nhóm tác giả, ITS có thể được dùng để nhận dạng phân tử các giống lan *D. officinale* [41].

Nghiên cứu hệ thống phân tử bằng cách sử dụng vùng nằm giữa các vùng được phiên mã (ITS) của vùng 18 - 26S DNA ribosome đã được thực hiện bởi Clements (2003) [32]. Bài báo cáo đã kết hợp dữ liệu phân tử với dữ liệu hình thái, từ đó cung cấp một cơ sở cho việc đánh giá lại mối quan hệ phát sinh của các loài *Dendrobium* thuộc nhóm Pedilonum trong nghiên cứu.

Cheng và cộng sự (2004) đã phân biệt các loài lan *Dendrobium* bằng trình tự ITS bao gồm các vùng ITS1, 5,8S và ITS2. Các loài lan *Dendrobium* trong nghiên cứu gồm: *D. tosaense*, *D. docinale* và *D. moniliforme*. Chiều dài của sản phẩm PCR lần lượt 632 bp (*D. tosaense*), 627 bp (*D. docinale*) và 628 bp (*D. moniliforme*). Mức độ tương đồng của vùng rDNA giữa các loài trên trong khoảng 91 – 95 %. Từ đó, cho thấy khả năng ứng dụng vùng ITS cho các đối tượng lan *Dendrobium* khác [37].

Xu và cộng sự (2006) nghiên cứu về sự đa dạng trong trình tự ITS giữa các loài lan *Dendrobium*. Kết quả cho thấy vùng ITS có mức độ khác biệt từ 3,2 - 37,9% (ITS1) và 5,0 - 26,6% (ITS2). Sự đa hình trong loài rất thấp nằm từ 0 – 3,0% (ITS1) và 0 - 4,0% (ITS2). Từ đó cho thấy vùng ITS có thể phân định tốt các loài lan *Dendrobium* trong nghiên cứu [110].

Shao và cộng sự (2009) đề xuất rằng vùng *psbA-trnH* của cpDNA có thể là được sử dụng làm marker tiềm năng để xác định các loài lan *Dendrobium*. Độ dài của các sản phẩm khuếch đại khác nhau nằm trong khoảng từ 721 đến 767 bp. Khoảng cách di truyền thay đổi từ 0,0013 đến 0,0183 trong số 15 loài và khoảng cách di truyền trung bình là 0,0148. Đồng thời không có sự khác biệt giữa các quần thể tại vùng *psbA-trnH* của nhiều loài lan *Dendrobium* [82].

Yao và cộng sự (2009) đã chứng minh rằng vùng giữa gen *psbA-trnH* có thể được sử dụng làm mã vạch để phân biệt các loài lan *Dendrobium* khác nhau và để phân biệt các loài *Dendrobium* với các loài lan khác. Trong số các loài nghiên cứu, 17 loài lan *Dendrobium* có tỷ lệ biến thể 0,3 - 0,9%. Ngoài ra, khoảng cách di truyền khác loài giữa các loài *Dendrobium* được nghiên cứu nằm trong khoảng 0 - 0,1%. Sự khác biệt giữa trình tự *psbA-trnH* của 17 loài lan *Dendrobium* và *Bulbophyllum odoratissimum* dao động từ 2,0 - 3,1%, với giá trị trung bình là 2,5% [113].

Nhóm tác giả Đài Loan, Lee và cộng sự 2009, sử dụng trình tự vùng *matK* ở lục lạp để phân tích mối quan hệ di truyền của các loài lan *Dendrobium*. Kết quả cho thấy các trình tự *matK* của các loài nghiên cứu tương đồng ở mức độ cao (91,1% - 99,7%), nhóm kết luận rằng trình tự gen *matK* rất bảo thủ ở chi lan *Dendrobium* [63].

Asahina và cộng sự (2010) tiến hành phân tích phát sinh gen bằng cách sử dụng trình tự của hai gen lục lạp, gen mã hóa maturase (*matK*) và gen mã hóa tiểu đơn vị lớn carboxylase 1,5-bisphosphate (*rbcL*), dưới dạng mã vạch DNA để xác định các loài lan *Dendrobium*. Tổng cộng có 5 loài lan *Dendrobium* được sử dụng trong nghiên cứu: *D. fimbriatum*, *D. moniliforme*, *D. nobile*, *D. pulchellum* và *D. tosaense*. Các cây phát sinh được xây dựng từ dữ liệu *matK* đã phân định thành công từng loài với nhau. Mặt khác, vùng trình tự *rbcL* phân định được số loài ít hơn so với *matK*, do vùng *rbcL* là vùng mức độ bảo tồn cao. Xác định nguồn gốc cũng như tính đồng nhất của các thành phần hóa học là rất quan trọng để kiểm soát chất lượng các loài thảo dược và xác định chính xác loại thảo dược được sử dụng. Kết quả cho thấy phương pháp dùng vùng trình tự mã vạch có thể được áp dụng để xác định các loài



lan *Dendrobium* và là một công cụ đầy hứa hẹn để xác định nguồn gốc các loại dược liệu [27].

Theo Yuan và cộng sự 2009, vùng biến thiên của trình tự *rbcL* có thể dùng làm dữ liệu để phân tích mối quan hệ phát sinh loài của nhóm lan *Dendrobium*. Trình tự vùng *rbcL* trong lục lạp của lan *Dendrobium* dài khoảng 944 – 950 bp, trong đó vùng bảo tồn, vùng biến thiên và vùng được sử dụng để phân tích phát sinh loài lần lượt là 536bp, 466 bp, 439 bp [117].

Yuan và cộng sự (2009) đã chứng minh hệ thống phân loại lan *Dendrobium* dựa trên vùng trình tự ITS không hoàn toàn phù hợp với hệ thống phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái. Kết quả cho thấy loài lan *D. moulmeinense* (thuộc tỉnh Vân Nam) đã tách biệt ra khỏi 35 loài lan *Dendrobium* khác trên cây phát sinh [118].

Huang và cộng sự (2010) báo cáo rằng trình tự ITS có thể được sử dụng như một trình tự mã vạch tiềm năng trong việc xác định các loài lan *Dendrobium*. Cả vùng *rbcL*, *matK* và *trnH-psbA* đều không cho kết quả khả quan để xác định lan *Dendrobium*. Đồng thời, các marker đơn không thể phân định hoàn toàn các loài lan *Dendrobium* khác nhau. Từ đó, sự kết hợp giữa các vùng trình tự thành một mã vạch DNA cho lan *Dendrobium* là cần thiết [50].

Xiang và cộng sự (2011) đã tiến hành nghiên cứu bộ mã vạch DNA gồm: *rbcL*, *matK*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA* và ITS trong việc phân định các loài thuộc chi *Holcoglossum*. Kết quả cho thấy tất cả các vùng DNA này, ngoại trừ *psbK-psbI* và *atpF-atpH*, có thể được khuếch đại dễ dàng và giải trình tự với các môi đã thiết lập. Vùng DNA *matK* và ITS có độ biến động cao nhất. Trong số sáu vị trí, *matK* có khả năng phân định cao nhất với (8 trong số 12 loài *Holcoglossum*). Tuy nhiên, sự kết hợp của *matK* và ITS cho thấy khả năng xác định loài cao hơn so với mã vạch *matK* đơn. Các mã vạch DNA đơn hoặc kết hợp phân định tốt ở các loài *Holcoglossum* phân bố ở vùng nhiệt đới, nhưng khó phân định được các biến thể của loài tại dãy núi Hengduan Trung Quốc. Trong nghiên cứu, *matK* đã chứng minh là một mã vạch DNA hữu ích cho chi *Holcoglossum*. Tuy nhiên, các khu vực DNA bổ

sung vẫn được yêu cầu để đẩy nhanh quá trình kiểm soát và bảo tồn các loài lan thuộc chi này [107].

Li và cộng sự (2012) đã xây dựng cơ sở dữ liệu trình tự ITS1-5.8S-ITS2 của 43 mẫu lan *Dendrobium* để nghiên cứu mối quan hệ giữa hệ thống phân loại hình thái và phân tử. Tổng cộng có 35 mẫu lan *Dendrobium* được chia thành 5 cụm và hầu hết các mẫu (24 trên 35) được nhóm lại với nhau. Kết quả cho thấy phần lớn loài được phân định bằng ITS tương đồng với hệ thống phân loại hình thái. Tuy nhiên, có một số loài được phân nhóm lại khi phân loại bằng ITS so với phân loại bằng hình thái. Ngoài ra, 8 mẫu lan *Dendrobium* khô chưa xử lý cũng được xác định bởi rDNA ITS [64].

Theo kết quả nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại của 20 loài lan *Dendrobium* của Chiang và cộng sự 2012, vùng ITS1 và ITS2 có mức độ đa dạng cao hơn nhiều so với vùng 5,8S rDNA. Chiều dài vùng ITS của 20 loài trong nghiên cứu nằm trong khoảng 636 đến 653 bp, mức độ phân biệt 75,7% đến 99,1%. Phân tích phát sinh loài từ vùng trình tự này cho phép phân định 5 loài lan *Dendrobium* có giá trị được liệu và có chung hình thái ngoài [38].

Parveen và cộng sự (2012) đã phát triển mã vạch DNA của loài *Paphiopedilum* Ấn Độ cùng với 3 giống lai tự nhiên của chúng dựa trên các vị trí trong cả bộ gen của lục lạp và hạt nhân. Năm vị trí đã được đánh giá về khả năng phân định loài gồm: *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK* từ genome lục lạp và nrITS từ bộ gen hạt nhân. Khả năng phân định được đánh giá bằng mô hình Kimura 2 tham số (K2P) trên phần mềm MEGA 4.0 (Molecular Evolution Genetics Analysis). *MatK* với giá trị thể hiện mức độ khác biệt giữa các loài trung bình là 0,9 % và có khả năng phân định tất cả 8 loài *Paphiopedilum* (100 %) thành các nhóm riêng biệt. Vùng ITS, mặc dù có giá trị thể hiện mức độ khác biệt giữa các loài trung bình 4,4%, nhưng chỉ phân định được 50% loài. Ngoài ra, mã vạch DNA của ba giống lai cũng phản ánh nguồn gốc của chúng [78].

Một công trình mang tính tổng kết về mã vạch DNA cho lan *Dendrobium* công bố đầu năm 2012 do nhóm tác giả Ấn Độ (Singh và cộng sự, 2012). Theo đó, các tác giả đã giải trình tự cho 6 vị trí trong đó 5 nằm trong lục lạp là *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* và ITS nằm trong nhân của 36 loài lan *Dendrobium* [86].

Sharma và cộng sự, (2012) đã giải trình tự gen ITS nằm trong nhân của 10 loài địa lan *Cymbidium* thu thập từ vùng Đông Bắc của Ấn Độ để phân tích định danh dưới loài và quan hệ phát sinh chủng loài của chúng [83].

Công trình sử dụng mã vạch DNA để phân định loài *Cymbidium* ở Thái Lan (Siripiyasing và cộng sự, 2012) bằng các trình tự gen *rpoB*, *rpoC1*, *matK*, và vùng *trnH-psbA* cho thấy khoảng cách di truyền giữa các loài rất cao và phép phân định các loài *Cymbidium aloifolium*, *C. atropurpureum*, *C. bicolor*, *C. chloranthum*, *C. dayanum*, *C. devonianum*, *C. ensifolium*, *C. finlaysonianum*, *C. haematodes*, *C. insigne*, *C. lancifolium*, *C. lowianum*, *C. mastersii*, *C. munronianum*, *C. rectum*, *C. roseum*, *C. sinense*, *C. tigrinum*, và *C. tracyanum* rất tốt [87].

Lan *Herba Dendrobii* được sử dụng như một loại thuốc cổ truyền quý của Trung Quốc, do nhu cầu sử dụng, giá thành cao nên loại thuốc này được làm giả rất phổ biến. Nghiên cứu của Wu và cộng sự 2012 sử dụng vùng ITS để xác định các mối quan hệ phát sinh loài của 11 loài *Dendrobium* và 2 loài giả (có hình thái rất giống *Dendrobium*). Kết quả cho thấy chiều dài của vùng ITS dao động trong khoảng 635-641 bp và tỷ lệ GC dao động từ 50,55% đến 57,25%. Cây phát sinh loài chỉ ra rằng hầu hết các loài *Dendrobium* có liên quan chặt chẽ và nằm về một nhánh so với hai loài còn lại. Do đó, vùng ITS có thể được sử dụng như là một chỉ thị phân tử để phân biệt các loài thuộc nhóm lan *Dendrobium* với các loài khác không thuộc chi *Dendrobium* [106].

Năm 2013, Moudi và cộng sự đã phân tích phát sinh loài giữa 4 nhóm (4 section: *Aporum*, *Crumenata*, *Strongyle*, *Bolbidium*) thuộc chi lan *Dendrobium* thu nhận tại bán đảo Malaysia bằng trình tự vùng *rbcL*. Theo nhóm nghiên cứu, các dữ

liệu hình thái không đủ để tách các loài này thành 4 nhóm riêng biệt, dữ liệu phân tử sẽ bổ sung thêm các dữ liệu cần thiết cho thấy mối quan hệ giữa chúng [73].

Một nhóm tác giả Hàn Quốc (Kim và cộng sự 2014) đã nghiên cứu xây dựng mã vạch cho phong lan tại Hàn Quốc. Nhóm này đã phân tích 647 trình tự của các vùng DNA lục lạp *rbcL*, *matK*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI* và *trnH-psbA* của 89 loài phong lan và 4 loài đối chứng để phát triển một mã vạch DNA hiệu quả cho Orchidaceae tại Hàn Quốc. Mức độ phân giải loài cho từng mã vạch riêng lẻ dao động từ 60,5% (*rbcL*) đến 83,5% (*trnH-psbA*). Mức độ phân giải loài đã được tăng cường đáng kể khi kết hợp năm mã vạch này với nhau. Trong số 26 khả năng kết hợp có thể có của 5 vùng, 6 sự kết hợp cho kết quả phân giải loài cao nhất (98,8%). Trong đó, sự kết hợp của *atpF-atpH* + *psbK-psbI* + *trnH-psbA*, với trình tự DNA ngắn nhất, là lựa chọn tốt nhất cho mã vạch của các loài phong lan Hàn Quốc [56].

Theo nghiên cứu của một nhóm tác giả Nhật Bản, Takamiya và cộng sự 2014, mối quan hệ phát sinh loài của nhóm lan *Dendrobium* trong chi *Dendrobium* và các nhóm khác trong chi được phân tích bằng trình tự vùng ITS (vùng 18S – 26S của rDNA trong nhân) và *matK* (gen mã hóa cho Maturase và một phần intron của *trnK* của bộ gen lục lạp). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng chi lan *Dendrobium* trong nghiên cứu được chia thành 13 nhánh riêng biệt, các nhóm *Amblyanthus*, *Aporum*, *Breviflores*, *Calcarifera*, *Crumenata*, *Dendrobium*, *Densiflora*, *Distichophyllae*, *Dolichocentrum*, *Holochrysa*, *Oxyglossum* và *Pedilonum* có tính cận ngành hoặc đa ngành (paraphyly hoặc polyphyly), nhóm *Stachyobium* là nhóm đơn ngành (monophyly) [91].

Nhóm tác giả Trung Quốc (Feng và cộng sự, 2015) sử dụng trình tự vùng ITS2 để làm barcode và phân tích phát sinh chủng loài của nhóm *Dendrobium* dùng làm dược liệu, có nguy cơ tuyệt chủng và có hình thái ngoài giống nhau đặc biệt ở giai đoạn chưa ra hoa. Kết quả phân tích 43 mẫu ITS2 của *Dendrobium* và sử dụng trình tự này của 64 loài lan *Dendrobium* để xây dựng cây phát sinh loài cho thấy vùng ITS2

không chỉ hiệu quả khi được dùng làm barcode để xác định các loài lan *Dendrobium* mà còn có tiềm năng dùng để phân tích phát sinh loài của chi lan *Dendrobium* [44].

Theo Xu và cộng sự 2015, lan *Dendrobium* là một trong những chi lớn nhất của thực vật có hoa, có nhiều vai trò quan trọng trong nghề làm vườn, y học cũng như bảo tồn đa dạng sinh học; tuy nhiên, đây cũng là một nhóm khá khó khăn để xác định loài. Nhóm tác giả này đã phân tích 1698 trình tự của 184 loài lan *Dendrobium* chủ yếu thu nhận tại các vùng đất liền châu Á, đánh giá và kết luận 5 marker – mã vạch duy nhất (ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) có thể dễ dàng khuếch đại và giải trình tự, barcode do sự kết hợp giữa ITS và *matK* là mã vạch tối ưu dựa trên tất cả các phương pháp đánh giá. Nghiên cứu này cũng đề nghị giới thiệu sự kết hợp ITS + *matK* như là mã vạch cho nhóm thực vật có hoa [111].

Theo Srikulnath và cộng sự 2015, ở Thái Lan, lan *Dendrobium* là nhóm quan trọng trong việc sản xuất hoa cắt cành và xuất khẩu, các giống hoang dại được sử dụng để tạo các cây lai ngày càng khan hiếm và cần được bảo tồn. Ở Thái Lan, chi lan *Dendrobium* bao gồm 9 nhóm (section): *Breviflores*, *Callista*, *Dendrobium*, *Distichophyllum*, *Formosae*, *Pedilonum*, *Rhopalanth*e, *Stachyobium*, và *Strongyle*. Nghiên cứu sử dụng trình tự vùng ITS và gen *matK* để tái xây dựng cây phát sinh loài cho 27 loài lan *Dendrobium* trong tự nhiên. Kết quả cho thấy cây phát sinh loài từ trình tự vùng ITS và gen *matK* có vài điểm khác nhau, cây phát sinh từ trình tự vùng ITS giống với cây phát sinh trong các hệ thống học đã có hơn. Kết quả xây dựng phát sinh loài từ sự kết hợp 2 trình tự khá giống với cây phát sinh từ dữ liệu vùng ITS, tuy nhiên vẫn có một vài điểm khác biệt so với hệ thống phân loại bằng hình thái [89].

Năm 2015, Wonnapijit và cộng sự (Thái Lan) phân tích phát sinh loài cho nhóm lan Lọng *Bulbophyllum* bằng trình tự 2 gen trong lục lạp (*matK* và *rbcL*) và 1 vùng trong nhân (ITS). Nghiên cứu này chỉ ra rằng trình tự vùng ITS có thể phân định rõ ràng ở cả những loài có quan hệ gần, trong khi sự kết hợp giữa 2 marker trong lục lạp cũng không đủ để phân biệt những loài có quan hệ gần gũi [104].

Li và cộng sự (2016) đã phân tích 5 mã vạch DNA (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS và ITS2) trên 127 mẫu đại diện cho 40 loài thuộc chi *Oberonia* từ Trung Quốc. Cả 3 mã vạch thuộc hệ gen lục lạp (*rbcL*, *matK* và *trnH-psbA*) có khả năng phân định thấp hơn so với các mã vạch thuộc hệ gen nhân (ITS và ITS2). Trong đó, ITS có tỷ lệ phân định cao nhất (82,14%). Khi kết hợp các tổ hợp gen thì mã vạch *rbcL* + ITS và *matK* + ITS được đề xuất làm mã vạch tốt nhất để xác định các loài *Oberonia*. Mặc dù khả năng phân định của 2 mã vạch trên không khác biệt so với vùng ITS đơn lẻ. Trong các nghiên cứu mã vạch DNA thực vật, việc sử dụng các marker từ các bộ gen khác nhau với đã được đề xuất, bởi vì sự kết hợp giữa các mã vạch DNA này cung cấp thông tin về phân định loài và quá trình tiến hóa [66].

Ghorbani và cộng sự (2016) đã tiến hành kiểm tra nguồn gốc của các củ lan được sử dụng làm bột Salep. Việc đánh giá nguồn gốc dựa trên các vùng trình tự ITS, *trnL-F*, và *matK* của 150 mẫu củ lan. Cơ sở dữ liệu tham chiếu trình tự bao gồm 211 trình tự ITS, 158 trình tự *trnL-F* và 121 trình tự *matK*. Kết quả cho thấy số lượng loài thuộc chi *Orchis* (34%), *Anacamptis* (27%) và *Dactylorhiza* (19%) là phổ biến nhất trong số các mẫu Salep. Nghiên cứu này cho thấy tất cả các loài phong lan trong khu vực Iran đang bị đe dọa bởi sản phẩm thương mại này. Đồng thời nhấn mạnh sự cấp bách của việc kiểm soát việc khai thác trái phép và buôn bán xuyên biên giới các củ lan được sử dụng làm Salep [45].

Năm 2017, Chattopadhyay và cộng sự đã thực hiện trên các vùng trình tự *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF*, ITS để xác định 14 chi lan, trong đó chi lan *Dendrobium* có 30 loài. Kết quả cho thấy *matK* và *rbcL* (tỷ lệ phân định được 52% và 48%) có khả năng phân định giữa các chi với nhau. Tuy nhiên để xác định các loài trong chi thì hai vùng trên bị giới hạn. Trong các vùng được khảo sát thì ITS có khả năng phân định ở cả mức độ loài (95,23%) [36]. Trên vùng ITS, ITS2 đã được đánh giá có khả năng phân định cao giữa các loài lan *Dendrobium* [68;101].

Ở Việt Nam cũng có một số công trình về hướng nghiên cứu này.

Năm 2012, nhóm tác giả Trần Hoàng Dũng và cộng sự đã thành công khi sử dụng mã vạch DNA từ đoạn trình tự ITS để nhận diện các biến chủng của loài Hương Thảo Trầm Rừng - *Dendrobium parashii* – một loài lan rất quý do chúng có mùi hương trầm rất đặc trưng [4].

Tác giả Trần Duy Dương (năm 2015) sử dụng chỉ thị ITS để nhận dạng một số nguồn gen Hoàng thảo bản địa quý của Việt Nam phục vụ công tác bảo tồn, làm cơ sở dữ liệu cho xây dựng mã vạch DNA. Nghiên cứu giải trình tự và sử dụng vùng ITS của 32 mẫu lan Hoàng Thảo ở Việt Nam để làm cơ sở nhận diện ở mức loài và dưới loài cho các mẫu vậy này (có 27 mẫu đã được định danh chính xác). Trình tự ITS một lần nữa cho thấy chúng là một mã vạch DNA phổ quát trong việc phân định loài và ở mức dưới loài cho nhóm thực vật có hoa [5].

Huỳnh Hữu Đức và cộng sự (2018) đã tiến hành thiết kế môi cho các trình tự: *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI* và ITS hỗ trợ xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA trong việc phân định các giống lan *Dendrobium* thuộc các nhóm: *Aerides*, *Coelogyne*, *Spathoglottis*, *Rhyncostylis*, *Ascocentrum* và *Arachnis*. Kết quả cho thấy các vùng trình tự đều cho kết quả khuếch đại từ các cặp môi được thiết kế: 97,56 % *rbcL*, 95,12 % *matK*, 97,56 % *atpF-atpH*, 97,56 % *psbK-psbI*, 95,12 % *trnH-psbA*, 85,37 % ITS1, 82,93 % *rpoB*, 82,93 % *rpoC1*. Từ đó, hỗ trợ cho việc lựa chọn các vùng mã vạch DNA để xây dựng cơ sở dữ liệu cho các giống lan rừng Việt Nam để phân loại, đánh giá và xác định loài [8].

Nghiên cứu của nhóm tác giả Vũ Thị Huyền Trang (2019) đã khảo sát các vùng ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1* và *trnH-psbA* giúp nhận diện nhanh 22 loài lan Hải (*Paphiopedilum*) Việt Nam. Kết quả cho thấy, sự kết hợp của ITS - *matK* có khả năng phân định cao nhất (17/22 loài) [97]. Nghiên cứu này cho thấy vùng ITS có thể ứng dụng trong việc phân định loài không chỉ trên lan *Dendrobium* mà còn trên những loài lan khác.

Tóm lại, phong lan nói chung và lan *Dendrobium* nói riêng là nhóm loài có giá trị kinh tế cao được làm thuốc, làm cảnh... Tuy nhiên, do điều kiện sống tự nhiên

ngày càng thu hẹp, sự khai thác quá mức của con người... mà chúng có nguy cơ biến mất trong tự nhiên. Các hoạt động bảo tồn nhóm loài này đang được tăng cường và quan tâm ở nhiều góc độ. Khảo sát, mô tả, thu thập để xây dựng các bộ sưu tập, nuôi cấy mô các loài quý hiếm và thông dụng... là hướng nghiên cứu đã được mở rộng trong thời gian qua.

Hướng nghiên cứu nhằm nhận diện, phân tích đa dạng di truyền cho nhóm lan *Dendrobium* hiện nay cũng đang được các nhà khoa học quan tâm. Nhiều nhóm kỹ thuật đã được ứng dụng như dùng chỉ thị hình thái, sinh lý, sinh hóa... và đặc biệt là các kỹ thuật có ứng dụng sinh học phân tử. Mỗi nhóm phương pháp đều có ưu và khuyết điểm riêng.

Hiện nay, mã vạch DNA là phương pháp hiện đại và đáp ứng được các yêu cầu như có tính phổ biến cao để có thể thực hiện trên nhiều loài; trình tự được dùng làm mã vạch có tính đặc hiệu cao và có hiệu suất nhân bản cao; có khả năng phân biệt đồng thời được nhiều loài.

Trong các trình tự được chọn làm mã vạch DNA ở thực vật, có rất nhiều trình tự đã được khảo sát trên nhiều nhóm loài khác nhau, trong đó có lan *Dendrobium*. Không giống như ở động vật, các nghiên cứu đã kết luận rằng không tồn tại mã vạch 1 vùng trình tự cho thực vật, và ngay sau đó người ta đã nhận ra rằng mã vạch có sự kết hợp nhiều trình tự là điều kiện tiên quyết cho mã vạch ở thực vật. Sau đó nhiều kiểu kết hợp các trình tự khác nhau đã được đề nghị.

Ở nhóm lan *Dendrobium*, nhiều kiểu kết hợp các marker đã được khảo sát và đề nghị. Từ các kết quả đó, nghiên cứu chọn một marker trong nhân là vùng ITS và 3 marker trong lục lạp (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) để phân tích, xây dựng mã vạch DNA và xác định mức độ đa dạng cho nhóm lan *Dendrobium* khu vực phía Nam.

### **1.5.3 Ứng dụng mã vạch DNA để xác định nguồn gốc bố mẹ**

Ở thực vật hạt kín, gen lục lạp thường được di truyền theo dòng mẹ. Bằng cách giải trình tự các gen lục lạp có thể xác định được cây có nguồn gốc làm mẹ. Trong



trường hợp biết nguồn gốc cây lai, từ kết quả cây mẹ, bằng phương pháp loại trừ, người ta có thể suy ra cây cho hạt phấn.

Nghiên cứu của Khew (2011) đã đánh giá tính khả thi của việc sử dụng mã vạch DNA để xác định nguồn gốc bố mẹ của một cây lan lai. Kết quả nghiên cứu cho thấy trình tự vùng *rbcL* ở các mẫu trong nghiên cứu không có biến thể nào nên không cần lặp lại đến lần thứ ba, vùng này không có khả năng sử dụng để xác định nguồn gốc bố mẹ. Trình tự vùng *matK* thích hợp cho việc nghiên cứu xác định nguồn gốc cây mẹ. Nghiên cứu này cũng khẳng định việc xác định chính xác nguồn gốc của một giống lan lai là vô cùng quan trọng với các nhà thực vật học, nhà lai tạo cũng như người sưu tập lan. Các đặc điểm của bố mẹ cho biết yêu cầu sinh trưởng, thói quen ra hoa... của cây lai đó. Đôi khi có trường hợp tranh chấp về nguồn gốc của một giống lan lai cụ thể như Vanda Tan Chay Yan hay Vanda Miss Joaquim [55].

## CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Mô tả hình thái: 40 mẫu giống lan *Dendrobium* thuộc Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM (Bảng 2.1).

**Bảng 2.1** Danh sách 40 giống loài lan *Dendrobium* từ Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM

STT	Tên thường gọi	Tên khoa học
1	Thủy tiên tím	<i>D. amabile</i> (Lour.) O' Brien
2	Thủy tiên dẹt	<i>D. sulcatum</i> Lindl.
3	Thủy tiên mỡ gà	<i>D. densiflorum</i> Lindl.
4	Thủy tiên vàng	<i>D. thyrsiflorum</i> Lindl.
5	Thủy tiên trắng	<i>D. farmeri</i> Lindl.
6	Hoàng phi hạc	<i>D. signatum</i> Rchb.f.
7	Giả hạc hè	<i>D. superbum</i> Lindl.
8	Giả hạc Hawaii	<i>D. anosmum</i> Lindl.
9	Giả hạc xuân tím	<i>D. anosmum</i> Lindl.
10	Giả hạc xuân Di Linh	<i>D. anosmum</i> Lindl.
11	Hoàng thảo hạc vỹ	<i>D. aphyllum</i> (Roxb.) C.E.C.Fisch.
12	Đại ý thảo	<i>D. aphyllum</i> (Roxb.) C.E.C.Fisch.
13	Thái bình	<i>D. pulchellum</i> Roxb. ex Lindl.
14	Thái bình lai ( <i>D. Gattton sunray</i> )	<i>D. pulchellum</i> “Gatton sunray “
15	Long tu	<i>D. primulinum</i> Lindl.
16	Long tu đá	<i>D. crepidatum</i> Lindl. & Paxton
17	Kim điệp vàng	<i>D. capillipes</i> Rchb.f.
18	Kim thoa	<i>D. chryseum</i> Rolfe

19	Báo hi	<i>D. secundum</i> (Bl.) Lindl. ex Wall.
20	Ý thảo ba màu	<i>D. devonianum</i> Paxton
21	Hoàng thảo thập hoa	<i>D. aduncum</i> Lindl.
22	Hoàng thảo tím Huế	<i>D. hercoglossum</i> Rchb. f.
23	Hoàng thảo ngọc thạch	<i>D. crystallinum</i> Rchb. f.
24	Hoàng thảo cong	<i>D. intricatum</i> Gagnep.
25	Hoàng thảo vôi	<i>D. cretaceum</i> Lindl.
26	Tử phi hạc	<i>D. tortile</i> Lindl.
27	Trúc phật bà	<i>D. pendulum</i> Roxb.
28	Trầm rừng	<i>D. parishii</i> Rchb.f.
29	Hoàng thảo chuỗi ngọc	<i>D. findlayanum</i> E.C.Parish & Rchb.f.
30	Hương duyên	<i>D. ellipsophyllum</i> Tang & F.T Wang
31	Nhất điểm hồng	<i>D. draconis</i> Rchb.f.
32	Lụa vàng (Nhất điểm hoàng)	<i>D. heterocarpum</i> Wall. ex Lindl.
33	Thanh hạc	<i>D. suzukii</i> T. Yukawa
34	Hoàng thảo đơn cam	<i>D. unicum</i> Seidenf.
35	Trầm hương (Hoàng thảo trầm hồng)	<i>D. hybrid</i> ( <i>D. anosmum</i> x <i>D. parishii</i> )
36	Trùng sơn	<i>D. venustum</i> Teijsm. & Binn.
37	Tử phi hạc	<i>D. tortile</i> Lindl.
38	Thanh hắc lan	<i>D. hemimelanoglossum</i> Guillaumin
39	Giả hạc Châu Như	<i>D. hybrid</i> ( <i>D. anosmum</i> x <i>D. aphyllum</i> )
40	Thất đốt họng đen	<i>D. findlayanum</i> E.C.Parish & Rchb.f.

Giải trình tự: sử dụng mẫu lá bánh tẻ của 84 mẫu giống lan *Dendrobium*. Trong đó:

- Đề tài sử dụng 71 mẫu giống của 25 loài *Dendrobium* để xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA (Bảng 2.2). Việc lựa chọn các mẫu lan *Dendrobium* khu vực phía Nam dựa trên hai cơ sở. Thứ nhất, các mẫu này thuộc Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM, báo cáo tổng kết đề tài năm 2011 của tác giả Dương Hoa Xô và cộng sự có ghi nhận vị trí thu mẫu [26]; thứ hai là kết hợp với những thông tin về sự phân bố của các loài lan ở Việt Nam trong “Trích yếu được cập nhật hóa về các loài lan của Việt Nam” [1].

**Bảng 2.2** Danh sách các mẫu lan *Dendrobium* được sử dụng để xây dựng mã vạch

STT	Tên thông thường ghi nhận	Tên khoa học ghi nhận	Các tên thông thường khác	KH mẫu
1	Thủy tiên tím	<i>D. amabile</i> (Lour.) O' Brien	Thủy tiên hương , Hoàng thảo duyên dáng, Kiều tím	1DT
				1DT2
				1PN
2	Hoàng Phi Giã hạc = Hoàng phi hạc	<i>D. signatum</i> Rchb. f. 1884	Hoàng thảo phi hạc	2DT
				2PN
				2TT
3a	Giã hạc hè	<i>D. anosmum</i> Lindl. (đồng danh <i>D. superbum</i> Rchb.f.)	Giã hạc, Lưỡng điểm hạc, Phi điệp	3TT
3b	Giã hạc xuân, Giã hạc Hawaii		Giã hạc, Lưỡng điểm hạc, Phi điệp, Giã hạc xuân, Giã hạc Hawaii	3DT
				27TT
3c	Giã hạc xuân mới, Giã hạc xuân Di Linh tím		Giã hạc họng trắng (var. <i>alba</i> ). Giã hạc họng tím ( <i>D. anosmum</i> var. <i>huttonii</i> )	27DT
				15TT
				15DT
4	Thủy tiên dẹt	<i>D. sulcatum</i> Lindl. (1838)	Hoàng thảo thủy tiên dẹt hay kiều dẹt, Hoàng thảo vàng cam	15PN
				5DT
5	Đại ý thảo	<i>D. aphyllum</i> (Roxb.) C. Fisch. 1928	Hạc vĩ, ngọc lan, thạch hộc không lá, lan Hoàng thảo hạc vĩ, vô điệp thạch hộc	6TT
				6DT
				6PN
6	Hoàng thảo thái bình	<i>D. pulchellum</i> Roxb. ex Lindl.	Hoàng thảo môi đỏ, Lông lầy, thạch hộc	10TT
				10DT

			lộng lẫy, Hoàng thảo Thái Bình	10DT2 10PN
7	Thủy tiên mỡ gà	<i>D. densiflorum</i> Wall. ex Lindl.	Thủy tiên vàng, thủy tiên mỡ gà	11TT 11DT 11DT2
8	Long tu	<i>D. primulinum</i> Lindl.	Long tu	12TT 12DT 12PN
9	Thủy tiên vàng	<i>D. thyrsoiflorum</i> Lindl.	Kim điệp hay kim điệp thân phình, Hoàng thảo kim điệp, thạch học dùi trống, củ chùy thạch học, Thủy tiên vàng, Thủy tiên mỡ gà, Kim điệp	13TT 13DT2 13PN
10	Thủy tiên trắng	<i>D. farmeri</i> Paxton Lindl.f.Rchb.f.	Thủy tiên trắng, Kiều trắng, Hoàng thảo thủy tiên.	14DT 14DT2 14PN
11	Báo hỷ	<i>D. secundum</i> (Bl.) Lindl.	Hoàng thảo báo hỷ	17TT 17DT
12	Xương cá	<i>D. aloifolium</i> (Bl.) Rchb. f.	Hoàng thảo móng rồng	18TT 18DT 18PN
13	Đại ý thảo ba màu	<i>D. devonianum</i> Paxton (1840)	Phương dung hay Hoàng thảo tam bảo sắc, Hoàng thảo mỹ dung, Ý thảo ba màu, Thạch học môi răng, Hoàng thảo tam bảo sắc	20TT 20DT 20DT2
14a	Thập nhất hoa, Thập hoa trắng, Thập hoa tím	<i>D. hercoglossum</i> Rchb. f. 1886 (đồng danh <i>D. linguella</i> Rchb. f. 1882)	Hoàng thảo tím Huế	21TT 21DT 21PN
14b	Hồng liên		Hoàng thảo Hương Vani, Hoàng thảo lưỡi thuyền.	33TT
15	Long nhãn, Hoàng thảo long nhãn	<i>D. fimbriatum</i> Hook (1823)	Kim điệp quần, mã tiên thạch học	22TT 22DT 22DT2
16	Trúc đen	<i>D. salaccense</i> (Bl.) Lindl.	Mộc lan Sa lặc, Hoàng thảo trúc	24TT
17a	Trường Sơn xanh			26TT

		<i>D. venustum</i> Teijsm. & Binn. 1864	Hoàng thảo yếu điệu, Hoàng thảo môi tơ	26DT 26DT2 29TT
17b	Trường Sơn trắng			
18	Kim điệp vàng,	<i>D. capillipes</i> Rchb.f.	Hoàng thảo kim điệp, Thanh Hoàng, Hoàng thảo sợi	28TT 28DT 28PN
19	Kim hoa thạch hộc	<i>D. nobile</i> Lindl.	Phi điệp kép hay Hoàng thảo căng gà, Hoàng phi hạc, thạch hộc, kim hoa thạch hộc, Hoàng thảo đùi gà, Hoàng thảo dẹt	30TT 30DT 30PN
20	Hoàng thảo xoắn họng vàng	<i>D. tortile</i> Lindl.	Hoàng thảo xoắn.	32TT
21	Hoàng thảo tuyết mai	<i>D. crumenatum</i> Sw.	Tuyết mai, Thạch hộc, Bạch câu	34TT 34PN
22	Hoàng thảo ngọc thạch	<i>D. crystallinum</i> Rchb. f. (1868)	Thạch hộc kim, Ngọc vạn pha lê, Hoàng thảo ngọc thạch, Hoàng thảo hoa sen, Phi điệp đơn	35TT 35DT 35PN
23	Hoàng thảo cong	<i>D. intricatum</i> Gagnep (1930)	Hoàng thảo hoa cong	36TT 36DT
24	Hoàng thảo vôi	<i>D. cretaceum</i> Lindl. 1847.	Hoàng thảo vôi, Long tu Lào (rất giống Long tu), Hoàng thảo sương mờ	37TT 37DT 37PN
25	Trầm rừng	<i>D. parishii</i> Rchb. f 1863	Giã hạc thân ngắn, Song hồng, Hoàng thảo tím hồng	38R- DT

Nghiên cứu đã thu 71 mẫu lá của các mẫu giống trong **Bảng 2.2** để chuẩn bị cho các nghiên cứu tiếp theo. Trong đó, 14 loài có kí hiệu 1, 2, 6, 11, 12, 13, 14, 18, 20, 22, 28, 30, 35, 37 thu được 3 mẫu cho mỗi đại diện. Loài *D. pulchellum* (10), *D. hercoglossum* (21, 33) và *D. venustum* (26, 29) thu được 4 đại diện, *D. anosmum* (3, 15, 27) thu được tất cả 7 đại diện. Các loài thu được 2 đại diện là 17, 34, 36. Riêng mẫu 5, 24, 32, 38R chỉ thu được 1 đại diện.

Đề tài sử dụng trình tự của 13 mẫu giống lai trong **Bảng 2.3** để ứng dụng truy nguyên nguồn gốc bố mẹ các giống lai. Các mẫu đều được thu tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM

Mỗi dòng để khuếch đại các trình tự thể hiện ở **Bảng 2.4**.

**Bảng 2.3** Danh sách một số giống lan thương mại và lan lai

STT	KH mẫu	Chú thích
1	L1	♀ <i>D. Burana white</i> x ♂ <i>D. anosmum</i>
2	207	♀ <i>D. Burana stripe</i> x ♂ <i>D. thyriflorum</i>
3	12	♀ <i>D. Burana white</i> x ♂ <i>D. Charming white</i>
4	88	♀ <i>D. Shavin white</i> x ♂ <i>D. Charming white</i>
5	BW	<i>D. Burana white</i>
6	BS	<i>D. Burana stripe</i>
7	SW	<i>D. Shavin white</i>
8	CW	<i>D. Charming white</i>
9	CN	Giã hạc Châu Như <i>D. anosmum</i> x <i>D. aphyllum</i>
10	31	Thái bình lai ( <i>Dendrobium Gattou sunray</i> ) ( <i>D. pulchellum</i> x <i>D. chrysotoxum</i> ) x <i>D. pulchellum</i>
11	38TT	Trầm hương (Hoàng thảo trầm hồng) <i>D. anosmum</i> x <i>D. parishii</i>
12	38DT	
13	38DT2	

**Bảng 2.4** Trình tự môi và chu trình nhiệt của các trình tự

Trình tự	Môi	Chu trình nhiệt	Nguồn
ITS	ITS1F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3')	98°C/55"	[102]
	ITS4R (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')	55°C/30" 72°C/40"	
<i>matK</i>	390F (5'CGATCTATTCATTCAATATTTCC3')	98°C/55"	[33; 111]
	1326R (5'TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT3')	50°C/40" 72°C/40"	
<i>rbcL</i>	aF (5'ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC3')	98°C/55"	[114]
	aR (5'CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTCTCCA3')	55°C/30" 72°C/40"	
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH-psbAF</i> (5'GTTATGCATGAACGTAATGCTC3')	98°C/55"	[31]
	<i>trnH-psbAR</i> (5'CGCGCATGGTGGATTACAAATCC3')	64°C/30" 72°C/40"	

## 2.2 Nội dung nghiên cứu

Với mục tiêu đánh giá mức độ đa dạng di truyền của các nhóm lan *Dendrobium* khu vực phía Nam, đồng thời khảo sát khả năng phân định loài của các vùng trình tự ITS, *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*. Đề tài tiến hành giải quyết 4 nội dung chính sau đây:

**Nội dung 1:** Mô tả, xây dựng cây phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái của 40 mẫu lan *Dendrobium*.

Đề tài chọn mô tả, xây dựng cây phát sinh dựa trên đặc điểm hình thái cho 40 giống lan *Dendrobium* có nguồn gốc ở khu vực miền Nam Việt Nam đã được định danh bằng phương pháp hình thái thuộc Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM.

