

SỬ DỤNG TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÙNG GEN NHÂN (*ITS-rRNA*) ĐỂ XÁC ĐỊNH LOÀI LAN THUỘC CHI LAN HOÀNG THẢO (*DENDROBIUM*)

VŨ ĐÌNH DUY⁽¹⁾

1. MỞ ĐẦU

Chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) là một trong những chi quan trọng nhất trong họ Phong lan (Orchidaceae), bao gồm 800-1400 loài [1, 2, 3, 4, 5] phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, miền Bắc và Đông Úc [6]. Đa số các loài này nằm trong Công ước quốc tế về buôn bán các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp (CITES). Có 107 loài thuộc *Dendrobium* ở Việt Nam và chúng phân bố rộng rãi trên khắp các vùng của nước ta [7, 8]. Chúng có ý nghĩa được liệu đối với sức khỏe con người như: tác dụng loại bỏ các chất độc hại tích lũy trong các mô, tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể, giảm lượng đường trong máu và kéo dài tuổi thọ [9, 10]. Mặc dù hình thái của các loài lan đã được nghiên cứu rộng rãi, thông tin về phân tử và di truyền quần thể của loài phần lớn chưa được biết đến.

Việc xác định chính xác các loài lan là rất quan trọng đối với việc xác định giống cây trồng, lựa chọn cha mẹ để nhân giống, sử dụng và bảo tồn nguồn gen của chúng. Các phương pháp truyền thống để xác định các loài trong *Dendrobium* chủ yếu dựa trên các quan sát kiểu hình [11, 12], trong khi các đặc điểm hình thái thường bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường [1, 13, 14]. Đặc biệt, trong giai đoạn chưa ra hoa, đặc điểm hình thái của nhiều loài *Dendrobium* là vô cùng giống nhau, nên phân biệt chúng rất khó khăn và đôi khi không thể thực hiện bằng phương pháp truyền thống [1, 2, 6, 12, 15]. Do đó, một phương pháp nhận dạng chính xác cho các loài *Dendrobium* là cần thiết.

Mã vạch DNA (DNA barcoding) là một kỹ thuật mới, sử dụng đoạn DNA ngắn để chuẩn hóa phân biệt giữa các loài [16, 17]. Chúng đã trở thành công cụ mới phục vụ có hiệu quả cho công tác giám định, phân loại, đánh giá quan hệ di truyền, phát hiện loài mới, quản lý chất lượng, nguồn gốc, xuất xứ, bản quyền của sản phẩm từ sinh vật [18, 19, 20]. Ở thực vật, một số vùng gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH* và *atpF-atpH* spacer) và vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại (phylogeny), phân loại (taxonomy) và nhận dạng (identity) loài [18, 21, 22, 23]. Các chỉ thị di truyền phân tử đã được sử dụng rộng rãi trong việc xác định các loài lan: *Paphiopedilum* [12], *Dendrobium* [24], *Cymbidium* [25], *Vanda* [26], *Phalaenopsis* [27]. Đặc biệt, cũng có khá nhiều công bố về mối quan hệ di truyền và nhận dạng loài lan trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) [6, 15, 25, 28, 15, 29, 30].

Gần đây, phân loại các loài thuộc chi *Dendrobium* là mối quan tâm lớn của các nhà thực vật học và được coi là một trong những thách thức phức tạp nhất ở họ lan [4, 6, 14, 31, 32]. Xác định loài với thông tin chính xác là một trong những chìa khóa để cải thiện quản lý và bảo tồn loài [33]. Một số phân tích phân tử đã chỉ ra rằng nhiều đặc điểm hình thái của *Dendrobium* dường như là đồng nhất, và một số đơn vị phân loại *Dendrobium* được xác định trước đây không phải là đơn ngành [4, 6, 14, 34,