**Nội dung 2:** Xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA cho 25 loài *Dendrobium* trong nghiên cứu.

71 mẫu giống thuộc 25 loài lan *Dendrobium* được tách DNA tổng số và khuếch đại với các vùng trình tự: ITS, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*. Trình tự sau giải được hiệu chỉnh loại bỏ các vùng mơ hồ trước khi kiểm tra tương đồng trên ngân hàng GenBank để xác định trình tự đặc trưng của các mẫu nghiên cứu.

Trình tự sau đó sẽ được sử dụng để xây dựng hệ thống mã vạch DNA cho từng mẫu vật. Hệ thống mã vạch DNA sau khi chuẩn hóa được đăng ký với ngân hàng GenBank.

**Nội dung 3:** Đánh giá đa dạng di truyền của nhóm lan *Dendrobium* bằng trình tự DNA marker

Tạo bộ dữ liệu trình tự DNA của từng marker cho các loài lan nghiên cứu và kết hợp các marker. Xây dựng cây phát sinh loài bằng thuật toán Maximum Likelihood bằng phần mềm MEGA 7.0. Từ đó đánh giá mức độ đa dạng di truyền của nhóm lan *Dendrobium* khu vực phía Nam.

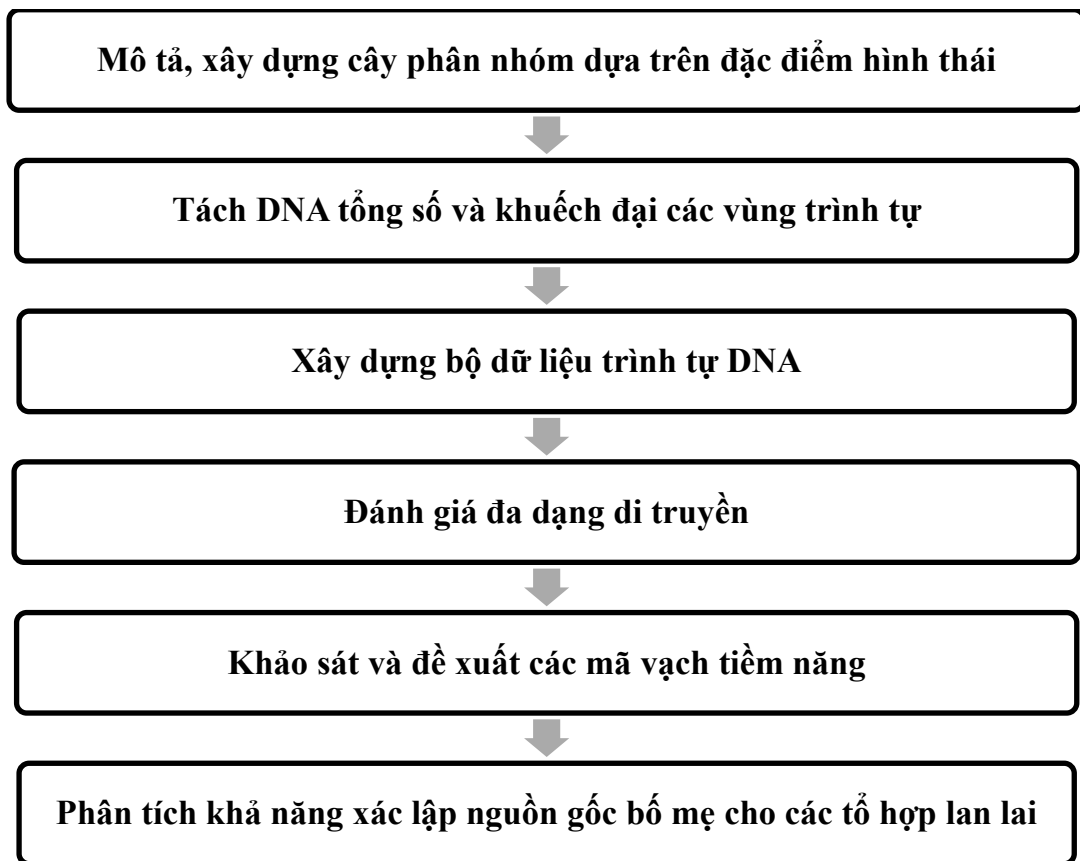


Khảo sát khả năng phân định của các marker (ITS, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) dựa trên cây phát sinh, các vị trí In-del (insertion/deletion) và phương pháp “Best Match / Best Close Match”. Từ đó đề xuất ra các marker tiềm năng.

**Nội dung 4:** Ứng dụng hệ thống DNA để truy nguyên nguồn gốc bố mẹ trong các tổ hợp lan lai và một số mẫu lai khác.

Đề tài giải trình tự gen *matK* và ITS của con lai từ các tổ hợp lai và lan Thái Lan nhập nội, sau đó tiến hành so sánh và phân tích các trình tự nhận được, so sánh với cơ sở dữ liệu trình tự DNA thu được và trên GenBank.

Sự liên kết của các nội dung nghiên cứu được thể hiện tóm tắt qua biểu đồ quy trình thực hiện ở **Hình 2.1**.



**Hình 2.1** Quy trình thực hiện các nội dung nghiên cứu

### 2.3 Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Thời gian: 8/2014 – 8/2018

Địa điểm: Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật, Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM, số 2374, Quốc lộ 1, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP.Hồ Chí Minh.

## **2.4 Hoá chất – thiết bị**

### **2.4.1 Hoá chất**

Hoá chất ly trích DNA:  $\beta$ -mercapto ethanol, Amonium Acetate, NaCl 5M, CTAB, PVP, EDTA, Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1), Isopropanol alcohol, Ethanol 70%, TE 1X, Tris-HCl 1M, GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit của hãng Thermo Scientific™.

Hoá chất PCR: Mytaq HS mix của hãng Bioline – EU, primer, nước cất hai lần khử trùng.

Hoá chất điện di: GeneRuler 1kb DNA Ladder của hãng Thermo Scientific™, TAE 0,5X, nước cất hai lần hấp khử trùng, thuốc nhuộm ethidium bromide.

### **2.4.2 Thiết bị**

Eppendorf 2/1,5 ml, eppendorf PCR nắp phẳng, chày nhựa, đầu tuýp các loại, bộ micropipet, bồn ủ nhiệt, tủ lạnh, tủ âm 20°C, lò vi sóng, cân điện tử, máy ly tâm, votex, máy Nanodrop, khay đổ gel, gel doc, buồng điện di, máy PCR.

## **2.5 Phương pháp nghiên cứu**

### **2.5.1 Hệ thống hóa mẫu vật dựa trên đặc điểm hình thái**

Đề tài “Sưu tập, nhập nội, chọn tạo và nhân nhanh các giống hoa Lan phục vụ nội tiêu và xuất khẩu” của Dương Hoa Xô và cộng sự được nghiệm thu năm 2011 đã sưu tập, định danh dựa trên các đặc điểm hình thái gần 250 mẫu giống lan. Trong các mẫu giống này có 102 giống lan rừng, thuộc nhiều chi trong họ Phong lan. Từ 72 mẫu giống thuộc chi *Dendrobium*, dựa trên “Trích yếu được cập nhật hoá về các loài lan của Việt Nam”, đề tài chọn ra 40 mẫu giống (Bảng 2.1) ra hoa tại thời điểm nghiên cứu, có khu vực thu mẫu và khu phân bố tại miền Nam Việt Nam làm đối tượng

nghiên cứu. Các mẫu giống này đã được định danh bằng phương pháp hình thái, có tên đồng danh, tên khoa học, tên thông thường được thống nhất trong Bộ sưu tập.

#### 2.5.1.1 Mô tả đặc điểm hình thái của các giống *Dendrobium*

Đề tài mô tả hình thái 40 mẫu giống lan *Dendrobium* (**Bảng 2.1**) gồm 37 mẫu *Dendrobium* rừng và 3 giống lai là Thái bình lai, Giả hạc Châu Như và Hoàng thảo Trâm hương. Các mẫu giống này ra hoa đúng vào thời điểm thu mẫu. Mẫu được định danh tên latin trong Bộ sưu tập lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM, nhóm nghiên cứu kiểm tra danh pháp khoa học dựa trên một số tài liệu chuyên khảo về lan, sau đó được tái thẩm định bởi chuyên gia.

Phân tích hoa theo phẫu thức ngang: chọn 1 hoa đã nở hoàn toàn, dùng lưỡi lam cắt nhẹ nhàng từng cánh hoa bao quanh cột nhị nhụy, sau đó sắp xếp các cánh hoa và cột nhị nhụy đối xứng qua một mặt phẳng cho giống hoa ban đầu rồi ghi nhận hình ảnh [16].

Phân tích hoa theo phẫu thức dọc: chọn 1 hoa đã nở hoàn toàn, dùng lưỡi lam cắt đôi hoa thành 2 phần bằng nhau (hoa đối xứng 2 bên), quan sát và chụp hình phần nửa bên trái của hoa [16].

Các mẫu giống lan *Dendrobium* được ghi nhận 5 hình ảnh (toàn cây, 1 phát hoa, 1 hoa, hoa cắt dọc, hoa cắt ngang). Các hình ảnh được ghi nhận thực tế, rõ ràng, độ phân giải cao và được xử lý trên nền đen để làm nổi bật đối tượng nghiên cứu cùng tỉ lệ xích để có thể hình dung kích thước thật của đối tượng.

Mô tả hình thái thực vật: tham khảo bảng các tính trạng trong quy phạm khảo nghiệm DUS với Địa lan và lan Hồ điệp [9]. Có 40 mẫu có hoa được mô tả thống nhất như nhau gồm 72 đặc điểm với các thông tin về rễ, thân, lá, hoa [**Phụ lục 1**]. Khảo nghiệm DUS (the examination of distinctness, uniformity and stability – đánh giá tính khác biệt, tính đồng nhất và tính ổn định) là khâu quan trọng trong quá trình thẩm định một giống cây trồng mới để cấp bằng bảo hộ, khảo nghiệm để tạo ra bản mô tả giống và việc sử dụng các đặc tính xác thực của giống nhằm xác định một giống.

### 2.5.1.2 Phân tích mối quan hệ của các giống *Dendrobium* dựa trên đặc điểm hình thái

Phương pháp xây dựng cây phân nhóm bằng phần mềm NTSYS PC: Nhập dữ liệu của các mẫu giống lan vào bảng tính Excel. Số liệu được mã hóa theo hệ nhị phân 0 và 1, mẫu nào có thì ghi là “1”, không có thì ghi là “0”. Sau đó, đưa dữ liệu vào chương trình NTSYSpc 2.1 phân tích theo phương pháp UPGMA, tạo giản đồ phả hệ tương quan giữa các các giống, loài hoa lan [3].

### 2.5.2 Xác định trình tự của 5 vùng DNA marker

#### 2.5.2.1 Phương pháp thu thập và bảo quản mẫu lan

25 loài *Dendrobium* bản địa, có nguồn gốc thu mẫu và khu phân bố tại khu vực phía Nam được lựa chọn để phân tích ở mức độ phân tử. Mẫu chọn phải thỏa mãn các tiêu chí: hình thái ngoài to đẹp, không bị bệnh, không tàn úa, có lá bánh tẻ. Mỗi mẫu thu nhận sẽ được tiến hành bảo quản lạnh sâu bằng cách chọn lá bánh tẻ, lau sạch bằng cồn, để nơi thoáng mát, sau đó cắt từ 1-5g lá tươi cho vào ống falcon 10ml, đánh số ký hiệu cẩn thận trong ống lẫn sổ theo dõi, sau đó cho ống mẫu vật vào tủ lạnh sâu (-20°C đến -80°C) cho các nghiên cứu về sau.

#### 2.5.2.2 Tách chiết và thu nhận DNA tổng số

Các mẫu lá sau khi thu nhận từ vườn lan được sử dụng để ly trích DNA tổng số bằng phương pháp CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) hoặc bằng bộ kit (GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit).

\* Phương pháp CTAB (Doyle and Doyle, 1990)

1. Nghiền 200 mg mẫu lá thành bột mịn trong khoảng 500  $\mu$ L dung dịch CTAB.
2. Chuyển hỗn hợp mẫu/CTAB sang microtube.
3. Ủ hỗn hợp mẫu/CTAB khoảng 15 phút ở 55°C trong bồn nước.
4. Ly tâm hỗn hợp mẫu/CTAB ở 12000 rpm trong 5 phút, thu dịch nổi sang ống mới.

5. Thêm vào mỗi ống 250  $\mu\text{L}$  hỗn hợp Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1), trộn dung dịch bằng cách đảo ngược ống. Sau đó, ly tâm ống ở tốc độ 13000rpm trong 1 phút.
6. Chuyển pha lỏng bên trên (chứa DNA) sang ống mới.
7. Thêm vào mỗi ống 50  $\mu\text{L}$  Amonium Acetate 7,5 M, 500  $\mu\text{L}$  ethanol tuyệt đối.
8. Đảo ống chậm rãi nhiều lần để kết tủa DNA. Thông thường, có thể nhìn thấy DNA kết tủa trong dung dịch. Có thể để ống ở  $-20^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ sau khi thêm ethanol.
9. Để rửa DNA, ly tâm hỗn hợp chứa DNA, loại bỏ dịch nổi, thêm vào 500  $\mu\text{L}$  ethanol 70% lạnh và đảo ống. Lặp lại bước này thêm 1 lần.
10. Ly tâm thu DNA ở tốc độ 13000 rpm trong 1 phút. Loại bỏ dịch nổi và để DNA khô (khoảng 15 phút). Chú ý không để DNA quá khô vì sẽ khó hòa tan trở lại.
11. Hòa DNA trong nước đã lọc khử trùng, không chứa Dnase (khoảng 50 – 400  $\mu\text{L}$ ).
12. Có thể thêm RNaseA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) vào nước trước khi hòa tan DNA (10  $\mu\text{L}$  RnaseA trong 10mL  $\text{H}_2\text{O}$ ).
13. Ủ DNA ở  $65^{\circ}\text{C}$  trong 20 phút để phá hủy Dnase và bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$ .

\* Tách chiết DNA bằng bộ kit (GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit)

1. Cân 100 mg mẫu lá nghiền trong niơ lỏng thành bột mịn.
2. Chuyển vào effendorf chứa sẵn 350  $\mu\text{L}$  Lysis Buffer A.
3. Bổ sung 50  $\mu\text{L}$  Lysis Bufer B, 20  $\mu\text{l}$  RNase A, trộn đều (vortex) trong 1 phút, ủ ở  $65^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút.
4. Bổ sung 130  $\mu\text{L}$  Precipitation Solution, lắc đều, giữ lạnh trên đá trong 5 phút.
5. Ly tâm 14000 rpm trong 5 phút.
6. Thu dịch nổi chuyển sang ống mới ( khoảng 450 – 550  $\mu\text{L}$ ).
7. Bổ sung 400  $\mu\text{L}$  Plant gDNA Binding solution, 400  $\mu\text{L}$  96% ethanol, lắc đều.
8. Chuyển 1/2 hỗn hợp (khoảng 600 – 700  $\mu\text{L}$ ) vào cột spin column.

9. Ly tâm 8000rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch lỏng qua cột.
10. Chuyển 1/2 hỗn hợp còn lại vào cột spin column.
11. Ly tâm 8000rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch lỏng qua cột.
12. Bổ sung 500  $\mu$ L dung dịch rửa ( Wash Buffer I), ly tâm 10000 rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch qua cột.
13. Đặt cột vào tube mới, bổ sung 500  $\mu$ L Wash Buffer II vào cột, ly tâm 14000 rpm trong 3 phút, loại bỏ dịch lỏng qua cột.
14. Đặt cột vào tube mới, bổ sung 100  $\mu$ L Elution, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
15. Ly tâm 10000 rpm trong 1 phút, thu dịch lỏng qua cột.
16. Lặp lại bước 14 và 15. Thu dịch lỏng (chứa DNA tổng số).
17. Sử dụng và bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.5.2.3 Kỹ thuật PCR, điện di

DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra định tính bằng điện di và định lượng bằng máy Nanodrop. Sản phẩm DNA tổng số đạt điều kiện sẽ được khuếch đại các vùng trình tự trong nghiên cứu (ITS, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) tương ứng với các cặp môi thể hiện trong **Bảng 2.4**. Các thành phần có trong phản ứng khuếch đại trình tự gồm 12,5  $\mu$ L Taq DNA pol 2x – premix, 1  $\mu$ L môi xuôi (5  $\mu$ M – 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L môi ngược (5  $\mu$ M – 10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L DNA khuôn và thêm nước cho đủ 25  $\mu$ L.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, 120V, 65mA trong 20 phút. Sản phẩm PCR của các mẫu sẽ được tải vào giếng cùng với một giếng chứa DNA ladder. Sau điện di, các băng sáng xuất hiện dưới tác dụng của tia UV và DNA ladder sẽ được dùng làm thang đo kích thước cho các sản phẩm PCR. Mỗi băng sáng sẽ biểu diễn cho các đoạn DNA có khối lượng phân tử khác nhau. Hai băng sáng liên tiếp cách nhau khoảng 100bp, băng nhỏ nhất (nằm dưới cùng) có kích thước 100bp, băng lớn nhất có kích thước 2000bp (2kb). Băng DNA phải sáng rõ, đúng kích

thước như trên lý thuyết thì xem như phản ứng khuếch đại thành công và có thể sử dụng sản phẩm PCR đó để giải trình tự.

Nếu quang phổ điện di cho kết quả một dải băng rộng hoặc cho nhiều vạch thì chứng tỏ DNA đã bị gãy đoạn nhiều hoặc lẫn DNA với RNA. Nếu quang phổ điện di cho băng gọn, rõ chứng tỏ DNA không bị đứt gãy và không lẫn tạp. Khi điện di, để hiện lên các băng DNA, trên băng gel điện di dùng ethidium bromid. Thuốc thử này tạo liên kết nhuộm với các base nito, khi chiếu tia tử ngoại (tia UV) vào băng gel thì các băng sáng hiện lên [6].

#### *2.5.2.4 Giải trình tự*

Sản phẩm PCR sau khi kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% được gửi giải trình tự 2 chiều bằng phương pháp Sanger sequencing với máy 3730xl DNA analyzer tại Công ty Macrogen, Hàn Quốc. Các 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 được tiến hành hợp thành 1 trình tự (consensus sequence) bằng phần mềm Seaview 4.0.

#### *2.5.2.5 Hiệu chỉnh trình tự*

Trình tự thô được loại bỏ các vùng mơ hồ tại 2 đầu và kiểm tra mức độ tin cậy của các nucleotide dựa trên peak tín hiệu bằng phần mềm FinchTV. Những trình tự có độ tin cậy thấp là các trình tự có peak tín hiệu thấp, chồng lên nhau sẽ được loại bỏ. Các trình tự thô sau khi được hiệu chỉnh được BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên cơ sở dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information) để kiểm tra mức độ tương đồng từ đó xác định lại chính xác nguồn gốc các trình tự. Các trình tự sau khi được xác định nguồn gốc được tiến hành sắp giống cột bằng phần mềm SeaView 4.0 nhằm phân tích những sai khác giữa các trình tự.

*Hiệu chỉnh trình tự bằng phần mềm FinchTV*

Kết quả giải trình tự 2 chiều được trả về dưới các dạng file: file AB1 (.ab1) và file text. Sử dụng phần mềm FinchTV mở file AB1 đối với trình tự được giải với mỗi xuôi (forward) và mỗi ngược (reverse).

Trong các cửa sổ hiện ra có các sóng sắc phổ:

- Màu xanh lục: nucleotide loại A (Adenine)
- Màu xanh dương: nucleotide loại C (Cystein)
- Màu đen: nucleotide loại G (Guanine)
- Màu đỏ: nucleotide loại T (Thyamine)

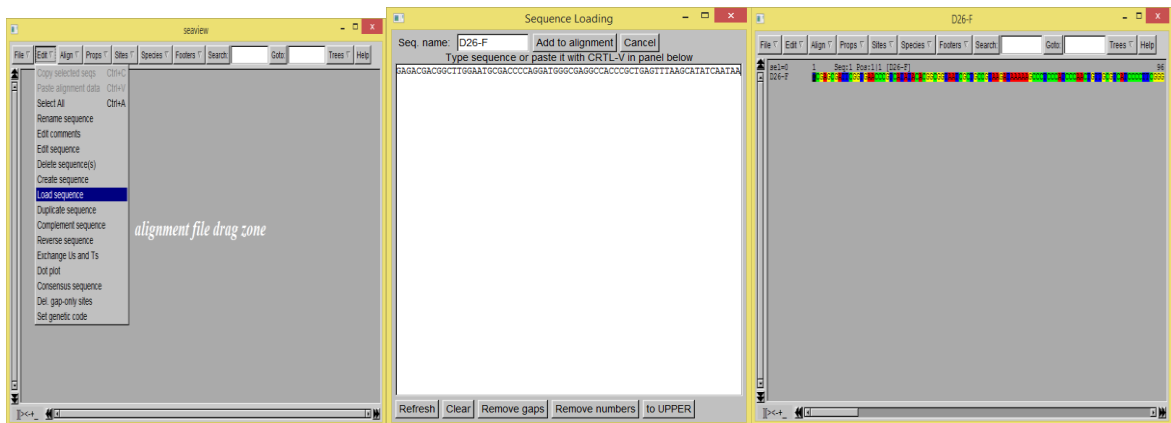
Nếu kết quả giải tốt sẽ thấy các đỉnh (peak) rõ ràng, không mập mờ (unambiguous) thể hiện cho từng loại nucleotide loại A – T – G – C. Sử dụng các thanh trượt X và Y để tăng hoặc giảm lần lượt chiều rộng và chiều cao của các đỉnh sóng nhìn chưa rõ. Quan sát và xóa bỏ các đoạn đầu và cuối của kết quả, những đoạn có các đỉnh sóng mập mờ.

*Hiệu chỉnh trình tự bằng phần mềm SeaView*

**Bước 1:** trong cửa sổ chương trình FinchTV chọn menu ‘Edit’, chọn ‘copy in FASTA Format’ (hoặc sử dụng tổ hợp phím nhanh Ctrl+C).

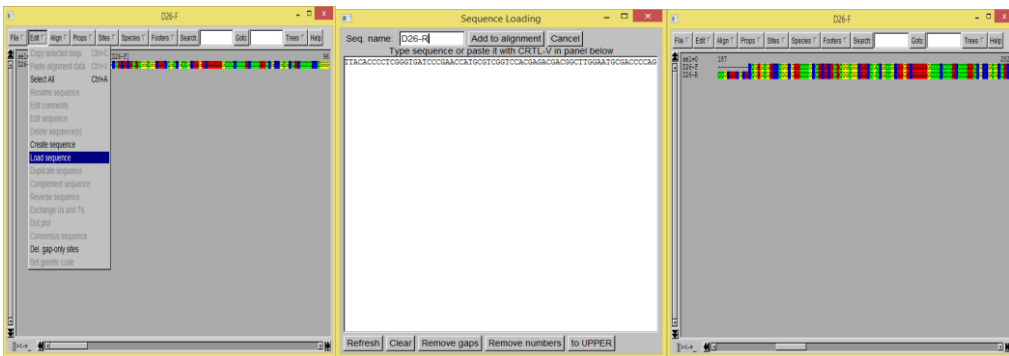
**Bước 2:** mở phần mềm SeaView 4.2.12, vào menu ‘Edit’ chọn “load sequence”. Khi cửa sổ hiện ra, nhấn tổ hợp phím Ctrl+V để dán trình tự đã copy dưới định dạng FASTA vào. Tiến hành cắt phần tên của trình tự (định dạng FASTA, ví dụ D26 – F) và chuyển vào ô ‘Seq. name’ trong cửa sổ, chọn “Add to alignment”.





**Hình 2.2** Quá trình hiệu chỉnh trình tự giải bằng môi xuôi trên SeaView

**Bước 3:** thêm trình tự ngược đã chỉnh sửa.



**Hình 2.3** Quá trình hiệu chỉnh trình tự giải bằng môi ngược trên SeaView

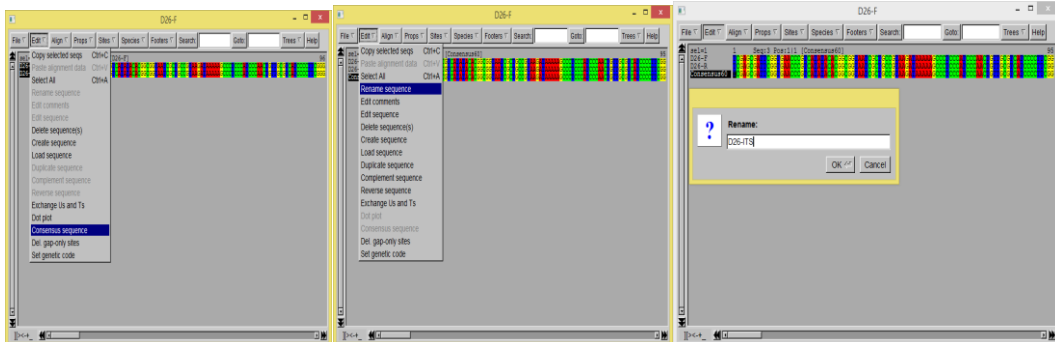
**Bước 4:** chọn 2 trình tự xuôi và ngược của cùng một mẫu trong cửa sổ SeaView, vào menu “Align” chọn “Align selected sequences” để sắp thẳng hàng.

**Bước 5:** kiểm tra các điểm sai khác giữa các trình tự. Mỗi điểm sai khác giữa hai trình tự xuôi và ngược sẽ được chỉnh sửa dựa theo trình tự nào có sóng sắc phổ rõ ràng hơn, đáng tin cậy hơn.

Đối với các đoạn chỉ có ở trình tự xuôi hoặc ngược thì tiến hành kiểm tra, hiệu chỉnh trình tự dựa trên việc quan sát các sóng sắc phổ. Nếu những điểm trong đoạn này không rõ ràng thì cần giải lại hoặc loại bỏ.

**Bước 6:** tạo trình tự thống nhất (trình tự liên ứng - Consensussequence), trong cửa sổ SeaView chọn 2 trình tự vào menu ‘Edit’ chọn ‘Consensus sequence’. Kết quả tạo

thành một trình tự kết hợp, thỏa hiệp, có thể đổi tên bằng cách chọn trình tự Consensus và vào ‘Edit’, chọn ‘Rename sequence’, đặt tên lại trình tự thỏa hiệp cho phù hợp.



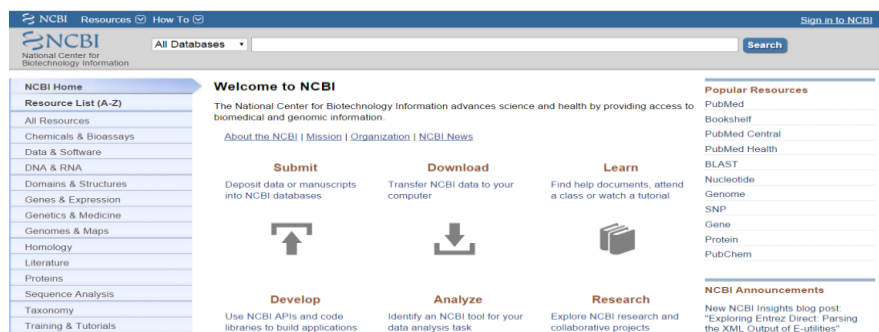
**Hình 2.4** Quá trình thống nhất 2 trình tự trên SeaView

*So sánh với cơ sở dữ liệu Genbank để kiểm tra độ chính xác của trình tự*

Sau khi hiệu chỉnh các sai lệch, trình tự liên ứng (consensus sequence) được rút ra từ hai kết quả giải trình tự và kiểm tra các sai lệch. Trình tự liên ứng là trình tự chính xác cho đoạn DNA khảo sát. Tuy nhiên, kết quả này cần được kiểm tra một lần nữa bằng công cụ BLAST để tìm các trình tự tương đồng có sẵn trên cơ sở dữ liệu Genbank. Nếu có các sai lệch giữa trình tự trên cơ sở dữ liệu và trình tự truy vấn thì cần được xem xét và kiểm tra lần nữa để xác nhận kết quả giải trình tự. Ngoài ra, việc thực hiện BLAST còn giúp kiểm tra sự nhiễm mẫu và đánh giá quá trình thu nhận và bảo quản mẫu.

Các bước thực hiện BLAST:

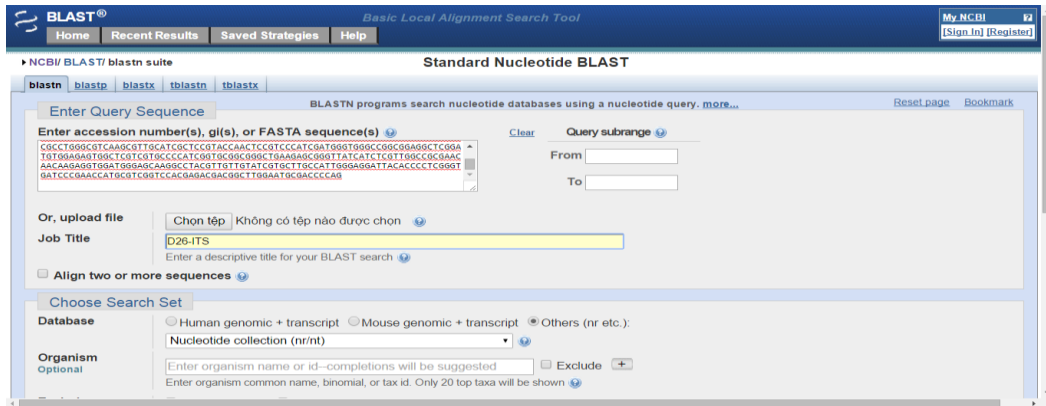
**Bước 1:** vào trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.



**Hình 2.5** Giao diện trang chủ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**Bước 2:** chọn BLAST ⇒ nucleotide blast.

**Bước 3:** copy và dán trình tự cần phân tích vào cửa sổ ‘Enter Query Sequence’. Trong tùy chọn ‘Database’ chọn ‘nucleotide collection’. Các tùy chọn khác đặt như mặc định.



**Hình 2.6** Giao diện BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**Bước 4:** chọn BLAST để phân tích và nhận kết quả.

#### 2.5.2.6 Xác định trình tự ITS2 từ trình tự ITS

Vùng ITS bao gồm ITS1 và ITS2 nối với nhau qua trình tự 5,8S. ITS ở *Dendrobium* biến thiên từ 636 – 653 bp, ITS1 có kích thước dao động 231 – 236 bp, 5,8S khá bảo tồn 163 bp, ITS2 có kích thước 241 – 254 bp [38]. Dựa vào đặc điểm này, trình tự ITS2 được xác định từ ITS như sau:

Bước 1: Thu nhận trình tự 5,8S, ITS2 tham khảo trên GenBank (Hình 2.7).

Bước 2: Sắp giống cột các trình tự 5,8S tham khảo với các trình tự ITS trong nghiên cứu, cắt bỏ từ đầu trình tự đến hết phần 5,8S.

Bước 3: Sắp giống cột các trình tự vừa cắt ở bước 2 với các trình tự ITS2 tham khảo để kiểm tra kích thước, cắt bỏ phần thừa (nếu có).

GenBank Send to: ▾

**Dendrobium anosmum isolate D4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: JN388570.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

---

Go to:

LOCUS JN388570 663 bp DNA linear PLN 27-DEC-2012  
 DEFINITION Dendrobium anosmum isolate D4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION JN388570  
 VERSION JN388570.1  
 KEYWORDS -  
 SOURCE Dendrobium anosmum  
 ORGANISM [Dendrobium anosmum](#)  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Liliopsida; Asparagales; Orchidaceae; Epidendroideae; Malaxideae; Dendrobieae; Dendrobium.

TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (21-JUL-2011) Center for Agricultural Biotechnology, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, No. 9 Section 4, Renmin Nan Road, Chengdu, Sichuan 610041, China

FEATURES  
 Location/Qualifiers  
 source 1..663  
 /organism="Dendrobium anosmum"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /cultivar="native A1"  
 /isolate="D4"  
 /db\_xref="taxon:524432"  
 /tissue\_type="leaf"  
 /country="China: Guangxi"  
 rRNA <1..3  
 /product="18S ribosomal RNA"  
 misc RNA 4..232  
 /product="internal transcribed spacer 1"  
 rRNA 233..395  
 /product="5.8S ribosomal RNA"  
 misc RNA 396..639  
 /product="internal transcribed spacer 2"  
 rRNA 640..663  
 /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN  
 1 ttatcgagat aatacattga gtgatcttga gaaccgctca aaataatcgg tggctatagc  
 61 ttccgagata aaaattcattc ccaatctttg cctcatcccc tcttcggggt gtggactgta  
 121 tgaaggatgg atgaaccccc aaatcggcgc agcatcgcgc caaggaaata tcgtaacaca  
 181 agcccttaaa tggatttggg gaatgggttg ctgttgcatg ccatttggat tgacacgact  
 241 ctgggcaatg gatattctgg ctctcgcac gatgaagagc gcagcgaat gcgatattg  
 301 gtgcgaattg cagaatcccc cgaaccatcg agtctttgaa cgcaagttgc gcccgaggcc  
 361 aatcgccaa gggcagctcc gcctggcgt caggcatttt gtcgctctg gcctagccac  
 421 ccatcgatgg atgtctggc gaggcctcgg atgtgcatgg tggctcctc tccccctcgg  
 481 cggcggggc tgaaggcgg ptcatcgtct tttggctgc gaacaataag gggtgattt  
 541 aatgaggcc tatgctattg tgtcgtcat ccctaagaga tgaccacacc tttgaggta  
 601 tcccaaatca tgcgttgatc catggatgpc gctttgaatg cgacccagg atgggcgagg  
 661 cca

//

**Hình 2.7** Cách thu nhận trình tự vùng ITS2 từ GenBank

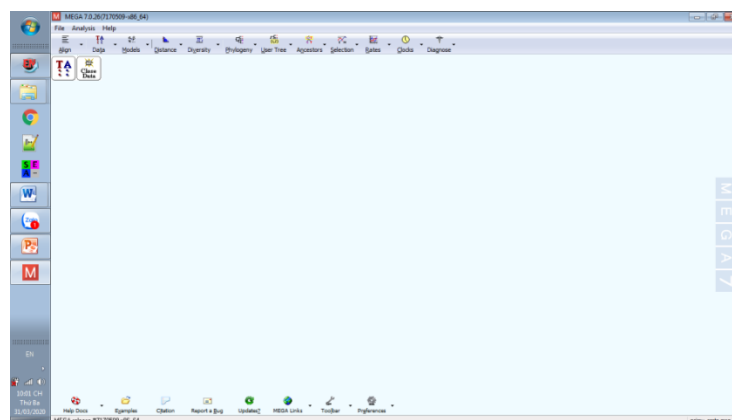
### 2.5.3 Phân tích mức độ đa dạng di truyền của nhóm lan *Dendrobium* bằng trình tự DNA marker

Việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền dựa trên mức độ phân nhánh cây phát sinh dựa trên các vùng trình tự theo cách từng marker riêng lẻ và ghép cặp các marker

với nhau. Cây phát sinh được xây dựng bằng thuật toán Maximum Likelihood với mô hình Kimura-2 thông số với 1.000 lần lặp lại trên phần mềm MEGA 7.0 [61].

### ***Các bước xây dựng cây phát sinh chủng loài***

- Thiết lập cơ sở dữ liệu vùng trình tự cho chi *Dendrobium*  
 Để tạo cơ sở dữ liệu của chi *Dendrobium*, đề tài khai thác dữ liệu trình tự trên <http://www.barcodinglife.com> với từ khóa “*Dendrobium*”.
- Sắp cột thẳng hàng, chọn vùng phân tích và phân tích cho từng vùng trình tự  
 Quá trình sắp cột thẳng hàng được thực hiện bằng phần mềm SeaView với tùy chọn MUSCLE và các thông số mặc định. Những điểm mờ hồ được hiệu chỉnh thủ công.
- Xác lập mô hình tiến hóa  
 The Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA) – Phân tích tiến hóa về mặt di truyền phân tử - là phần mềm được xây dựng để phân tích so sánh về DNA và protein, nhằm mục đích suy luận về các mô hình tiến hóa phân tử của gen, bộ gen của các loài theo quá trình tiến hóa. Việc xây dựng cây phát sinh dựa trên phần mềm MEGA 7.0 theo mô hình Kimura 2 - thông số, thuật toán Maximum Likelihood, chỉ số bootstrap là 1.000, để tiến hành tính toán khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh loài.



**Hình 2.8** Giao diện phần mềm MEGA 7.0

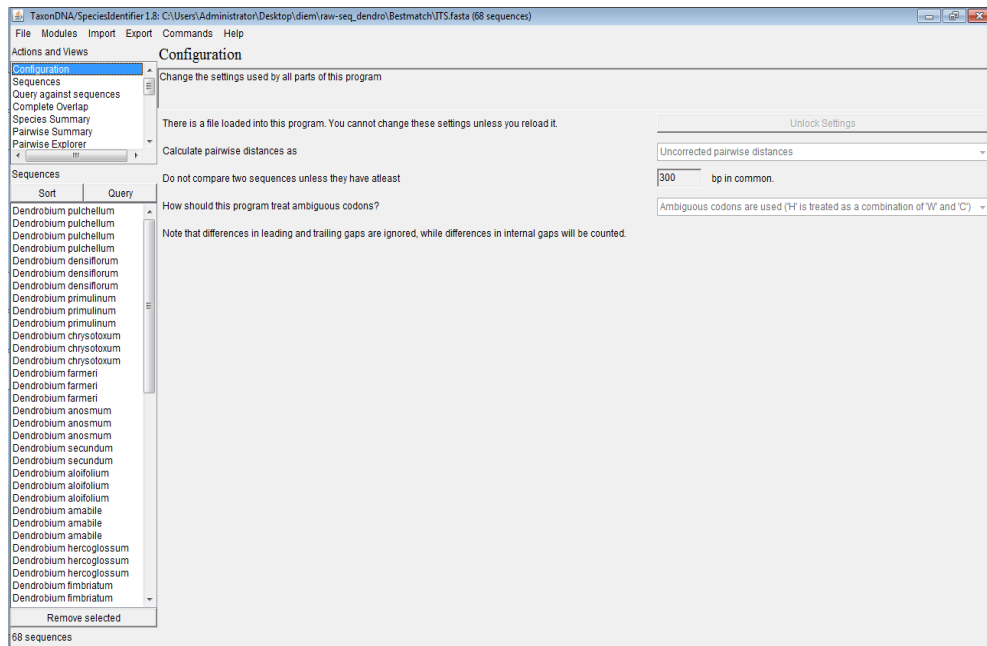
Việc xác định khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh loài cho phép ta xác định mức độ phân định loài của các marker. Từ đó, ta sẽ chọn được marker có độ phân định loài cao để làm bộ mã vạch DNA cho loài.

#### ***2.5.4 Phân tích khả năng phân định loài của các vùng trình tự***

Việc tìm ra các marker tiềm năng có vai trò quan trọng trong việc xác định nhanh các loài *Dendrobium*. Từ đó giúp hỗ trợ cho việc quản lý nguồn gen quý của Việt Nam, xác định những loài được dùng làm dược liệu. Đặc biệt, giúp ngăn chặn việc buôn bán bất hợp pháp các loài lan quý hỗ trợ cho việc bảo tồn. Tuy nhiên, mỗi phương pháp có những ưu, nhược điểm khác nhau. Từ đó, nghiên cứu kết hợp nhiều phương pháp để đạt được kết quả tối ưu nhất. Các vùng trình tự marker được khảo sát dựa trên khả năng phân định bằng cây phát sinh, kết hợp với việc phân tích các đoạn In-del. Đồng thời áp dụng song song phương pháp “Best Match / Best Close Match” để chọn ra được marker tiềm năng nhất.

Phân tích In-del dựa trên những đột biến thêm nucleotide (insertion) và đột biến mất nucleotide (deletion). Những đột biến này đôi khi chỉ xuất hiện tại 1 nucleotide hoặc 1 đoạn ngắn nên không thể tạo thành nhánh riêng trên cây phát sinh. Tuy nhiên, các đột biến trên lại mang lại thông tin rất hữu ích trong việc phân định loài.

Phương pháp “Best Match/ Best Close Match” dựa trên so sánh khoảng cách di truyền của các trình tự được phân tích. Sự khác biệt giữa “Best Close Match” và “Best Match” là giá trị Threshold (giá trị ngưỡng). Giá trị ngưỡng (%) được tính dựa trên tất cả các intra-distance (khoảng cách di truyền cùng loài), để xác định mức độ tương đồng của các trình tự và những trình tự không thỏa giá trị này (No match) sẽ bị xóa trước khi được xác định. Những trình tự đạt giá trị intra là giá trị bé nhất khi so với trình tự cùng loài được xếp vào Correct (xác định được). Nếu giá trị intra này cũng xuất hiện khi so sánh với các trình tự khác loài được xếp vào Ambiguous (mơ hồ). Khi một trình tự có giá trị intra lớn hơn inter được xếp vào Incorrect (không xác định được) [70].



**Hình 2.9** Giao diện phần mềm Speciesidentifier

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Mô tả và xây dựng cây phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái các giống lan *Dendrobium*

#### 3.1.1 Mô tả đặc điểm hình thái sơ bộ các giống lan *Dendrobium*

Mỗi mẫu giống được ghi nhận 72 đặc điểm hình thái. *Dendrobium* là chi hiện đang ghi nhận ngày càng nhiều các giống lai được công bố; do đó, tham khảo các tiêu chuẩn trong khảo nghiệm DUS và tạo ra các bản mô tả giống từ các đặc điểm hình thái là việc làm có ý nghĩa. Dựa vào khảo nghiệm DUS, đề tài ghi nhận các đặc điểm hình thái nhằm mục đích sau khi dùng hệ thống mã vạch DNA để xác định được tên loài của mẫu cần phân tích, có thể truy xuất thông tin về hình ảnh, các đặc điểm hình thái của mẫu đó.

Kết quả ghi nhận đặc điểm hình thái được mã hoá ở **Phụ lục 3**. Một ví dụ cụ thể ở mẫu *Dendrobium primulinum* Linld. có các đặc điểm như: rễ mọc dưới gốc, đa thân - thông, mặt cắt dọc của thân giả có dạng hình elip, mặt cắt ngang của thân giả có dạng hình tròn, đốt thân không có rãnh, lá có dạng hình chữ nhật thuôn dài, đỉnh lá nhọn, đối xứng, mặt cắt ngang của lá thẳng, lá không xoắn, màu xanh đậm, không có sắc tố anthocyanin, phát hoa dạng chùm, cuống hoa nửa rủ xuống, cuống hoa không có sắc tố anthocyanin, hoa đơn, cánh hoa trải ngang, hoa không có hương thơm hoặc chỉ thơm thoảng thoảng, lá đài lưng hình chữ nhật, hơi cong theo chiều dọc cánh đài lưng, đỉnh lá đài lưng có dạng tù, rìa của lá đài lưng không có hoặc có sự uốn cong trở lại rất yếu, không có hoặc có rất ít sự gợn sóng, lá đài bên có dạng hình chữ nhật, trục dọc của lá đài bên hơi cong, đỉnh lá đài bên nhọn, rìa của lá đài bên không có hoặc có sự uốn cong rất yếu, ngoài rìa lá đài bên không có hoặc rất ít sự gấp nếp, đài hoa có hai màu, không có vết đốm, vết sọc trên lá đài, không có vết đốm, vết sọc trên tràng hoa, tràng hoa có dạng thuôn chữ nhật, đỉnh tràng hoa chưa có dạng cụt, rìa tràng hoa không có hoặc có sự gấp nếp rất yếu tràng hoa có hai màu, môi hoa ra có dạng hình cầu dẹp, trục dọc môi hoa hơi uốn cong, đỉnh của tràng hoa không chia thùy, rìa môi hoa không có hoặc có sự uốn cong rất yếu, ngoài rìa cánh môi không có



hoặc có sự gấp nếp rất yếu, môi hoa có hai màu, có vết đốm, không có vết sọc trên môi hoa, lá mặt trên mặt dưới đều có màu xanh, lá đài bên không có lông, thẳng, cánh hoa có màu trắng, pha lê, hồng, trà, cánh hoa không có đốm, không có sọc, thẳng, không có lông, môi hoa có dạng phiến răng reo, màu trắng, pha lê, hồng, trà, có đốm vàng nghệ, môi hoa nhẵn, có lông, mép môi hoa có dạng răng reo (có ria, lông), phát hoa mọc ở nách lá, thời gian hoa tàn khoảng 2-4 tuần, hoa thơm vào ban ngày, hoa nở vào mùa xuân, lá sắp xếp theo kiểu hai hàng so le.

Kết quả phân tích đặc điểm hình thái cho thấy, như các nghiên cứu trước đó về lan *Dendrobium* của Phạm Hoàng Hộ, Trần Hợp, Dương Đức Huyền... các loài trong nghiên cứu cùng thuộc chi lan *Dendrobium*, nên đều có các đặc điểm hình thái như hệ rễ khỏe mọc từ gốc thân hoặc gốc giả hành; đa thân, giả hành phân đốt; lá có bề mặt nhẵn, mọc thành hai hàng tập trung ở đỉnh thân, không có cuống lá, phát hoa mọc ở nách lá, màu sắc hoa phong phú, hoa có cấu tạo giống nhau: Hoa có 3 cánh đài ngoài cùng, một ở phía trên hay sau gọi là đài lưng và 2 cánh đài ở 2 bên là đài bên. Cả 3 đều giống nhau về hình dáng và kích thước. Xen kẽ với 3 cánh đài là 3 cánh hoa với 2 cánh trên giống với cánh đài chỉ có cánh dưới cùng thay đổi thành cánh môi rất đa dạng theo các loài. Cánh môi là cái bẫy dụ dỗ và nơi đậu cho côn trùng đến thụ phấn. Giữa hoa có cột nhị nhụy với gốc là họng dạng phễu chứa mật. Dù có cấu tạo hoa giống nhau, mỗi loài hoa lại có đặc điểm hình dáng, màu sắc đặc trưng riêng, đây chính là dấu hiệu chính về hình thái để phân biệt các mẫu nghiên cứu. Bên cạnh đó, có một số đặc điểm khác biệt có thể dùng để phân biệt các loài với nhau như hình dạng thân, hình dạng lá... (Các chỉ tiêu phân loại được thể hiện ở **Phụ lục 1**)

Theo Wilfret và cộng sự (1979), bộ nhiễm sắc thể của *Dendrobium* thường là  $2n = 38$ , đôi khi là  $2n = 40$  và một vài ngoại lệ có thể là  $2n = 76$  hoặc  $2n = 114$ , một số loài có cùng số lượng nhiễm sắc thể nhưng kích thước của các nhiễm sắc thể lại có thể rất khác nhau. Nguyên nhân di truyền này có thể là một trong những lý do khiến hình thái của nhóm lan này rất đa dạng [104].



Giả hạc Hawaii - *Dendrobium anosmum* Lindl.



Hoàng thảo chuỗi ngọc – *Dendrobium findlayanum* E.C.Parish & Rehb.f.

**Hình 3.1** Kết quả giải phẫu và ghi nhận hình ảnh 2 mẫu giống *Dendrobium*:

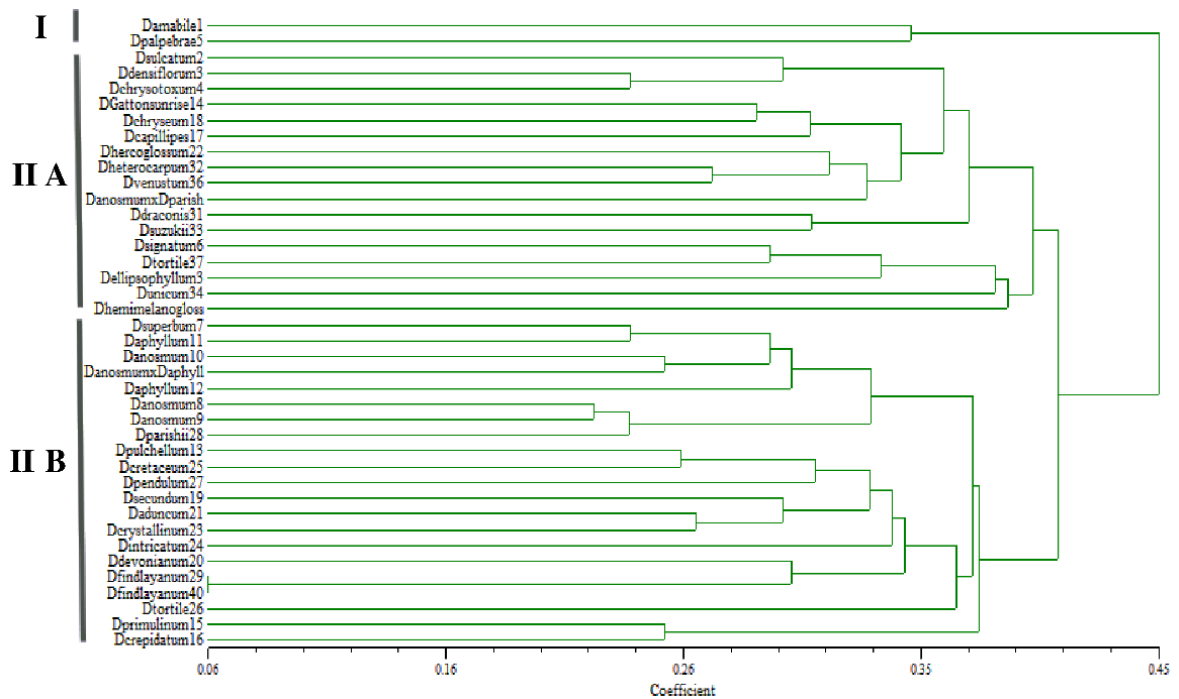
*D. anosmum* và *D. findlayanum*

(thanh ngang = 2cm). Các mẫu còn lại được thể hiện ở **Phụ lục 2**

Từ việc phân tích hình thái, nghiên cứu đã nhận thấy sự nhầm lẫn trong định danh mẫu giống Thủy tiên vàng (*D. thyrsiflorum* Lindl.), được điều chỉnh thành Thủy tiên hoàng lạp (*D. chrysotoxum* Lindl.). Hoàng thảo Thủy tiên là nhóm lan *Dendrobium* thuộc tông Kiều (Chrysotoxae) tổ Callista [11]. Ở Việt Nam, lan Thủy tiên khá được ưa chuộng do nhóm lan này có các đặc điểm như dễ chăm sóc, phát hoa to, màu sắc tươi sáng nổi bật và đặc biệt là một số loài có giá trị trong y học. Tuy nhiên, việc nhận diện, phân loại nhóm lan này hiện nay vẫn chưa thực sự thống nhất dẫn đến các quan điểm khác nhau về số lượng loài Hoàng thảo Thủy tiên ở Việt Nam. Theo Cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ, Thủy tiên vàng có hai loài khác nhau là *Dendrobium thyrsiflorum* và *Dendrobium farmeri*, giữa *Dendrobium thyrsiflorum* và *Dendrobium densiflorum* lại có nhiều đặc điểm khó phân biệt và vấn đề tương tự cũng xảy ra với *Dendrobium farmeri* (Thủy tiên vàng) và *Dendrobium palpebrae* (Trâm vàng) [12]. Theo Averyanov và cộng sự, *Dendrobium thyrsiflorum* và *Dendrobium densiflorum* là một loài (Thủy tiên vàng), Thủy tiên trắng có 2 loài là *Dendrobium farmeri* và *Dendrobium palpebrae* [1]. Cũng có công trình cho rằng đây là 4 loài khác

nhau *Dendrobium densiflorum* (Hoàng thảo Thủy Tiên mỡ gà), *Dendrobium fameri* (Hoàng thảo Thủy Tiên Vương), *Dendrobium palpebrae* (Hoàng thảo Thủy Tiên vàng), *Dendrobium thyrsiflorum* (Hoàng thảo Thủy tiên cam)... [90].

### 3.1.2 Phân nhóm dựa vào đặc điểm hình thái của 40 mẫu lan *Dendrobium*



**Hình 3.2** Cây phân nhóm dựa trên 72 đặc điểm hình thái của 40 mẫu giống lan *Dendrobium*

Theo kết quả phân nhóm (**Hình 3.2**), hai mẫu *D. amabile* và *D. palpebrae* tách riêng thành một nhóm I do hai loài này có hình dạng lá, các thành phần hoa khá giống nhau, tuy nhiên nhóm này lại tách biệt hẳn với nhóm các loài Hoàng thảo thủy tiên khác. Trong nghiên cứu có 5 loài Hoàng thảo thủy tiên thuộc nhóm Callista, ngoài 2 loài kể trên, ba loài còn lại là *D. sulcatum*, *D. densiflorum* và *D. chrysotoxum* có sự tương cận nhiều về hình thái nên tách thành một nhánh nhỏ trong nhóm IIA; trong đó, *D. densiflorum* và *D. chrysotoxum* có mức độ tương đồng về hình thái nhiều hơn so với *D. sulcatum*.

Nhóm II được tách thành 2 nhóm nhỏ hơn là IIA và IIB. Nhóm IIA có 17 đại diện thì chỉ có 1 mẫu *D. hemcoglossum* có dạng thân thông; trong khi nhóm IIB có

21 đại diện thì có tới 10 mẫu có dạng thân thông (5 mẫu giả hạc, hạc vĩ, đại ý thảo, trầm rừng, long tu và long tu đá).

*D. anosmum* (7,8,9,10), *D. aphyllum* (11,12) và *D. parishii* (28) có sự tương đồng nhiều về hình thái, có mối quan hệ tiến hóa gần gũi và loài lai được hình thành từ *D. anosmum* và *D. aphyllum* được xếp chung thành một nhóm. Tuy nhiên, cây lai Hoàng thảo trầm hồng (*D. anosmum* x *D. parishii*) lại tách riêng và thuộc về một nhóm khác chung với *D. hercoglossum*, *D. heterocarpum* và *D. venustum*.

Long tu (*D. primulinum*) và long tu đá (*D. crepidatum*) cũng có sự tương đồng nhiều về hình thái nên tách riêng thành 1 nhánh nhỏ trong nhóm IIB.

Mẫu Thái bình lai (*D. Gaston sunray*) có nguồn gốc là cây lai giữa (*D. pulchellum* x *D. chrysotoxum*) và *D. pulchellum*, nhưng trên cây phân nhóm hình thái, mẫu Thái bình lai ở nhóm IIA, cùng với *D. chrysotoxum*, còn *D. pulchellum* thuộc nhóm IIB.

Các mẫu nghiên cứu thuộc nhiều nhóm khác nhau theo báo cáo của Trần Hợp, Phạm Hoàng Hộ, Dương Đức Huyền... Tuy nhiên, với các đặc điểm hình thái được chọn để mô tả, phân tích, các loài thuộc cùng nhóm không thấy có sự tách biệt rõ ràng. Ví dụ ở nhánh IIB có 21 mẫu giống thì theo Phạm Hoàng Hộ có 16 mẫu thuộc nhóm *Dendrobium*, 2 mẫu *D. secundum* và *D. intricatum* thuộc nhóm *Pedilorum*, mẫu *D. aduncum* thuộc nhóm *Breviflores*.

Tóm lại, cây phân nhóm dựa trên 72 đặc điểm hình thái phần nào thể hiện được mối quan hệ di truyền của 40 mẫu giống *Dendrobium* trong nghiên cứu. Bên cạnh đó, một số loài có hình thái giống nhau, mối quan hệ gần gũi nhưng kết quả thể hiện trên cây phân nhóm chưa phản ánh được điều này. Các đặc điểm hình thái được mô tả, hình ảnh của 40 mẫu giống *Dendrobium* có thể dùng để nhận diện các mẫu giống, đặc biệt là các mẫu giống thu được có hoa. Phương pháp phân tích đặc điểm hình thái một lần nữa cho thấy giá trị trong việc định danh các loài.

Kết quả mô tả và phân nhóm các mẫu giống *Dendrobium* dựa trên đặc điểm hình thái trong nghiên cứu là nguồn dữ liệu hình thái đồng bộ có thể bổ sung cho:

Một số trang web về Lan trên thế giới cung cấp thông tin về tên khoa học, đồng danh, một số đặc điểm hình thái, sinh thái... Ở các web này, hình ảnh có thể thiếu hoàn toàn hoặc mỗi loài có 1-3 hình ảnh đại diện, các hình ảnh còn chưa đồng bộ về phong nền và chưa có tỉ lệ xích.

Các trang web về lan tại Việt Nam đa số là các hội chơi, mua bán và trao đổi lan. Các web này cũng đăng tải nhiều thông tin hữu ích về tên gọi, mô tả đặc điểm chung, phân bố, cách chăm sóc,... Về mặt hình ảnh, các web thường đăng tải các hình ảnh thực tế cả cây, phát hoa, các hình ảnh này thường thiếu tỉ lệ xích. Web trung tâm dữ liệu thực vật Việt Nam có chuyên mục cho từng loài thuộc chi *Dendrobium*, tuy nhiên đa số là thông tin về vị trí phân loại, tên Việt Nam, tên khoa học, đồng danh (nếu có), một số ít có hình ảnh minh họa (hình chụp thực tế cả cây hoặc phát hoa, thiếu tỉ lệ xích), rất ít đại diện được mô tả đầy đủ về hình thái, khu phân bố... Nếu có, các thông tin mô tả này được thể hiện bằng tiếng Anh, hình ảnh minh họa cho nhóm này rất đẹp và đầy đủ. Một số web còn sai sót khi cho rằng *Dendrobium* là loài. Nhìn chung, chất lượng và độ tin cậy của các web này chưa cao.

Sách chuyên khảo về lan và nhóm giáo trình về phân loại học thực vật tại Việt Nam hiện nay không nhiều. Các tài liệu này đa số tiến hành phân loại sau đó mô tả hình thái, minh họa bằng hình vẽ đẹp, sắc nét, tuy nhiên chưa đồng bộ như có những đại diện thì có hình vẽ toàn cây, 1 hoa, giải phẫu hoa thậm chí hoa đờ với tỉ lệ xích rõ ràng nhưng cũng có những đại diện chỉ có hình vẽ tổng thể 1 cây và thiếu tỉ lệ xích; các hình chụp thực tế chất lượng còn chưa cao và nhiều tác phẩm thiếu hẳn kênh minh họa này. Tác phẩm “The Orchid of Vietnam Illustrated Survey” cũng chỉ cung cấp hình chụp minh họa đầy đủ cho một số rất ít các đại diện.

Các sách tham khảo cung cấp thông tin về cách nuôi trồng, chăm sóc... lan được xuất bản khá nhiều. Các sách này không cung cấp nhiều thông tin về từng loài cụ thể, thuật ngữ sử dụng còn chưa chính xác, nhiều tác giả cho rằng *Dendrobium* là 1 loài, thậm chí 1 họ. Hình ảnh đẹp, tuy nhiên không phải là hình ảnh khoa học, chỉ có một số hình đại diện, không đồng bộ cho tất cả các loài, không có tỉ lệ xích ví dụ

như cuốn Trồng và chăm sóc hoa Lan, có hình minh họa hoa cắt ngang cho 4 chi trong họ Lan nhưng không có đại diện của *Dendrobium*.

### 3.2 Xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA cho 25 loài *Dendrobium* trong nghiên cứu

#### 3.2.1 Kết quả khuếch đại các vùng trình tự

DNA tổng số của 71 mẫu lá được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các vùng: ITS, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcL* bằng các cặp mồi tương ứng (Bảng 2.4). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8 % (100V trong 40 phút). Kết quả cho thấy, phần lớn các băng sáng, rõ (Hình 3.3 – 3.6). Không có hiện tượng đa băng xảy ra cho thấy các cặp mồi đã bắt cặp đặc hiệu với vùng trình tự tương ứng.

**Bảng 3.1** Thông kê kết quả tỉ lệ thực hiện thành công phản ứng PCR khuếch đại các vùng trình tự nghiên cứu

Trình tự	PCR	Tỉ lệ PCR thành công (%)
<i>rbcL</i>	36/36	100
<i>matK</i>	69/71	97,18
<i>trnH-psbA</i>	58/71	81,69
ITS	71/71	100



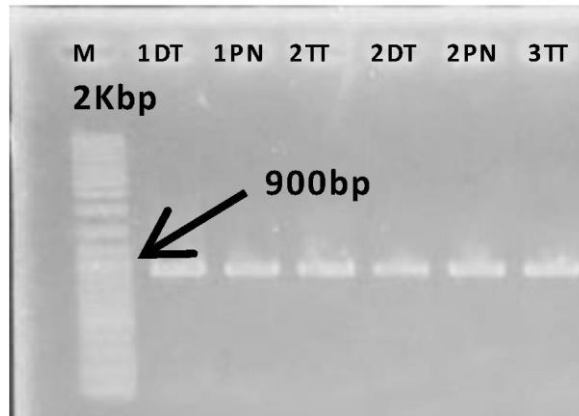
**Hình 3.3** Kết quả PCR khuếch đại vùng *rbcL* với cặp mồi aF/aR  
M: thang DNA, 1: *D. amabile* (Lour.) O'Brien, 2: *D. signatum* Rchb. f. 1884

Với cặp mồi aF/aR, khuếch đại thành công trình tự vùng *rbcL* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi mẫu giống lan *Dendrobium* trên gel agarose sau khi điện di (**Hình 3.3**). Các băng nằm ở vị trí khoảng 600 bp. Các băng sản phẩm rõ, đúng kích thước nên có thể sử dụng giải trình tự. Với trình tự *rbcL*, nghiên cứu đã khuếch đại được 36/36 mẫu (chiếm tỉ lệ 100 %).



**Hình 3.4** Kết quả PCR khuếch đại vùng *matK* với cặp mồi *matK390F/ 1326R*.  
M: thang DNA, 1: *D. amabile* (Lour.) O'Brien, 2: *D. signatum* Rehb. f. 1884

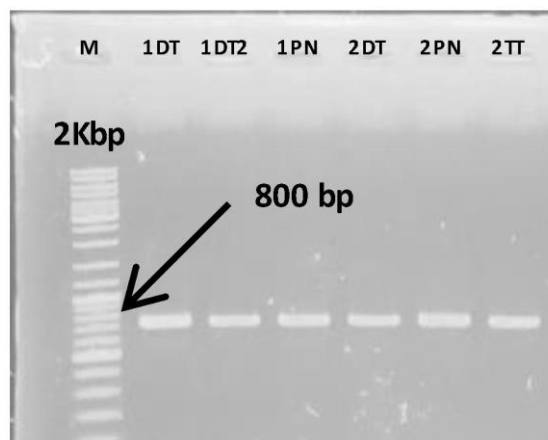
Với cặp mồi *matK390F/ 1326R*, nghiên cứu đã khuếch đại thành công trình tự vùng *matK* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi mẫu giống lan *Dendrobium* trên gel agarose sau khi điện di (**Hình 3.4**). Các băng nằm ở vị trí khoảng 900 - 1000 bp, kích thước vùng *matK* được khuếch đại là phù hợp. Kết quả này cũng tương ứng với các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác khi khuếch đại vùng *matK* trên cây lan Hoàng Thảo [86;89;111]. Với trình tự *matK*, nghiên cứu đã khuếch đại được 69/71 mẫu (chiếm tỉ lệ 97,18 %), kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Xu và cộng sự (97,42 %) [111]. Các băng sản phẩm rõ, đúng kích thước nên có thể sử dụng giải trình tự.



**Hình 3.5** Kết quả PCR khuếch đại vùng *trnH-psbA* với cặp mồi *trnH-psbA F/ trnH-psbA R*

M: thang DNA, 1: *D. amabile* (Lour.) O'Brien, 2: *D. signatum* Rchb. f. 1884

Với cặp mồi *trnH-psbA F/ trnH-psbA R*, nghiên cứu đã khuếch đại thành công trình tự vùng *trnH-psbA* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi mẫu giống lan *Dendrobium* trên gel agarose sau khi điện di (**Hình 3.5**). Các băng nằm ở vị trí khoảng 900 - 1000 bp. Các công trình nghiên cứu khuếch đại vùng trình tự này còn hạn chế. Singh (2012) đã báo cáo là chưa khuếch đại được vùng trình tự này trên đối tượng *Dendrobium* [86]. Xu và cộng sự (2015) cho kết quả nghiên cứu khuếch đại trình tự vùng *trnH-psbA* với chiều dài 1460bp và tỷ lệ khuếch đại thành công là 49,68% [86;111]. Với trình tự *trnH-psbA*, nghiên cứu này đã khuếch đại được 58/71 mẫu (chiếm tỉ lệ 81,69%). Các băng sản phẩm rõ, đúng kích thước nên có thể sử dụng giải trình tự.



**Hình 3.6** Kết quả PCR khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1F/ITS4R.

M: thang DNA, 1: *D. amabile* (Lour.) O'Brien, 2: *D. signatum* Rchb. f. 1884



Với cặp mồi ITS1F/ 4R, nghiên cứu đã khuếch đại thành công trình tự vùng ITS bằng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi mẫu giống lan *Dendrobium* trên gel agarose sau khi điện di (**Hình 3.6**). Các băng nằm ở vị trí khoảng 700 - 800 bp. Như vậy, kích thước vùng ITS được khuếch đại là phù hợp. Kết quả này cũng khá tương đồng với các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác khi khuếch đại vùng ITS trên đối tượng lan Hoàng Thảo. Theo Chiang và cộng sự (2012) chiều dài của vùng ITS khuếch đại được có kích thước khoảng 750 bp, Xu và cộng sự (2015) cũng báo cáo kết quả sản phẩm khuếch đại vùng ITS cho chiều dài 857 bp; nghiên cứu của Chattopadhyay (2017) cho thấy chiều dài vùng ITS là 753 bp [35;38;111]. Các nghiên cứu này khuếch đại được các vùng ITS với chiều dài hơi chênh lệch được giải thích là do sử dụng các cặp mồi khác nhau.

Với trình tự vùng ITS, nghiên cứu đã khuếch đại được 71/71 mẫu (chiếm tỉ lệ 100 %). Kết quả này cũng tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của , Xu và cộng sự (2015), Liu và cộng sự (2019) [67;111]. Các băng sản phẩm rõ, đúng kích thước nên có thể sử dụng giải trình tự.

**Bảng 3.2** Kết quả khuếch đại các vùng trình tự trong nghiên cứu

<b>Kí hiệu mẫu</b>	<b><i>rbcL</i></b>	<b><i>matK</i></b>	<b><i>trnH-psbA</i></b>	<b>ITS</b>
1DT	+	+	—	+
1DT2	+	+	+	+
1PN	O	+	+	+
2DT	+	+	+	+
2PN	+	+	+	+
2TT	+	+	+	+
3TT	+	+	+	+
3DT	O	+	+	+
5DT	+	+	+	+
6TT	+	+	+	+
6DT	O	+	+	+
6PN	O	+	+	+
10TT	O	—	—	+
10DT	+	+	+	+

10DT2	+	+	—	+
10PN	+	+	+	+
11TT	+	+	+	+
11DT	O	+	+	+
11DT2	O	+	—	+
12TT	+	+	+	+
12DT	O	+	—	+
12PN	O	+	+	+
13TT	+	+	+	+
13DT2	O	+	+	+
13PN	O	+	—	+
14DT	O	+	+	+
14DT2	+	+	—	+
14PN	O	+	+	+
15TT	+	—	+	+
15DT	O	+	+	+
15PN	O	+	+	+
17TT	+	+	+	+
17DT	O	+	—	+
18TT	+	+	+	+
18DT	O	+	—	+
18PN	O	+	—	+
20TT	O	+	+	+
20DT	+	+	—	+
20DT2	O	+	+	+
21TT	+	+	+	+
21DT	O	+	+	+
21PN	O	+	+	+
22TT	+	+	+	+
22DT	O	+	+	+
22DT2	O	+	+	+
24TT	+	+	+	+
26TT	+	+	+	+
26DT	O	+	+	+
26L	O	+	+	+
27TT	+	+	+	+
27DT	O	+	+	+
28DT	O	+	+	+
28PN	O	+	+	+
28TT	+	+	+	+
29TT	+	+	+	+
30TT	+	+	+	+

30DT	O	+	+	+
30PN	O	+	+	+
32TT	+	+	+	+
33TT	+	+	+	+
34TT	+	+	+	+
34PN	O	+	+	+
35TT	+	+	—	+
35DT	+	+	+	+
35PN	+	+	+	+
36TT	+	+	+	+
36DT	O	+	—	+
37TT	+	+	+	+
37DT	O	+	+	+
37PN	O	+	+	+
38R-DT	+	+	+	+

+: lên 1 band; —: không lên band; O: không tiến hành khuếch đại

### 3.2.2 Phân tích và thiết lập cơ sở dữ liệu trình tự DNA cho một số giống lan *Dendrobium*

Tỷ lệ giải trình tự thành công ở tất cả các vùng trình tự có kết quả PCR thành công là 100%. Sau khi được hiệu chỉnh và xác định mức độ tương đồng bằng BLAST với cơ sở dữ liệu NCBI, tất cả các trình tự được đăng ký trên Genbank (**Bảng Phụ lục 4**) nhằm góp phần làm đa dạng bộ dữ liệu của lan *Dendrobium*.

**Bảng 3.3** Thống kê kết quả giải trình tự của các vùng trong nghiên cứu

Trình tự	Giải trình tự	Tỷ lệ giải trình tự thành công (%)
<i>rbcL</i>	36/36	100,00
<i>matK</i>	69/69	100,00
<i>trnH-psbA</i>	58/58	100,00
ITS	71/71	100,00

Kết quả BLAST trên Genbank (**Phụ lục 4**) cho thấy mức độ bao phủ, mức độ tương đồng của trình tự nghiên cứu và trình tự tham khảo giữa các trình tự DNA được khuếch đại cũng khác nhau *rbcL* (100%, 97,8 - 100%), *matK* (100%, 98,2 - 100%), *trnH-psbA* (99 - 100%, 96,77 - 100%), ITS (99 - 100%, 96,39 - 100%). Đại đa số kết

quả đầu tiên của quá trình BLAST đều là các trình tự của *Dendrobium*, với giá trị độ bao phủ, giá trị độ tương đồng cao. Điều này cho thấy mẫu thu thập là đáng tin cậy, mẫu không bị lẫn tạp các mẫu khác, quá trình bảo quản mẫu tốt, đạt độ tin cậy cao.

Trong tất cả các mẫu được BLAST, chỉ có các mẫu thuộc loài Trường sơn (*D. venustum*) cho kết quả BLAST tương đồng với trình tự *rbcL* của 1 loài thuộc chi *Bulbophyllum*. Kết quả này có thể được giải thích do trình tự vùng *rbcL* có độ bảo tồn cao.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Dendrobium venustum voucher 26TT ribulose-1,5-bisphosphate carb</a>	926	926	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019365.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium venustum voucher 29TT ribulose-1,5-bisphosphate carb</a>	926	926	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019364.1</a>
✓	<a href="#">Bulbophyllum affine ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenas</a>	915	915	100%	0.0	99.60%	<a href="#">KJ462098.1</a>
✓	<a href="#">Bulbophyllum macranthum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ox</a>	915	915	100%	0.0	99.60%	<a href="#">KJ462096.1</a>
✓	<a href="#">Bulbophyllum lilacinum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxyge</a>	915	915	100%	0.0	99.60%	<a href="#">KF421861.1</a>
✓	<a href="#">Bulbophyllum lobbii voucher 2938 ribulose-1,5-bisphosphate carboxyl</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MN719138.1</a>
✓	<a href="#">Coelogyne swaniana voucher RG4946 ribulose-1,5-bisphosphate carl</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MK398179.1</a>
✓	<a href="#">Coelogyne swaniana voucher L001 ribulose-1,5-bisphosphate carbox</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MK398178.1</a>
✓	<a href="#">Coelogyne foerstermannii voucher YKH 028 ribulose-1,5-bisphosphat</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MK398177.1</a>
✓	<a href="#">Coelogyne foerstermannii voucher L005 ribulose-1,5-bisphosphate ca</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MK398176.1</a>
✓	<a href="#">Coelogyne foerstermannii voucher RG 3993 ribulose-1,5-bisphosphat</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MK398175.1</a>
✓	<a href="#">Coelogyne testacea voucher KGB 20081942 ribulose-1,5-bisphospha</a>	909	909	100%	0.0	99.40%	<a href="#">MK398174.1</a>

**Hình 3.7** Kết quả so sánh trình tự vùng *rbcL* của mẫu 26TT (*D. venustum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

Đối với vùng *rbcL*, nghiên cứu này cũng đóng góp cho ngân hàng dữ liệu GenBank 6 trình tự của các loài chưa có dữ liệu vùng này trên GenBank: *D. amabile* 2 trình tự, *D. seduncum* 1 trình tự, *D. tortile* 1 trình tự, *D. venustum* 2 trình tự.

Kết quả BLAST các mẫu có kí hiệu 13 với cơ sở dữ liệu của GenBank cho thấy đây là *D. chrysotoxum* chứ không phải *D. thyrsoflorum*.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher 13TT internal transcribed spacer 1.</a>	1131	1131	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT004852.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher 13DT2 internal transcribed spacer 1</a>	1125	1125	99%	0.0	100.00%	<a href="#">MT004853.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum internal transcribed spacer 1..partial sequen</a>	1114	1114	99%	0.0	99.67%	<a href="#">EU477501.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher 13PN internal transcribed spacer 1.</a>	998	998	99%	0.0	96.23%	<a href="#">MT004851.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher KFBG2654A internal transcribed sp</a>	998	998	99%	0.0	96.23%	<a href="#">KY966526.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2</a>	998	998	99%	0.0	96.23%	<a href="#">AB593533.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium capillipes voucher NCHU-D89331201-1013 18S ribosoma</a>	998	998	99%	0.0	96.23%	<a href="#">HM590379.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum isolate gi66 internal transcribed spacer 1..pa</a>	992	992	99%	0.0	96.07%	<a href="#">MK522232.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum isolate V01 internal transcribed spacer 1..pa</a>	992	992	99%	0.0	96.07%	<a href="#">MK483291.1</a>

**Hình 3.8** Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 13TT (*D. chrysotoxum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher 13TT maturase K (matK).gene.pa</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019397.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher 13DT2 maturase K (matK).gene.p</a>	1498	1498	100%	0.0	99.76%	<a href="#">MT019399.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum voucher 13PN maturase K (matK).gene.pa</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MT019398.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum isolate MV1 maturase K (matK).gene.parti</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MK616659.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum isolate MP20 maturase K (matK).gene.pari</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MK607430.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum isolate MP6 maturase K (matK).gene.parti</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MK607418.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium chrysotoxum isolate MD2 maturase K (matK).gene.parti</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MK603114.1</a>

**Hình 3.9** Kết quả so sánh trình tự vùng *matK* của mẫu 13TT (*D. chrysotoxum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

Kết quả BLAST các mẫu có kí hiệu 14 với cơ sở dữ liệu của GenBank cho thấy đây có thể là *D. palpebrae* Lindl.. Theo The plant list, *D. farmeri* Paxton và *D. palpebrae* Lindl. có thể được chấp nhận là đồng danh nhưng mức độ tin cậy không cao.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri voucher 14DT2 internal transcribed spacer 1, part</a>	1133	1133	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT004883.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri voucher 14PN internal transcribed spacer 1, part</a>	1133	1133	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT004882.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri voucher 14DT internal transcribed spacer 1, part</a>	1133	1133	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT004881.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium palpebrae genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 ar</a>	1133	1133	100%	0.0	100.00%	<a href="#">AB593626.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium palpebrae chloroplast genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 2</a>	1122	1122	100%	0.0	99.67%	<a href="#">AB972352.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri isolate DD33 internal transcribed spacer 1, partial</a>	1122	1122	99%	0.0	99.84%	<a href="#">KJ672671.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium palpebrae voucher KFBG3083D internal transcribed spac</a>	1072	1072	100%	0.0	98.21%	<a href="#">KY966568.1</a>

**Hình 3.10** Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 14DT (*D. farmeri*) với cơ sở dữ liệu GenBank

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri voucher 14DT2 maturase K (matK) gene, partial</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019416.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri voucher 14PN maturase K (matK) gene, partial c</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019415.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri voucher 14DT maturase K (matK) gene, partial c</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019414.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium densiflorum voucher 11DT2 maturase K (matK) gene, pa</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019410.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium amabile maturase K gene, partial cds; chloroplast</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MF409030.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium thyriflorum maturase K gene, partial cds; chloroplast</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MF409021.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium farmeri maturase K gene, partial cds; chloroplast</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MF409019.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium palpebrae maturase K gene, partial cds; chloroplast</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MF409018.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium densiflorum isolate vmt25 maturase K (matK) gene, parti</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MG490231.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium thyriflorum isolate vmt20 maturase K (matK) gene, parti</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MG490226.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium palpebrae voucher KFBG3083D maturase K (matK) gen</a>	1509	1509	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KY966858.1</a>

**Hình 3.11** Kết quả so sánh trình tự vùng *matK* của mẫu 14DT (*D. farmeri*) với cơ sở dữ liệu GenBank

Kết quả BLAST các mẫu có kí hiệu 6TT và 6DT cho thấy đây có thể là *D. anosmum* chứ không phải *D. aphyllum*. Kết quả này có thể do sự nhầm lẫn trong việc thu mẫu của đề tài và treo bảng tên cho mẫu 6TT trong Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ sinh học Tp.HCM.

✓	<a href="#">Dendrobium parishii isolate gi60 internal transcribed spacer 1, partial s</a>	1081	1081	100%	0.0	98.69%	<a href="#">MK522227.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum isolate gi48 internal transcribed spacer 1, partia</a>	1081	1081	100%	0.0	98.69%	<a href="#">MK522219.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum voucher KFBG2769A internal transcribed spacer</a>	1081	1081	100%	0.0	98.69%	<a href="#">KY966516.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum chloroplast genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 2</a>	1081	1081	100%	0.0	98.69%	<a href="#">AB972339.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum cultivar S10 18S ribosomal RNA gene, partial s</a>	1081	1081	100%	0.0	98.69%	<a href="#">KP743544.1</a>

**Hình 3.12** Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 6DT (*D. anosmum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

✓	<a href="#">Dendrobium parishii isolate MP22 maturase K (matK) gene, partial cd</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">MK607431.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium parishii voucher KFBG2616 maturase K (matK) gene, pa</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">KY966860.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium parishii chloroplast DNA, complete genome</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">LC193518.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium parishii chloroplast matK gene for maturase K, partial cd:</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">AB972316.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum chloroplast matK gene for maturase K, partial</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">AB972311.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum maturase K (matK) pseudogene, partial seque</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">KF957849.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium parishii maturase K (matK) pseudogene, partial sequenc</a>	1504	1504	100%	0.0	99.88%	<a href="#">KF957848.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium primulinum voucher 12TT maturase K (matK) gene, parti</a>	1498	1498	100%	0.0	99.76%	<a href="#">MT019427.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum voucher 27DT maturase K (matK) gene, partia</a>	1498	1498	100%	0.0	99.76%	<a href="#">MT019390.1</a>

**Hình 3.13** Kết quả so sánh trình tự vùng *matK* của mẫu 6DT (*D. anosmum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

Kết quả BLAST mẫu có kí hiệu 28TT cho thấy đây có thể là *D. primulinum* chứ không phải *D. capillipes*. Kết quả này có thể do sự nhầm lẫn trong việc treo bảng tên cho mẫu 28TT trong Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ sinh học Tp.HCM.

✓	<a href="#">Dendrobium cf. primulinum TBG 118293 genes for 18S rRNA, ITS1, 5:</a>	1125	1125	100%	0.0	100.00%	<a href="#">AB593521.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium polyanthum voucher KFBG2711A internal transcribed spa</a>	1120	1120	100%	0.0	99.84%	<a href="#">KY966576.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium polyanthum voucher KFBG2555A internal transcribed spa</a>	1120	1120	100%	0.0	99.84%	<a href="#">KY966575.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium polyanthum voucher KFBG2548A internal transcribed spa</a>	1114	1114	100%	0.0	99.67%	<a href="#">KY966574.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium primulinum isolate P03 internal transcribed spacer 1, parti</a>	1027	1027	100%	0.0	97.05%	<a href="#">MK483269.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium primulinum strain DP2 internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	1027	1027	100%	0.0	97.05%	<a href="#">KY499212.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium primulinum internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal I</a>	1027	1027	100%	0.0	97.05%	<a href="#">KX522641.1</a>

**Hình 3.14** Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của mẫu 28TT (*D. primulinum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

✓	<a href="#">Dendrobium primulinum isolate MP3 maturase K (matK) gene, partial</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MK603116.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium lituiflorum isolate vmt16 maturase K (matK) gene, partial</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">MG490222.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum voucher KFBG2769A maturase K (matK) gene</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">KY966807.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium parishii maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">KF361616.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium parishii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">AB847834.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium aff. anosmum TBG 159409 chloroplast matK gene for m</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">AB847686.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium primulinum voucher Jin X-H 10793 tRNA-Lys (trnK) gene</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">KF143708.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium primulinum strain B24 maturase K (matK) pseudogene a</a>	1493	1493	100%	0.0	99.63%	<a href="#">FJ794064.1</a>

**Hình 3.15** Kết quả so sánh trình tự vùng *matK* của mẫu 28TT (*D. primulinum*) với cơ sở dữ liệu GenBank

Khi BLAST dựa trên trình tự vùng *trnH-psbA*, nhiều mẫu cho kết quả không giống với tên khoa học như *D. amabile*, *D. venustum*, *D. anosmum*... Điều này là do các trình tự *trnH-psbA* công bố trên NCBI của các loài này còn hạn chế, thậm chí chưa có. Đối với vùng *trnH-psbA*, nghiên cứu này cũng đóng góp cho ngân hàng dữ liệu GenBank 44 trình tự của 18 loài chưa có dữ liệu vùng này trên GenBank: *D. aloifolium*, *D. anosmum*, *D. aphyllum*, *D. creaceum*, *D. crumenatum*, *D. primulinum*, *D. devonianum*, *D. hercoglossum*, *D. intricatum*, *D. pulchellum*, *D. secundum*, *D. signatum*, *D. tortile*, *D. venustum*, *D. parishii*, *D. hancockii*, *D. crystallinum* và *D. anosmum* x *D. parishii*.