35]. Một phương pháp nhanh chóng và chính xác để xác định loài lan là điều cần thiết góp phần cho việc bảo tồn nguồn gen các loài lan có giá trị ở nước ta [12, 28]. Trung *et al.* (2013) [12] lần đầu phân tích trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) để xây dựng cơ sở dữ liệu DNA phân tử và tìm ra mối quan hệ di truyền giữa các loài lan trong chi lan hài (*Paphiopedilum*) ở Việt Nam. Kết quả cho thấy vùng gen này rất hữu ích cho phân tích phát sinh chủng loại. Đặc biệt, tác giả cũng đã định hướng trong tương lai tiếp tục phát triển các chỉ thị phân tử khác để xác định các loài hay giống của chi lan hài ở Việt Nam khó xác định hình thái (nếu không có hoa). Feng *et al.* (2015) [15] cũng đã nhận dạng 64 loài lan thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium*) ở Trung Quốc dựa trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS2*). Kết quả chỉ ra rằng trình tự nucleotide vùng gen *ITS2* không chỉ được sử dụng hiệu quả như một mã vạch để xác định các loài thuộc chi *Dendrobium*, mà cũng có khả năng đóng góp vào phân tích phát sinh loài của chi lan đó.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã giải mã trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) để xác định loài lan Phi điệp, góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA nhằm cung cấp nền tảng cho bảo tồn, tiến hóa và hệ thống sinh học của loài.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: 15 mẫu lan thuộc chi Hoàng thảo thu tại các hộ gia đình hai tỉnh Hải Dương (T1-T8) và Hòa Bình (T9-T15) được dùng làm vật liệu nghiên cứu (hình 1)



Hình 1. Loài lan thu tại Hải Dương

Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN tổng số: DNA tổng số được tách chiết bằng bộ hóa chất Plant DNA isolation Kit (Norgenbiotek, Canada).

Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR: Nhân bản vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi ITS1: 5'- AGTCGTAACAAGGTTTCC-3' và ITS2: 5'-GTAAGTTTCTTCTCCTCC-3' [36]. Thành phần mỗi phản ứng PCR có thể tích 25μl với các thành phần: 7μl nước khử ion; 12,5μl PCR Master mix kit (2X); 1,25μl mồi xuôi (10 pmol/μl); 1,25 μl mồi ngược (10 pmol/μl); 3 μl ADN (10-20ng). Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 94°C trong 3 phút; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72°C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4°C.

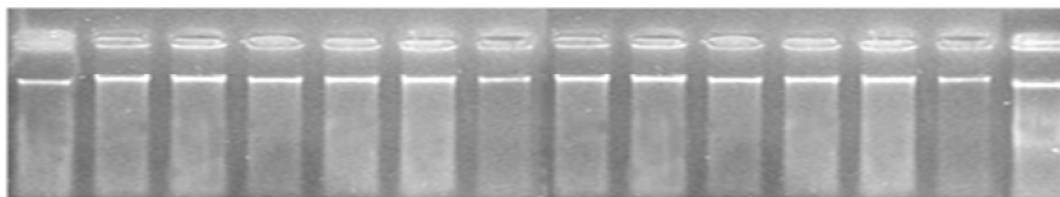
Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại công ty Macrogen, Hàn Quốc. Trình tự DNA sau khi giải trình tự được hiệu chỉnh và loại bỏ các xung tín hiệu nhiễu với sự trợ giúp của phần mềm ChromasPro2.1.6 [37]. Trình tự nucleotide của 15 mẫu lan được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank (sử dụng công cụ BLAST trong NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 [38]. Các vùng không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại: Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood) sử dụng phần mềm Treefinder v 2011 [39] và phương pháp Bayesian inference (BI) bằng phần mềm MrBayes v 3.2.1 [40]. Trước khi phân tích ML và BI, dữ liệu trình tự nucleotide sẽ được khảo sát phân bố nucleotide, kiểm tra các giả thuyết và xác định mô hình tiến hóa tối ưu sử dụng bởi Kakusan 4.0 [41] dựa trên thông tin Akaike được hiệu chỉnh (corrected AICc - Akaike Information Criterion). Mô hình tiến hóa tốt nhất được chọn cho ML là mô hình đảo chiều thời gian tổng thể (GTR) với giá trị tham số gamma (G: 0,7675 trong ML và 0,4762 trong BI). Kiểm tra ước lượng tham số và điểm hội tụ bằng cách sử dụng phần mềm Tracer 1.5 [42]. Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap) trong cây ML (MLBS) và BI (BPP) với 1.000 lần lặp lại. Ngoài ra, đánh giá các nút trong cây ML với giá trị bootstrap 75% trở lên [43] và các nút có BPP 95% trở lên có ý nghĩa trong phân tích BI [44]. Khoảng cách di truyền (P) giữa các loài trong chi được tính toán bằng Mega 7.0 [45].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết và làm sạch DNA tổng số từ 15 mẫu lan

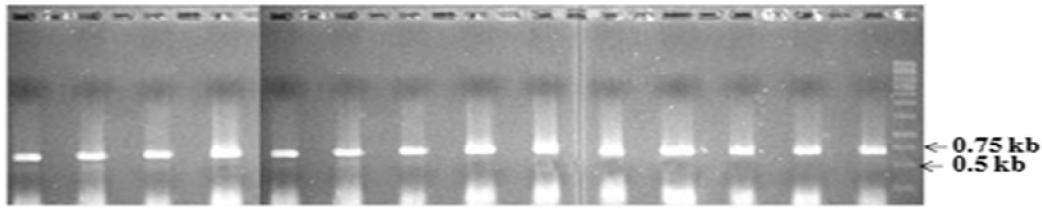
DNA tổng số của 15 mẫu lan đã được tách chiết DNA thành công với chất lượng DNA cao (hình 2). Kết quả điện di kiểm tra DNA trên gel agarose 1% cho thấy ADN ít bị đứt gãy và tương đối sạch. Kết quả đo OD cho thấy chỉ số OD260/OD280 của các mẫu luôn nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0 cho thấy hàm lượng DNA có độ tinh khiết cao.



Hình 2. Kết quả kiểm tra DNA tổng số 15 mẫu lan trên gel agarose 1%

3.2. Nhân bản trình tự DNA vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) với cặp mồi ITS1/ITS2

Cặp mồi ITS1/ITS2 đã nhân bản thành công ở nhiệt độ gắn mồi là 55°C cho 15 mẫu nghiên cứu (hình 3). Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 650 bp. Chất lượng của sản phẩm PCR được thể hiện khi điện di trên gel agarose 1,5% chỉ có một băng duy nhất, sáng đậm, đủ tiêu chuẩn để giải mã trình tự nucleotide.



Hình 3. Sản phẩm PCR của 15 mẫu lan phân tích với cặp mồi ITS1/ITS2 điện di trên gel agarose 1,5%. Marker phân tử 1 kb

3.3. Xác định trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* của 15 mẫu lan

Sau khi xác định trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) của 15 mẫu lan từ 2 tỉnh Hải Dương và Hòa Bình. Kết quả chỉ ra rằng 15 mẫu này có mức độ tương đồng nucleotide 100% nên đã sử dụng kết quả của 1 mẫu để tiến hành các phân tích tiếp theo. Trình tự thu được từ 15 mẫu lan được kiểm tra tính tương đồng (similarity) với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm chỉ ra rằng trình tự nucleotide của 15 mẫu lan tương đồng cao với các loài trong chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*). Cụ thể, tương đồng di truyền cao 100% với loài lan Dã hạc - Phi điệp (Giả hạc) (*Dendrobium anosmum* EU477499); 99% với loài lan Giả hạc thân ngắn (*D. parishii* AB593630) và loài lan Hoàng thảo kèn (*D. luteiflorum* KJ944624); 98% với loài lan Hạc vĩ (*D. aphyllum* KC205201). Tuy nhiên, mức độ tương đồng di truyền khá thấp với loài lan Long tu (*D. primulinum* AB593641) (94%); lan Hoàng thảo vôi (*D. cretaceum* KJ944626) (93%); Hoàng thảo nghệ tâm (*D. loddigesii* AB593604) (90%),... Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự nucleotide truy vấn. Kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (99%) cũng không thể suy ngược lại tên loài bởi kết quả BLAST chỉ hiển thị trình tự nucleotide tương đồng nhất mà trên Genbank hiện có. Do kết quả của BLAST cho ra những điểm nghi vấn chưa chuẩn xác, vì vậy chúng tôi đã sử dụng phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại để xác định tên khoa học cho 15 mẫu lan trong nghiên cứu.