✓	<a href="#">Dendrobium anosmum x Dendrobium aphyllum voucher CN psbA-trnI</a>	1238	1238	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019509.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum voucher 6DT psbA-trnH intergenic spacer, par</a>	1238	1238	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019460.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium anosmum voucher 6TT psbA-trnH intergenic spacer, par</a>	1238	1238	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MT019459.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium brymerianum isolate SH26 PsbA (psbA) gene, partial cds</a>	1146	1146	100%	0.0	97.63%	<a href="#">KP412232.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium nobile isolate SH16 PsbA (psbA) gene and psbA-trnH int</a>	1146	1146	100%	0.0	97.63%	<a href="#">KP412170.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium nobile isolate SH14 PsbA (psbA) gene, partial cds; and r</a>	1146	1146	100%	0.0	97.63%	<a href="#">KP412169.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium nobile voucher 4-4 photosystem II protein D1 (psbA) gen</a>	1146	1146	100%	0.0	97.63%	<a href="#">GU458304.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium nobile voucher 2-7 photosystem II protein D1 (psbA) gen</a>	1140	1226	100%	0.0	97.48%	<a href="#">GU458303.1</a>
✓	<a href="#">Dendrobium nobile isolate SH15 PsbA (psbA) gene, partial cds; and r</a>	1134	1134	100%	0.0	97.33%	<a href="#">KP412226.1</a>

**Hình 3.16** Kết quả so sánh trình tự vùng *trnH-psbA* của mẫu 6TT (*D. anosmum*) với cơ sở dữ liệu GenBank



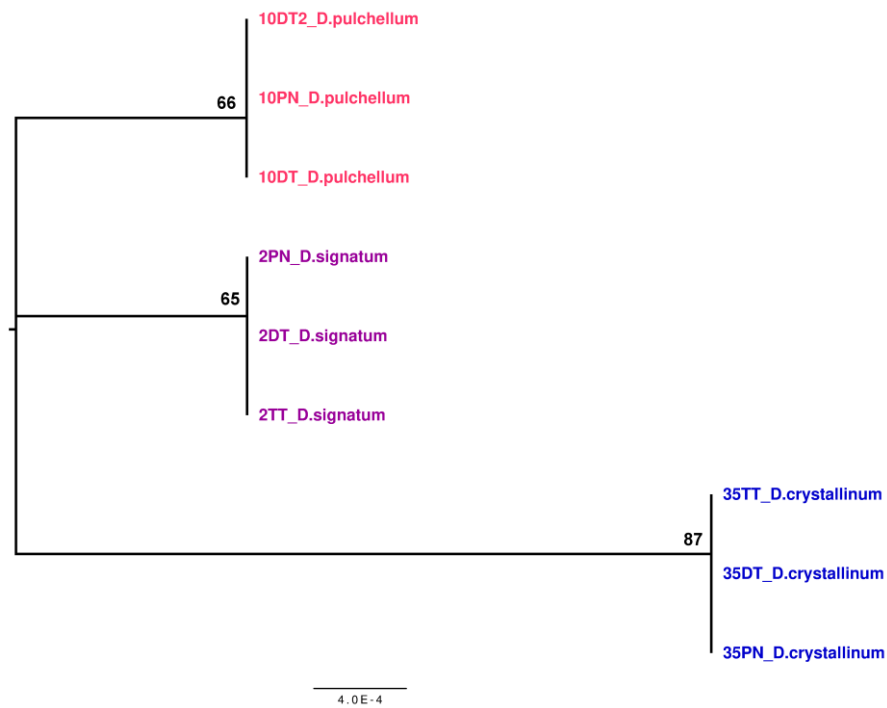
### 3.2.2.1 Phân tích và thiết lập cơ sở dữ liệu trình tự DNA cho một số giống lan *Dendrobium* bằng các marker đơn

#### 3.2.2.1.1 Phân tích DNA barcode *rbcL* và đánh giá đa dạng di truyền cho bộ mẫu trong nghiên cứu với barcode này

Kết quả nghiên cứu này một lần nữa cho thấy vùng *rbcL* là vùng khá bảo tồn. Trong quá trình nghiên cứu, khi khuếch đại và giải trình tự vùng *rbcL* với 9 mẫu thuộc 3 loài *D. crystallinum*, *D. pulchellum* và *D. signatum*, kết quả align và cây phát sinh loài (Hình 3.17) cho thấy rất ít hoặc thậm chí không có sự biến đổi ở các đại diện thuộc cùng một loài. Sau đó, các loài *D. amabile*, *D. anosmum*, *D. venustum* được phân tích với 2 đại diện cho mỗi loài. Kết quả cho thấy gần như không có sự khác biệt giữa các trình tự này ở các mẫu thuộc cùng một loài. Với kết quả này, đề tài đã quyết định dừng lại khi giải trình tự vùng *rbcL* thành công cho 36 mẫu đại diện cho 25 loài trong nghiên cứu. Với trình tự vùng *rbcL*, nghiên cứu của Khew và cộng sự (2011) cũng đã nhận thấy kết quả sắp giống cột thẳng hàng các trình tự thuộc cùng một loài hoàn toàn giống nhau ở tất cả các mẫu và không quan sát thấy có sự biến đổi nucleotit nào, chính vì vậy nên không cần lặp lại cho PCR và giải trình tự [55].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201		
35TT <i>D. crystallinum</i>	C	C	T	G	A	A	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	A	T	T	G	G	G	G	A	.....
35DT <i>D. crystallinum</i>	C	C	T	G	A	A	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	A	T	T	G	G	G	G	A	.....
35PN <i>D. crystallinum</i>	C	C	T	G	A	A	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	A	T	T	G	G	G	G	A	.....
10DT <i>D. pulchellum</i>	C	C	T	G	A	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	G	T	T	G	G	G	G	A	.....
10DT2 <i>D. pulchellum</i>	C	C	T	G	A	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	G	T	T	G	G	G	G	A	.....
10PN <i>D. pulchellum</i>	C	C	T	G	A	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	G	T	T	G	G	G	G	A	.....
2PN <i>D. signatum</i>	C	C	T	G	A	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	C	T	T	G	G	G	G	A	.....
2DT <i>D. signatum</i>	C	C	T	G	A	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	C	T	T	G	G	G	G	A	.....
2TT <i>D. signatum</i>	C	C	T	G	A	C	T	A	C	G	A	A	A	C	C	A	.....	G	T	T	C	T	T	G	G	G	G	A	.....

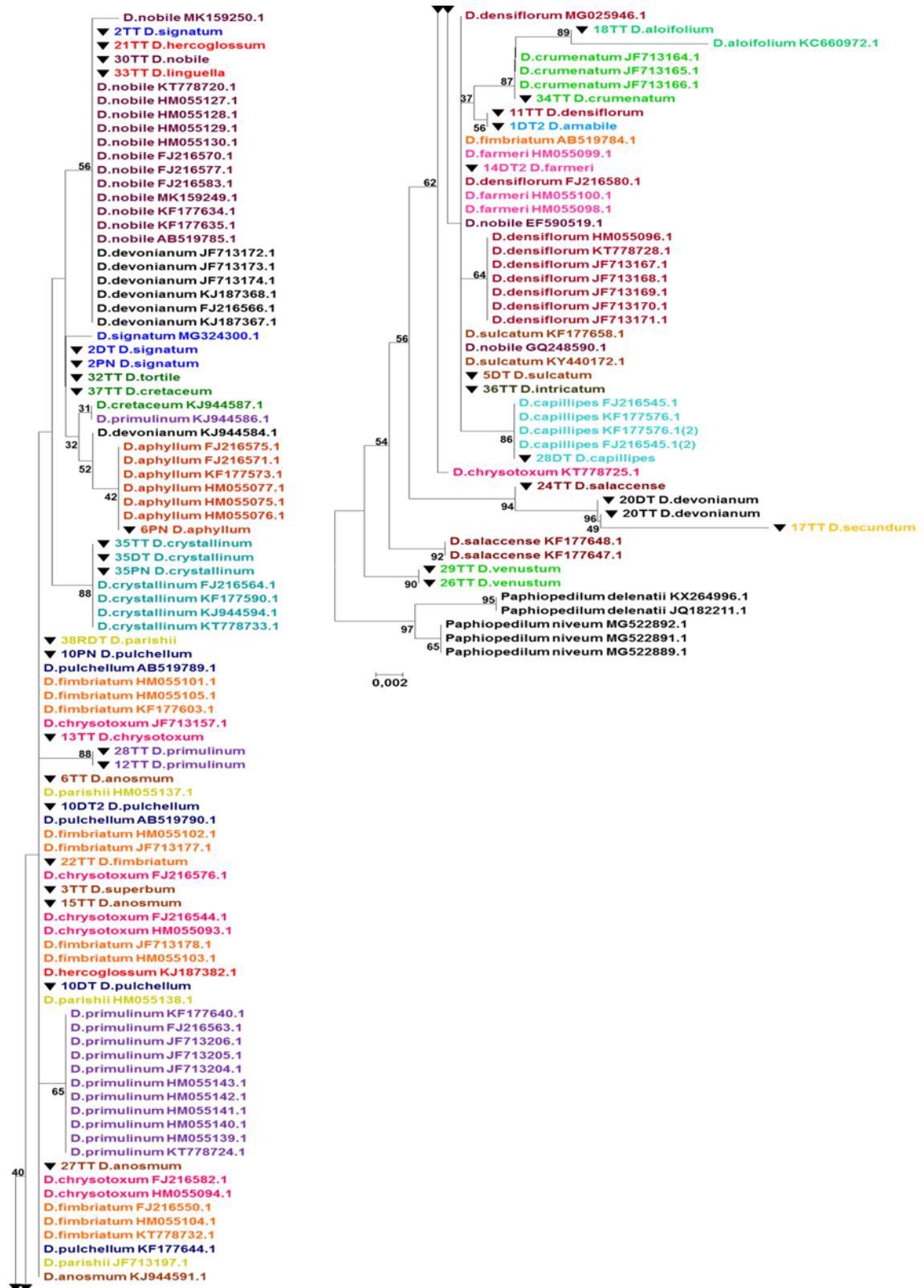
**Hình 3.17** Kết quả align 9 trình tự vùng *rbcL* của các loài *D. crystallinum*, *D. pulchellum* và *D. signatum* trong nghiên cứu.



**Hình 3.18** Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự vùng *rbcL* của các loài *D. crystallinum*, *D. pulchellum* và *D. signatum* trong nghiên cứu.

Trình tự vùng *rbcL* sau khi được hiệu chỉnh và Align, được phân tích bằng phần mềm MEGA 7.0 trên 36 trình tự của 36 mẫu giống cho kết quả chiều dài trình tự sau hiệu chỉnh dài khoảng 500 bp, vị trí bảo tồn là 475/500 vị trí, vị trí biến đổi là 25/500 vị trí. Vùng trình tự *rbcL* là vùng có mức độ bảo tồn cao [80], dẫn đến sự khác biệt giữa các trình tự thấp. Từ đó, các trình tự trong cây phát sinh *rbcL* nằm trải dài trên thân cây và có rất ít nhánh.

Cây phát sinh được dựng từ vùng *rbcL* có số lượng loài phân định được thấp (7/25 loài) trong các vùng trình tự được nghiên cứu. Các loài phân định được gồm: *D. aloifolium*, *D. crumenatum*, *D. aphyllum*, *D. capillipes*, *D. crystallinum*, *D. secundum* và *D. venustum*. Các mẫu trong nghiên cứu và các mẫu tham khảo trên Genbank còn nằm lẫn vào nhau trong cây phát sinh. Trong nghiên cứu của Huỳnh Hữu Đức và cộng sự (2018) [8], khi phân tích trình tự vùng *rbcL* các mẫu lan thu thập thuộc các chi khác nhau nhưng trên cây phát sinh loài, các mẫu này cũng không hoàn toàn tách nhau ra. Như vậy, vùng *rbcL* có giá trị trong xây dựng mã vạch, có thể dùng để nhận diện ở mức chi hoặc họ.



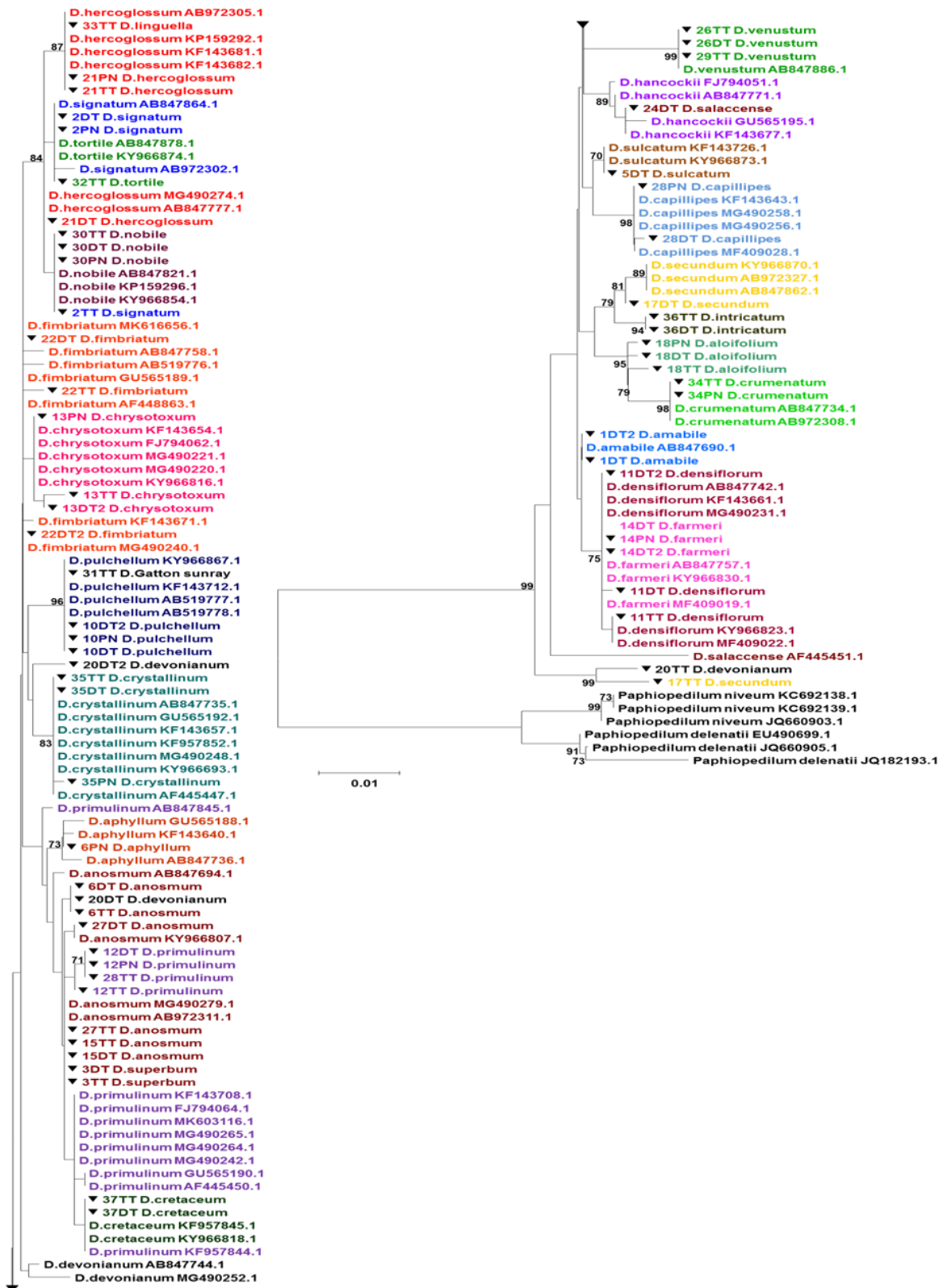
**Hình 3.19** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng *rbcL* của 36 mẫu lan *Dendrobium* nghiên cứu và 90 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood

*rbcL* là gen đầu tiên được giải trình tự ở thực vật, có trình tự gen nằm trong lục lạp. *rbcL* đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phát sinh loài và phân loại thực vật với hơn 10000 trình tự *rbcL* có sẵn trong GenBank. Do sự dễ dàng trong khuếch đại PCR ở một số nhóm thực vật, CBOL gần đây đã công nhận *rbcL* là một trong những trình tự gen tiềm năng nhất cho các nghiên cứu DNA barcode ở thực vật. Ở các loài khác nhau kích thước của gen này cũng khác nhau. Tuy nhiên, do khả năng phân biệt loài thấp, nên hầu hết các nhóm đều cho rằng nên sử dụng kết hợp *rbcL* với các chỉ thị barcode khác.

### 3.2.2.1.2 Phân tích DNA barcode *matK* và đánh giá đa dạng di truyền cho bộ mẫu trong nghiên cứu với barcode này

Cây phát sinh được xây dựng từ 69 trình tự vùng *matK* của 25 loài trong nghiên cứu. Trình tự vùng *matK* sau khi được hiệu chỉnh và Align, được phân tích bằng phần mềm MEGA 7.0 trên 69 trình tự của 69 mẫu giống cho kết quả chiều dài trình tự sau hiệu chỉnh dài khoảng 820bp, vị trí bảo tồn là 734/822 vị trí, vị trí biến đổi là 88/822 vị trí.

Trong số các gen lục lạp, *matK* là một trong những gen tiến hoá nhanh nhất, có kích thước khoảng 1550 bp và mã hóa cho enzyme maturase. Do *matK* tiến hoá nhanh và có mặt hầu hết trong thực vật nên đã được sử dụng như một chỉ thị trong nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài và phát sinh loài ở thực vật. CBOL đã thử nghiệm *matK* trên gần 550 loài thực vật và thấy rằng 90% mẫu thực vật hạt kín dễ dàng khuếch đại trình tự bằng cách sử dụng một cặp mồi đơn và đề nghị sử dụng *matK* là một trong những trình tự barcode chuẩn cho thực vật (CBOL). Nhiều nghiên cứu cũng khẳng định *matK* là vùng trình tự khá đa dạng trong bộ gen lục lạp, đồng thời được chứng minh là có khả năng phân định cao ở mức độ loài [27;86;111].



Hình 3.20 Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng *matK* của 69 mẫu lan *Dendrobium* nghiên cứu và 91 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood

Trên cây phát sinh loài xây dựng dựa trên trình tự vùng *matK*, các loài *D. hercoglossum*, *D. signatum*, *D. nobile*, *D. fimbriatum*, *D. chrysotoxum*, *D. devonianum*, *D. pulchellum*, *D. crystallinum*, *D. primulinum*, *D. aphyllum*, *D. anosmum* và *D. cretaceum* có quan hệ gần gũi; các loài *D. capillip*, *D. sulcatum*, *D. hancockii*, *D. venustum* thuộc cùng một nhánh; các loài *D. crumenatum*, *D. aloifolium*, *D. intricatum*, *D. secundum*; các loài *D. amabile*, *D. densiflorum*, và *D. farmeri* tạo thành nhóm riêng biệt.

Các loài *Dendrobium* thuộc section *Callista* trong nghiên cứu: *D. sulcatum*, *D. densiflorum*, *D. chrysotoxum*, *D. farmeri* và *D. amabile*. Loài *D. sulcatum* và *D. chrysotoxum* nằm thành từng nhánh riêng biệt và cách xa với với 3 loài còn lại. *D. amabile*, *D. densiflorum* và *D. farmeri* nằm thành 1 nhánh chung, trong đó *D. amabile* tách thành 1 nhánh riêng so với 2 loài còn lại. Các trình tự của *D. densiflorum* và *D. farmeri* nằm lẫn với nhau ở cả các trình tự từ GenBank. Loài *D. farmeri* có đặc điểm hình thái rất giống với *D. palpebrae*, một số tác giả không tách chúng thành 2 loài riêng biệt. Trong khi đó *D. palpebrae* còn được gọi là *Dendrobium densiflorum var farmerii* (Paxton) Regel 1874. cho thấy được mối quan hệ gắn kết chặt chẽ giữa *D. densiflorum* và *D. farmeri*. Vùng trình tự *matK* thuộc vùng gen lục lạp với mức độ biến thiên cao hơn so với vùng *rcbL*, từ việc phân tách của các loài Hoàng thảo Thủy tiên thuộc nhóm *Callista* cho thấy được sự tiến hóa của bộ gen lục lạp nói chung và gen *matK* nói riêng.

Các trình tự của *D. fimbriatum* không phân thành nhánh mà nằm trải dài trên cây phát sinh. Đồng thời mẫu 17TT (*D. secundum*) không nằm chung nhánh với với các trình tự cùng loài mà tách biệt thành 1 nhánh riêng với mẫu 20TT (*D. devonianum*). Từ những điều trên cho thấy tuy *matK* là gen khá đa dạng trong bộ gen lục lạp, nhưng mức độ đa dạng của vùng gen này vẫn thấp so với bộ gen nhân. Từ đó dẫn đến việc nằm lẫn lộn của các loài *D. secundum* và *D. fimbriatum*.

Cây phát sinh từ vùng *matK* cho thấy các mẫu nghiên cứu được phân thành từng nhánh riêng biệt với các trình tự từ GenBank bao gồm: *D. aloifolium*, *D.*

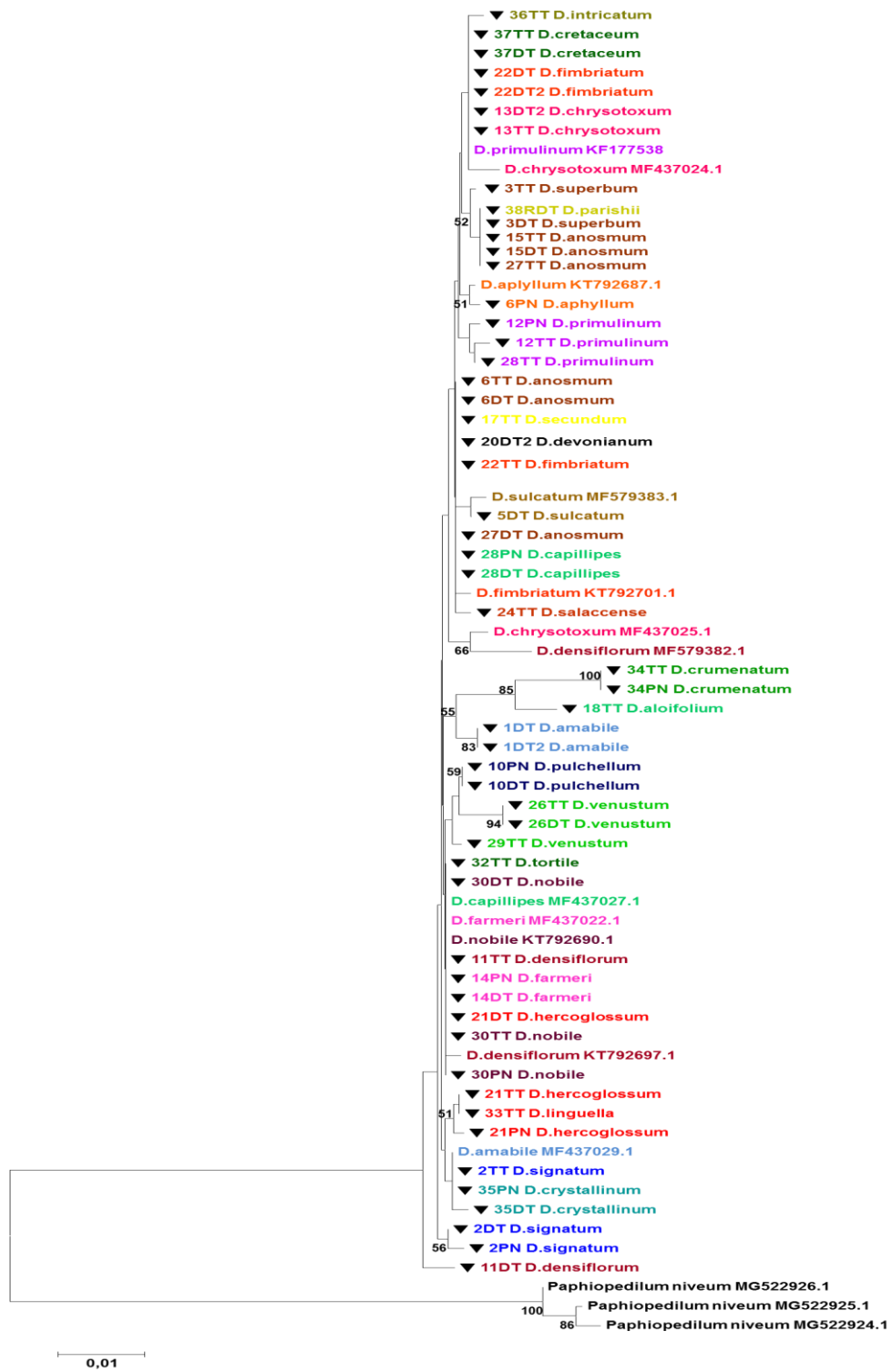
*amabile*, *D. aphyllum*, *D. capillipes*, *D. chrysotoxum*, *D. crumenatum*, *D. crystallinum*, *D. intricatum*, *D. sulcatum*, *D. hancockii*, *D. pulchellum* và *D. venustum* (Hình 3.20). Mức độ phân định loài của *matK* (12/25 loài) cao hơn so với *rbcL* (7/25 loài). Các loài *D. densiflorum*, *D. farmeri*, *D. fimbriatum*, *D. secundum*, *D. tortile*, *D. signatum*, *D. primulinum*, *D. nobile*, *D. hercoglossum*, *D. devonianum*, *D. cretaceum*, *D. parishii* và *D. anosmum* không phân định được bằng vùng *matK*.

Kết quả phân loại trên cho thấy có sự phân nhánh rõ rệt giữa các loài khi phân tích trên vùng *matK*, các mẫu giống gần nhau nằm trong cùng một nhánh hoặc những nhánh gần nhau với khoảng cách di truyền thấp. Vùng *matK* có thể phân loại tốt hơn do chúng tiến hóa nhanh hơn và mức độ bảo tồn thấp hơn vùng *rbcL*.

3.2.2.1.3 Phân tích DNA barcode *trnH-psbA* và đánh giá đa dạng di truyền cho bộ mẫu trong nghiên cứu với barcode này

Cây phát sinh được xây dựng từ 58 trình tự vùng *trnH-psbA* của 25 loài lan *Dendrobium* trong nghiên cứu. Trình tự vùng *trnH-psbA* sau khi được hiệu chỉnh và Align, được phân tích bằng phần mềm MEGA 7.0 trên 58 trình tự của 58 mẫu giống cho kết quả chiều dài trình tự sau hiệu chỉnh dài khoảng 800bp, vị trí bảo tồn là 725/784 vị trí, vị trí biến đổi là 59/784 vị trí.

Trình tự vùng *trnH-psbA* cho cây phát sinh loài của các mẫu *Dendrobium* phân tích được chia thành các nhóm. Các loài *D. fimbriatum*, *D. chrysotoxum*, *D. devonianum*, *D. primulinum*, *D. aphyllum*, *D. anosmum*, *D. cretaceum*, *D. salaccence*, *D. intricatum* và *D. secundum*, *D. sulcatum*, *D. parishii*, *D. primulinum* nằm chung thành một nhóm. Các loài *D. hercoglossum*, *D. signatum*, *D. nobile*, *D. pulchellum*, *D. crystallinum*, *D. tortile*, *D. densiflorum*, *D. venustum* và *D. farmeri* tạo thành một nhóm. *D. amabile* nằm riêng lẻ. Các loài *D. aloifolium* và *D. crumenatum* tạo thành một nhóm.



**Hình 3.21** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng *trnH-psbA* của 58 mẫu lan *Dendrobium* nghiên cứu và 13 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood



Cây phát sinh được dựng từ vùng *trnH-psbA* có số lượng loài phân định được thấp (8/25 loài ở *trnH-psbA*) trong các vùng trình tự được nghiên cứu. Các loài phân định được gồm: *D. aloifolium*, *D. amabile*, *D. aphyllum*, *D. crumenatum*, *D. salaccense*, *D. sulcatum*, *D. pulchellum* và *D. venustum*. Trong đó, mẫu *D. salaccense* đã được xác định lại bằng vùng ITS và *matK* là *D. hancockii*. Vùng *trnH-psbA* là vùng giữa gen (intergenic spacer) có mức độ đa dạng cao thường được sử dụng làm marker trong việc phân định loài [68]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, các nhánh thuộc cây phát sinh được dựng từ vùng *trnH-psbA* có độ tin cậy thấp (< 80). Đồng thời dữ liệu của vùng trình tự này trên các loài *Dendrobium* thuộc GenBank còn rất hạn chế, nên việc nhận định các loài được phân định chưa được rõ ràng.

Vùng giữa gen *trnH-psbA* đã được đề xuất bởi Yao và cộng sự (2009) để xác định 15 loài lan *Dendrobium* [113]. Đây là vùng có chiều dài từ 722 đến 785 bp và được đề xuất rằng đây là marker có sự khác biệt giữa các loài rất cao trong khi sự khác biệt cùng loài là rất thấp. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, khi dùng trình tự vùng *trnH-psbA* thì số lượng loài được phân định là khá thấp.

#### 3.2.2.1.4 Phân tích DNA barcode ITS và đánh giá đa dạng di truyền cho bộ mẫu trong nghiên cứu với barcode này

Trình tự vùng ITS sau khi được hiệu chỉnh và Align, được phân tích bằng phần mềm MEGA 7.0 trên 71 trình tự của 71 mẫu giống cho kết quả chiều dài trình tự sau hiệu chỉnh dài khoảng 640bp, vị trí bảo tồn là 276/639, vị trí biến đổi là 363/639.

Vùng ITS (internal transcribed spacer) là một đoạn rDNA (ribosome DNA) không có chức năng, nằm giữa các DNA cấu trúc của ribosome thường được dịch mã. ITS là vùng không bảo tồn, nó nằm giữa các vùng DNA rất được bảo tồn là 18S, 5.8S và 28S. Để đảm bảo cho quá trình sinh tổng hợp protein diễn ra bình thường, sai sót ở các gen này luôn được sửa chữa kịp thời. Có thể nói rằng do các vùng xung quanh được bảo tồn nên vùng ITS là vùng hứng đột biến. Do vậy, vùng ITS được chọn để so sánh phân biệt các sinh vật với nhau.



Cây phát sinh từ vùng ITS cho thấy các mẫu trong nghiên cứu được nhóm chung thành 1 nhánh riêng biệt với các trình tự cùng loài của chúng trên GenBank mà không có sự trộn lẫn với các loài khác gồm có: *D. aloifolium*, *D. amabile*, *D. aphyllum*, *D. capillipes*, *D. chrysotoxum*, *D. crumenatum*, *D. crystallinum*, *D. densiflorum*, *D. farmeri*, *D. intricatum*, *D. parishii*, *D. pulchellum*, *D. hancockii*, *D. secundum*, *D. sulcatum* và *D. venustum* (**Hình 3.22, Bảng 3.4**). *D. superbum* là tên đồng danh của *D. anosmum*. Do đó, trình tự của 2 loài này đã nằm lẫn vào nhau với các mẫu trong nghiên cứu và các mẫu từ GenBank trên nhánh cây phát sinh. Tổ chức China Plant BOL Group đề xuất việc bổ sung vùng ITS trong nhân (Internal Transcribed Spacer) kết hợp với *matK* + *rbcL* như mã vạch cho thực vật để có thể xác định tối đa các loài, thậm chí giúp phân định các loài có liên quan chặt chẽ (2011). Như vậy, trong 4 vùng trình tự phân tích trong nghiên cứu, ITS là trình tự DNA có khả năng phân định loài cao nhất (16/25).

Khi phân tích trên cả 2 cây phát sinh ITS và *matK*, mẫu *D. salaccense* trong nghiên cứu (24DT) không nằm chung với các trình tự cùng loài trên GenBank. Sau khi kiểm tra mức độ tương đồng của trình tự này với dữ liệu từ GenBank bằng công cụ BLAST, mẫu 24DT này lại tương đồng với *D. hancockii* 99,71% ở dữ liệu trình tự ITS và 100% ở dữ liệu trình tự *matK* (**Hình 3.23**). Do 2 loài này có tên Tiếng Việt khá giống nhau: *D. salaccense* là “Hoàng thảo trúc” và *D. hancockii* là “Hoàng trúc lan”. Từ đó dẫn đến việc sai sót trong quá trình thu thập mẫu. Do đó mẫu 24DT được xác định tên khoa học thành *D. hancockii*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<a href="#">Dendrobium hancockii isolate TKM2014DB01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1123	1123	100%	0.0	99.84%
<a href="#">Dendrobium hancockii voucher Jin X-H 13492 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1123	1123	100%	0.0	99.84%
<a href="#">Dendrobium hancockii isolate D25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1123	1123	100%	0.0	99.84%
<a href="#">Dendrobium hancockii voucher PS2533MT01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1123	1123	100%	0.0	99.84%
<a href="#">Dendrobium hancockii genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 26S rRNA, partial sequence, bio. material: TBG&lt;JPN&gt;:122506</a>	1123	1123	100%	0.0	99.84%
<b>ITS</b>					
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<a href="#">Dendrobium pendulum voucher Jin X-H s.n. 6 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence, and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</a>	1506	1506	100%	0.0	100.00%
<a href="#">Dendrobium hancockii voucher Jin X-H 13492 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence, and maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast</a>	1506	1506	100%	0.0	100.00%
<a href="#">Dendrobium hancockii isolate vmt35 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</a>	1500	1500	100%	0.0	99.88%
<a href="#">Dendrobium hainanense isolate vmt33 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</a>	1500	1500	100%	0.0	99.88%
<a href="#">Dendrobium hancockii chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, bio. material: TBG:122506</a>	1500	1500	100%	0.0	99.88%
<a href="#">Dendrobium hancockii maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast</a>	1495	1495	100%	0.0	99.75%
<b>MatK</b>					

**Hình 3.23** Kết quả so sánh trình tự vùng ITS, *matK* của mẫu *D. salaccense* (24DT) với cơ sở dữ liệu

Trong 3 mẫu 22DT, 22DT2 và 22TT của loài *D. fimbriatum*, mẫu 22TT đã tách nhánh hoàn toàn khỏi 2 mẫu còn lại. Tuy nhiên, khi so sánh với các trình tự GenBank, mẫu 22TT đã nằm chung nhánh với trình tự của *D. fimbriatum* (MK522230.1) và 2 mẫu còn lại nằm chung nhánh với các trình tự *D. fimbriatum* khác. Kết quả này đã chứng minh rằng, trong loài *D. fimbriatum* đã phân thành những hướng khác nhau trong tiến hóa. Những nghiên cứu sâu hơn về các biến thể của loài này nên được thực hiện.

Trình tự của hai loài *D. signatum* và *D. tortile* nằm lẫn với nhau trên cùng một nhánh. Do hình thái hoa của chúng rất giống nhau ngoại trừ cánh hoa của loài *D. tortile* không có màu vàng, tím hơn và xoắn hơn. Từ đó, cho thấy có sự tương đồng về mặt phân tử và các đặc điểm hình thái. Ngoài ra, *D. signatum* đôi khi được gọi bằng tên khoa học đồng danh là *D. tortile var. hildebrandi* (Rolfe) T. Tang & F.T. Wang (1951). Từ đó, kết luận rằng 2 loài trên có mối quan hệ di truyền rất chặt chẽ. *D. hercoglossum* và *D. linguella* là hai tên đồng danh của một loài. Trên tất cả các cây phát sinh loài, loài này có liên quan chặt chẽ với *D. nobile*, *D. signatum* và *D. tortile* và không thể phân biệt hoàn toàn.

Hai loài *D. primulinum* và *D. cretaceum* có hình thái khá giống nhau, cho thấy đây là 2 loài có mối liên hệ với nhau về mặt di truyền. Điều đó giải thích cho việc 2 loài này nằm chung nhánh trên cây phát sinh. Loài có sự phân li nhiều nhất là *D. devonianum* khi cả ba mẫu trong nghiên cứu và các trình tự của loài này từ GenBank, được phân tách thành các nhánh khác nhau trên tất cả các cây ITS, *matK* và *rbcL*.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy mối quan hệ gần gũi giữa *D. anosmum*, *D. parishii* và *D. aphyllum*, cũng như giữa *D. pulchellum* và *D. chrysotoxum*.

Kết quả phân nhóm của các mẫu 6TT, 6DT và 28TT, kết hợp với phân tích hình thái một lần nữa khẳng định, các mẫu này có sự sai sót, nhầm lẫn trong việc thu mẫu của đề tài và treo bảng tên trong Bộ sưu tập hoa lan của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM.

Năm 2018, một cuộc khảo sát trên 23 loài lan *Dendrobium* của Việt Nam đã được nghiên cứu trong đó 20 loài được xác định bằng vùng trình tự ITS [42]. Đây là một trong những nghiên cứu có giá trị về sự đa dạng di truyền của lan *Dendrobium* tại Việt Nam. Tuy nhiên, vì kích thước mẫu nhỏ với 32 mẫu, hầu hết các loài được nghiên cứu (15 trên 23) chỉ được thu một mẫu. Do đó, sự khác biệt giữa những cá thể cùng loài chưa được phân tích. Nghiên cứu này đã cố gắng đưa 2-3 mẫu cho mỗi loài vào phân tích đa dạng di truyền, ngoại trừ 5 loài *D. aphyllum*, *D. parishii*, *D. salaccense*, *D. sulcatum* và *D. tortile*. Do đó sự đa dạng di truyền được phân tích không chỉ giữa các loài mà còn giữa những biến thể trong cùng một loài. Ngoài ra, nghiên cứu này còn cung cấp thông tin của 16 loài khác không được đưa vào nghiên cứu của Trần Duy Dương (2018). Vùng ITS cũng được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về xác định loài lan *Dendrobium* [67;99].

Khi so sánh với cây phân nhóm dựa trên đặc điểm hình thái, kết quả cho thấy chỉ một số loài được phân định bằng ITS có sự tương đồng. Một số nghiên cứu cũng đã khẳng định hệ thống phân loại lan *Dendrobium* dựa trên các trình tự DNA không hoàn toàn phù hợp với hệ thống phân loại dựa trên đặc điểm hình thái [32;64;118].

**Bảng 3.4** Danh sách các loài *Dendrobium* được xác định dựa trên vùng trình tự ITS (không bao gồm các biến thể và các loài lai)

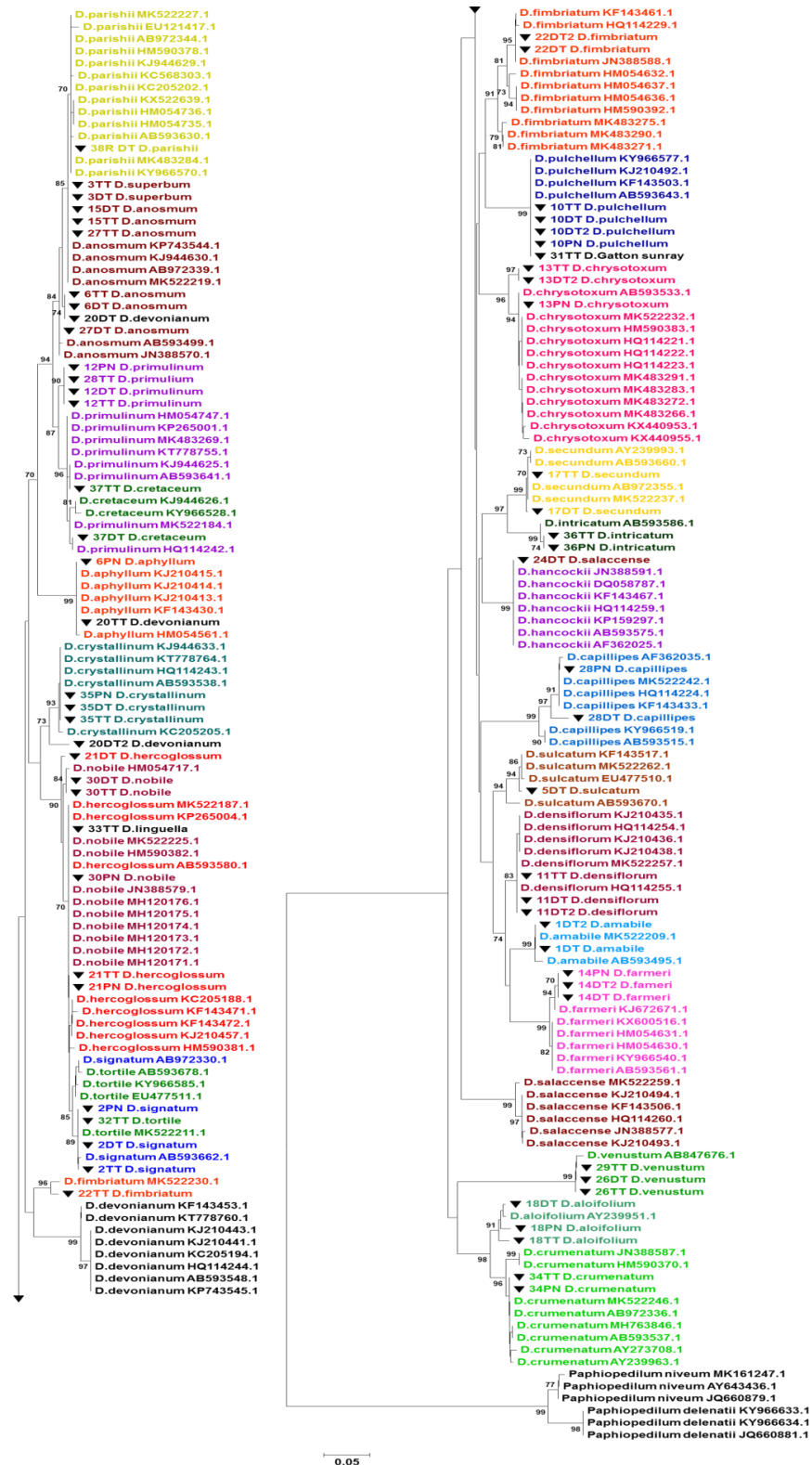
Hình thái	Tên thông thường	Xác định dựa trên trình tự ITS
<i>D. aloifolium</i>	Hoàng thảo móng rồng	<i>D. aloifolium</i>
<i>D. amabile</i>	Thủy tiên hường, Hoàng thảo duyên dáng, Kiều tím	<i>D. amabile</i>
<i>D. anosmum</i>	Giã hạc xuân, Giã hạc hawaii, Giã hạc, Lương điếm hạc, Phi điệp	Không xác định
<i>D. aphyllum</i>	Đại ý thảo, Hạc vĩ, Hoàng thảo hạc vĩ, Ngọc lan, Thạch hộc không lá	<i>D. aphyllum</i>
<i>D. capillipes</i>	Hoàng thảo kim điệp, Thanh Hoàng, Hoàng thảo sợi	<i>D. capillipes</i>
<i>D. chrysotoxum</i>	Thủy tiên vàng, Thủy tiên mỡ gà, Kim điệp, Kim điệp thân phình, Hoàng thảo kim điệp, Thạch hộc dài trống, Cổ chùy thạch hộc	<i>D. chrysotoxum</i>
<i>D. cretaceum</i>	Hoàng thảo vôi, Long tu Lào, Hoàng thảo sương mờ	Không xác định
<i>D. crumenatum</i>	Hoàng thảo tuyết mai, Thạch hộc, Bạch câu	<i>D. crumenatum</i>
<i>D. crystallinum</i>	Hoàng thảo ngọc thạch, Thạch hộc kim, Ngọc vạn pha lê, Hoàng thảo hoa sen, Phi điệp đơn	<i>D. crystallinum</i>
<i>D. densiflorum</i>	Thủy tiên mỡ gà	<i>D. densiflorum</i>
<i>D. devonianum</i>	Đại ý thảo 3 màu, Phương dung, Hoàng thảo tam bảo sắc, Hoàng thảo mỹ dung, Thạch hộc môi răng	Không xác định
<i>D. farmeri</i>	Thủy tiên trắng, Kiều trắng,	<i>D. farmeri</i>
<i>D. fimbriatum</i>	Long nhãn, Hoàng thảo long nhãn, Kim điệp quăn, mã tiên thạch hộc	Không xác định
<i>D. hercoglossum</i>	Thập nhất hoa, Thập hoa trắng, Thập hoa tím, Hoàng thảo tím Huế	Không xác định
<i>D. intricatum</i>	Hoàng thảo hoa cong	<i>D. intricatum</i>
<i>D. nobile</i>	Phi điệp kép, Hoàng phi hạc, Thạch hộc, Kim hoa thạch hộc, Hoàng thảo đuôi gà, Hoàng thảo đẹt	Không xác định
<i>D. parishii</i>	Trầm rừng, Giã hạc thân ngắn, Song hồng, Hoàng thảo tím hồng	<i>D. parishii</i>

<i>D. primulinum</i>	Long tu	Không xác định
<i>D. pulchellum</i>	Hoàng thảo môi đỏ, Lộng lẫy, Thạch học lộng lẫy, Hoàng thảo Thái Bình, Hoàng thảo da cam, Thái Bình	<i>D. pulchellum</i>
<i>D. salaccense</i>	Hoàng thảo trúc, Trúc đen, Mộc lan Sa lặc	<i>D. hancockii</i>
<i>D. secundum</i>	Hoàng thảo báo hi	<i>D. secundum</i>
<i>D. signatum</i>	Hoàng thảo phi hạc, Hoàng phi Giã hạc	Không xác định
<i>D. sulcatum</i>	Thủy tiên dẹt, Hoàng thảo thủy tiên dẹt hay kiêu dẹt, Hoàng thảo vàng cam	<i>D. sulcatum</i>
<i>D. tortile</i>	Hoàn thảo xoắn, Hoàng thảo xoắn họng vàng	Không xác định
<i>D. venustum</i>	Trường Sơn xanh	<i>D. venustum</i>

Từ hiệu quả phân nhánh của trình tự vùng ITS so với các chỉ thị khác và các báo cáo cho rằng ITS2 là vùng tiềm năng trong việc phân định loài, nghiên cứu tiến hành tách riêng vùng ITS2 dựa trên trình tự ITS của *Dendrobium anosmum* (JN388570.1). Vùng ITS2 được dùng để xây dựng cây phát sinh cho kết quả phân định loài trùng khớp với vùng ITS (16/25 loài).

Dù vùng ITS2 có tỷ lệ vị trí biến đổi cao hơn so với ITS, tuy nhiên khi so sánh cây phát sinh dựa trên ITS và ITS2 không thấy sự khác biệt giữa chúng. Từ đó cho thấy vùng ITS2 cũng được xem là marker tiềm năng cho việc phân tích đa dạng di truyền của nhóm lan *Dendrobium*. ITS2 có thể là một mã vạch bổ sung lý tưởng, các ứng dụng sau này có thể thiết lập phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng để khuếch đại trình tự vùng ITS2 và sử dụng thông tin từ vùng trình tự này để nhận diện cũng như phân tích đa dạng di truyền cho nhóm lan *Dendrobium* nếu khuếch đại vùng ITS không thành công.

Tóm lại, kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy trong bộ gen nhân, trình tự vùng ITS và ITS2 được đánh giá là có khả năng phân định loài tốt hơn so với các trình tự ở lục lạp [36;112]. ITS có tỉ lệ khuếch đại và giải trình tự trong nghiên cứu này đều là 100%. Nhìn chung, với 1 mã vạch duy nhất, ITS là ứng cử viên tốt nhất cho các loài thuộc chi *Dendrobium*.



**Hình 3.24** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS2 của 71 mẫu lan *Dendrobium* nghiên cứu và 95 trình tự tham khảo với thuật toán Maximum Likelihood



### 3.2.2.2 Phân tích và đánh giá đa dạng di truyền của các mẫu trong nghiên cứu với các vùng marker được ghép

Mã vạch trong đó có sự kết hợp nhiều trình tự đã được đề xuất là mã vạch DNA cho cây trồng trên đất liền và thường có thể cải thiện tỉ lệ phân định, nhận diện các loài so với các mã vạch chỉ dùng 1 trình tự duy nhất (CBOL). Kết quả xây dựng các cây phát sinh từ các tổ hợp ghép 2-3-4 marker được thể hiện ở Phụ lục 5, kết quả thống kê các loài được phân định của từng cây phát sinh thể hiện ở Phụ lục 7.

Từ kết quả đánh giá đa dạng di truyền cho thấy với 4 marker dùng trong nghiên cứu, vùng ITS có khả năng phân định các loài cao nhất. Từ đó, nghiên cứu tiến hành ghép cặp vùng ITS với các vùng còn lại theo hình thức (ITS + 1 marker khác) để tăng thêm khả năng xác định loài của các marker được bắt cặp. Kết quả dựa vào cây phát sinh cho thấy khi tiến hành ghép cặp ITS với các gen còn lại cho kết quả phân định loài lần lượt: ITS-*matK* (18/25), ITS-*rbcL* (18/25), ITS-*trnH-psbA* (15/25). Việc bắt cặp vùng ITS với các vùng DNA còn lại cho kết quả phân định, độ tin cậy của các nhánh cây cao hơn so với các gen riêng lẻ: *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA*. Đặc biệt, khi bắt cặp ITS-*matK* đã phân định thêm được loài *D. cretaceum* và *D. primulinum* so với trình tự ITS riêng lẻ.

Các cặp ghép khác cũng được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài, tuy nhiên kết quả phân nhánh cũng cho kết quả tương tự như các cặp ghép có sự tham gia của trình tự vùng ITS. Kết quả phân định loài lần lượt: *matK-rbcL* (18/25), *matK-trnH-psbA* (18/25), *rbcL-trnH-psbA* (16/25). Trong nghiên cứu này, mã vạch *matK-rbcL* được đề xuất bởi CBOL cho tỉ lệ phân định (72%) dựa trên phương pháp xây dựng cây phát sinh loài tương đương với tỉ lệ CBOL đã đề xuất là 72%.

Tiếp theo, các tổ hợp ghép 3 marker cũng được tiến hành khảo sát. Kết quả phân định loài lần lượt: ITS-*matK-rbcL* (18/25), ITS-*matK-trnH-psbA* (18/25), ITS-*rbcL-trnH-psbA* (19/25), *matK-rbcL-trnH-psbA* (18/25). Cuối cùng, tổ hợp ghép 4 marker được khảo sát cho kết quả phân định loài là 19/25. Khi sử dụng tổ hợp ghép

ITS-*matK-trnH-psbA*, ITS-*rbcL-matK-trnH-psbA* *D. fimbriatum* đã tách thành nhóm riêng biệt (Hình 3.25). Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã từng đề xuất mã vạch DNA nên sử dụng kết hợp các trình tự này.

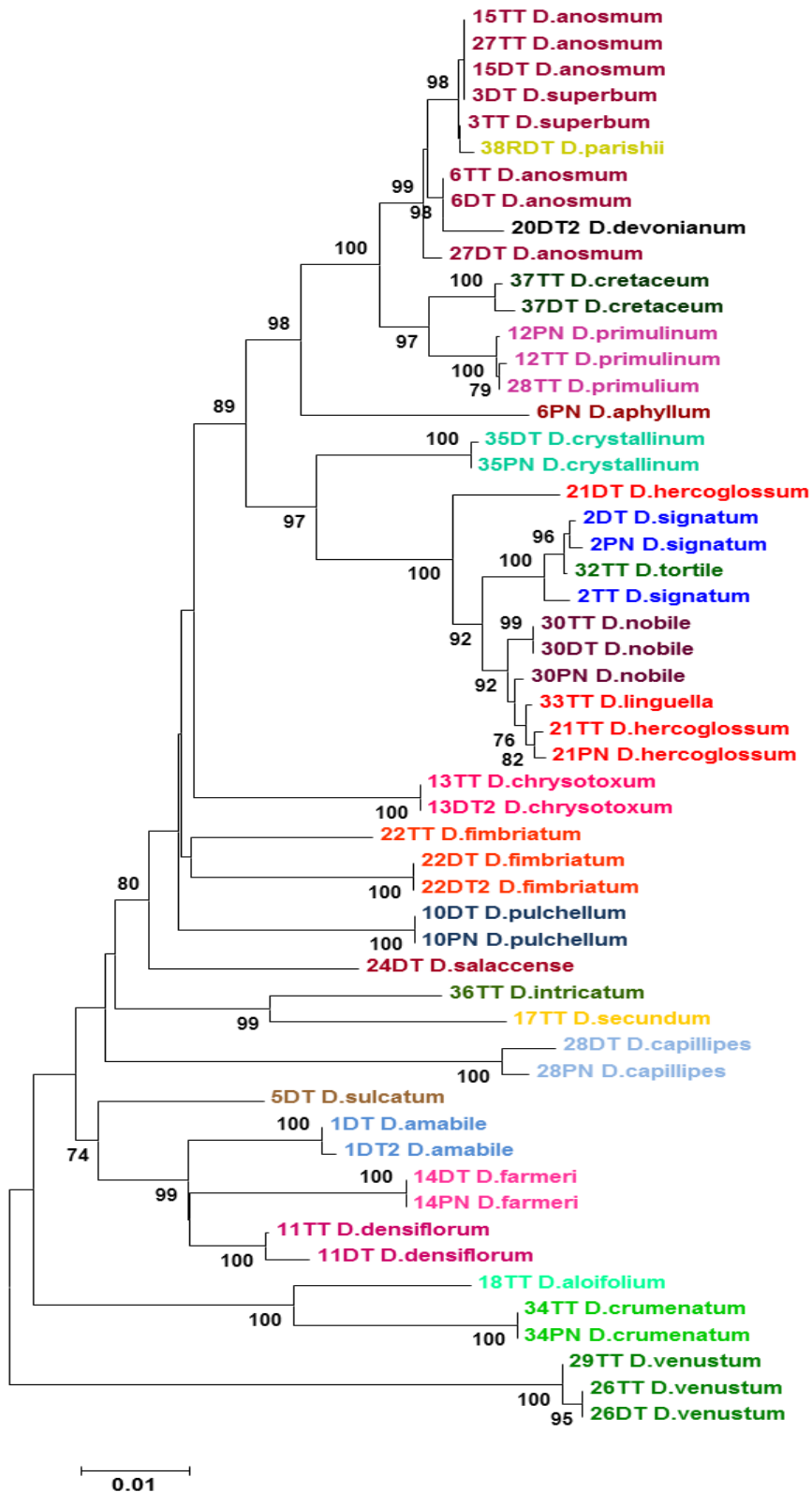
Nghiên cứu của Li và cộng sự (2016) đã phân tích 5 vùng mã vạch (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS và ITS2) của 127 cá thể đại diện cho 40 loài thuộc chi *Oberonia* họ Phong lan ở Trung Quốc. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy cả 3 trình tự nghiên cứu thuộc bộ gen lục lạp đều có khả năng phân định loài thấp hơn so với 2 vùng DNA nhân (ITS và ITS2) và ITS có khả năng phân định cao hơn. Các tổ hợp trình tự ghép từ 2 – 4 vùng DNA không phân định tốt hơn so với trình tự của vùng ITS. Tuy nhiên, với sự phân tích bằng các phương pháp khác nhau, cuối cùng báo cáo này kết luận rằng ITS-*rbcL* và ITS-*matK* là mã vạch tốt nhất để xác định các loài thuộc chi *Oberonia* [66]. Nghiên cứu thuộc phạm vi luận án cũng cho thấy, ITS cũng là vùng được khuếch đại và giải trình tự với hiệu suất cao nhất, là trình tự mã vạch đơn tiềm năng nhất. Đối với kết quả phân tích mã vạch có sự kết hợp các trình tự, kết quả của đề tài này cho rằng ITS-*rbcL-matK-trnH-psbA* cho tỉ lệ phân định tốt hơn và đề xuất ITS-*rbcL-matK-trnH-psbA* là mã vạch cho nhóm lan *Dendrobium*. Trong số các thử nghiệm xây dựng cây phát sinh loài bằng việc ghép các trình tự 2-4 marker, ITS-*rbcL-matK-trnH-psbA* cho thấy sự phân định loài tốt nhất (19/25), tốt hơn so với mã vạch ITS duy nhất và có độ tin cậy cao hơn các cây phát sinh được xây dựng bởi các tổ hợp ghép khác. Việc sử dụng các dấu hiệu từ các vùng trình tự khác nhau sẽ giúp chúng ta hiểu hơn về phân định loài và quá trình tiến hoá của loài. Vùng ITS là vùng phổ quát có độ biến thiên cao, có ở hầu hết các sinh vật kể cả nấm, vi khuẩn. Mặt khác, vùng *rbcL* trong các mẫu nghiên cứu dù không mấy khác biệt nhưng việc thu mẫu, nhận diện sẽ dễ dàng hơn khi các mẫu khó phân biệt ở mức chi, họ, vùng *matK*, *trnH-psbA* là các trình tự trong lục lạp có sự biến đổi cao.

Tóm lại, để phân tích mức độ đa dạng di truyền, các trình tự *Dendrobium* trong nghiên cứu đã được so sánh với các trình tự có trên GenBank (mã số Accession number của các trình tự trên GenBank được thể hiện ở **Bảng Phụ lục 7**). Dựa vào việc phân tích cây phát sinh, các cá thể cùng loài sẽ được xếp vào cùng một nhánh

tách biệt với những loài khác. Nhìn chung, không có sự xung đột giữa 4 cây phát sinh được dựng bằng ITS, *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA*. Tuy nhiên trong đó, cây ITS cho thấy mức độ phân nhánh rõ ràng nhất. Các mẫu giống *Dendrobium* trong nghiên cứu khá đa dạng về mặt di truyền và rõ ràng đó là những biến thể khác biệt so với các mẫu giống đã được công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank.

Kết quả phân nhóm trên các cây phát sinh đã cho thấy mức độ đa dạng của nhóm lan *Dendrobium* trong nghiên cứu. Ở trình tự bảo tồn nhất trong 4 vùng được chọn để nghiên cứu, *rbcL* vì được cho là có thể dùng để nhận diện ở mức chi, họ nên khó tách các mẫu trong nghiên cứu ra thành các nhóm khác nhau, các mẫu trong nghiên cứu, các mẫu tham khảo còn nằm lẫn vào nhau. Tuy nhiên, với 3 vùng còn lại, sự đa dạng và mối quan hệ giữa các loài, các đại diện thuộc cùng loài được thể hiện rõ ràng. Các cây phát sinh đều cho thấy trong 5 loài Hoàng thảo thủy tiên, có 4 loài (*D. densiflorum*, *D. farmeri*, *D. amabile* và *D. sulcatum*) đều thuộc section Densiflora luôn thuộc về một nhóm. Bốn loài này có mối quan hệ gần với *D. chrysotoxum* (Thủy tiên Hoàng Lạp), và *D. chrysotoxum* lại có mối quan hệ gần gũi hơn với *D. pulchellum*. Cây phát sinh cũng cho thấy mối quan hệ gần gũi giữa *D. anosmum*, *D. aphyllum* và *D. parishii*. Ngoài ra, các loài này rất gần với *D. primulinum*. *D. primulinum* (Long tu) lại có quan hệ họ hàng rất gần với Hoàng thảo vôi (Long tu Lào) *D. cretaceum*. Mối quan hệ giữa các loài trong nghiên cứu khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Takamiya và cộng sự (2014) khi dùng trình tự ITS + *matK* để phân tích mối quan hệ phát sinh cho 214 mẫu thuộc 56 loài trong chi *Dendrobium* [91].

Cây phát sinh bằng trình tự vùng ITS, *matK*, *trnH-psbA* đều cho thấy các mẫu có dạng đa thân thông thường đứng chung với nhau và điều tương tự cũng xảy ra với các loài có đặc điểm đa thân đứng. Cụ thể như cây phát sinh sử dụng trình tự ghép ITS-*matK*, từ mẫu trên cùng của cây phát sinh đến hết *D. devonianum* chỉ có mẫu *D. parishii* là thân đứng. Từ *D. crystallinum* đến hết thì chỉ có *D. tortile* và *D. intricatum* là có thân thông.



**Hình 3.25** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ghép ITS-*rbcL*-*matK*-*trnH*-*psbA* của các mẫu lan *Dendrobium* nghiên cứu với thuật toán Maximum Likelihood

### **3.3 Kết quả khảo sát các marker tiềm năng trong việc xác định các loài lan *Dendrobium* khu vực phía Nam**

Khảo sát đa dạng di truyền của các nhóm lan *Dendrobium* không chỉ cung cấp thông tin cho việc quản lý nguồn gen quý của Việt Nam đồng thời hỗ trợ cho việc xác định chính xác các loài *Dendrobium* được dùng làm dược liệu. Đồng thời hỗ trợ cho việc bảo tồn bằng cách xác định nhanh và hạn chế việc buôn bán bất hợp pháp các loài quý hiếm có nguy cơ bị tuyệt chủng. Nghiên cứu này khảo sát các vùng trình tự marker tiềm năng trong việc phân định loài hỗ trợ cho công tác bảo tồn. Việc khảo sát các trình tự marker tiềm năng được tiến hành trên 25 loài *Dendrobium* trong nghiên cứu. Để đạt được kết quả khảo sát tốt nhất, đề tài kết hợp phương pháp dựa trên cây phát sinh chủng loại và thông tin các vùng In-del. Bên cạnh đó các vị trí Variable, Parsimony, Single-tons được ghi lại. Phương pháp “Best Match/ Best Close Match” được tiến hành song song nhằm so sánh với phương pháp trên để đạt được kết quả tối ưu.

Cả 2 vùng ITS2 (66,66 %) và ITS (56,80 %) là 2 vùng cho kết quả đa hình nucleotide (dựa trên vị trí Variable) cao khi so sánh với vùng *matK* (10,70 %), *trnH-psbA* (6,52 %) và *rbcL* (5,18 %). Trong đó vùng ITS2 có mức độ đa hình cao hơn so với vùng trình tự ITS. Kết quả này tương ứng với những nghiên cứu trước đây [36;44;107]. Tuy nhiên khi phân tích phát sinh, số lượng loài mà vùng ITS2 và ITS phân định được là như nhau (16/25).

**Bảng 3.5** Kết quả phân tích các thông số giữa các marker ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* trong việc phân định loài *Dendrobium*

Trình tự	Kích thước (bp)	Số mẫu	Số loài	Variable site (%)	Parsimony (%)	Single-ton (%)	In-del	Số loài phân định được dựa trên cây phát sinh	Số loài phân định được dựa trên cây phát sinh và các đoạn In-del
ITS	639	71	25	363 (56,80)	344 (53,83)	19 (2,97)	15	16/25	18/25
ITS2	252	71	25	168 (66,66)	156 (61,90)	12 (4,76)	12	16/25	16/25
<i>matK</i>	822	69	25	88 (10,70)	62 (7,54)	26 (2,46)	3	12/25	12/25
<i>rbcL</i>	501	35	22	26 (5,18)	18 (3,60)	8 (1,58)	0	7/25	7/25
<i>trnH-psbA</i>	784	58	25	59 (7,52)	41 (5,22)	18 (2,30)	13	8/25	8/25

**Bảng 3.6** Kết quả tổng hợp các vị trí in-del dựa trên marker ITS, *trnH-psbA* của các loài *Dendrobium* trong nghiên cứu

Loài	ITS		<i>trnH-psbA</i>	
	Insertion	Deletion	Insertion	Deletion
<i>D. aloifolium</i>	141; 396-397; 624	140; 162-164; 201-202; 527; 564; 598	437-441; 759	143-148; 246-265; 381-394
<i>D. amabile</i>	141; 396-397; 528	38; 73-74; 140; 162-164; 201-202; 460; 527; 564-580; 598; 605-612; 624		75-84; 114-125; 143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. anosmum</i>	0	38; 140-141; 162-164; 170; 201-202; 396-397; 527; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 381-394; 437-441
<i>D. aphyllum</i>	0	38; 41-43; 140-141; 162-164; 201-202; 396-397; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. capillipes</i>	396-397	38; 41-43; 74-75; 140-141; 162-164; 200-202; 396-397; 527; 564; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 369-394; 437-441
<i>D. chrysotoxum</i>	38	38; 140-141; 162-164; 201-202; 396-397; 527; 564; 598 624	246-265; 294-315;	143-148; 437-441

<i>D. cretaceum</i>	201-202;	38; 140-141; 162-164; 170; 396-397; 527; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 382-395; 437-441
<i>D. crumenatum</i>	38; 141	38; 41-43; 66; 140; 162-164; 201-202; 527; 564; 573-576; 598; 624	143-148; 437-441	246-265; 294-315; 382-383;
<i>D. crystallinum</i>	527	38; 43; 140-141; 162-164; 201- 202; 396-397; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 382-395; 437-441
<i>D. densiflorum</i>	141; 396- 397	38; 43; 73-74; 140; 162-164; 201-202; 527; 564; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. devonianum</i>	141	38; 43; 140; 162-164; 201-202; 396-397; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441; 381-394
<i>D. farmeri</i>	141; 564;	38; 43; 73-74; 140; 162-164; 201-202; 527; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. fimbriatum</i>	0	38; 140-141; 162-164; 201-202; 306-307; 527; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. hercoglossum</i>	0	38; 43; 140-141; 162-164; 201- 202; 396-397; 527-528; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 382-383; 437-441
<i>D. intricatum</i>	141; 397; 598	38; 43; 75; 95; 140; 162-164; 201-202; 396; 527; 564; 576- 584; 624	759-760	143-148; 246-265; 294-315; 382-395; 437-441
<i>D. nobile</i>	0	31; 38; 43; 140-141; 162-164; 201-202; 396-397; 423; 527- 528; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 383-396; 437-441
<i>D. parishii</i>		38; 43; 140-141; 162-164; 170; 201-202; 396-397; 527; 564; 576; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 382-395; 437-441
<i>D. primulinum</i>		38; 43; 140-141; 162-165; 396- 397; 201-202; 527; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. pulchellum</i>	43;	38; 140-141; 162-164; 201-202; 396-397; 527; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. hancockii</i>	397; 598	38; 43; 140-141; 162-164; 201- 202; 396; 527; 564; 576; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 369-394; 437-441
<i>D. secundum</i>	140-141; 397	38; 43; 76; 95; 162-164; 201- 202; 396; 527; 564; 571-579; 598; 617; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 381-394; 437-441
<i>D. signatum</i>	202;	38; 43; 140-141; 162-164; 201; 396-397; 423; 527-528; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. sulcatum</i>	38; 141; 162-164; 396-397	41-43; 73-74; 140; 201-202; 527; 564; 598; 624;	0	143-148; 246-265; 294-315; 437-441
<i>D. tortile</i>	202;	38; 43; 140-141; 162-164; 201; 396-397; 423; 527-528; 564; 576; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 382-383; 437-441
<i>D. venustum</i>	38; 397, 576	41-43; 81-82; 140-141; 162- 164; 201-202; 396; 501; 527; 564; 598; 624	0	143-148; 246-265; 294-315; 369-394; 437-441

Phân tích cây phát sinh của vùng ITS cho thấy có 3 cặp *Dendrobium* không định được gồm: *D. cretaceum* và *D. primulinum*; *D. hercoglossum* và *D. nobile*; *D. tortile* và *D. signatum*. Đề tài tiến hành kiểm tra các vùng trình tự chèn (insertion) và vùng trình tự bị mất (deletion) của những loài trên bằng trình tự ITS. Kết quả đã chỉ ra sự khác biệt giữa 2 loài *D. cretaceum* và *D. primulinum* tại các vị trí nucleotide 86, 89, 221-222 (các trình tự này được sắp giống cột với trình tự ITS hoàn chỉnh của *Dendrobium primulinum* HM054747.1) được thể hiện ở **Hình 3.26**. Những vị trí trên không xuất hiện ở vùng ITS2. Trình tự của loài *D. primulinum* trong nghiên cứu chứa 3 vị trí mất nucleotide tại các vị trí 86, 221, 222 và 1 vị trí chèn nucleotide tại vị trí 89. Từ đó, 2 loài này có thể phân định được bằng thông tin các vị trí In-del của trình tự ITS. Mặc dù vùng ITS ít đa dạng hơn so với ITS2. Nhưng trình tự này (15 vị trí) chứa nhiều vị trí In-del hơn so với ITS2 (12 vị trí). Khi kết hợp phương pháp dựa trên cây phát sinh chủng loại và vị trí In-del, vùng ITS có khả năng phân định được 19 trong 25 (76 %). Điều này cũng đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trước đây [96;97]. Sự kết hợp nhiều vị trí thành một marker không thể hiện được sự phân định được rõ ràng nên không được đề cập đến ở đây.

	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	
37DT <i>D.cretaceum</i>	A	T	C	G	T	T	-	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	T	A	T	A	A	T
37TT <i>D.cretaceum</i>	A	T	C	G	T	T	-	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	T	A	T	A	A	T
37PN <i>D.cretaceum</i>	A	T	C	G	T	T	-	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	T	A	T	A	A	T
12TT <i>D.primulinum</i>	A	T	C	-	T	T	C	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	-	-	T	A	A	T
12DT <i>D.primulinum</i>	A	T	C	-	T	T	C	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	-	-	T	A	A	T
12PN <i>D.primulinum</i>	A	T	C	-	T	T	C	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	-	-	T	A	A	T
28TT <i>D.primulinum</i>	A	T	C	-	T	T	C	G	C	C	T	.....	C	A	T	C	-	-	T	A	A	T

**Hình 3.26** Vị trí In-del của *D. cretaceum* và *D. primulinum* trên vùng ITS

Phương pháp “Best Match/ Best Close Match” giúp xác định trình tự marker tiềm năng trong việc nhận diện loài [47]. Kết quả cho thấy vùng ITS2 có số lượng trình tự “Correct matches” cao nhất, tiếp theo là ITS, *trnH-psbA* và *matK*. Trong khi đó vùng *rbcL* cho kết quả thấp nhất trong các marker được khảo sát.



**Bảng 3.7** Kết quả khảo sát khả năng phân định loài bằng phương pháp “Best Match/ Best Close Match”

Trình tự	Số mẫu	Best Match (%)			Best Close Match (%)			
		Correct	Ambiguous	Incorrect	Correct	Ambiguous	Incorrect	No match
ITS	71	54 (76,05)	5 (7,04)	12 (16,90)	49 (69,01)	5 (7,04)	8 (11,26)	9 (12,67)
ITS2	71	54 (76,05)	7 (9,85)	10 (14,08)	49 (69,01)	6 (8,45)	7 (9,85)	9 (12,67)
<i>matK</i>	69	42 (60,86)	17 (24,63)	10 (14,49)	42 (60,86)	17 (24,63)	10 (14,49)	0 (0,00)
<i>rbcL</i>	35	7 (20,00)	23 (65,71)	5 (14,28)	7 (20,00)	23 (65,71)	5 (14,28)	0 (0,00)
<i>trnH-psbA</i>	58	38 (65,51)	7 (12,06)	13 (22,41)	38 (65,51)	7 (12,06)	13 (22,41)	0 (0,00)

Correct: trình tự phân định được; Ambiguous: trình tự mơ hồ; Incorrect: trình tự không phân định được; No match: trình tự không thỏa giá trị ngưỡng

Phương pháp "Best Match / Best Close Match" là phương pháp dựa trên việc so sánh khoảng cách di truyền của các trình tự được phân tích. Những trình tự có giá trị khoảng cách di truyền cùng loài (intra-distance) là thấp nhất khi so với những trình tự cùng loài khác được xếp vào nhóm “Correct”. Nếu giá trị này cũng xuất hiện khi so với các trình tự của loài khác thì sẽ được xếp vào nhóm “Ambiguous”. Những trình tự có khoảng cách di truyền cùng loài lớn hơn khoảng cách di truyền khác loài (inter-distance) được xếp vào nhóm “Incorrect”. Với phương pháp “Best Close Match”, một ngưỡng giá trị (threshold value) được tính toán dựa trên tất cả giá trị khoảng cách di truyền cùng loài để xác định mức độ tương đồng của các trình tự. Những trình tự bé hơn ngưỡng giá trị này (No match) sẽ bị loại bỏ ra khỏi bộ dữ liệu trước khi chương trình tiến hành phân định.

Vùng trình tự *matK* và *rbcL* là 2 vùng bảo tồn, mức độ tương đồng của 2 vùng này lên đến 97 %. Từ đó, khi chọn giá trị ngưỡng là 3 % không có trình tự nào được xếp vào nhóm “No match”. Trong khi đó vùng ITS và ITS2 là các vùng có mức độ

đa hình cao nên kết quả (54 trình tự) cao hơn các vùng *matK*, *trnH-psbA* và *rbcL*. Khi dùng phương pháp “Best Close Match” với giá trị ngưỡng là 3%, cả 2 vùng trên đều cho kết quả như nhau (49 trình tự phân định được) và cao nhất trong các marker được khảo sát. Từ đó cho thấy tiềm năng phân định loài của ITS và ITS2.

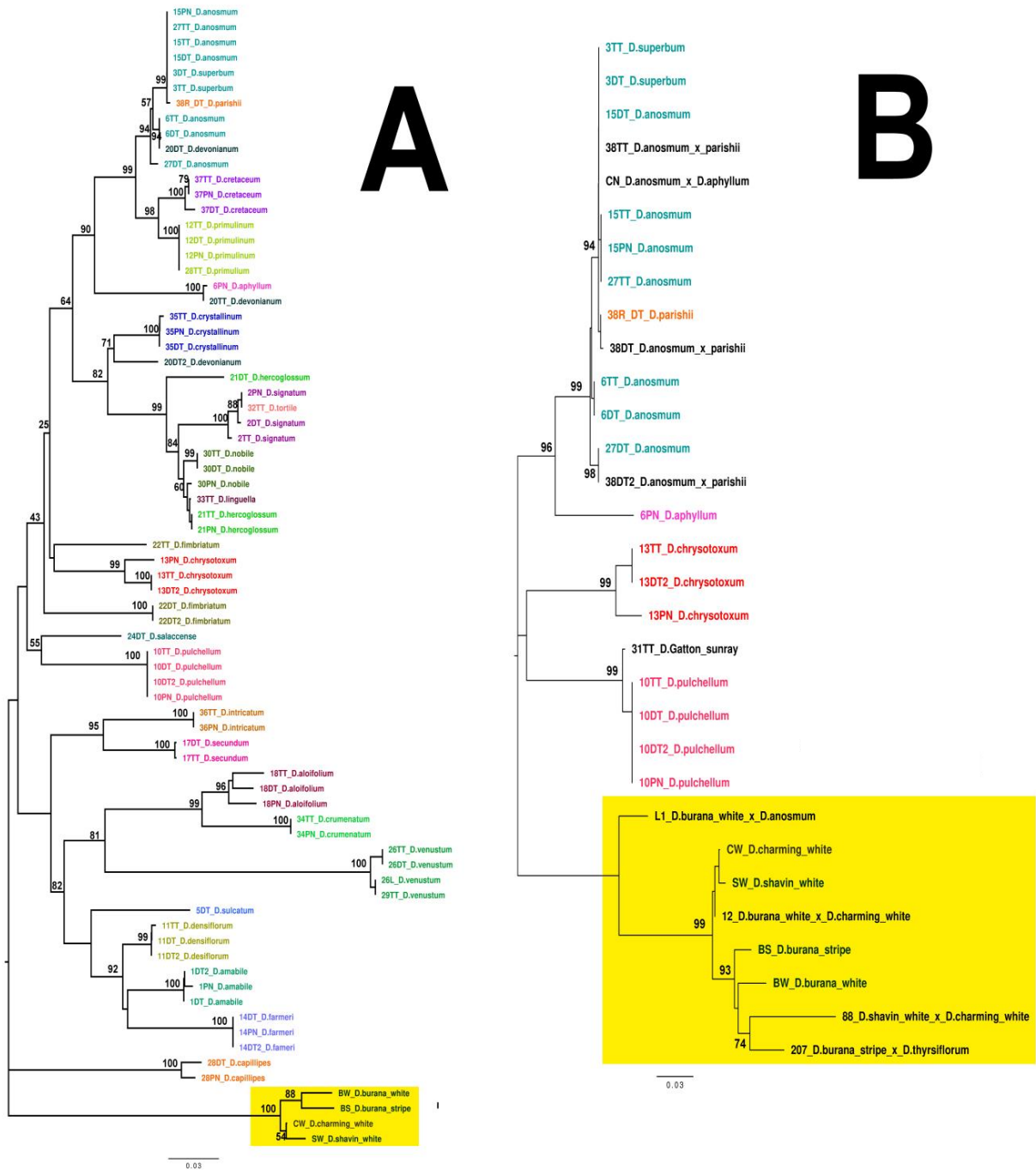
Khi so sánh phương pháp “Best Match / Best Close Match” với phương pháp dùng cây phát sinh kết hợp với thông tin In-del có sự tương đồng về kết quả thu được khi vùng ITS và ITS2 đều có khả năng phân định tốt nhất, vùng *rbcL* cho kết quả phân định thấp nhất. Từ đó, nghiên cứu đề xuất vùng ITS và ITS2 là những marker tiềm năng cho việc xác định nhanh các nhóm lan *Dendrobium*.

### **3.4 Ứng dụng hệ thống DNA để khảo sát khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ của các tổ hợp lan lai**

Các giống lan thuộc khu vực phía Nam Việt Nam trong nghiên cứu được xây dựng cây phát sinh với một số giống lan lai dựa trên marker ITS, *trnH-psbA* và *matK*. Các giống lan nhập nội gồm *D. Burana*, *D. Shavin*, *D. Charming* và các tổ hợp lai L1, 207, 12, 88 được lai tạo tại Trung tâm Công nghệ sinh học Tp. HCM. Các giống lan *Dendrobium* lai có nguồn gốc hoàn toàn từ *Dendrobium* thuần rừng cũng được thu thập để phục vụ nghiên cứu này.

#### **3.4.1 Phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ dựa trên trình tự vùng ITS**

Kết quả cây phát sinh được xây dựng dựa trên trình tự vùng ITS cho thấy các mẫu giống lan lai Thái Lan nằm riêng về một phần của cây phát sinh, tách biệt với các mẫu *Dendrobium* bản địa trong nghiên cứu. Khi bổ sung các trình tự vùng ITS của các tổ hợp lai của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp.HCM, kết quả cây phát sinh cho thấy các tổ hợp lai này cũng nằm cùng nhóm với lan lai Thái Lan.



**Hình 3.27** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng ITS của các mẫu lan *Dendrobium* với thuật toán Maximum Likelihood (A: 71 mẫu *Dendrobium* bản địa và 4 mẫu *Dendrobium* lai; B: 18 mẫu *Dendrobium* bản địa và 13 mẫu lai)

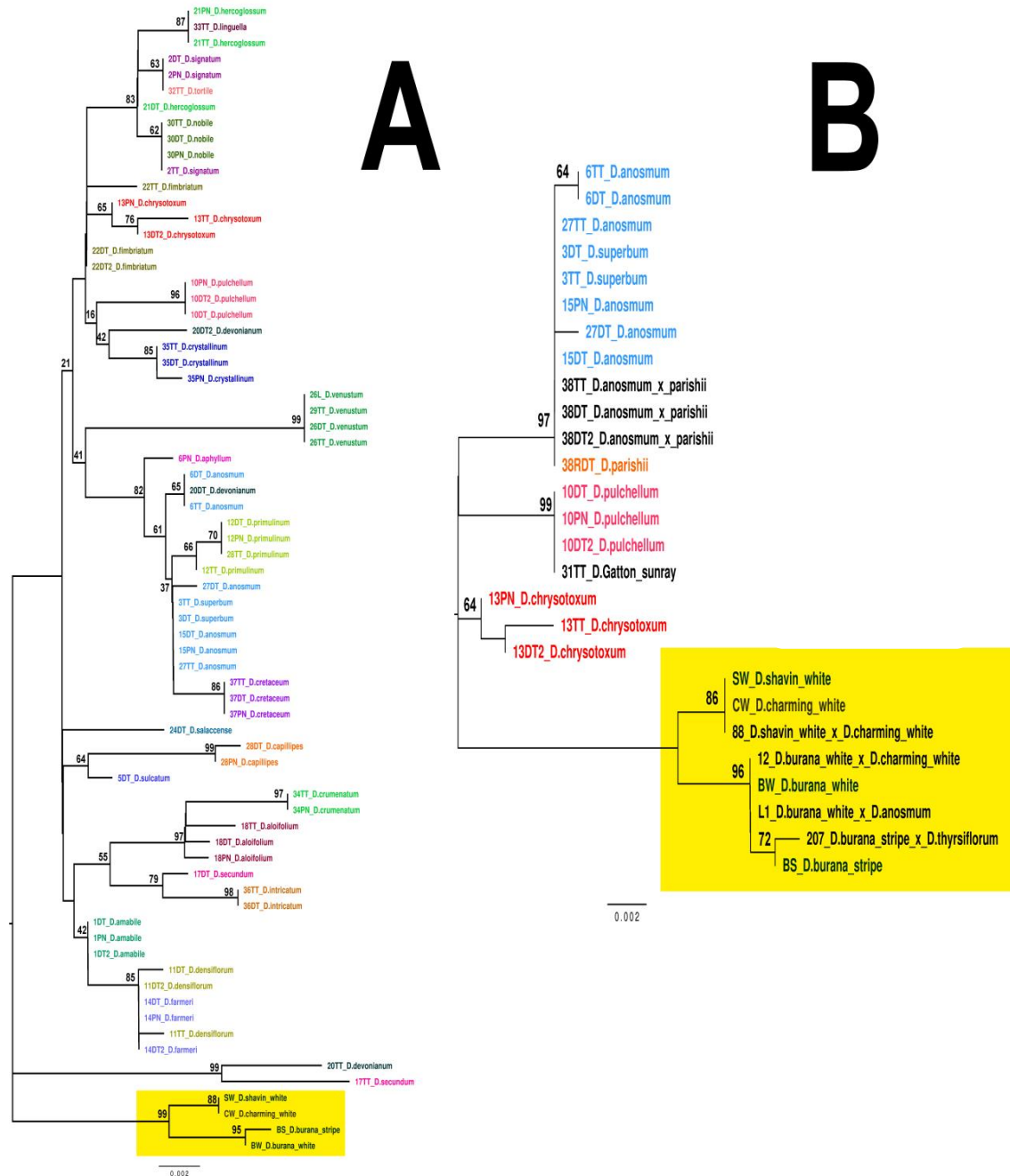
Đối với các mẫu giống lan lai có nguồn gốc hoàn toàn từ lan bản địa, kết quả cây phát sinh cho thấy các mẫu lai này nằm chung nhóm với các mẫu được cho là nguồn gốc bố mẹ của chúng. Tuy nhiên, cả mẫu lai có nguồn gốc Thái Lan và bản địa đều không thể xác định đâu là loài có nguồn gốc là bố, đâu là loài có nguồn gốc là mẹ.

Kết quả này cùng với những phân tích về cây phát sinh loài của các mẫu *Dendrobium* trong nghiên cứu dựa trên 4 vùng trình tự một lần nữa cho thấy cơ sở để bố trí các tổ hợp lai. Các kết quả đều cho thấy các loài *D. anosmum*, *D. parishii* và *D. aphyllum* có mối quan hệ gần gũi, tương tự đối với *D. pulchellum* và *D. chrysotoxum*. Như vậy, nên bố trí các tổ hợp lai từ các loài có mối quan hệ di truyền càng gần thì càng dễ thành công trong việc tạo ra các giống loài mới.

#### **3.4.2 Phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ dựa trên trình tự vùng *matK***

Kết quả cây phát sinh được xây dựng dựa trên trình tự vùng *matK* cho thấy các mẫu giống lan lai Thái Lan nằm riêng về một phần của cây phát sinh, tách biệt với các mẫu *Dendrobium* bản địa trong nghiên cứu. Khi bổ sung các trình tự vùng *matK* của các tổ hợp lai của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp.HCM, kết quả cây phát sinh cho thấy các tổ hợp lai này cũng nằm cùng nhóm với lan lai Thái Lan. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với báo cáo của Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp.HCM, khi tạo các tổ hợp lai này đã sử dụng cây lai có nguồn gốc nhập nội từ Thái Lan làm cây mẹ. *matK* là trình tự gen thuộc lục lạp, do đó, việc các tổ hợp lai này có trình tự vùng *matK* tương đồng với mẹ là kết quả hợp lý. Trên cây phát sinh loài, L1 và 12 nằm chung nhóm với *D. Burana white*, điều này một lần nữa khẳng định *D. Burana white* có nguồn gốc là cây mẹ của L1 và 12. Mẫu 207 nằm chung nhóm với *D. Burana stripe*, điều này một lần nữa khẳng định *D. Burana stripe* có nguồn gốc là cây mẹ của 207. Riêng mẫu 88 nằm chung nhóm với cả *D. Shavin white* và *D. Charming white*, như vậy trường hợp này Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp.HCM báo cáo *D. Shavin white* giữ vai trò làm mẹ nhưng kết quả phân tích trình tự vùng *matK* không giúp tái

khẳng định điều này. Kết quả này chỉ cho thấy *D. Shavin white* và *D. Charming white* có mối quan hệ rất gần gũi, không thể phân định dựa vào trình tự vùng *matK*.