3.4. Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*)

Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu lan nghiên cứu sẽ được so sánh về khoảng cách di truyền với trình tự của 16 loài trong cùng chi (dữ liệu lấy trên Genbank (bảng 1)). Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, các vị trí còn lại được sử dụng cho phân tích. Kết quả phân tích cho thấy có 278/648 vị trí biến đổi (variable), 160/648 vị trí có giá trị mang thông tin (parsimony informative). Khoảng cách di truyền giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo phương pháp *p-distance* đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài trong chi lan Hoàng thảo. Kết quả cho thấy, khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi lan Hoàng thảo dao động khá lớn trung bình 12,12% (1-17%). Tuy nhiên, không có sai khác nucleotide nào được tìm thấy giữa 15 mẫu lan trong nghiên cứu và loài lan Phi điệp đã được công bố trên

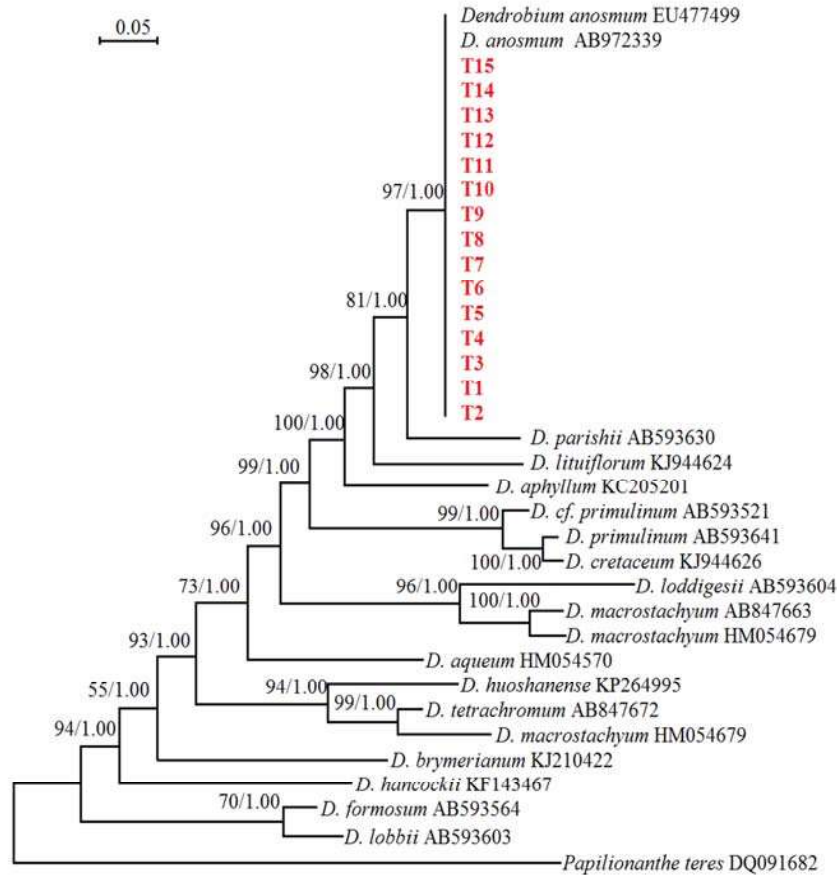
Genbank (*D. anosmum* EU477499); sự sai khác rất thấp (1%) cũng được tìm thấy giữa loài lan đã hạc với loài lan Giả hạc thân ngắn (*D. parishii*) và loài lan Hoàng thảo kèn (*D. litiiflorum*). Khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi lan Hoàng thảo (12,12%) cao hơn so với khoảng cách di truyền giữa các loài gổ quý thuộc chi *Dalbergia* trung bình 8,1% (6,5-9,3%) [46]. Kết quả này phản ánh 15 mẫu lan trên có tên khoa học là (*Dendrobium anosmum*). Để có thêm các bằng chứng khoa học chúng tôi xác định vị trí phân loại của 15 mẫu lan.

Bảng 1. Khoảng cách di truyền của 15 mẫu lan (T) với 16 loài trong chi lan Hoàng thảo lấy từ Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. T	-																
2. <i>Dendrobium anosmum</i> EU477499	0.00	-															
3. <i>D. parishii</i> AB593630	0.01	0.01	-														
4. <i>D. litiiflorum</i> KJ944624	0.01	0.01	0.01	-													
5. <i>D. aphyllum</i> KC205201	0.01	0.01	0.02	0.02	-												
6. <i>D. primulinum</i> AB593641	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	-											
7. <i>D. cretaceum</i> KJ944626	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.01	-										
8. <i>D. macrostachyum</i> AB847663	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	-									
9. <i>D. loddigesii</i> AB593604	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.11	0.11	0.11	-								
10. <i>D. tetrachromum</i> AB847672	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0.14	0.15	-							
11. <i>D. aqueum</i> HM054570	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11	-						
12. <i>D. brymerianum</i> KJ210422	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.10	-					
13. <i>D. transparens</i> AB593679	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15	0.16	0.06	0.12	0.13	-				
14. <i>D. hancockii</i> KF143467	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.12	0.11	0.09	0.13	-			
15. <i>D. formosum</i> AB593564	0.15	0.15	0.15	0.15	0.14	0.15	0.15	0.15	0.16	0.14	0.13	0.12	0.15	0.12	-		
16. <i>D. lobbii</i> AB593603	0.16	0.16	0.16	0.16	0.15	0.15	0.16	0.18	0.17	0.16	0.15	0.14	0.17	0.13	0.10	-	
17. <i>D. huoshanense</i> KP264995	0.12	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13	0.15	0.10	0.12	0.13	0.11	0.14	0.14	0.15	-

3.5. Vị trí phân loại của các mẫu lan

Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 16 loài thuộc chi lan Hoàng thảo đã được xây dựng theo cả 2 phương pháp ML và BI (hình 4) chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau. Các phân tích ML và Bayesian (BI) đã tạo ra với thông số $(-\ln L) = 1768,912$ và 1811,33 tương ứng. 15 mẫu trong nghiên cứu và loài lan Phi điệp (*D. anosmum* EU477499) tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (100%) và quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap (MLBS = 97%, BPP = 100%). Kết quả này cho phép nhận định 15 mẫu lan nghiên cứu có chung nguồn gốc với loài lan Phi điệp trên thế giới.



Hình 4. Mối quan hệ họ hàng của 15 mẫu nghiên cứu với các loài trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML) và phương pháp Bayesian inference (BI). Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. Loài lan Hồ điệp *Papilionanthe teres* DQ091682 được xem như loài ngoài nhóm (outgroup)

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy rằng trình tự nucleotide vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) là một vùng DNA hoàn toàn có thể xác định, giám định được loài lan Phi điệp ở giai đoạn cây chưa ra hoa và cũng như chứng minh khả năng phân biệt thành công giữa các loài (hình 4). Kết quả này phù hợp với công bố của Tran Duy Duong *et al.* (2018) [28]. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng một số đặc điểm hình thái tương đồng của các loài trong chi *Dendrobium* có thể làm cho việc phân loại các loài này gây tranh cãi. Do đó, cần thiết phải tiến hành phối kết hợp chặt chẽ phương pháp phân loại truyền thống với phương pháp phân loại hiện đại để có cơ sở khoa học xác định chính xác tên loài và mối quan hệ di truyền giữa các loài.