**Hình 3.28** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng *matK* của các mẫu lan *Dendrobium* với thuật toán Maximum Likelihood

(A: 69 mẫu *Dendrobium* bản địa và 4 mẫu *Dendrobium* thương mại;  
B: 15 mẫu *Dendrobium* bản địa và 12 mẫu lai)

Đối với các mẫu giống lan lai có nguồn gốc hoàn toàn từ lan rừng, kết quả cây phát sinh cho thấy các mẫu lai này nằm chung nhóm với các mẫu được cho là nguồn gốc bố mẹ của chúng. Kết quả này một lần nữa cho thấy các giống bố mẹ có mối quan hệ gần gũi thì dễ tạo ra con lai.

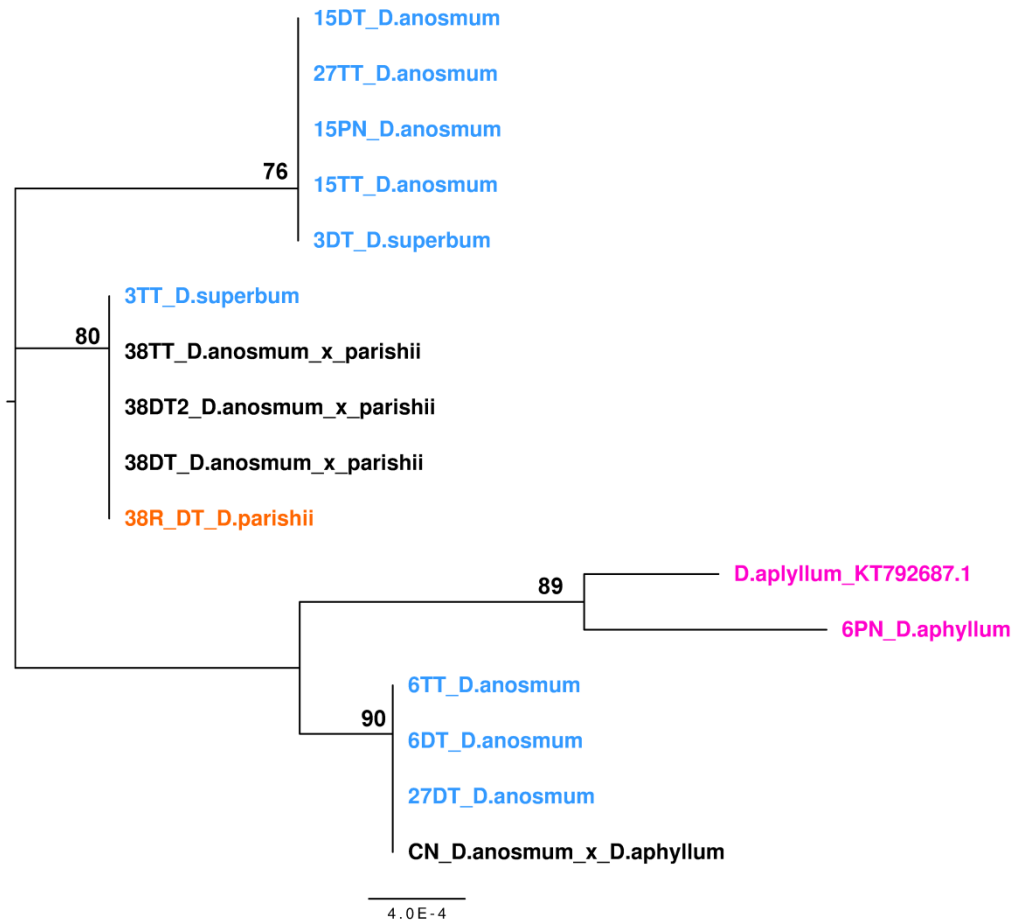
Các loài *D. anosmum*, *D. parishii* và *D. aphyllum* có mối quan hệ rất gần gũi. Chính vì thế, các giống lai là Trầm hương (*D. anosmum* x *D. parishii*) và Giã hạc Châu Như (*D. anosmum* x *D. aphyllum*) nằm chung nhóm với các loài bố mẹ, không phân biệt được đâu là giống có vai trò là bố, đâu là giống có vai trò là mẹ.

Đối với mẫu D. Gatton sunray, kết quả phân tích trình tự vùng *matK* cũng giúp xác định trong tổ hợp lai để tạo ra cây lai này thì *D. pulchellum* giữ vai trò là cây mẹ. Theo báo cáo, *D. pulchellum* lai với *D. chrysotoxum* tạo nên giống lai D. Illustre. *D. Illustre* được lai ngược lại với *D. pulchellum* để tạo nên D. Gatton sunray. Từ đó cho thấy D. Gatton sunray chứa nhiều tính trạng của *D. pulchellum* nên giải thích cho việc loài lai này nằm chung với loài *D. pulchellum* trên cây phát sinh [53].

Như vậy, trình tự vùng *matK* có khả năng được sử dụng để tái xác lập nguồn gốc bố, mẹ trong các tổ hợp lai do gen *matK* thuộc bộ gen lục lạp và được di truyền theo dòng mẹ. Ngoài ra, vùng trình tự *matK* cũng phân định tốt giữa giống lan *Dendrobium* Việt Nam với các giống lan *Dendrobium* Thái Lan trên thị trường.

### **3.4.3 Phân tích khả năng truy nguyên nguồn gốc bố, mẹ dựa trên trình tự vùng *trnH-psbA***

Kết quả sử dụng trình tự vùng *matK* để phân tích khả năng xác lập nguồn gốc bố mẹ cho thấy *matK* chưa xác định được mẫu giống có vai trò làm mẹ khi các loài bố mẹ có mối quan hệ gần gũi. Nghiên cứu tiếp tục phân tích vùng trình tự *trnH-psbA* của 4 mẫu lai (3 mẫu Trầm hồng (38) và 1 mẫu Giã hạc Châu Như (CN)). Kết quả thể hiện trên cây phát sinh cho thấy trình tự vùng *trnH-psbA* có thể giúp xác định vai trò bố mẹ trong trường hợp của Giã hạc Châu Như.



**Hình 3.29** Cây phát sinh loài dựa trên trình tự vùng *trnH-psbA* của 12 mẫu *Dendrobium* bản địa và 4 mẫu *Dendrobium* lai với thuật toán Maximum Likelihood

Tóm lại, trình tự vùng *matK*, *trnH-psbA* có thể được sử dụng để tái xác nhận vai trò bố mẹ cho một số giống lai. Nghiên cứu này ứng dụng hệ thống trình tự DNA của *matK*, *trnH-psbA* đã tái xác nhận nguồn gốc bố mẹ của 4 tổ hợp lan lai và 3 giống lan lai khác. Trong đó, 3 tổ hợp lan lai của Trung tâm công nghệ Sinh học Tp. HCM, 2 giống lan lai khác đã được xác định giống/ loài giữ vai trò là nguồn gốc bố, giống/ loài giữ vai trò là nguồn gốc mẹ.

## KẾT LUẬN – ĐỀ NGHỊ

### Kết luận

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu đã thu nhận, có thể đi đến các kết luận sau:

1. Đã xây dựng được cơ sở dữ liệu về các đặc điểm hình thái, hình ảnh minh họa và cây phân nhóm cho 40 mẫu lan *Dendrobium* khu vực phía Nam Việt nam. Đây là cơ sở dữ liệu đáng tin cậy, phục vụ cho việc so sánh, đánh giá và nhận diện các mẫu lan thuộc chi *Dendrobium*.

2. Có 25 loài lan *Dendrobium* bản địa đã được chọn lọc để phân tích 4 vùng trình tự ITS, *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA*. Bộ dữ liệu gồm các trình tự thu nhận trong nghiên cứu khi so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank là đáng tin cậy và có thể dùng để xác định mối quan hệ họ hàng giữa các loài *Dendrobium*. Từ cơ sở đó đã đăng kí 246 dữ liệu trình tự trên GenBank (Phụ lục 6), trong đó có 36 trình tự vùng *rbcL*, 76 trình tự vùng ITS, 72 trình tự vùng *matK*, 61 trình tự vùng *trnH-psbA* (tất cả các trình tự trong nghiên cứu của 25 loài bản địa và một số trình tự của loài lai). Đặc biệt, bộ dữ liệu này đã đóng góp mới 6 trình tự vùng *rbcL*, 44 trình tự vùng *trnH-psbA* của các loài chưa được công bố trên GenBank, tất cả các trình tự đăng kí đều có nguồn gốc tại Việt Nam. Các kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu về chỉ thị DNA barcode và đa dạng cho các loài lan *Dendrobium*.

3. Phân tích DNA barcode và đánh giá đa dạng di truyền cho 25 loài lan *Dendrobium* với các trình tự ITS, *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* cho thấy 19 loài lan *Dendrobium* đã được xác định, nhiều loài có mức độ đa dạng về trình tự cao ngay cả giữa các mẫu thuộc cùng một loài. Trình tự vùng ITS (hoặc ITS2) có mức độ đa dạng di truyền cao hơn 3 vùng còn lại và có thể được sử dụng để nhận diện và xác định mức độ đa dạng của các loài lan *Dendrobium*, cũng như cho các loài lan *Dendrobium* nói chung. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp 4 vùng trình tự làm mã vạch đối với 25 loài *Dendrobium* cho kết quả nhận diện loài tốt nhất (19/25 loài) với độ tin cậy cao.

4. Đã thực hiện truy nguyên nguồn gốc bố mẹ cho 5/7 mẫu giống *Dendrobium* lai bằng trình tự vùng *matK*, *trnH-psbA*. Đây có thể là những dữ liệu để đánh giá các



mẫu giống trong công tác lai tạo có thể bổ sung vào hồ sơ lý lịch của các tổ hợp lan *Dendrobium* lai.

### **Đề nghị**

- Phát triển cơ sở dữ liệu phân tử (trình tự các vùng ITS, *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*) đồng bộ cho các loài lan khác thuộc chi *Dendrobium*, các loài thuộc các chi khác trong họ phong lan có giá trị thẩm mỹ, kinh tế như *Phalaenopsis*, *Aerides*, *Coelogyne*...

- Nghiên cứu ứng dụng công nghệ NGS để đánh giá đa dạng và nhận diện loài cho nhóm lan *Dendrobium*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Averyanov V.L. và Averyanova L.A. (2003), *Trích yếu được cập nhật hóa về các loài lan của Việt Nam*. Nxb Đại học Quốc Gia, Hà Nội, 1-7;26-31; 63-66.
2. Trần Văn Bảo (1999), *Kỹ thuật nuôi trồng Phong lan*. Nxb Trẻ, Tp. HCM, 70-84.
3. Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2003), *Giáo trình di truyền số lượng*, Chương 2, Trường Đại học Nông Lâm, Tp. HCM, 15-32.
4. Trần Hoàng Dũng, Trần Lệ Trúc Hà, Vũ Thị Huyền Trang, Đỗ Thành Trí và Trần Duy Dương (2012), "Xây dựng mã vạch DNA bằng trình tự internal transcribed spacer để nhận diện Hoàng thảo trầm rừng (*Dendrobium parishii*) và Phi điệp (*Dendrobium anosmum*) tại Việt Nam", *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, 3-18.
5. Trần Duy Dương (2015), *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, Viện Khoa Học Nông Nghiệp Việt Nam.
6. Hồ Huỳnh Thùy Dương (2008), *Sinh học phân tử*. Nxb Giáo dục, 129-134.
7. Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Trọng Ngôn và Trần Nhân Dũng (2012), "Quan hệ giữa các giống, loài hoa lan (Orchidaceae) dựa trên đặc điểm hình thái", *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 2012(22a), 165-175.
8. Huỳnh Hữu Đức, Phan Diễm Quỳnh và Nguyễn Trường Giang (2018), Báo cáo tổng kết đề tài *Xây dựng cơ sở dữ liệu trình tự DNA Barcode cho một số loài lan rừng Việt Nam dựa trên marker phân tử DNA Barcode*. Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. HCM.
9. Hiệp hội quốc tế về bảo hộ giống cây trồng mới (UPOV) (2011), *Quy phạm khảo nghiệm DUS một số loài hoa và tài liệu hướng dẫn chung*. Nxb Nông nghiệp (tài liệu dịch), 139-240.
10. Phạm Hoàng Hộ (1972), *Cây cỏ miền Nam Việt Nam – Quyển II*. Trung tâm học liệu, Bộ Giáo dục Việt Nam.
11. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam Quyển III*. Nhà xuất bản trẻ, Tp. HCM, 813-839.

12. Trần Hợp (1998), *Phong lan Việt Nam*. Nxb Nông Nghiệp, Hà Nội, 7-25, 210-270.
13. Trần Văn Huân và Văn Tích Lượm (2004), *Kỹ thuật nuôi trồng cấy lan*. Nxb Mỹ thuật, 21.
14. Dương Đức Huyền (1992), *Nghiên cứu phân loại chi Hoàng thảo - Dendrobium Sw (Họ Lan Orchidaceae) ở Việt Nam*, Luận án phó tiến sĩ khoa học sinh học, Viện Khoa học Việt Nam.
15. Nguyễn Văn Kết và Nguyễn Văn Vinh (2012), "Nghiên cứu khả năng nhân giống loài lan Hoàng thảo sáo (*Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxt.) *in vitro*", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48(5), 89-95.
16. Trần Công Khánh (1981), *Thực tập hình thái và giải phẫu thực vật*. Nxb Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
17. Dương Công Kiên (2006), *Nuôi cấy mô (tập 3)*. Tủ sách Đại học Khoa học Tự nhiên.
18. Vũ Ngọc Lan và Nguyễn Thị Lý Anh (2013), "Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl.", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(7), 917-925.
19. Nghị định về Quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm số 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ.
20. Nguyễn Công Nghiệp (2000), *Trồng hoa lan*. Nxb Trẻ, 115-128.
21. Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Liên, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Hoàng Nhung và Trần Đình Giới (2012), "Đa dạng sinh học một số loài lan rừng thuộc chi *Dendrobium* bằng kỹ thuật RADP", *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 2012(22a), 186-192.
22. Primack R.B. (1999), *Cơ sở sinh học bảo tồn*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật (tài liệu dịch), 7.
23. Đỗ Văn Quảng (2011), *Nghiên cứu giải pháp bảo tồn và phát triển sản xuất loài lan rừng có giá trị kinh tế cao tại Bình Phước*, Thông tin Khoa học và Công nghệ Bình Phước.
24. Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan và Trần Thế Mai (2012), "Nhân giống *in vitro* loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. (Hoàng Thảo Long nhãn)", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10(2), 263-271.

25. Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhân, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga và Nguyễn Quang Thạch (2014), "Nhân giống *in vitro* *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Thạch học thiết bì)", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(8), 1274-1282.
26. Dương Hoa Xô, Hà Thị Loan, Phan Diễm Quỳnh, Lê Thị Thu Hằng và Võ Thị Thanh Tuyền (2011), *Sưu tập, nhập nội, chọn tạo và nhân nhanh các giống hoa lan phục vụ nội tiêu và xuất khẩu*, Trung tâm Công nghệ sinh học Tp. HCM.

### Tiếng Anh

27. Asahina H., Shinozaki J., Masuda K., Morimitsu Y., and Satake M. (2010), "Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences", *Journal of natural medicines*, 64, 133-138.
28. Baldwin B.G. (1992), "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae", *Molecular phylogenetics and evolution*, 1(1), 3-16.
29. Bhattacharyya P., and Kumaria S. (2014), "Molecular characterization of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid, based on randomly amplified polymorphic DNA", *Plant systematics and evolution*, 301, 201–210.
30. Bulpitt C.J., Li Y., Bulpitt P.F. and Wang J. (2007), "The use of orchids in Chinese medicine", *Journal of the royal society of medicine*, 100(12), 558–563.
31. Cabelin V.L., and Alejandro G.J. (2016), "Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA Barcoding", *Pharmacognosy magazine*, 12, S384-388.
32. Clements M.A. (2003), "Molecular phylogenetic systematics in the Dendrobiinae (Orchidaceae), with emphasis on *Dendrobium* section Pedilonum", *Telopea*, 10(1), 247-298.
33. Cuenoud P., Savolainen V., Chatrou L.W., Powell M., Grayer R.J., and Chase M.W. (2002), "Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences", *American journal of botany*, 89(1), 132-144.

34. Chase M., Cowan R., Hollingsworth P., van den Berg C., Madriñán S., Petersen G., Seberg O., Jorgensen T., Cameron K., Carine M., Pedersen N., Hedderson T., Conrad F., Richardson J.E., Hart M., Barraclough T., Kelly L., and Wilkinson M. (2007), "A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants", *Taxon*, 56, 295-299.
35. Chattopadhyay P., Banerjee G., and Banerjee N. (2017), "Distinguishing orchid species by DNA barcoding: increasing the resolution of population studies in plant biology", *Omics: a journal of integrative biology*, 21, 711-720.
36. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., and Leon C. (2010), "Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species", *Public library of science One*, 5(1), e8613.
37. Cheng K.T., Lo S.F., Lee C.Y., Chen C.C., and Tsay H.S. (2004), "The rDNA sequence analysis of three *Dendrobium* species ", *Journal of food and drug analysis*, 12(4), 367-369.
38. Chiang C.H., Yu T.A., Lo S.F., Kuo C.L., Peng W.H., and Tsay H.S. (2012), "Molecular authentication of *Dendrobium* species by multiplex polymerase chain reaction and amplification refractory mutation system analysis", *Journal of the American society for horticultural science*, 137, 438-444.
39. Ding G., Ding X., Shen J., Tang F., Liu D., He J., Li X., and Chu B. (2005), "Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD", *Yao xue xue bao - Acta pharmaceutica sinica*, 40(11), 1028-1032.
40. Ding G., Li X., Ding X., and Qian L. (2009), "Genetic diversity across natural populations of *Dendrobium officinale*, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers", *Genetika*, 45(3), 375-382.
41. Ding X., Xu L., Wang Z., Zhou K., Xu H., and Wang Y. (2002), "Authentication of stems of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences", *Planta medica*, 68(2), 191-192.
42. Duong T., Trung K., Nghia L., Thuy N., Hien P., Khoa N., Dung T., Trung D., and Khanh T. (2018), "Identification of Vietnamese native *Dendrobium* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence", *Advanced studies in biology*, 10, 1-12.

43. Fan W., Luo Y., Li X., Gu S., Xie M., He J., Cai W., and Ding X. (2009), "Development of microsatellite markers in *Dendrobium fimbriatum* Hook, an endangered Chinese endemic herb", *Molecular ecology resources*, 9(1), 373-375.
44. Feng S., Jiang Y., Wang S., Jiang M., Chen Z., Ying Q., and Wang H. (2015), "Molecular identification of *Dendrobium* Species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study", *International journal of molecular sciences*, 16(9), 21975-21988.
45. Ghorbani A., Gravendeel B., Selliah S., Zarré S., and De Boer H. (2017), "DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep", *Molecular ecology resources*, 17(2), 342-352.
46. Gu S., Ding X., Wang Y., Zhou Q., Ding G., Li X., and Qian L. (2007), "Isolation and characterization of microsatellite markers in *Dendrobium officinale*, an endangered herb endemic to China", *Molecular ecology notes*, 7(6), 1166-1168.
47. Guo Y.Y., Huang L.Q., Liu Z.J., and Wang, X.Q. (2016), "Promise and challenge of DNA Barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*)", *Public library of science One*, 11(1), e0146880-e0146880.
48. Hollingsworth P.M., Forrest L., Spouge J., Hajibabaei M., Ratnasingham S., Bank M., Chase M., Cowan R., Erickson D. and Fazekas A. (2009), "DNA barcode for land plants". *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 106, 12794–12797.
49. Hollingsworth P.M., Graham S.W., and Little D.P. (2011), "Choosing and using a plant DNA barcode", *Public library of science One*, 6(5), e19254.
50. Huang H., Li J.S., Fu A.J., and Yan H. (2010), "Screening of potential DNA barcoding marks in *Dendrobium*", *Chinese journal of tropical crops*, 31(10), 1769-1777.
51. Jiang G.L. (2013), "Molecular markers and marker-assisted breeding in plants", *Plant breeding from laboratories to fields*, 45-83.
52. Jing Q., Honghong F., Tingchun L., Yi L., and Yongping C. (2008), "Analysis of genetic diversity and affinity relationships among the medical species of *Dendrobium* Sw. by RAPD ", *Forest by-product and speciality in China*, 95, 9-11.

53. Kamemoto H., Amore T.D., and Kuehnle A.R. (1999), *Breeding Dendrobium orchids in Hawaii*, University of Hawaii Press.
54. Kang J., Lu J., Qiu S., Chen Z., Liu J.J., and Wang H. (2015), "Dendrobium SSR Markers play a good role in genetic diversity and phylogenetic analysis of Orchidaceae species", *Scientia horticultruae*, 183.
55. Khew G.S. and Chia T.F. (2011) "Parentage determination of Vanda Miss Joaquim (Orchidaceae) through two chloroplast genes rbcL and matK", *Annals of botany Plants*, Volume 2011, plr018.
56. Kim H.M., Oh S.H., Bhandari G.S., Kim C.S., and Park C.W. (2014), "DNA barcoding of Orchidaceae in Korea", *Molecular ecology resources*, 14(3), 499-507.
57. Konhar R., Debnath M., Vishwakarma S., Bhattacharjee A., Sundar D., Tandon P., Dash D. and Biswal D.K. (2019), "The complete chloroplast genome of Dendrobium nobile, an endangered medicinal orchid from north-east India and its comparison with related Dendrobium species", *PeerJ*, 7756.
58. Kress W., Wurdack K., Zimmer E., Weigt L., and Janzen D. (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 102, 8369-8374.
59. Kress W.J., and Erickson D.L. (2012), "DNA barcodes: methods and protocols", *Molecular biology and methods*, 858, 3-8.
60. Kumar M., Chaudhary V., Sharma V.R., Sirohi U., and Singh J. (2018), "Advances in biochemical and molecular marker techniques and their applications in genetic studies of orchid: A review", *International journal of chemical studies*, 6(6), 806-822.
61. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
62. Khatun H., Khatun M., Biswas M.S., Kabir M.R., and Al-Amin A. (2010), "In vitro growth and development of *Dendrobium* hybrid orchid", *Bangladesh journal of agricultural research*, 35, 507-514.
63. Lee W., Lee S., Chen K., Lin R., Liou T., and Chung J. (2009), "Genetic relationships of *Dendrobium* (Orchidaceae) species based on chloroplast-matK gene sequences", *Journal of Taiwan agricultural research*, 58(1), 61-71.

64. Li D., Li Z.J., Mao P., Yan X.F., Chun Z., and Ma X.R. (2012), "Phylogenetic analysis and identification of *Dendrobium* species based on ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence", *Acta horticulturae sinica*, 39(8), 1539-1550.
65. Li T., Wang J., and Lu Z. (2005), "Accurate identification of closely related *Dendrobium* species with multiple species-specific gDNA probes", *Journal of biochemical and biophysical methods*, 62(2), 111-123.
66. Li Y., Tong Y., and Xing F. (2016), "DNA Barcoding Evaluation and Its Taxonomic Implications in the Recently Evolved Genus *Oberonia* Lindl. (Orchidaceae) in China", *Frontiers in plant science*, 7, 1791-1791.
67. Liu H., Fang C., Zhang T., Guo L., and Ye Q. (2019), "Molecular authentication and differentiation of *Dendrobium* species by rDNA ITS region sequence analysis", *AMB express*, 9(1), 53-53.
68. Liu Y.T., Chen R.K., Lin S.J., 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", *Genetics and molecular research*, 13(2), 2709-2717.
69. Meier R. (2008), "DNA sequences in taxonomy: Opportunities and challenges", *The new taxonomy*, 7, 95-127.
70. Meier R., Shiyang K., Vaidya G., and Ng P.K. (2006), "DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success", *Systematic biology*, 55(5), 715-728.
71. Michaels S.D., and Amasino R.M. (1998), "A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR", *The plant journal*, 14(3), 381-385.
72. Mohammed S., and Habib K. (2016), *Fumonisin B1 detection, production and histopathological effects*, Lap Lambert academic publishing.
73. Moudi M., Yong C., Nazre M., Abdullah J., and Go R. (2013), "Phylogenetic analysis among four sections of genus *Dendrobium* sw. (Orchidaceae) in Peninsular Malaysia using rbcL sequence data", *International journal of bioassays*, 2, 932-937.
74. Nanakorn W., and Indharamusika S. (1999), *Ex-situ conservation of native Thai orchids at Queen Sirikit Botanic Garden*, 2115.



75. 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, 469–481.
76. Niu S., Huang J., Li P.X., Yang H.J., Zhang Y.Q., Zhang G.Q., Chen L.J., Niu Y.X., Luo Y.B., and Liu Z.J. (2018), "Morphological type identification of self-incompatibility in *Dendrobium* and its phylogenetic evolution pattern", *International journal of molecular sciences*, 19, 2595.
77. Olmstead R., and Palmer J. (1994), "Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis", *American journal of botany*, 81(9), 1205-1224.
78. Parveen I., Singh H.K., Raghuvanshi S., Pradhan U.C., and Babbar S.B. (2012), "DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species", *Molecular ecology resources*. 12(1), 82-90.
79. Peng R., Li Q.S., and Li L.Y. (2004), "RAPD-based molecular identification of *Dendrobium* species", *Journal of southwest agricultural university*, 4.
80. Peyachoknagul S., Mongkolsiriwatana C., Srikulnath S., Huehne P., and Srikulnath K. (2014), "Identification of native *Dendrobium* species in Thailand by PCR-RFLP of rDNA-ITS and chloroplast DNA", *Science asia*, 40, 113–120.
81. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., and Huelsenbeck J.P. (2012), "MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space", *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
82. Shao S.G., Han L., Ma Y.H., Shen J., Zhang W.C., and Ding X.Y. (2009), "Analysis and authentication of cpDNA *psbA-trnH* regions of *Dendrobium* species of Fengdous", *Acta pharmaceutica sinica B*, 244(10), 1173-1178.
83. Sharma S.K., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., and Rao S.R. (2012), "Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA", *Gene*, 495(1), 10-15.
84. Shen J., Ding X., Liu D., Ding G., He J., Li X., Tang F., and Chu B. (2006), "Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo", *Biological and pharmaceutical bulletin*, 29(3), 420-422.

85. Shiau Y.J., Nalawade S., Hsia C.N., Mulabagal V., and Tsay H.S. (2005), "In vitro propagation of the Chinese medicinal plant, *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl., from axenic nodal segments", *In vitro cellular and developmental biology - Plant*, 41, 666-670.
86. Singh H., Parveen I., Raghuvanshi S., and Babbar S. (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 research notes*, 5, 42.
87. Siripiyasing P., Kaenratana K., Mookkamul P., Tanee T., Sudmoon R., and Chaveerach A. (2011), "DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand", *African journal of agricultural research*, 393-404.
88. Someswar R., and Bikramjit B. (2014), "In vitro micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. a threatened orchid", *Scholars academic journal of biosciences*, 2(1), 39-42.
89. Srikulnath K., Sawasdichai S., Jantapanon T., Pongtongkam P., and Peyachoknagul S. (2015), "Phylogenetic relationship of *Dendrobium* species in Thailand inferred from chloroplast matK gene and nuclear rDNA ITS region", *The horticulture journal*, MI-028, 243-252.
90. Takamiya T., Wongsawad P., Sathapattayanon A., Tajima N., Suzuki S., Kitamura S., Shioda N., Handa T., Kitanaka S., and Iijima H. (2014a), "Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, *Dendrobium* section *Dendrobium* and allies", *Annals of botany plants*, 6.
91. Takamiya T., Wongsawad P., Sathapattayanon A., Tajima N., Suzuki S., Kitamura, S., Shioda, N., Handa, T., Kitanaka, S., Iijima, H., and Yukawa, T. (2014b), "Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse group, *Dendrobium* section *Dendrobium* and allies", *Annals of botany plants*, 6.
92. Takamiya T., Wongsawad P., Tajima N., Shioda N., Lu J., Wen C., Wu J., Handa T., Iijima H., Kitanaka S., and Yukawa T. (2011), "Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer sequence", *Biological and pharmaceutical bulletin*, 34, 779-782.

93. Techen N., Parveen I., Pan Z., and Khan I.A. (2014), "DNA barcoding of medicinal plant material for identification", *Current opinion in biotechnology*, 25, 103-110.
94. UNEP-WCMC, *Checklist of CITES species*, Available at: <http://checklist.cites.org> (Accessed: 10/11/2019).
95. Verma P.C., Chakrabarty D., Jena S.N., Mishra D.K., Singh P.K., Sawant S.V., and Tuli R. (2009), "The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR", *Industrial crops and products*, 29(2-3), 581-589.
96. Vu H.T., Huynh P., Tran H.D., and Le L. (2018), "In Silico study on molecular sequences for identification of *Paphiopedilum* species", *evolutionary bioinformatics*, 14, 117693431877454.
97. Vu H.T., Vu Q.L., Nguyen T.D., Tran N., Nguyen T.C., Luu P.N., Duong T., Nguyen T.K., and Le L. (2019), "Genetic diversity and identification of Vietnamese *Paphiopedilum* species using DNA sequences", *Biology*, 9, 9.
98. Wang H., Jiangjie L., Shi N., and Ying Q. (2006), "Analysis of genetic diversity and affinity relationships among 13 species of *Dendrobium* Sw. by RAPD", *Chinese traditional and herbal drugs*, 37(4), 588-592.
99. Wang H., Shi L.L., Zhou J., and Zhu G.P. (2018), "DNA barcoding identification of *Dendrobium huoshanense* and its adulterants", *China journal of Chinese materia medica*, 43(20), 4055-4061.
100. Wang H. Z., Feng S. G., Lu J. J., Shi N. N., and Liu J. J. (2009), "Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers", *Scientia horticulturae*, 122(3), 440-447.
101. Wang X., Chen X., Yang P., Wang L., and Jianping H. (2017), "Barcoding the *Dendrobium* (Orchidaceae) species and analysis of the intragenomic variation based on the Internal Transcribed Spacer 2", *BioMed research international*, 2017, 1-10.
102. Waud M., Busschaert P., Ruyters S., Jacquemyn H., and Lievens B. (2014), "Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing", *Molecular ecology resources*, 14(4), 679-699.

103. Wilfret G., and Kamemoto H. (1969), "Genome and karyotype relationships in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae). I. crossability", *American journal of botany*, 56, 521-526.
104. Wonnapijit P., and Sriboonlert A. (2015), "Molecular phylogenetics of species of *Bulbophyllum* sect. *Trias* (Orchidaceae; Epidendroideae; Malaxidae) based on nrITS and plastid *rbcL* and *matK*", *Phytotaxa*, 226, 1.
105. Wood H. (2006), *The dendrobiums*, Portland: Timber Press.
106. Wu C.T., Gupta S.K., Wang A.Z.M., Lo S.F., Kuo, C.L., Ko Y.J., Chen C.L., Hsieh C.C., and Tsay H.S. (2012), "Internal transcribed spacer sequence based identification and phylogenetic relationship of herba *Dendrobii*", *Journal of food and drug analysis*, 20(143), e51.
107. Xiang X.G., Hu H., Wang W., and Jin X.H. (2011), "DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae): A test of DNA barcode candidates", *Molecular ecology resources*, 11, 1012-1021.
108. Xiao K., Ge X.J., Li X.Q., and Tang, Y.P. (2008), "Fingerprinting cluster analysis of plants of *Dendrobium* by RAPD", *Acta academiae medicinae Zunyi*, 31(5), 454-456.
109. Xie M., Hou B., Han L., Ma Y., and Ding X. (2010), "Development of microsatellites of *Dendrobium officinale* and its application in purity identification of germplasm", *Yao xue xue bao - Acta pharmaceutica sinica*, 45(5), 667-672.
110. Xu H., Wang Z., Ding X., Zhou K., and Xu L. (2006), "Differentiation of *Dendrobium* species used as "Huangcao Shihu" by rdna ITS sequence analysis", *Planta medica*, 72(1), 89-92.
111. Xu S., Li D., Li J., Xiang X., Jin W., Huang W., Jin X., and Huang L. (2015), "Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia", *Public library of science One*, 10(1), e0115168-e0115168.
112. Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., Li Y., Pang X., Xu H., Zhu Y., Xiao P., and Chen S. (2010), "Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals", *Public library of science One*, 5(10), e13102.
113. Yao H., Song J.Y., Ma X.Y., Liu C., Li Y., Xu H.X., Han J.P., Duan L.S., and Chen S.L. (2009), "Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region", *Planta medica*, 75(6), 667-669.

114. Yao P.C., Gao H.Y., Wei Y.N., Zhang J.H., Chen X.Y., and Li H.Q. (2017), "Evaluating sampling strategy for DNA barcoding study of coastal and inland halo-tolerant *Poaceae* and *Chenopodiaceae*: A case study for increased sample size", *Public library of science One*, 12(9), e0185311.
115. Yu H., He R., Ni N., and Zhang S. (2004), "Fingerprinting analysis of plants of *Dendrobium* Sw. by AFLP", *Chinese traditional and herbal drugs*, 35(7), 808-810.
116. Yu R., Guangsui Y., Junmei Y., Yanling Z., and Xian H. (2007), "Analysis of Genetic Diversity in *Dendrobium* Germplasm by RAPD Markers", *Chinese agricultural science bulletin*, 23(6), 598-600.
117. Yuan Z.Q., Zhang J.Y., and Liu, T. (2009), "Sequence variation of *rbcL* gene and phylogenetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) plants", *Lishizhen medicine and materia medica research*, 7.
118. Yuan Z.Q., Zhang J.Y., and Liu T. (2009), "Phylogenetic relationship of China *Dendrobium* species based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA", *Biologia plant*, 53, 155-158.
119. Yue G.H., Lam L., and Hong Y. (2006), "Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties", *Molecular ecology notes*, 6, 832-834.
120. Yukawa T., Kita K. and Handa T (2000), "DNA phylogeny and morphological diversification of Australian *Dendrobium* (Orchidaceae). In *Monocots: Systematics and Evolution*", Collingwood, Australia, 465–471.
121. Zhang J., Yuan Z., and Liu T. (2007), "Analysis and classification of *Dendrobium* species (Orchidaceae) plants in China by RAPD", *Northern horticulture*, 7, 134-136.
122. Zimmer E.A., and Wen J. (2012), "Using nuclear gene data for plant phylogenetics: progress and prospects", *Molecular phylogenetics and evolution*, 65(2), 774-785.

## CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### Trong nước

- Nguyễn Như Hoa, Trần Hoàng Dũng, Dương Hoa Xô, Huỳnh Hữu Đức (2017), “Phân tích mối quan hệ phát sinh chủng loài của một số mẫu lan *Dendrobium* dựa trên trình tự vùng ITS”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 12(85): tr 41-46
- Nguyễn Như Hoa (2018), “Phân tích trình tự vùng ITS của một số loài Hoàng thảo Thủy Tiên”, *Tạp chí Khoa học trường Đại học Sư phạm Tp. HCM*, 15(6): tr 149-155

### Quốc tế

- Nhu-Hoa Nguyen, Huyen-Trang Vu, Ngoc-Diep Le, Thanh-Diem Nguyen, Hoa-Xo Dương, Hoang-Dung Tran (2020), “Molecular identification and evaluation of the genetic diversity of *Dendrobium* species collected in Southern Vietnam” *Biology* 2020, 9(4), 76; <https://doi.org/10.3390/biology9040076>
- Nhu-Hoa Nguyen, Tuan-Loc Le, Huyen-Trang Vu, Kim-Dinh Tran, Hop Tran, Hoa-Xo Dương, Hoang-Dung Tran (2020), “Analysis and Categorization of Several *Dendrobium* Species Based on Morphological Traits”. *Annual Research & Review in Biology*, 35(3), 97-114; <https://doi.org/10.9734/arrb/2020/v35i330205>

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1: Phương pháp mô tả hình thái thực vật

1. A. Rễ: (1) Mọc xen kẽ nách lá; (2) Mọc dưới gốc; (3) Có rễ củ.
2. B. Dạng thân: (1) Đơn thân; (2) Đa thân – đứng; (3) Đa thân – thông, (4) Không thân; (5) Thân củ.
3. C. Hình dạng mặt cắt dọc của thân giả: (1) Hình chữ nhật, (2) elip, (3) hình tròn, (4) hình trứng.
4. D. Hình dạng mặt cắt ngang của thân giả: (1) Hình elip, (2) hình tròn.
5. E. Đặc điểm đốt thân: (1) Đốt có rãnh dọc, (2) Đốt không có rãnh dọc.
6. F. Hình dạng lá: (1) Hình mác hẹp, (2) Hình chữ nhật/thuôn dài, (3) Hình mũi mác ngược, (4) Hình giáo.
7. G. Dạng đỉnh lá: (1) nhọn, (2) tù, (3) có khía.
8. H. Tính đối xứng của đỉnh lá: (1) không đối xứng, (2) đối xứng.
9. I. Hình dạng mặt cắt ngang của lá: (1) thẳng, (2) lõm.
10. J. Độ xoắn của lá: (1) Không xoắn hoặc rất ít, (2) ít xoắn, (3) trung bình, (4) xoắn nhiều, (5) rất nhiều.
11. K. Màu xanh của lá: (1) nhạt, (2) vừa phải, (3) đậm.
12. L. Sắc tố anthocyanin trên lá: (1) Không có, (2) có.
13. M. Dạng phát hoa: (1) Hoa đơn; (2) Dạng chùm.
14. N. Hướng của cuống hoa: (1) Thẳng đứng, (2) nửa thẳng, (3) vòng cung, (4) nửa rủ xuống, (5) rủ xuống.
15. O. Sắc tố anthocyanin trên cuống hoa: (1) Không có, (2) có.
16. P. Kiểu hoa: (1) Đơn, (2) Nửa kép, (3) kép.

17. Q. Ấn tượng chung về cánh hoa và đài hoa: (1) tất cả uốn cong vào, (2) Một số uốn cong vào, một số trải ngang, (3) Tất cả trải ngang, (4) Một số trải ngang, một số quay ngược lại, (5) tất cả quay ngược lại, (6) Một số uốn cong, một số quay ngược lại.
18. R. Hương thơm của hoa: (1) Không có hoặc thoang thoảng, (2) ít thơm, (3) thơm.
19. S. Hình dạng lá đài lưng: (1) Hình mác, (2) dạng đường thẳng, (3) hình thuôn chữ nhật, (4) Elip, (5) Trứng ngược.
20. T. Độ uốn cong của trục dọc của lá đài lưng: (1) Uốn cong với đỉnh uốn ngược lên, (2) Uốn cong mạnh, (3) uốn nhẹ, (4) thẳng, (5) hơi uốn ngược lại, (6) Uốn ngược mạnh, (7) Uốn ngược lại với đỉnh uốn cong.
21. U. Hình dạng đỉnh lá đài lưng: (1) Nhọn hẹp, (2) Nhọn, (3) Tù, (4) Cụt, (5) Có khía.
22. V. Sự uốn cong trở lại của rìa lá đài lưng: (1) Không có hoặc rất yếu, (2) yếu, (3) trung bình, (4) mạnh, (5) rất mạnh.
23. W. Sự gợn sóng của rìa lá đài lưng: (1) Không có hoặc rất ít, (2) ít gợn sóng, (3) gợn sóng trung bình, (4) nhiều, (5) rất nhiều.
24. X. Hình dạng lá đài bên: (1) Hình mác, (2) dạng đường thẳng, (3) hình thuôn chữ nhật, (4) Elip, (5) Trứng ngược.
25. Y. Độ uốn cong của trục dọc lá đài bên: (1) Cong với đỉnh uốn ngược lại, (2) cong nhiều, (3) hơi cong, (4) thẳng, (5) hơi uốn ngược lại, (6) uốn ngược mạnh, (7) uốn ngược lại với đỉnh uốn cong.
26. Z. Dạng đỉnh lá đài bên: (1) Nhọn hẹp, (2) Nhọn, (3) Tù, (4) Cụt, (5) Có khía.
27. AA. Sự uốn cong trở lại của rìa lá đài bên: (1) Không có hoặc rất yếu, (2) yếu, (3) trung bình, (4) mạnh, (5) rất mạnh.