4. KẾT LUẬN

- Vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) của 15 mẫu lan thuộc chi Hoàng thảo được giải trình tự có kích thước 648 nucleotide. Trong đó, 278/648 vị trí nucleotide biến đổi, 160/648 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin.

- 15 mẫu lan được xác định thuộc loài lan Phi điệp (*Dendrobium anosmum*) dựa trên phân tích khoảng cách di truyền và quan hệ họ hàng với các loài lan đã công bố.

- Vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) đại diện cho sự tiến hóa dẫn đến sai khác nucleotide đủ để đảm bảo cho sự phân định loài.

Lời cảm ơn: Đề tài này được hỗ trợ bởi nguồn kinh phí của quỹ bảo tồn Mohamed bin Zayed cho Vũ Đình Duy, mã số: 180518329.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang H.Z., Feng S.G., Lu, J.J., Shi, N.N., Liu J.J., *Phylogenetic study and molecular identification of 31 Dendrobium species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers*. Scientia Horticulturae, 2009, **122**:440-447.
2. Feng S.G., Lu J.J., Gao L., Liu J.J., Wang H.Z., *Molecular phylogeny analysis and species identification of Dendrobium (Orchidaceae) in China*, Biochemical Genetics, 2014, **52**:127-136.
3. Tsi Z.H., Chen S.C., Luo Y.B., Zhu G.H., *Orchidaceae (3). In flora republicae popularis sinicae*, Science Press: Beijing, China, 1999.
4. Adams P.B., *Systematics of Dendrobiinae (Orchidaceae), with special reference to Australian taxa*, Botanical Journal of the Linnean Society, 2011, **166**:105-126.
5. Moudi M., Go R., Yien C.Y.S., Saleh M.N., *A review on molecular systematic of the genus Dendrobium Sw*, Acta Biologica Malaysiana, 2013, **2**(2):71-78
6. Xiang X.G., Schuiteman A., Li D.Z., Huang W.C., Chung S.W., Li J.W., Zhou H.L., Jin W.T., Lai Y.J., Li Z.Y., Jin X.H., *Molecular systematics of Dendrobium (Orchidaceae, Dendrobieae) from mainland Asia based on plastid and nuclear sequences*, Molecular Phylogenetics and Evolution, 2013, **69**:950-960.
7. Trần Hợp., *Phong lan Việt Nam*, NXB. Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh, 1998.
8. Leonid Averyanov, Anna L. Averyanova., *Updated checklist of the Orchids of Vietnam*. Vietnam National University Publishing House, Hanoi, 2003.
9. Bulpitt C.J., Li Y., Bulpitt P.F., *The use of orchids in Chinese medicine*, Journal of the Royal Society of Medicine, 2007, **100**(12):558-563.
10. Chinese Pharmacopoeia Editorial Committee (CPEC). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. In Theoretical and Applied Genetics, CPEC, Beijing, China, 2010.
11. Jin W., Yao S., *Cultivation and appreciation of noble spring Orchid cultivars*; Guangdong Science and Technology Press: Guangzhou, China, 2006.
12. Trung K.H., Khanh T.D., Ham L.H., Duong T.D., Khoa N.T., *Molecular phylogeny of the endangered Vietnamese Paphiopedilum species based on the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA*, Advanced Studies in Biology, 2013, **5**:337-346.