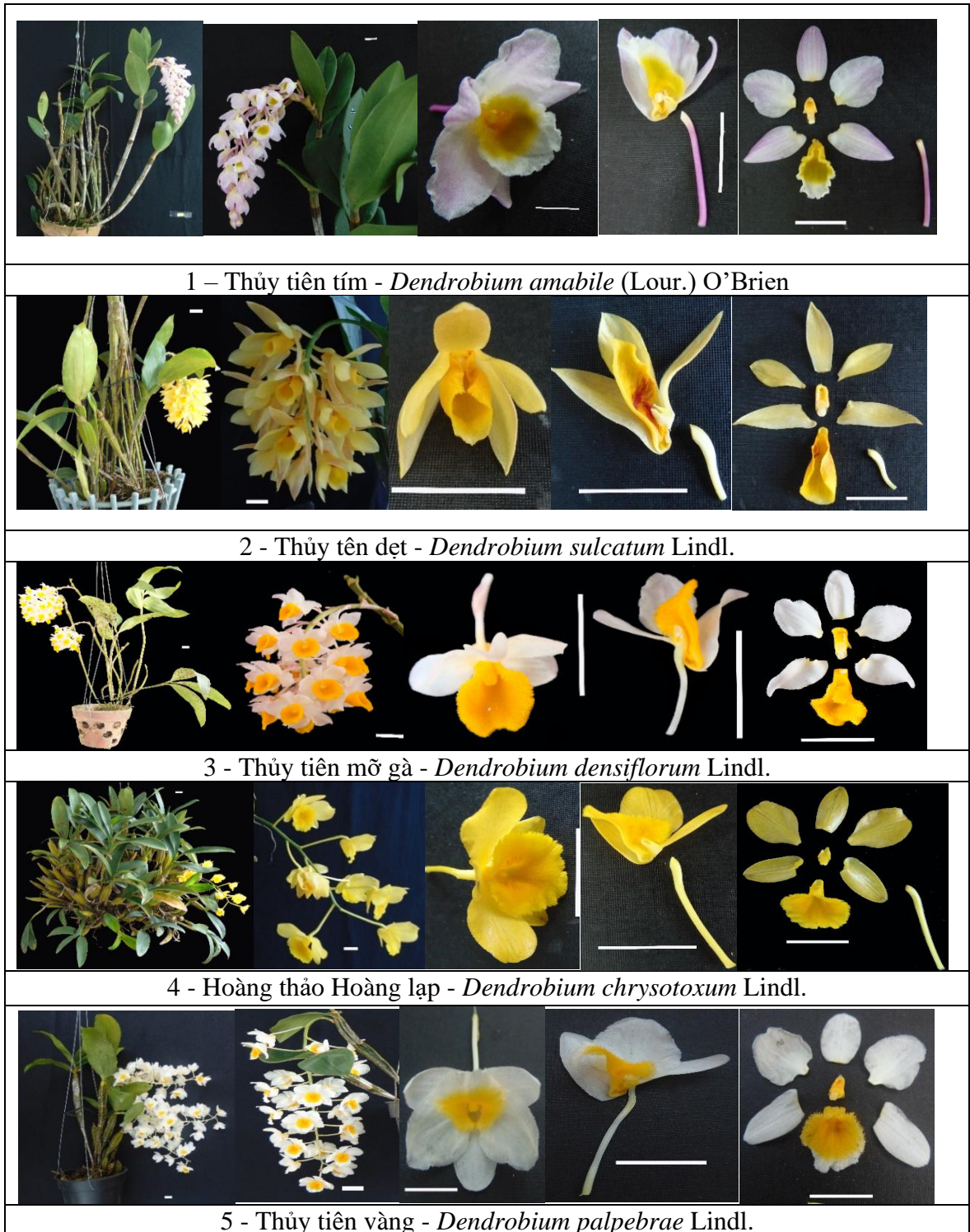


28. AB. Sự gập nếp ngoài rìa lá đài bên: (1) Không có hoặc rất ít, (2) ít, (3) trung bình, (4) nhiều, (5) rất nhiều.
29. AC. Số màu của đài hoa: (1) một, (2) hai, (3) ba, (4) hơn ba.
30. AD. Vết đốm trên lá đài: (1) không có, (2) có.
31. AE. Vết sọc trên lá đài: (1) không có, (2) có.
32. AF. Vết đốm trên tràng hoa: (1) không có, (2) có.
33. AG. Vết sọc trên tràng hoa: (1) không có, (2) có.
34. AH. Hình dạng tràng hoa: (1) Hình thoi, (2) dạng đường thẳng, (3) hình thuôn chữ nhật, (4) Elip, (5) Trứng ngược, (6) Hình thìa.
35. AI. Độ uốn cong của trục dọc của tràng hoa: (1) Uốn cong với đỉnh uốn ngược trở ra, (2) Uốn cong mạnh, (3) hơi cong, (4) thẳng, (5) hơi uốn ngược lại, (6) Uốn ngược mạnh, (7) Uốn ngược lại với đỉnh uốn cong.
36. AJ. Hình dạng đỉnh tràng hoa: (1) Nhọn hẹp, (2) Nhọn, (3) Tù, (4) Cụt, (5) Có khía.
37. AK. Sự uốn cong trở lại của rìa tràng hoa: (1) Không có hoặc rất yếu, (2) yếu, (3) trung bình, (4) mạnh, (5) rất mạnh.
38. AL. Nếp gập của rìa tràng hoa: (1) Không có hoặc rất yếu, (2) yếu, (3) trung bình, (4) mạnh, (5) rất mạnh.
39. AM. Số màu của tràng hoa: (1) một, (2) hai, (3) ba, (4) hơn ba.
40. AN. Hình dạng môi hoa: (1) tam giác hẹp, (2) tam giác, (3) tứ giác, (4) tròn, (5) hình cầu dẹt, (6) hình thìa.
41. AO. Độ uốn cong của trục dọc môi hoa: (1) Cong với đỉnh uốn ngược lại, (2) cong nhiều, (3) hơi cong, (4) thẳng, (5) hơi uốn ngược lại, (6) uốn ngược mạnh, (7) uốn ngược lại với đỉnh uốn cong.
42. AP. Chia thùy ở đỉnh tràng hoa: (1) Không có, (2) Có.

43. AQ. Sự uốn cong trở lại của rìa môi hoa: (1) Không có hoặc rất yếu, (2) yếu, (3) trung bình, (4) mạnh, (5) rất mạnh.
44. AR. Sự gấp nếp ngoài rìa cánh môi: (1) Không có hoặc rất yếu, (2) yếu, (3) trung bình, (4) mạnh, (5) rất mạnh.
45. AS. Số màu của môi hoa: (1) một, (2) hai, (3) ba, (4) hơn ba.
46. AT. Vết đốm trên môi hoa: (1) không có, (2) có.
47. AU. Vết sọc trên môi hoa: (1) không có, (2) có.
48. AV. Màu sắc lá mặt trên: (1) Màu xanh; (2) Có vân trên lá; (3) Có sọc; (4) Có phần sấp.
49. AW. Màu sắc lá mặt dưới: (1) Màu xanh; (2) Chấm tía; (3) Có vân; (4) Có phần sấp.
50. AX. Màu sắc lá đài lưng (trên) (1 lá): (1) Trắng, pha lê; (2) Hồng, trà; (3) Lục nhạt, lục sẫm; (4) Tím; (5) Vàng, cam; (6) Nâu vàng.
51. AY. Đặc điểm lá đài lưng (trên) (1 lá): (1) Đốm tím, đỏ; (2) Đốm nâu đỏ; (3) Sọc tím; (4) Sọc nâu đỏ; (5) Sọc lục; (6) Không.
52. AZ. Lá đài lưng (trên) - Nhấn hay thẳng: (1) Nhấn; (2) Thẳng.
53. BA. Lá đài lưng (trên) - Có lông: (1) Có lông; (2) Không.
54. BB. Màu sắc lá đài bên (2 lá): (1) Trắng, pha lê; (2) Hồng, trà; (3) Lục nhạt, lục sẫm; (4) Tím; (5) Vàng, cam; (6) Đỏ; (7) Nâu vàng.
55. BC. Đặc điểm lá đài bên: (1) Đốm tím, đỏ; (2) Đốm nâu đỏ; (3) Sọc tím; (4) Sọc nâu đỏ; (5) Sọc lục; (6) Không.
56. BD. Lá đài bên - Nhấn hay thẳng: (1) Nhấn; (2) Thẳng.
57. BE. Lá đài bên - Có lông: (1) Có; (2) Không.
58. BF. Màu sắc cánh hoa: (1) Trắng, pha lê; (2) Hồng, trà; (3) Lục nhạt, lục sẫm; (4) Tím; (5) Vàng, cam; (6) Nâu vàng.

59. BG. Đặc điểm cánh hoa: (1) Đốm tím, đỏ; (2) Đốm nâu đỏ; (3) Đốm lục; (4) Sọc tím; (5) Sọc nâu đỏ; (6) Không.
60. BH. Cánh hoa - Nhãn hay thẳng: (1) Nhãn; (2) Thẳng.
61. BI. Cánh hoa - Có lông: (1) Có; (2) Không.
62. BJ. Hình dạng môi hoa: (1) Ống; (2) Trụ; (3) Phiến răng reo; (4) Phiến chia thùy; (5) Phễu, túi.
63. BK. Màu sắc môi hoa: (1) Trắng, pha lê; (2) Hồng, trà; (3) Lục nhạt, lục sẫm; (4) Tím; (5) Vàng, cam; (6) Đỏ; (7) Nâu vàng.
64. BL. Đặc điểm môi hoa: (1) Đốm tím, đỏ; (2) Đốm nâu đỏ; (3) Đốm vàng nghệ; (4) Đốm trắng, vàng; (5) Sọc tím; (6) Không.
65. BM. Môi hoa - Nhãn hay thẳng: (1) Nhãn; (2) Thẳng.
66. BN. Môi hoa - Có lông: (1) Có; (2) Không.
67. BO. Môi hoa - đặc điểm mép môi: (1) Răng reo (có ria, lông); (2) Tron.
68. BP. Kiểu mọc phát hoa: (1) Đỉnh chồi; (2) Góc thân; (3) Nách lá.
69. BQ. Thời gian hoa tàn: (1) 0-2 tuần; (2) 2-4 tuần; (3) 1-2 tháng; (4) hơn 2 tháng.
70. BR. Thời điểm thơm: (1) Ngày; (2) Đêm.
71. BS. Mùa hoa nở: (1) Mùa xuân; (2) Hạ; (3) Thu; (4) Đông; (5) Quanh năm.
72. BT. Kiểu sắp xếp lá: (1) Xoắn; (2) Hai hàng.

Phụ lục 2: Đặc điểm hình thái các giống *Dendrobium* Việt Nam





6 - Hoàng phi giả hạt=Hoàng phi hạc - *Dendrobium signatum* Rchb.f.



7 - Giả hạc hề - *Dendrobium superbum*



8 - Giả hạc xuân = giả hạc Hawaii - *Dendrobium anosmum* Lindl.



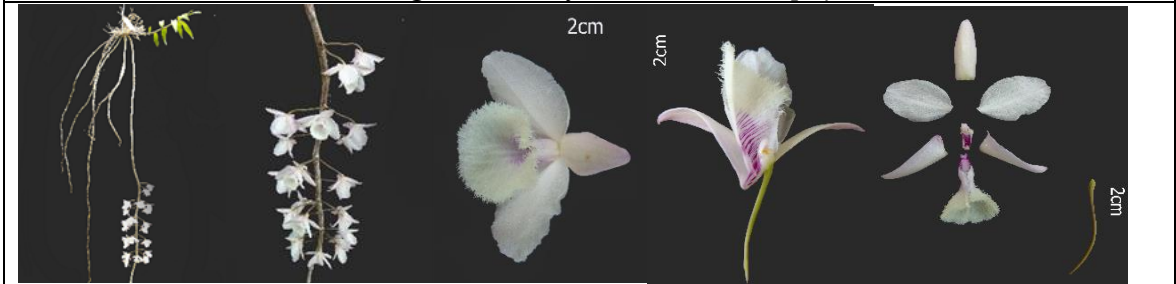
9 - Giả hạc xuân tím - *Dendrobium anosmum*



10 - Giả hạt xuân mới = Giả hạc xuân di linh tím - *Dendrobium anosmum* var alba



11 - Hoàng thảo hạc vỹ - *Dendrobium aphyllum*



12 - Đại ý thảo - *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.E.C.Fisch.



13 - Thái bình - *Dendrobium pulchellum* Roxb. ex Lindl.



14 - Thái bình lai - *Dendrobium Gatton sunrise*



15 - Long tu - *Dendrobium primulinum* Lindl.



16 - Long tu đá - *Dendrobium crepidatum* Lindl.



17 - Kim điệp vàng - *Dendrobium capillipes* Rchb.f.



18 - Kim thoa - *Dendrobium chryseum* Rolfe



19 - Báo hỉ - *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl.



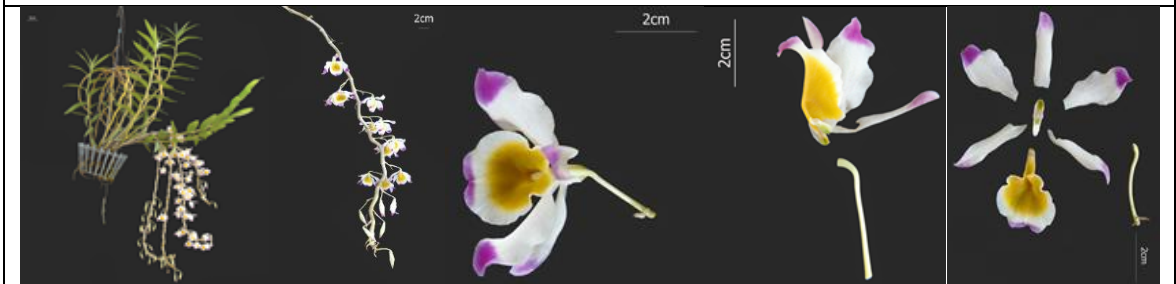
20 - ý thảo 3 màu - *Dendrobium devonianum* Paxt



21 - Hồng câu - *Dendrobium aduncum* Lindl.



22 - Thập nhất hoa trắng môi đỏ - Hoàng thảo tím Huế - *Dendrobium hercoglossum* Rchb. f.



23 - Hoàng thảo ngọc thạch - *Dendrobium crystallinum* Rchb. f.



24 - Hoàng thảo công - *Dendrobium intricatum* Gagnep



25 - Hoàng thảo vôi - *Dendrobium cretaceum* Lindl.





26 - Tử phi hạc - *Dendrobium tortile* Lindl.



27 - Trúc phát bà - *Dendrobium pendulum*



28 - Hoàng thảo tím, HT kèn, trầm rừng - *Dendrobium parishii* Rehb.f.



29 - HT chuỗi ngọc (thắt đốt họng vàng) - *Dendrobium findlayanum*



30 - Hương duyên - *Dendrobium ellipsophyllum* Tang & F.T Wang



31 - Nhật điểm hồng - *Dendrobium draconis* Rchb.f.



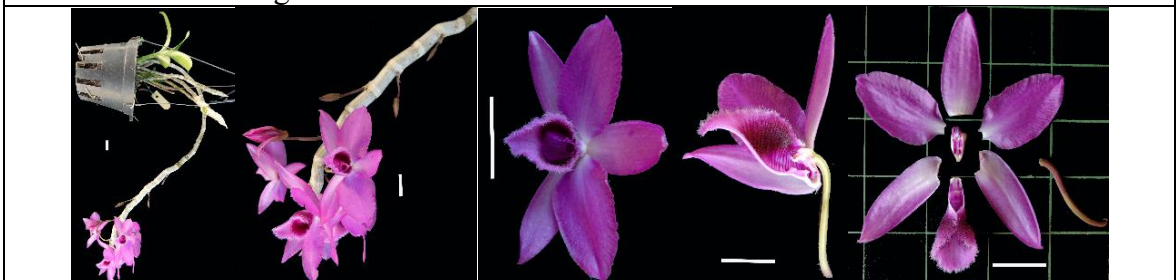
32 - Lụa vàng (Nhật điểm hoàng) - *Dendrobium heterocarpum* Wall.ex Lindl.



33 - Thanh hạc - *Dendrobium suzukii*



34 - Hoàng thảo đơn cam - *Dendrobium unicum* Seidenfaden 1970



35 - Trầm hương(Hoàng thảo trầm hồng) - (*D. anosmum* x *D. parishii*)



36 - Trường sơn - *Dendrobium venustum* Teijsman Lindl.



37 - Hoàng thảo xoắn họng vàng - *Dendrobium tortile* Lindl.



38 - Thanh hắc lan - *Dendrobium hemimelanoglossum* Lindl. & Paxton 1850



39 - Giả hạc Châu Như - *D. anosmum* x *D. aphyllum*



40 - Hoàng thảo chuỗi ngọc (Thắt đốt họng đen) - *Dendrobium findlayanum*

**Phụ lục 3: Kết quả mã hoá thông tin các đặc điểm hình thái các giống *Dendrobium* Việt Nam**

STT	ĐD	Loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40									
			1	A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
3	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1			
		3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1			
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
4	D	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		4	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	E	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0			
6	F	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	G	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	H	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0			
		2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

PL-15

9	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1					
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1				
10	J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0						
		2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
		4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
11	K	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
12	L	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
		2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0		
13	M	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1		
		2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
14	N	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		4	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	O	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16	P	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0		
		3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1		
17	Q	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1



















**Phụ lục 4: Thống kê kết quả BLAST các trình tự nghiên cứu với Genbank**

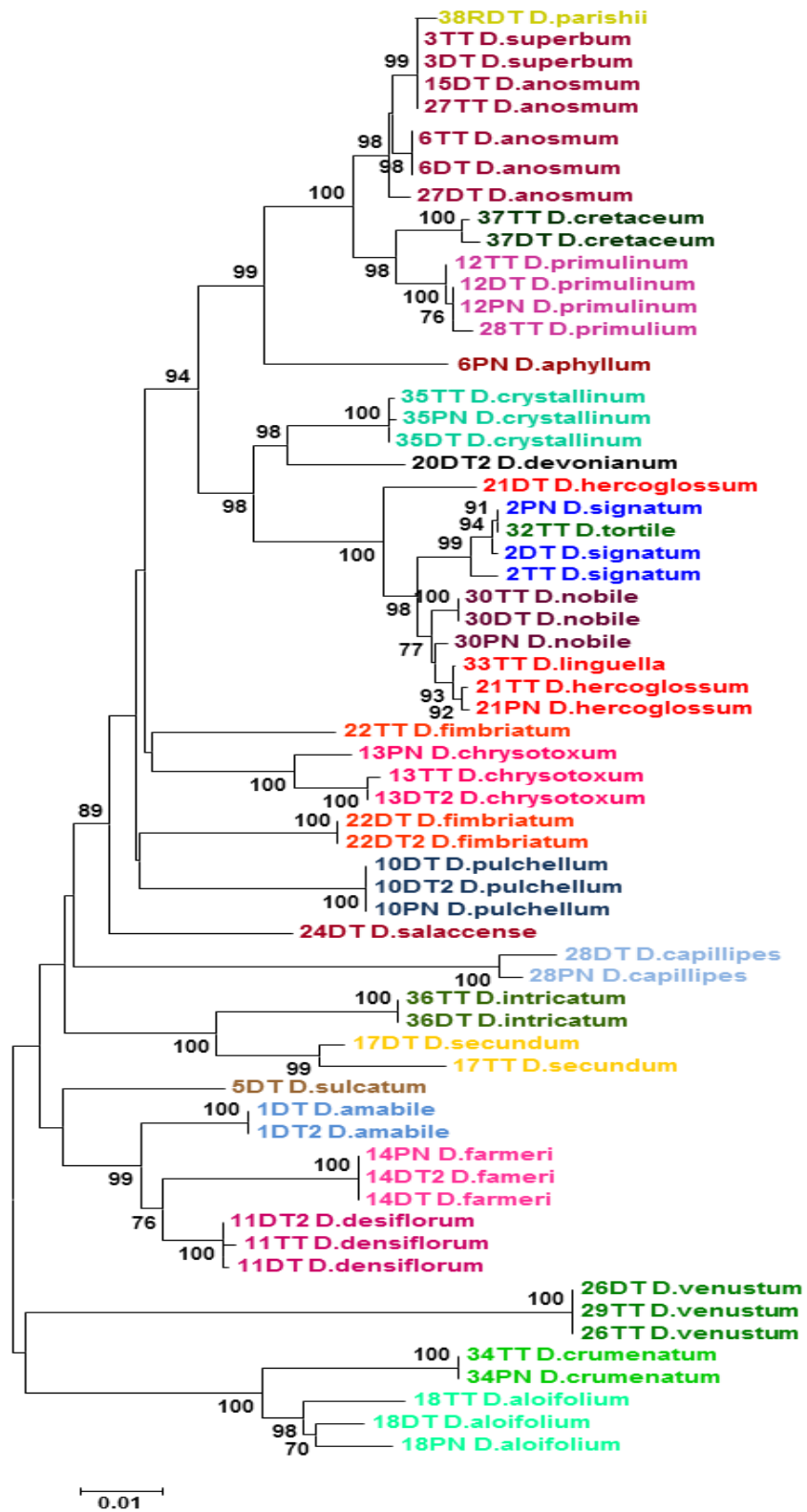
Loài	Mẫu	ITS				matK				rbcL				trnH-psbA			
		Loài tương ứng	GA	QC (%)	I (%)	Loài tương ứng	GA	QC (%)	I (%)	Loài tương ứng	GA	QC (%)	I (%)	Loài tương ứng	GA	QC (%)	I (%)
<i>D.anosmum</i>	3TT	D.anosmum	MK522219.1	100	99.84	D. parishii	MK607431.1	100	100	D. catenatum	MG324302.1	100	100	D. pendulum	KT792693.1	100	99.69
	3DT	D.anosmum	MK522219.1	100	99.84	D. parishii	MK607431.1	100	100					D. pendulum	KT792693.1	100	99.64
	15DT	D.anosmum	MK522219.1	100	99.84	D. parishii	MK607431.1	100	100					D. pendulum	KT792693.1	100	99.64
	15TT	D.anosmum	MK522219.1	100	99.84					D. catenatum	MG324302.1	100	100	D. pendulum	KT792693.1	100	99.64
	15PN	D.anosmum	MK522219.1	100	99.84	D. parishii	MK607431.1	100	100					D. pendulum	KT792693.1	100	99.64
	27TT	D.anosmum	MK522219.1	100	99.84	D. parishii	MK607431.1	100	100	D. catenatum	MG324302.1	100	100	D. pendulum	KT792693.1	100	99.64
	27DT	D.anosmum	KY966516.1	100	100	D.anosmum	KY966807.1	100	100					D. pendulum	KT792693.1	100	99.64
	6TT	D.anosmum	MK522219.1	100	98.69	D. parishii	MK607431.1	100	99.9	D. catenatum	MG324302.1	100	100	D. nobile	KP412170.1	100	97.63
	6DT	D.anosmum	MK522219.1	100	98.69	D. parishii	MK607431.1	100	99.9					D. nobile	KP412170.1	100	97.63
<i>D.aphyllum</i>	6PN	D.aphyllum	MK522217.1	100	100	D.aphyllum	LC192953.1	100	100					D. aphyllum	KF177469.1	100	100
<i>D.capillipes</i>	28DT	D. capillipes	AB593510.1	100	99.18	D. capillipes	KY966872.1	100	100					D. capillipes	EU887926.1	100	99.68
	28PN	D. capillipes	MK522242.1	100	100	D. capillipes	MF409028.1	100	100					D. capillipes	EU887926.1	100	99.68
<i>D.chrysotoxum</i>	13PN	D. chrysotoxum	AB593533.1	100	100	D. chrysotoxum	MK616659.1	100	100								
	13TT	D. chrysotoxum	EU477501.1	99	99.67	D. chrysotoxum	MK616659.1	100	99.6	D. catenatum	MG324302.1	100	100	D. chrysotoxum	KX023283.1	100	96.94
	13DT2	D. chrysotoxum	EU477501.1	99	99.67	D. chrysotoxum	MK616659.1	100	99.9					D. chrysotoxum	KT792700.1	100	96.77
<i>D.cretaceum</i>	37TT	D. primulinum	KJ944625.1	100	99.84	D.cretaceum	KY966818.1	100	100	D. moniliforme	MN200385.1	100	100	D. primulinum	GQ153535.1	100	100
	37DT	D. primulinum	MK522184.1	100	99.84	D.cretaceum	KY966818.1	100	100					D. primulinum	KF177538.1	100	99.69
	37PN	D. primulinum	KJ944625.1	100	100	D.cretaceum	KY966818.1	100	100					D. primulinum	KF177538.1	100	99.69
<i>D. crumenatum</i>	34TT	D. crumenatum	MK522246.1	100	99.84	D. crumenatum	AB972308.1	100	100	D. pseudotenellum	NC_045854.1	100	100	D. crumenatum	JF693815.1	100	100



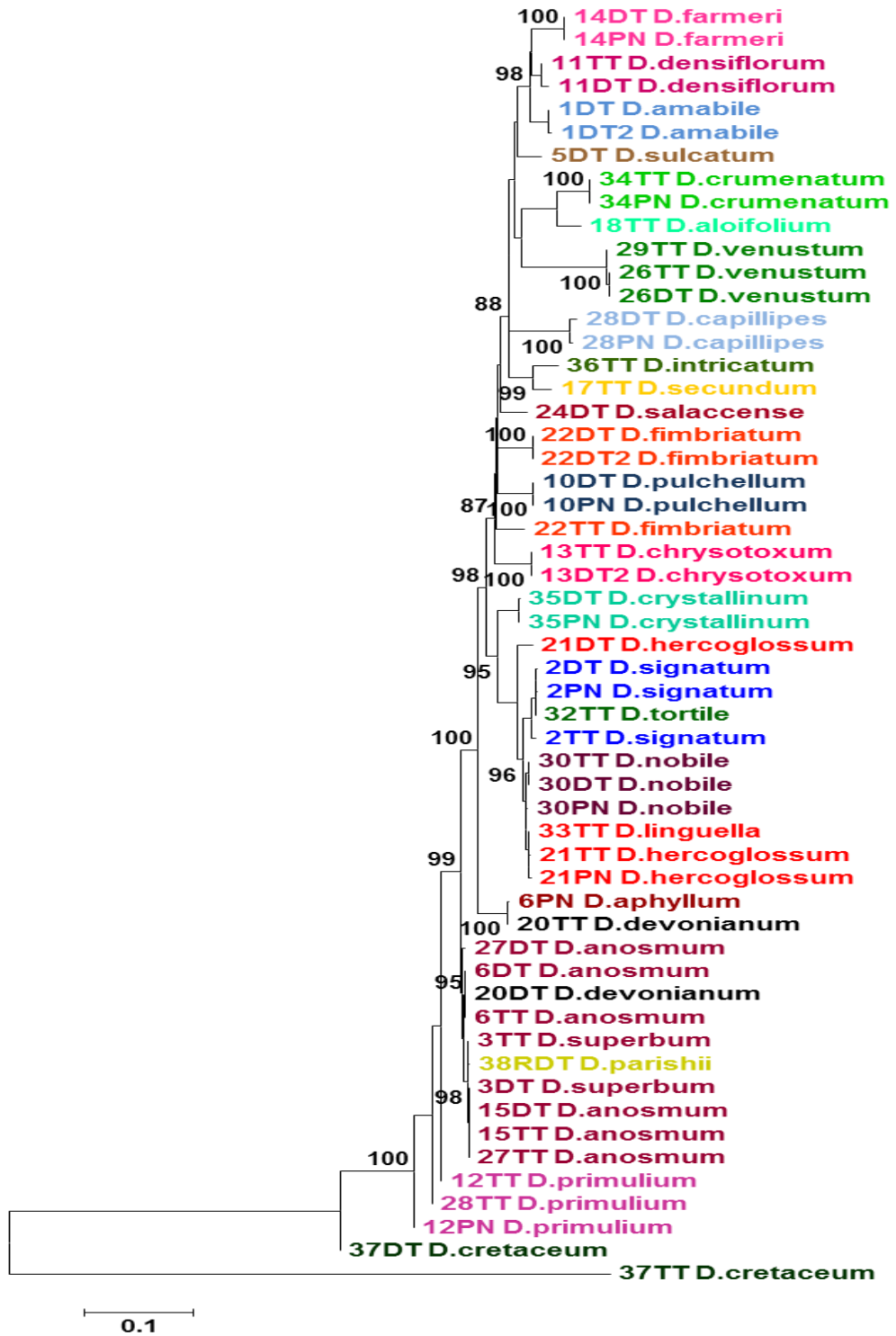
	11TT	D.densiflorum	DQ058786.1	100	99.84	D.densiflorum	MG490231.1	100	99.9	D. strongylanthum	KR673323.1	100	100	D. thyrsoflorum	EU887929.1	100	99.69
	11DT	D.densiflorum	HQ114255.1	100	100	D.densiflorum	MG490231.1	100	100					D. thyrsoflorum	EU887929.1	100	98.76
<i>D.pulchellum</i>	10TT	D.pulchellum	KY966577.1	100	100												
	10DT	D.pulchellum	KY966577.1	100	100	D.pulchellum	KY966867.1	100	100	D. flexicaule	LC348965.1	100	100	D.pulchellum	KF177541.1	99	100
	10DT2	D.pulchellum	KY966577.1	100	100	D.pulchellum	KY966867.1	100	100	D. catenatum	MG324302.1	100	100				
	10PN	D.pulchellum	KY966577.1	100	100	D.pulchellum	KY966867.1	100	100	D. catenatum	MG324302.1	100	100	D.pulchellum	KF177541.1	99	100
<i>D.secundum</i>	17DT	D.secundum	MK522237.1	100	99.67	D.secundum	AB972327.1	100	99.8								
	17TT	D.secundum	MK522237.1	100	99.83	D.secundum	KY966848.1	100	98.2	D. hybrid	AB519791.1	100	97.8	D. ellipsophyllum	KF177494.1	100	99.53
<i>D.signatum</i>	2TT	D.tortile	MK522211.1	100	99.01	D.nobile	KY966854.1	100	100	D. devonianum	LC317045.1	100	100	D. heterocarpum	KJ672709.1	100	100
	2DT	D.tortile	KY966545.1	100	100	D.tortile	KY966874.1	100	100	D. moniliforme	MN200385.1	100	100	D. huoshanense	KJ672710.1	100	99.69
	2PN	D.tortile	MK522211.1	99	100	D.tortile	KY966874.1	100	100	D. moniliforme	MN200385.1	100	100	D. findlayanum	KJ672702.1	100	99.53
<i>D.tortile</i>	32TT	D.tortile	MK522211.1	99	100	D.tortile	KY966874.1	100	100	D. moniliforme	MN200385.1	100	100	D. findlayanum	KJ672702.1	100	99.84
<i>D.venustum</i>	26TT	D.venustum	KY966532.1	100	99.84	D. venustum	KY966822.1	100	100	Bulbophyllum affine	KJ462098.1	100	99.6	D. capillipes	EU887926.1	100	98.87
	26DT	D.venustum	KY966532.1	100	99.84	D. venustum	KY966822.1	100	100					D. pulchellum	KF177541.1	100	99.05
	26L	D.venustum	KY966532.1	100	99.84	D. venustum	KY966822.1	100	100					D. fimbriatum	KF177500.1	100	98.93
	29TT	D.venustum	KY966532.1	100	99.84	D. venustum	KY966822.1	100	100	Bulbophyllum affine	KJ462098.1	100	99.6	D. capillipes	EU887926.1	100	99.36
<i>D.parishii</i>	38RDT	D.parishii	MK483284.1	100	100	D. parishii	MK607431.1	100	100					D. pendulum	KT792693.1	100	99.69
<i>D.sulcatum</i>	5DT	D.sulcatum	MK522262.1	100	99.67	D.sulcatum	KY966873.1	100	100	D. jenkinsii	MF579380.1	100	100	D. tosaense	KJ672727.1	100	97.33
<i>D.hancockii</i>	24DT	D.hancockii	KP159297.1	100	99.84	D. hancockii	KF143677.1	100	100	D. jenkinsii	MF579380.1	100	100	D. ellipsophyllum	KF177494.1	100	100
<i>D.crystallinum</i>	35TT	D.crystallinum	KJ944633.1	100	99.84	D.crystallinum	MG490248.1	100	100	D. crystallinum	KT778733.1	100	100				
	35DT	D.crystallinum	KY966529.1	100	100	D.crystallinum	MG490248.1	100	100	D. crystallinum	KT778733.1	100	100	D.crystallinum	KP704453.1	100	99.84
	35PN	D.crystallinum	KY966529.1	100	100	D.crystallinum	MG490248.1	100	99.9	D. crystallinum	KT778733.1	100	100	D.crystallinum	FJ216476.1	100	99.84



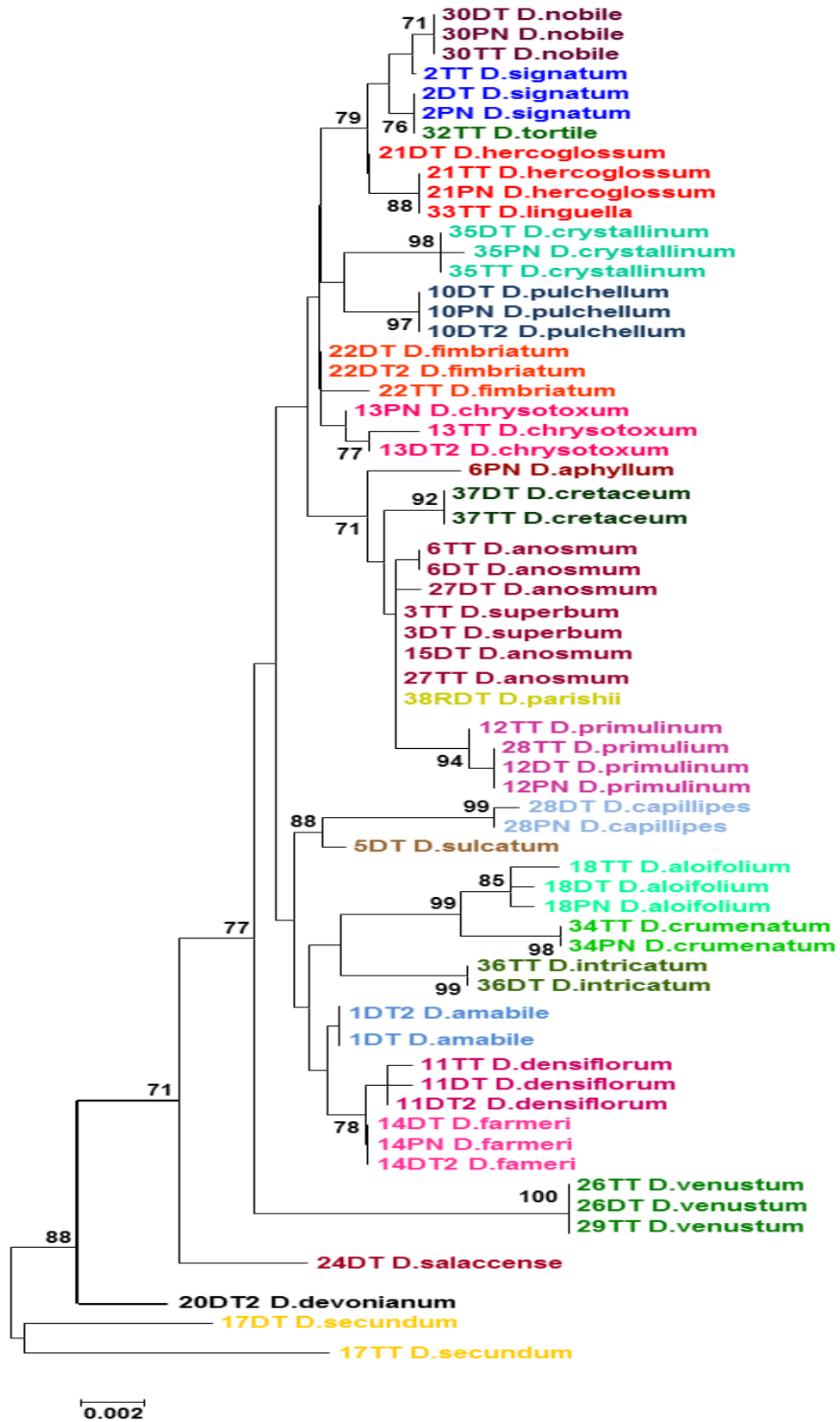
Phụ lục 5: Cây phát sinh của các gene ghép



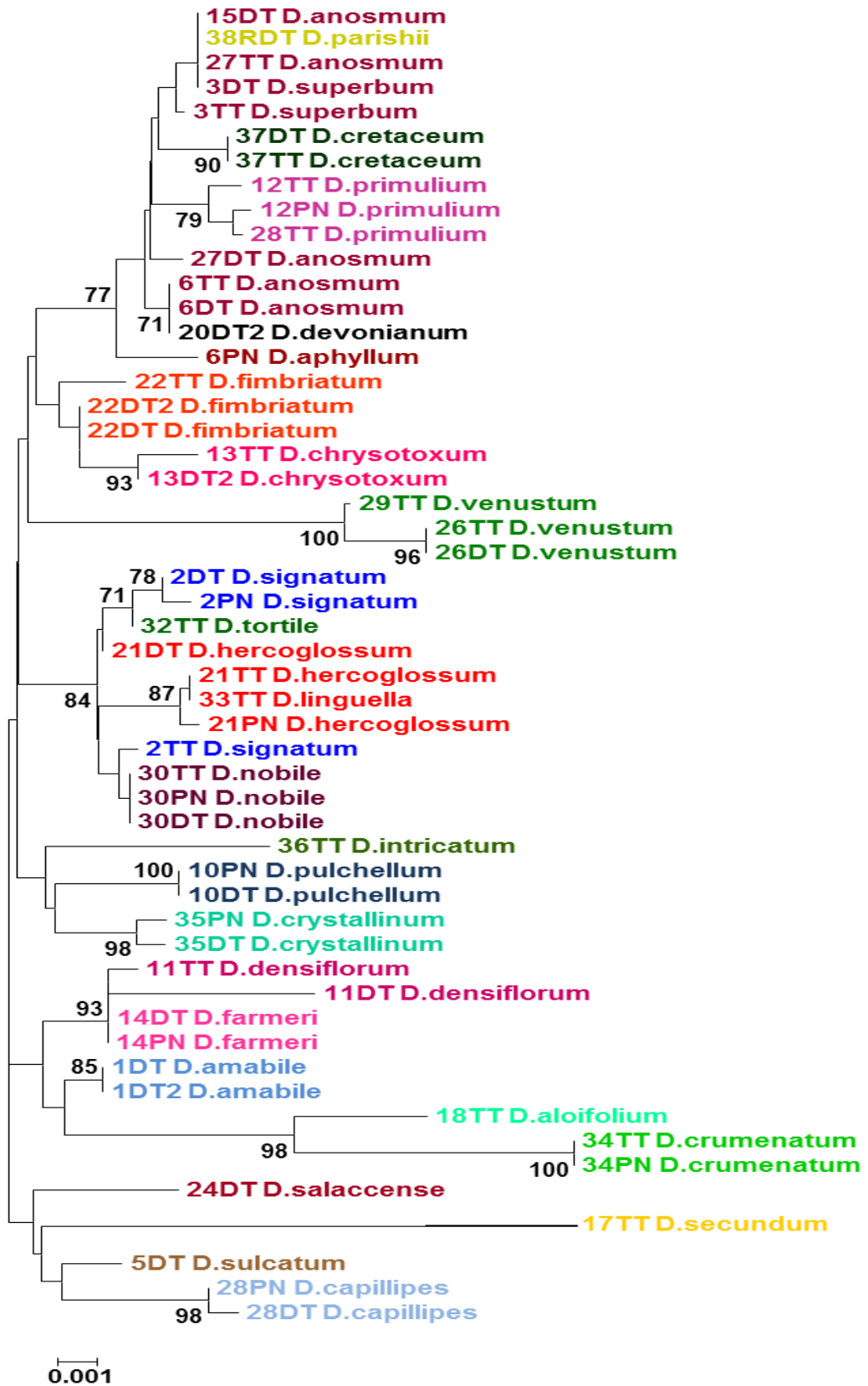
Hình 1 Cây phát sinh ITS-*matK* được dựng bằng Maximum Likelihood



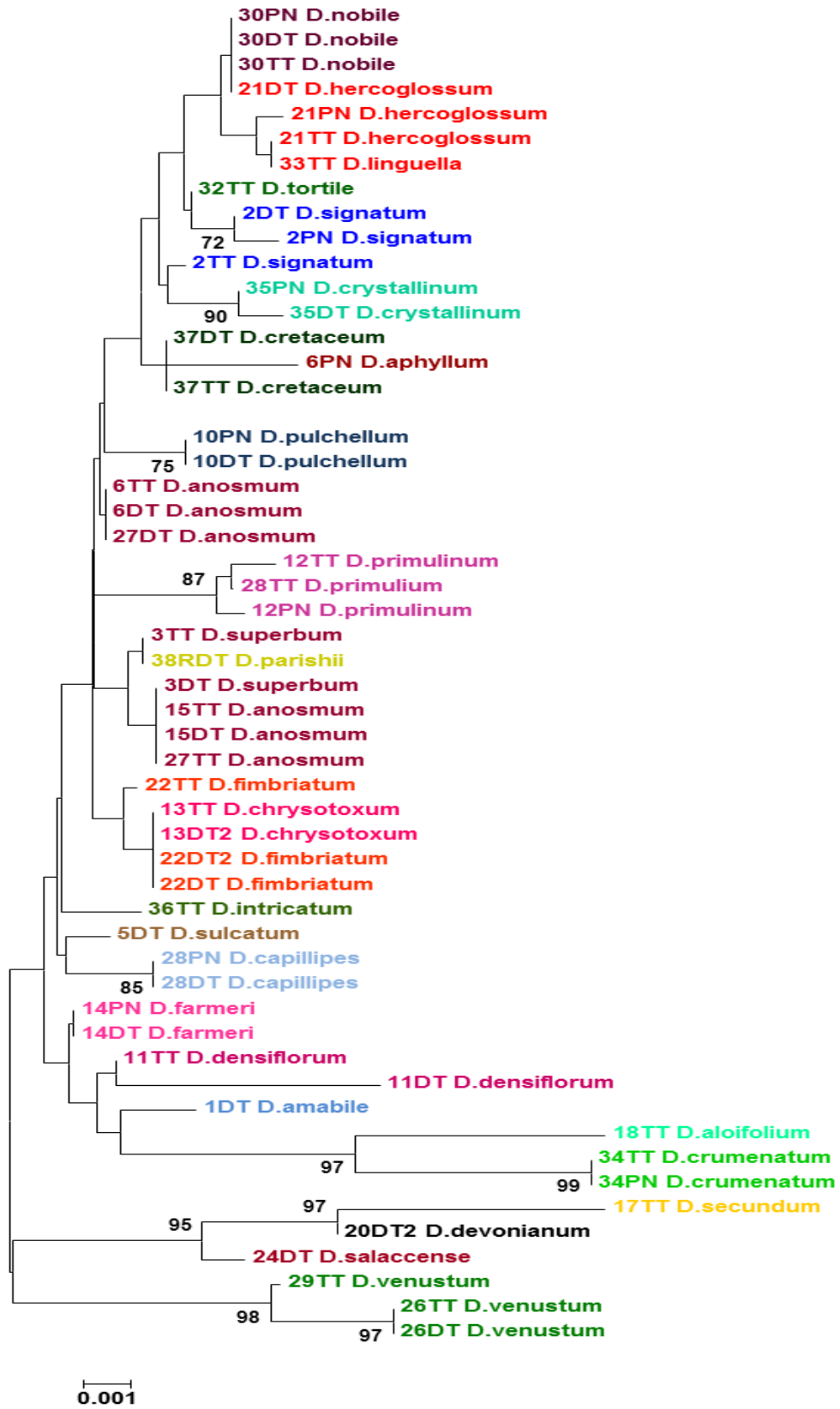
**Hình 2** Cây phát sinh ITS-*trnH* được dựng bằng Maximum Likelihood