13. Ding G., Li X., Ding X., Qian L., *Genetic diversity across natural populations of Dendrobium officinale, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers*, Genetika, 2009, **45**:375-382.
14. Lau D.T., Shaw P.C., Wang J., But P.P., *Authentication of medicinal Dendrobium species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA*, Planta Medica, 2001, **67**:456-460.
15. Feng S., He R., Yang S., Chen Z., Jiang M., Lu J., Wang H., *Start codon targeted (SCoT) and target region amplification polymorphism (TRAP) for evaluating the genetic relationship of Dendrobium species*, Gene, 2015, **567**:182-188.
16. Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W., *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator**, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, **101**:14812-14817.
17. Liu J., Provan J., Gao L.M., Li D.Z., *Sampling strategy and potential utility of indels for DNA barcoding of closely related plant species: A case study in *taxus**, International Journal of Molecular Sciences, 2012a, **13**:8740-8751.
18. 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., Leon C., *Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species*, PLoS ONE, 2010, **5**:e8613.
19. Gao T., Yao H., Song J., Liu C., Zhu Y., Ma X., Pang X., Xu H., Chen S., *Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2*, Journal of Ethnopharmacology, 2010, **130**:116-121.
20. Liu Z., Zeng X., Yang D., Ren G., Chu G., Yuan Z., Luo K., Xiao P., Chen S., *Identification of medicinal vines by ITS2 using complementary discrimination methods*, Journal of Ethnopharmacology, 2012b, **141**:242-249.
21. Yao H., Song J.Y., Ma X.Y., Liu C., Li Y., Xu H.X., Han J.P., Duan L.S., Chen S.L., *Identification of Dendrobium Species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region*, Planta Medica, 2009, **75**:667-669.
22. Kress W.J., Erickson D.L., *A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region*, PLoS ONE 2007, **2**:e508.
23. Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T.G., Savolainen V., *DNA barcoding the florae of biodiversity hotspots*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, **105**:2923-2928.
24. Kumar P., Rawat G.S., Wood H.P., *Diversity and ecology of Dendrobiums (Orchidaceae) in Chotanagpur plateau, India*, Taiwan, 2011, **56**(1):23-36.
25. Sharma S.K., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., Rao S.R., *Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA*, Gene, 2012, **495**:10-15.

26. Peyachoknagul S., Nettuwakul C., Phuekvilai P., Wannapinpong S., Srikulnath K., *Development of microsatellite markers of vandaceous orchids for species and variety identification*, Genetics and Molecular Research, 2014, **13**:5441-5445.
27. Chen W.H., Kao Y.L., Tang C.Y., Tsai C.C., Lin T.Y., *Estimating nuclear DNA content within 50 species of the genus Phalaenopsis Blume (Orchidaceae)*, Scientia Horticulture, 2013, **161**:70-75.
28. Tran Duy Duong, Khuat Huu Trung, La Tuan Nghia, Nguyen Thi Thanh Thuy, Pham Bich Hien, Nguyen Truong Khoa, Tran Hoang Dung, Do Minh Trung, Tran Dang Khanh, *Identification of Vietnamese native Dendrobium species based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence*, Advanced Studies in Biology, 2018, **10**(1):1-12
29. Liu Y.T., Chen R.K., Lin S.J., Chen Y.C., Chin S.W., Chen F.C., Lee C.Y., *Analysis of sequence diversity through internal transcribed spacers and simple sequence repeats to identify Dendrobium species*, Genetics and Molecular Research, 2014, **13**(2):2709-2717.
30. Burke J.M., Bayly M.J., Adams P.B., Ladiges P.Y., *Molecular phylogenetic analysis of Dendrobium (Orchidaceae), with emphasis on the Australian section Dendrocoryne, and implications for generic classification*, Australian Systematic Botany, 2008, **21**:1-14
31. Yukawa T., Uehara K., *Vegetative diversification and radiation in subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): Evidence from chloroplast DNA phylogeny and anatomical characters*, Plant Systematics and Evolution, 1996, **201**:1-14
32. Morris M.W., Steen W.L., Judd W.S., *Vegetative anatomy and systematics of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae)*, Botanical Journal of the Linnean Society, 1996, **120**:89-144.
33. Blasi A.T., Vorontsova M., *Plant identification is key to conservation*, Nature, 2015, **521**:161
34. Burke J.M., Bayly M.J., Adams P.B., Ladiges P.Y., *Molecular phylogenetic analysis of Dendrobium (Orchidaceae), with emphasis on the Australian section Dendrocoryne, and implications for generic classification*, Australian Systematic Botany, 2008, **21**:1-14
35. Schuiteman A., *Dendrobium (Orchidaceae): To split or not split*, Gard Bull Singapore, 2011, **63**:245-257.
36. Tsai C.C., Chiang Y.C., Huang S.C., Chen C.H., Chou C.H., *Molecular phylogeny of Phalaenopsis Blume (Orchidaceae) on the basis of plastid and nuclear DNA*, Plant Systematics and Evolution, 2010, **288**:77-98.
37. Chromas Pro2.1.6 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Queensland, Australia)
38. Hall T.A., 1999. *BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*, Nucleic Acids Symposium Series, 1999, **41**:95-98
39. Jobb G., TREEFINDER version March 2011. <http://www.treefinder.de>
40. Ronquist F., Huelsenbeck J.P., MrBAYES 2.3: *Bayesian phylogenetic inference under mixed models*, Bioinformatics, 2003, **19**:1572-1574