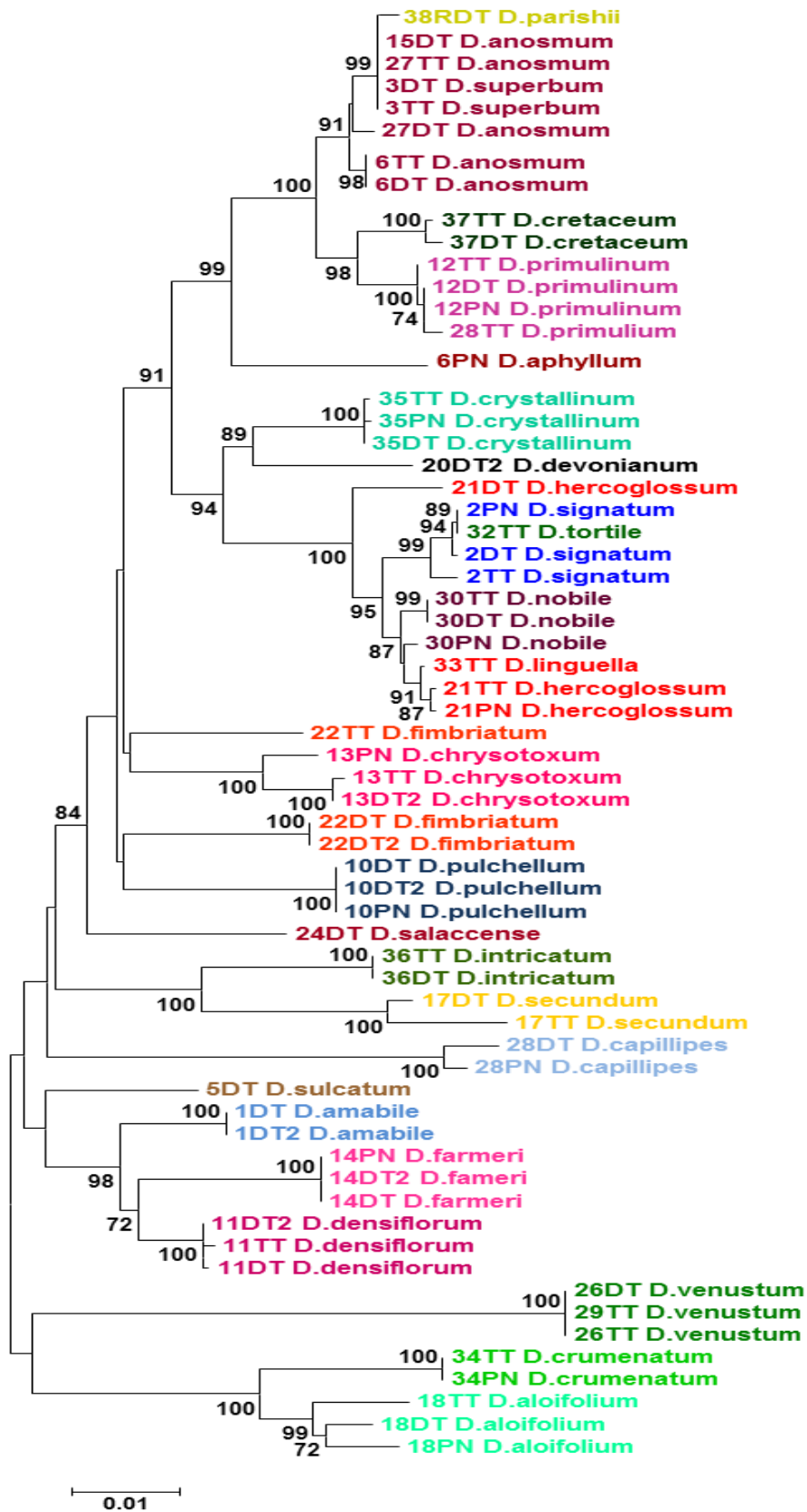
**Hình 3** Cây phát sinh *matK-rbcL* được dựng bằng Maximum Likelihood



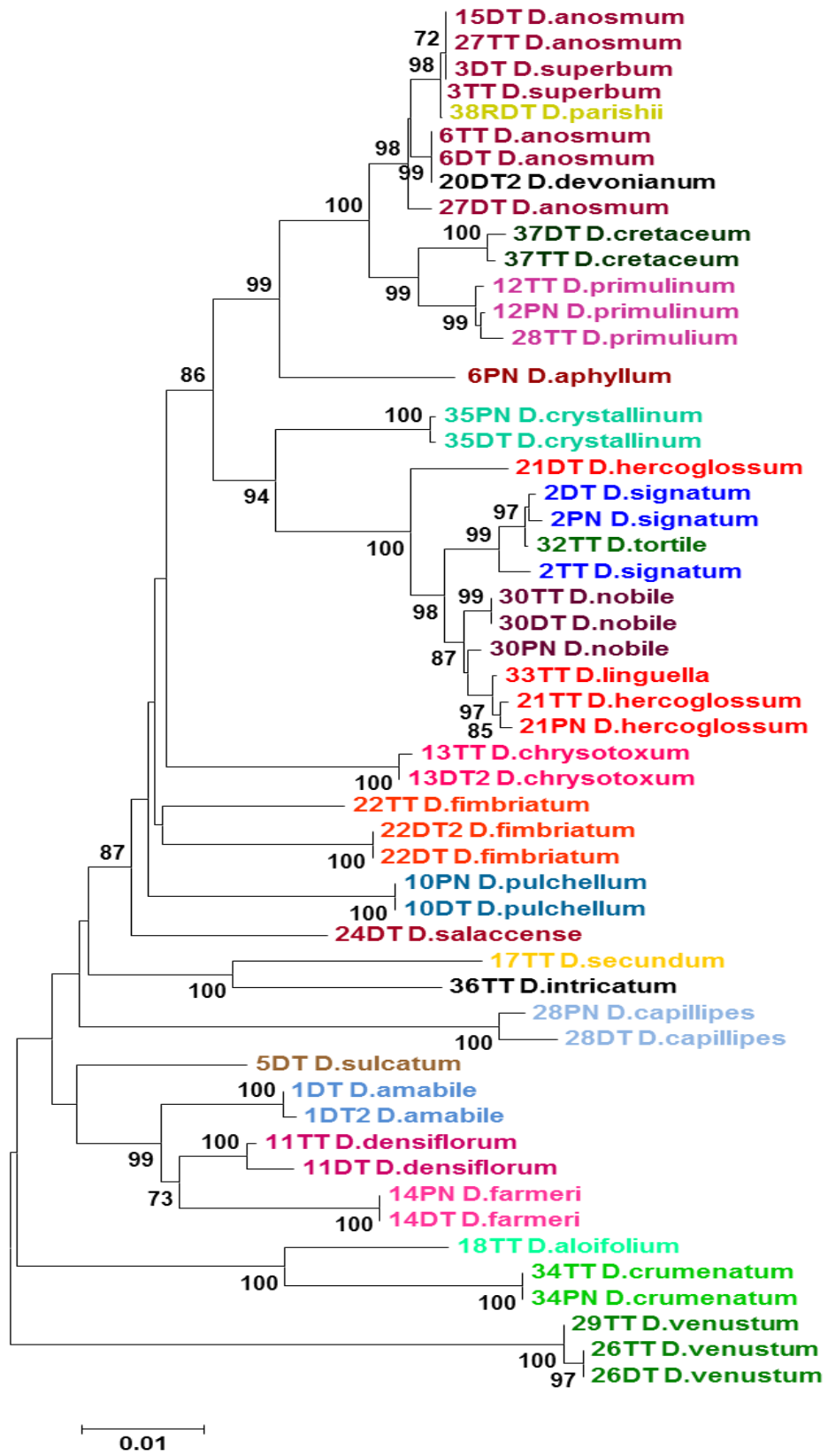
**Hình 4** Cây phát sinh *matK-trnH* được dựng bằng Maximum Likelihood



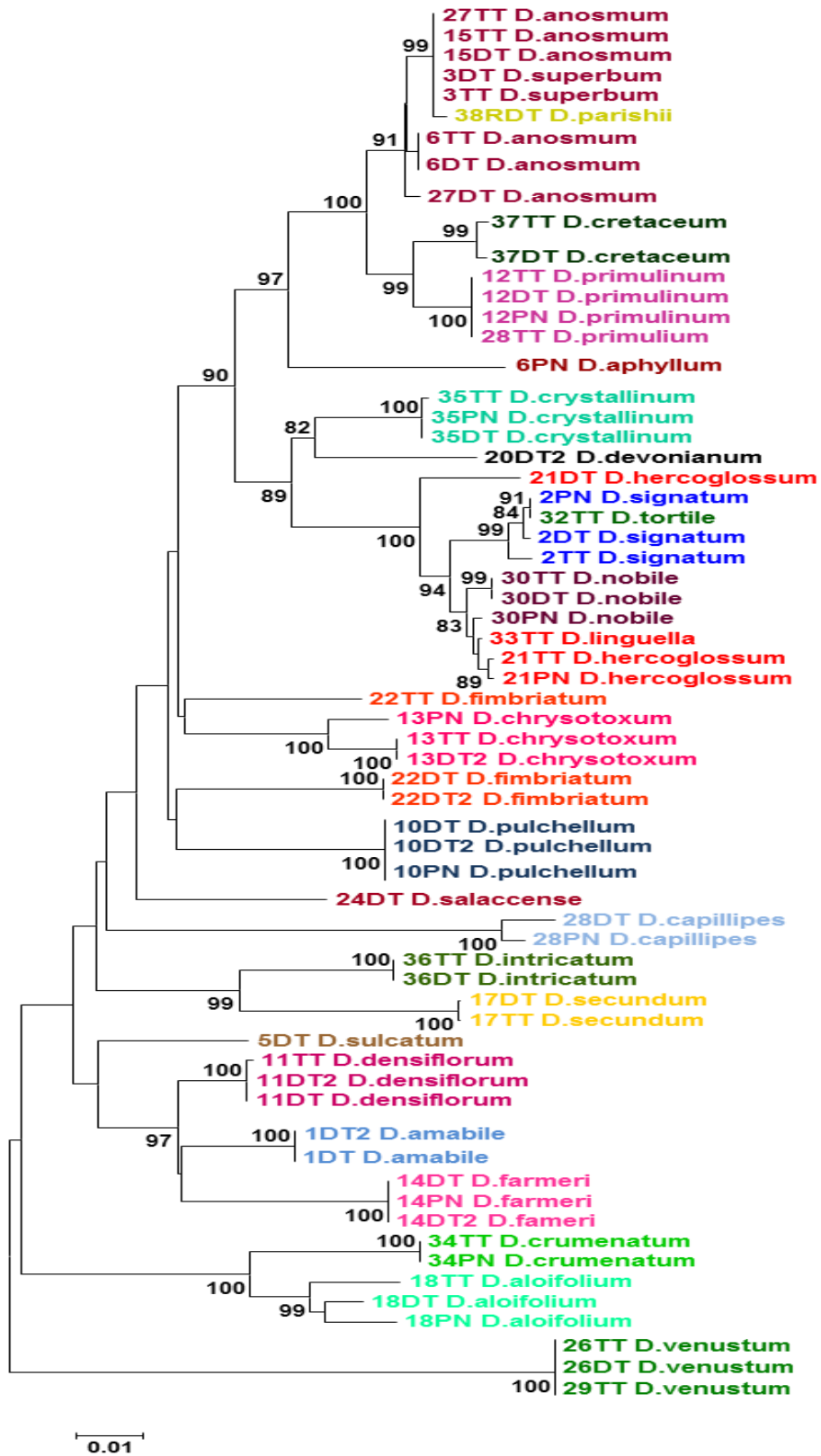
Hình 5 Cây phát sinh *rbcL-trnH* được dựng bằng Maximum Likelihood



Hình 6 Cây phát sinh ITS-*matK-rbcL* được dựng bằng Maximum Likelihood

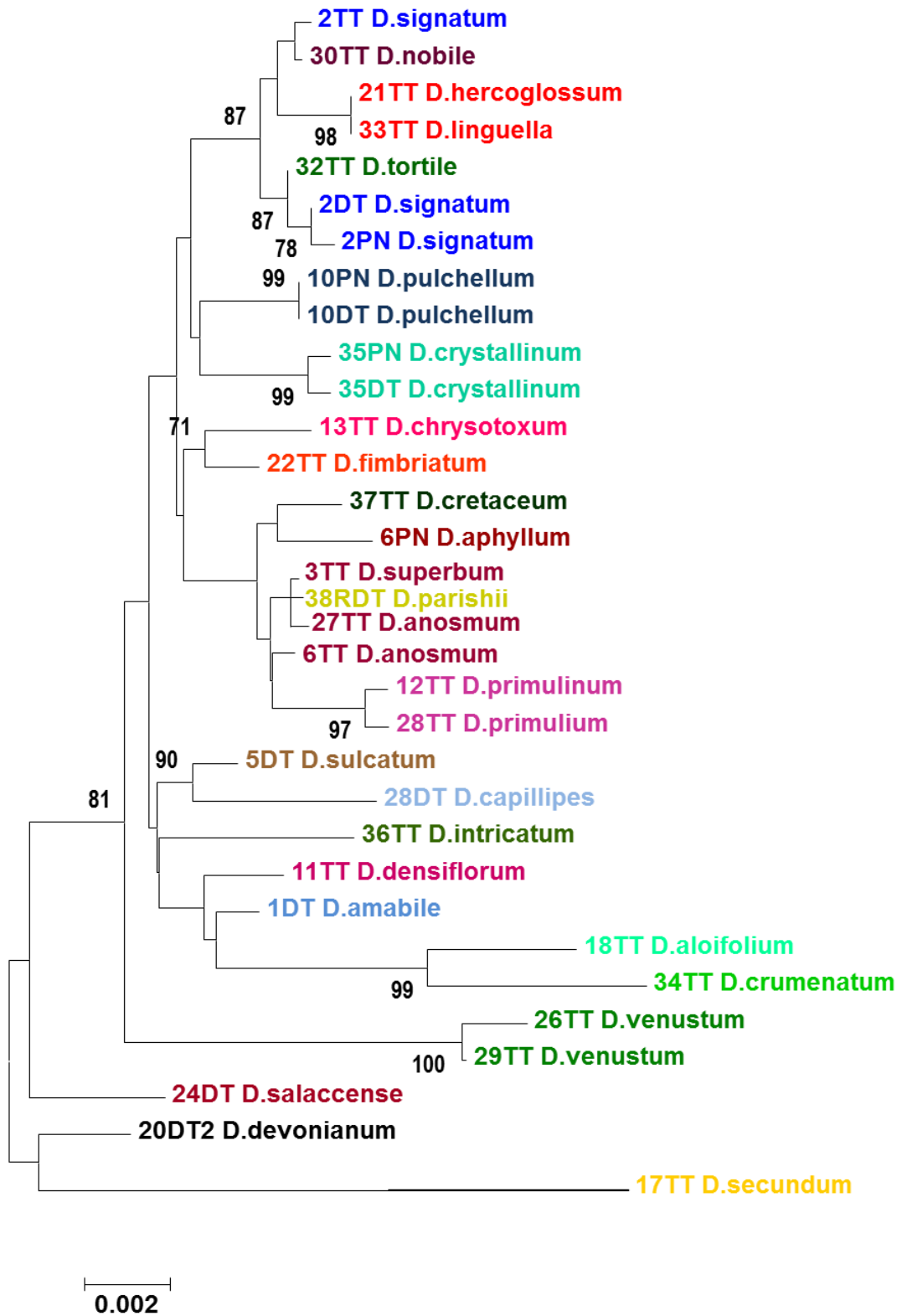


**Hình 7** Cây phát sinh ITS-matK-trnH được dựng bằng Maximum Likelihood

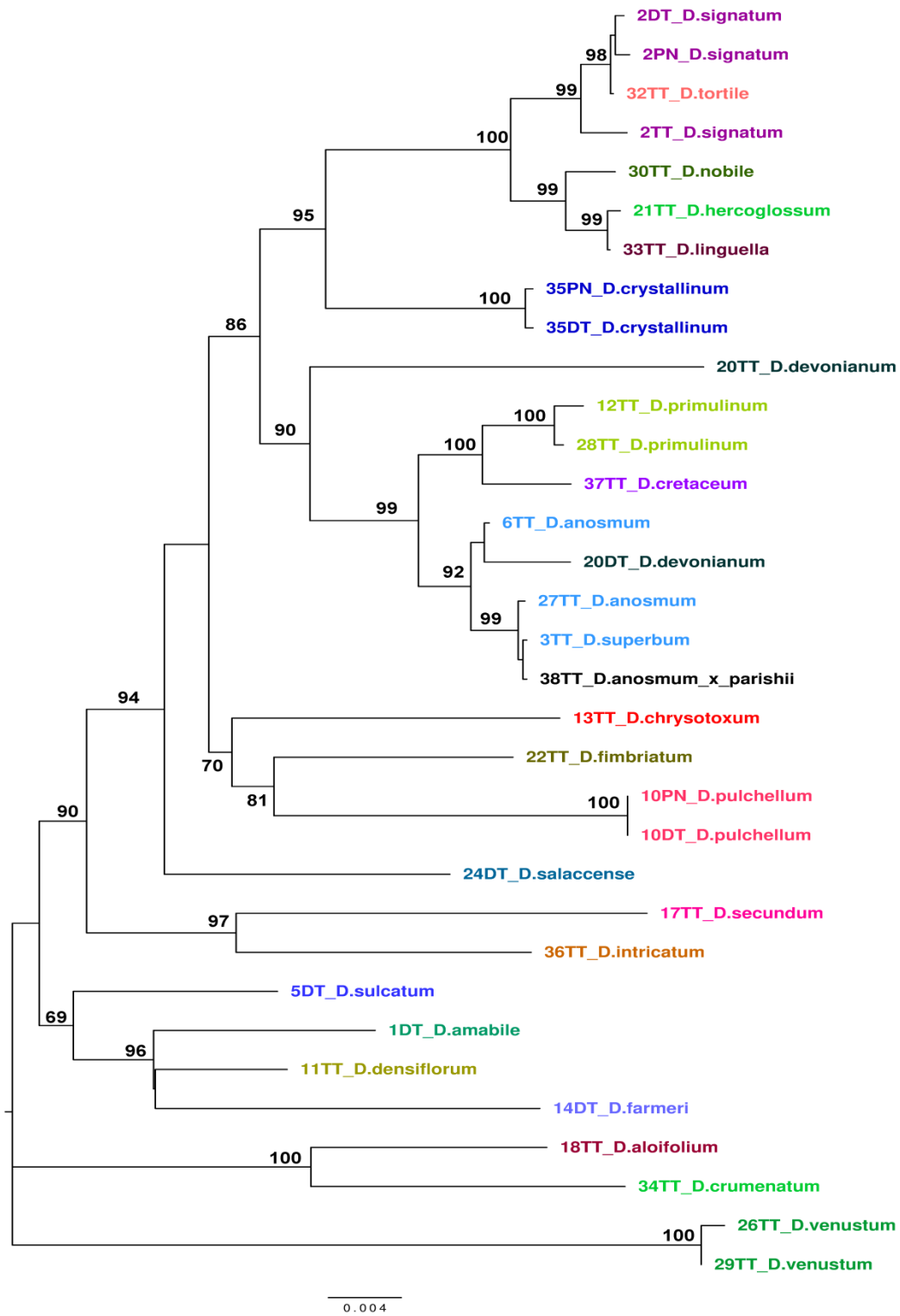


Hình 8 Cây phát sinh ITS-rbcL được dựng bằng Maximum Likelihood





**Hình 9** Cây phát sinh matK-*rbcL*-trnH được dựng bằng Maximum Likelihood



**Hình 10** Cây phát sinh ITS-*rbcL-trnH-psbA* được dựng bằng Maximum Likelihood

## Phụ lục 6: Mã số trình tự từ GenBank và các mẫu đã được submit

		ITS		<i>matK</i>		<i>rbcL</i>		<i>trnH-psbA</i>	
Loài	Mẫu	Trình tự được submit	Trình tự từ NCBI	Trình tự được submit	Trình tự từ NCBI	Trình tự được submit	Trình tự từ NCBI	Trình tự được submit	Trình tự từ NCBI
<i>D. aloifolium</i>	18DT	MT004837	AY239951.1	MT019381	AB847694.1	Not available	KC660972.1	Not available	
	18TT	MT004836		MT019380		MT019343		MT019476	
	18PN	MT004838		MT019379		Not available		Not available	
<i>D. anosmum</i>	3TT	MT004839	JN388570.1	MT019385	KY966807.1	MT019346	KJ944591.1	MT019457	
	3DT	MT004840	KP743544.1	MT019386	AB972311.1	Not available		MT019456	
	15DT	MT004841	MK522219.1	MT019387	MG490279.1	Not available		MT019474	
	15TT	MT004842	KJ944630.1	Not available		MT019345		MT019472	
	15PN	MT004843	AB593499.1	MT019388		Not available		MT019473	
	27TT	MT004844		MT019389		MT019344		MT019489	
	27DT	MT004845		MT019390		Not available		MT019490	
	6TT	MT004846		MT019391		MT019347		MT019459	
	6DT	MT004847		MT019392				MT019460	
<i>D. aphyllum</i>	6PN	MT004848	KJ210415.1	MT019393	AB847736.1	Not available		MT019461	
			KJ210414.1		GU565188.1				
			KJ210413.1		KF143640.1				
			KF143430.1						
			HM054561.1						
<i>D. capillipes</i>	28DT	MT004849	KY966519.1	MT019395	KF143643.1	Not available	FJ216545.1	MT019493	MF437027.1

	28PN	MT004850	AF362035.1	MT019396	MG490258.1	Not available	KF177576.1	MT019492	
			KF143433.1		MG490256.1				
			HQ114224.1		MF409028.1				
			MK522242.1						
			AB593515.1						
<i>D.chrysotoxum</i>	13PN	MT004851	HQ114223.1	MT019398	KF143654.1	Not available	FJ216582.1	Not available	MF437024.1
	13TT	MT004852	HQ114222.1	MT019397	FJ794062.1	MT019349	FJ216544.1	MT019468	MF437025.1
	13DT2	MT004853	HQ114221.1	MT019399	MG490221.1	Not available	FJ216576.1	MT019469	
			HM590383.1		MG490220.1		HM055094.1		
			MK522232.1		KY966816.1		JF713157.1		
			MK483291.1				KT778725.1		
			MK483283.1				HM055093.1		
			MK483272.1						
			MK483266.1						
			KX440955.1						
			KX440953.1						
		AB593533.1							
<i>D.cretaceum</i>	37TT	MT004854	KJ944626.1	MT019400	KF957845.1	MT019359	KJ944587.1	MT019512	
	37DT	MT004855	KY966528.1	MT019401	KY966818.1	Not available		MT019510	
	37PN	MT004856		MT019402		Not available		MT019511	
<i>D. crumenatum</i>	34TT	MT004864	AY239963.1	MT019403	AB847734.1	MT019350	JF713166.1	MT019500	
	34PN	MT004865	AY273708.1	MT019404	AB972308.1		JF713165.1	MT019501	
			JN388587.1				JF713164.1		

			HM590370.1						
			MK522246.1						
			AB972336.1						
			MH763846.1						
			AB593537.1						
<i>D.primulinum</i>	12TT	MT004857	HM054747.1	MT019427	AB847845.1	MT019368	KF177640.1	MT019466	
	12DT	MT004858	HQ114242.1	MT019428	GU565190.1	Not available	FJ216563.1	Not available	
	12PN	MT004859	MK522184.1	MT019429	KF143708.1	Not available	JF713206.1	MT019467	
	28TT	MT004860	KP265001.1	MT019394	FJ794064.1	MT019348	JF713205.1	MT019491	
			MK483269.1		KF957844.1		JF713204.1		
			KT778755.1		AF445450.1		HM055143.1		
			KJ944625.1		MK603116.1		HM055142.1		
			AB593641.1		MG490265.1		HM055141.1		
					MG490264.1		HM055140.1		
					MG490242.1		HM055139.1		
							KT778724.1		
<i>D.devonianum</i>	20TT	MT004861	KJ210443.1	MT019411	AB847744.1	MT019377	KJ187367.1	MT019477	
	20DT	MT004862	KJ210441.1	MT019412	MG490252.1	Not available	FJ216566.1	MT019478	
	20DT2	MT004863	KF143453.1	MT019413		Not available	KJ187368.1	Not available	
			KP743545.1				JF713174.1		
			KC205194.1				JF713173.1		
			HQ114244.1				JF713172.1		
			KT778760.1				KJ944584.1		

			AB593548.1						
<i>D.fimbriatum</i>	22DT	MT004869	JN388588.1	MT019418	AB519776.1	Not available	AB519784.1	MT019484	KT792701.1
	22TT	MT004870	KF143461.1	MT019417	AB847758.1	MT019356	KF177603.1	MT019482	
	22DT2	MT004871	HM054637.1	MT019419	GU565189.1	Not available	FJ216550.1	MT019483	
			HM054636.1		KF143671.1		JF713178.1		
			HM054632.1		AF448863.1		JF713177.1		
			HQ114229.1		MK616656.1		HM055105.1		
			HM590392.1		MG490240.1		HM055104.1		
			MK522230.1				HM055103.1		
			MK483290.1				HM055102.1		
			MK483275.1				HM055101.1		
		MK483271.1				KT778732.1			
<i>D.hercoglossum</i>	33TT	MT004874	KJ210457.1	MT019423	AB847777.1	MT019362	KJ187382.1	MT019499	
	21TT	MT004909	KF143472.1	MT019420	KF143682.1	MT019366		MT019479	
	21PN	MT004910	KF143471.1	MT019422	KF143681.1	Not available		MT019480	
	21DT	MT004911	KC205188.1	MT019421	KP159292.1	Not available		MT019481	
			HM590381.1		AB972305.1				
			MK522187.1		MG490274.1				
			KP265004.1						
		AB593580.1							
<i>D.intricatum</i>	36TT	MT004872	AB593586.1	MT019446		MT019360		MT019504	
	36DT	MT004873		MT019447		Not available		Not available	
<i>D.nobile</i>	30TT	MT004875	JN388579.1	MT019424	AB847821.1	MT019363	EF590519.1	MT019495	KT792690.1

PL-41

	30DT	MT004876	MH120176.1	MT019425	KP159296.1	Not available	AB519785.1	MT019497	
	30PN	MT004877	MH120175.1	MT019426	KY966854.1	Not available	KF177635.1	MT019496	
			MH120174.1				KF177634.1		
			MH120173.1				MK159250.1		
			MH120172.1				MK159249.1		
			MH120171.1				FJ216583.1		
			HM054717.1				FJ216577.1		
			MK522225.1				FJ216570.1		
			HM590382.1				GQ248590.1		
							HM055130.1		
							HM055129.1		
							HM055128.1		
							HM055127.1		
							KT778720.1		
<i>D.amabile</i>	1DT	MT004878	MK522209.1	MT019382	AB847690.1	MT019376		MT019451	MF437029.1
	1DT2	MT004879	AB593495.1	MT019384		MT019375		Not available	
	1PN	MT004880		MT019383		Not available		MT019452	
<i>D.farmeri</i>	14DT	MT004881	KX600516.1	MT019414	AB847757.1	Not available	HM055100.1	MT019471	MF437022.1
	14PN	MT004882	KJ672671.1	MT019415	KY966830.1	Not available	HM055099.1	MT019470	
	14DT2	MT004883	HM054631.1	MT019416	MF409019.1	MT019355	HM055098.1	Not available	
			HM054630.1						
			KY966540.1						
		AB593561.1							

<i>D.densiflorum</i>	11DT2	MT004884	KJ210438.1	MT019410	AB847742.1	Not available	MG025946.1	Not available	MF579382.1
	11TT	MT004885	KJ210436.1	MT019408	KF143661.1	MT019354	FJ216580.1	MT019464	KT792697.1
	11DT	MT004886	KJ210435.1	MT019409	MG490231.1	Not available	JF713171.1	MT019465	
			HQ114255.1		KY966823.1		JF713170.1		
			HQ114254.1		MF409022.1		JF713169.1		
			MK522257.1				JF713168.1		
							JF713167.1		
							HM055096.1		
						KT778728.1			
<i>D.pulchellum</i>	10TT	MT004887	KY966577.1	Not available	AB519778.1	Not available	KF177644.1	Not available	
	10DT	MT004888	KJ210492.1	MT019430	AB519777.1	MT019369	AB519789.1	MT019463	
	10DT2	MT004889	KF143503.1	MT019432	KF143712.1	MT019370	AB519790.1	Not available	
	10PN	MT004890	AB593643.1	MT019431	KY966867.1	MT019371		MT019462	
<i>D.salaccense</i>			JN388577.1		AF445451.1		KF177648.1		
			KJ210494.1				KF177647.1		
			KF143506.1						
			HQ114260.1						
			MK522259.1						
			KJ210493.1						
<i>D.secundum</i>	17DT	MT004892	AY239993.1	MT019435	AB847862.1	Not available		Not available	
	17TT	MT004893	MK522237.1	MT019434	KY966870.1	MT019367		MT019475	
			AB972355.1		AB972327.1				
			AB593660.1						



<i>D.signatum</i>	2TT	MT004894	AB972330.1	MT019436	AB972302.1	MT019374	MG324300.1	MT019453	
	2DT	MT004895	AB593662.1	MT019437	AB847864.1	MT019373		MT019454	
	2PN	MT004896		MT019438		MT019372		MT019455	
<i>D.tortile</i>	32TT	MT004897	MK522211.1	MT019445	AB847878.1	MT019361		MT019498	
			KY966585.1		KY966874.1				
			EU477511.1						
			AB593678.1						
<i>D.venustum</i>	26TT	MT004898	AB847676.1	MT019440	AB847886.1	MT019365		MT019486	
	26DT	MT004899		MT019441		Not available		MT019487	
	26L	MT004900		MT019442		Not available		MT019488	
	29TT	MT004901		MT019443		MT019364		MT019494	
<i>D.parishii</i>	38RDT	MT004902	KC568303.1	Unsubmitted		Not available		MT019508	
			EU121417.1						
			KY966570.1						
			KX522639.1						
			KC205202.1						
			HM054736.1						
			HM054735.1						
			HM590378.1						
			KJ944629.1						
			MK522227.1						
			MK483284.1						
			AB972344.1						
		AB593630.1							

<i>D.sulcatum</i>	5DT	MT004903	KF143517.1	MT019439	KF143726.1	MT019358	KF177658.1	MT019458	MF579383.1
			MK522262.1		KY966873.1		KY440172.1		
			EU477510.1						
			AB593670.1						
<i>D.hancockii</i>	24DT	MT004891	JN388591.1	MT019433	AB847771.1	MT019357		MT019485	
			DQ058787.1		GU565195.1				
			AF362025.1		KF143677.1				
			KF143467.1		FJ794051.1				
			HQ114259.1						
			KP159297.1						
			AB593575.1						
<i>D.crystallinum</i>	35TT	MT004866	AB593538.1	MT019405	AB847735.1	MT019351	FJ216564.1	Not available	
	35DT	MT004867	KC205205.1	MT019406	GU565192.1	MT019352	KF177590.1	MT019503	
	35PN	MT004868	HQ114243.1	MT019407	KF143657.1	MT019353	KJ944594.1	MT019502	
			KJ944633.1		KF957852.1		KT778733.1		
			KT778764.1		MG490248.1				
					KY966693.1				
					AF445447.1				
<i>D. Gatton sunray</i>	31TT	MT004904		MT019444					
<i>D. anosmum x D. parishii</i>	38TT	MT004905		MT019448		MT019378		MT019505	
	38DT	MT004906		MT019449				MT019507	
	38DT2	MT004907		MT019450				MT019506	
<i>D. anosmum x D. aphyllum</i>	CN	MT004908					MT019509		

**Phụ lục 7:** Thống kê các loài *Dendrobium* khu vực phía Nam phân định được bằng marker ITS, *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*

STT	Loài	ITS	ITS2	matK	rbcl	trnH-psbA	ITS-matK	ITS-rbcl	ITS-trnH	matK-rbcl	matK-trnH	rbcl-trnH	ITS-matK-rbcl	ITS-matK-trnH	ITS-rbcl-trnH	matK-rbcl-trnH	4 trình tự
1	<i>D. aloifolium</i> (Bl.) Rchb. f.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	<i>D. amabile</i> (Lour.) O' Brien	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	<i>D. anosmum</i> Lindl. (đồng danh <i>D. superbium</i> Rehb.f.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	<i>D. aphyllum</i> (Roxb.) C. Fisch. 1928	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	<i>D. capillipes</i> Rchb. f.	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	<i>D. chrysotoxium</i> Rehb.f.	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	<i>D. cretaceum</i> Lindl. 1847.	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
8	<i>D. crumenatum</i> Sw.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	<i>D. crystallinum</i> Rehb.f. (1868)	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	<i>D. densiflorum</i> Wall. ex Lindl.	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	<i>D. devonianum</i> Paxton (1840)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	<i>D. farmeri</i> Paxton Lindl.f./Rehb.f.	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	<i>D. fimbriatum</i> Hook (1823)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+
14	<i>D. hercoglossum</i> Rehb. f. 1886 (đồng danh <i>D. linguella</i> Rehb. f. 1882)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	<i>D. intricatum</i> Cognep (1930)	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	<i>D. nobile</i> Lindl.	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—
17	<i>D. parishii</i> Rehb. f. 1863	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—	+	—	+
18	<i>D. primulinum</i> Lindl.	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
19	<i>D. pulchellum</i> Roxb. ex Lindl.	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	<i>D. hancockii</i> (tên ban đầu <i>D. salaccense</i> (Bl.) Lindl)	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	<i>D. secundum</i> (Bl.) Lindl.	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	<i>D. signatum</i> Rehb. f. 1884	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	<i>D. sulcatum</i> Lindl. (1838)	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	<i>D. tortile</i> Lindl.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	<i>D. venustum</i> Teijsm. & Binn. 1864	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tổng		16/25	16/25	12/25	7/25	8/25	18/25	18/25	15/25	18/25	18/25	16/25	18/25	18/25	19/25	18/25	19/25

+: phân định được, —: không phân định được

**Phụ lục 8:** Thống kê kết quả “Best Match/ Best Close Match” các trình tự *Dendrobium* khu vực phía Nam bằng marker ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*

**Bảng 1** Thống kê kết quả “Best Match/ Best Close Match” các trình tự *Dendrobium* khu vực phía Nam bằng ITS, ITS2, *matK*

Loài	Mẫu	ITS							ITS2							matK							
		Best Match (%)			Best Close Match (%)				Best Match (%)			Best Close Match (%)				Best Match (%)			Best Close Match (%)				
		Correct	Ambiguous	Incorrect	Correct	Ambiguous	Incorrect	No match	Correct	Ambiguous	Incorrect	Correct	Ambiguous	Incorrect	No match	Correct	Ambiguous	Incorrect	Correct	Ambiguous	Incorrect	No match	
<i>D. aloifolium</i>	18TT	Green						Red	Green						Red	Green			Green				
	18DT	Green						Red	Green						Red	Green			Green				
	18PN	Green						Red	Green						Red	Green			Green				
<i>D. amabile</i>	1DT	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	1DT2	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	1PN	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
<i>D. anosmum</i> (synonym name <i>D. superbum</i> )	27TT	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	27DT		Yellow			Yellow				Yellow			Yellow				Yellow			Green			
	6TT		Yellow			Yellow				Yellow			Yellow				Yellow			Green			
	6DT		Yellow			Yellow				Yellow			Yellow				Yellow			Green			
	15TT	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	15DT	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	15PN	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	3TT	Green			Green				Green			Green				Green			Green				
	3DT	Green			Green				Green			Green				Green			Green				



<i>D. hercoglossum</i> (synonym name <i>D. linguella</i> )	21DT	Green				Red	Green				Red		Yellow			Yellow	
	21PN	Green			Green		Green			Green			Green			Green	
	33TT	Green				Blue			Blue		Blue		Green			Green	
<i>D. intricatum</i>	36TT	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
	36DT	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
<i>D. nobile</i>	30TT	Green			Green		Green			Green			Yellow			Yellow	
	30DT	Green			Green					Green			Yellow			Yellow	
	30PN	Green			Green			Blue			Blue		Yellow			Yellow	
<i>D. parishii</i>	38R-DT			Blue		Blue			Blue					Blue			Blue
<i>D. primulinum</i>	28TT	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
	12TT	Green			Green		Green			Green			Yellow			Yellow	
	12DT	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
	12PN	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
<i>D. pulchellum</i>	10TT	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
	10DT	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
	10DT2	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
	10PN	Green			Green		Green			Green		Green			Green		
<i>D. hancockii</i> (previously named <i>D. salaccense</i> )	24DT			Blue			Red			Blue			Red		Yellow		Yellow
<i>D. secundum</i>	17TT	Green			Green		Green			Green				Blue			Blue
	17DT	Green			Green		Green			Green				Blue			Blue
<i>D. signatum</i>	2DT		Yellow			Yellow			Yellow				Yellow			Yellow	
	2PN			Blue			Blue			Yellow			Yellow			Yellow	

	2TT		Yellow		White	Yellow		White	Yellow		White	Yellow				Blue			Blue		
<i>D. sulcatum</i>	5DT			Blue				Red			Blue				Red		Yellow			Yellow	
<i>D. tortile</i>	32TT			Blue			Blue			Blue			Blue				Blue			Blue	
<i>D. venustum</i>	26TT	Green			Green			Green			Green			Green			Green			Green	
	26DT	Green			Green			Green			Green			Green			Green			Green	
	26L	Green			Green			Green			Green			Green			Green			Green	
	29TT	Green			Green			Green			Green			Green			Green			Green	
<i>D. devonianum</i>	20TT			Blue			Blue			Blue			Blue				Blue			Blue	
	20DT			Blue			Blue			Blue			Blue				Blue			Blue	
	20DT2			Blue			Red			Blue			Red				Blue			Blue	

**Bảng 2** Thống kê kết quả “Best Match/ Best Close Match” các trình tự *Dendrobium* khu vực phía Nam bằng *rbcL*, *trnH-psbA*

Loài	Mẫu	<i>rbcL</i>						<i>trnH-psbA</i>							
		Best Match (%)			Best Close Match (%)			Best Match (%)			Best Close Match (%)				
		Correct	Ambiguous	Incorrect	Correct	Ambiguous	Incorrect	No match	Correct	Ambiguous	Incorrect	Correct	Ambiguous	Incorrect	No match
<i>D. aloifolium</i>	18TT														
	18DT														
	18PN														
<i>D. amabile</i>	1DT														
	1DT2														
	1PN														
<i>D. anosmum</i> (synonym name <i>D. superbum</i> )	27TT														
	27DT														
	6TT														
	6DT														
	15TT														
	15DT														
	15PN														
	3TT														
	3DT														
<i>D. aphyllum</i>	6PN														
<i>D. capillipes</i>	28DT														
	28PN														
<i>D. chrysotoxum</i>	13TT														



	13DT2	Black					Green			Green			
	13PN	Black											
<i>D. cretaceum</i>	37TT		Yellow			Yellow			Green			Green	
	37DT	Black					Green			Green			
	37PN	Black					Green			Green			
<i>D. crumenatum</i>	34TT		Yellow			Yellow			Green			Green	
	34PN	Black					Green			Green			
<i>D. crystallinum</i>	35TT	Green			Green				Black				
	35DT	Green			Green			Green			Green		
	35PN	Green			Green			Green			Green		
<i>D. densiflorum</i>	11TT			Blue			Blue			Blue			Blue
	11DT	Black					Green			Green			
	11DT2	Black											
<i>D. farmeri</i>	14DT	Black					Green			Green			
	14DT2		Yellow			Yellow			Black				
	14PN	Black					Green			Green			
<i>D. fimbriatum</i>	22TT		Yellow			Yellow			Yellow			Yellow	
	22DT	Black					Green			Green			
	22DT2	Black					Green			Green			
<i>D. hercoglossum</i> (synonym name <i>D. linguella</i> )	21TT		Yellow			Yellow			Green			Green	
	21DT	Black					Green			Green			
	21PN	Black					Green			Green			
	33TT		Yellow			Yellow				Blue			Blue
<i>D. intricatum</i>	36TT		Yellow			Yellow			Yellow			Yellow	

	36DT	[Black]												
<i>D. nobile</i>	30TT	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]
	30DT	[Black]							[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]
	30PN	[Black]							[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]
<i>D. parishii</i>	38R-DT	[Black]							[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]
<i>D. primulinum</i>	28TT	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	[White]
	12TT	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	
	12DT	[Black]												
	12PN	[Black]							[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]
<i>D. pulchellum</i>	10TT	[Black]							[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]
	10DT	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	
	10DT2	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	
	10PN	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	
<i>D. hancockii</i> (previously named <i>D. salaccense</i> )	24DT	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	
<i>D. secundum</i>	17TT	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	
	17DT	[Black]												
<i>D. signatum</i>	2DT	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	
	2PN	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	
	2TT	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	
<i>D. sulcatum</i>	5DT	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	
<i>D. tortile</i>	32TT	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[Yellow]	[White]	[White]	[White]	[Blue]	[White]	[White]	[Blue]	
<i>D. venustum</i>	26TT	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	[Green]	[White]	[White]	

	26DT	[Black]								[Blue]			[Blue]	
	26L	[Black]								[Blue]			[Blue]	
	29TT	[Green]		[Green]					[Blue]			[Blue]		
<i>D. devonianum</i>	20TT			[Blue]		[Blue]			[Blue]			[Blue]		
	20DT	[Black]							[Yellow]			[Yellow]		
	20DT2	[Black]												