41. Tanabe A.S., *Kakusan 4 and Aminasan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data*. Molecular Ecology Resources, 2011, **11**:914-921.
42. Rambaut A., Drummond A., *TRACER version 1.5*, 2009 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
43. Huelsenbeck J.P., Hillis D.M., 1993. *Success of phylogenetic methods in the fourtaxon case*, Systematic Biology, 1993, **42**:247-264.
44. Leaché A.D., Reeder T.W., *Molecular systematics of the eastern fence lizard (Sceloporus undulatus): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches*, Systematic Biology, 2002, **51**:44-68.
45. Kumar S., Stecher G., Tamura K., *MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets*, Molecular Biology and Evolution, 2016, **33**(7):1870-1874.
46. Dương Văn Tăng, Nguyễn Quốc Bình, Đinh Thị Phòng, *Trình tự nucleotide vùng ITS nhân và mối quan hệ di truyền của 3 loài gỗ quý Việt Nam: Trắc (Dalbergia cochinchinensis), Cẩm lai (D. oliveri) và Sưa (D. tonkinensis)*. Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4, 2011, tr.1296-1300.

SUMMARY

USING ITS NUCLEAR GENE NUCLEOTIDE SEQUENCES FOR IDENTIFICATION SPECIES IN *DENDROBIUM*

DNA barcoding is a useful tool for species identification using standardized genomic DNA fragments. We used DNA barcodes (Internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA - *ITS-rDNA*) to explore *Dendrobium anosmum*, and to investigate the current taxonomy of *Dendrobium*. In this study, the success rate for PCR of *ITS* region was 100%. The success rate for bidirectional sequencing of PCR product was 100% with length of 650bp. All 15 samples from two provinces (Hai Duong and Hoa Binh) of Vietnam have close relationship with *D. anosmum* (MLBS=97%, BPP=100%). Genetic p-distances interspecific divergence within and among *Dendrobium* species was varied from 1% to 17%, average (12.12%). The genetic relationship of species/gender belonging to the *Dendrobium* genus showed that they have the same evolutionary origin.

Keywords: *Dendrobium anosmum*, DNA barcoding, DNA Sequencing, identification, ITS (Internal Transcribed Spacer), nhận dạng, DNA mã vạch, lan Phi điệp, trình tự nucleotide.

Nhận bài ngày 11 tháng 3 năm 2019

Phản biện xong ngày 17 tháng 6 năm 2019

Hoàn thiện ngày 19 tháng 6 năm 2019

⁽¹⁾ Viện Sinh thái Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga