

# NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM TRÌNH TỰ VÙNG ITS TRONG ĐỊNH DANH VÀ XÁC ĐỊNH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN MỘT SỐ LOÀI LAN THUỘC CHI HOÀNG THẢO (*Dendrobium*)

Huỳnh Thị Trúc Phương, Hồ Việt Thế\*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

\*Email: thehv@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 21/01/2021; Ngày chấp nhận đăng: 03/5/2021

## TÓM TẮT

Lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) là một chi lớn trong họ Phong lan. Nhiều loài trong chi lan này có giá trị kinh tế cao do vẻ đẹp hoặc tính dược liệu. Tuy nhiên, việc phân loại các loài dựa trên đặc điểm hình thái thường khó khăn do có nhiều điểm tương đồng giữa các loài. Trong nghiên cứu này, mã vạch DNA dựa trên vùng đệm sao chép nội (ITS-based DNA barcode) được sử dụng để phân tích cấu trúc di truyền của 10 mẫu lan Hoàng thảo được thu thập từ các khu vực khác nhau. Kết quả cho thấy có sự đa dạng di truyền trong vùng ITS của 10 mẫu lan. Dựa vào phân tích theo mô hình Kimura 2-parameter, khoảng cách di truyền giữa các mẫu lan dao động từ 0,00 đến 1,14. Qua định danh bằng BLAST, trong 10 mẫu lan có một mẫu thuộc loài *Dendrobium catenatum*, một mẫu thuộc loài *Dendrobium aphyllum* và tám mẫu còn lại được xác định thuộc loài *Dendrobium anosmum*. Như vậy, mã vạch DNA dựa trên vùng ITS có triển vọng lớn trong việc nhận dạng và phân loại cũng như cung cấp thông tin về mối quan hệ di truyền giữa các loài lan trong chi Hoàng thảo.

*Từ khóa:* Đa dạng di truyền, *Dendrobium*, ITS, mã vạch DNA, chỉ thị phân tử.

## 1. MỞ ĐẦU

Chi lan Hoàng thảo *Dendrobium* là một chi lớn trong họ Phong lan (Orchidaceae) bao gồm khoảng 800-1400 loài [1]. Ở Việt Nam có hơn 100 loài lan Hoàng thảo với giá trị về trang trí và dược liệu khác nhau. Việc phân loại chính xác ở cấp độ loài là công việc quan trọng để bảo tồn, sử dụng bền vững nguồn tài nguyên thực vật và đánh giá quý gen của chi thực vật này là nhiệm vụ quan trọng, cấp bách mang tính khoa học và thực tiễn cao. Thông thường, các loài lan được phân biệt với nhau thông qua thân, lá và hoa trên cây trưởng thành. Tuy nhiên, phương pháp này thường bị tác động bởi các yếu tố ngoại cảnh, giai đoạn phát triển của cây. Các đặc điểm hình thái của nhiều cây trong chi Hoàng thảo rất giống nhau trong giai đoạn chưa có hoa [2]. Để phân biệt cây thông qua hình thái chính xác thì một yêu cầu tiên quyết là cây phải ở giai đoạn phát triển hoàn chỉnh điều này làm tốn thời gian khá nhiều, hơn nữa các kết quả hầu như đều dựa vào cảm tính của người đánh giá nên có thể gây ra sai lệch kết quả cuối cùng. Do đó, rất khó và thậm chí không thể phân biệt các loài này bằng cách sử dụng phân loại hình thái học. Vì vậy, việc phát triển một phương pháp chính xác và không phức tạp để xác thực các loài lan trong chi Hoàng thảo là cấp thiết.

Mã vạch DNA là công cụ hiện được sử dụng nhiều để phân biệt các loài có quan hệ họ hàng gần. Mã vạch DNA là kỹ thuật để xác thực sinh vật dựa trên một đoạn DNA ngắn, trong đó, vùng nội phiên mã ở DNA ribosome (Internal transcribed spacer/ITS) có độ bảo tồn trong loài, tuy nhiên có sự biến động cao ở mức độ trên loài, ngoài ra đây là vùng dễ khuếch đại với một lượng DNA nhỏ. Do đó, mã vạch ITS đã được xem là vùng lý tưởng để xác thực các loài

thực vật khác nhau. Mã vạch này đã được sử dụng nhiều trong việc định danh các loài lan ở nhiều nước khác nhau như Trung Quốc [2], Malaysia [3], Sri Lanka [4]. Ở nước ta, vùng ITS đã được sử dụng để nhận diện mẫu giống lan trước khi nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô [5]. Vùng này sau đó cũng được xác định phù hợp hơn các vùng DNA khác như *matK*, *rbcL*, *rpoB1*, *rpoB2*, *rpoC1* và *rpoC2* trong phân biệt các loài mẫu lan kim tuyến [6], gần đây hơn, vùng ITS cũng được sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài lan như Giả hạc, Long tu, Trầm [7]. Trong nghiên cứu này, sự đa dạng di truyền của 10 mẫu lan thuộc chi Hoàng thảo được thu thập ở các vùng địa lý khác nhau đã được phân tích bằng cách sử dụng đánh dấu mã vạch DNA dựa trên ITS. Kết quả thu được có thể cung cấp thông tin khoa học cho việc phân loại, xác định, bảo tồn và phát triển các loài lan thuộc chi Hoàng thảo ở Việt Nam.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

Thông qua liên hệ với các đồng nghiệp, viện nghiên cứu và trường đại học, tổng cộng 10 mẫu lan có đặc điểm đặc trưng thuộc chi Hoàng thảo được thu thập từ các địa điểm khác nhau và được trình bày ở Bảng 1. Sau khi thu thập, các mẫu được bảo quản ở tủ mát và sử dụng cho tách chiết DNA.

Bảng 1. Danh sách các mẫu lan sử dụng trong nghiên cứu

STT	Nơi thu nhận	Ký hiệu mẫu
1	Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp.HCM	HF
2	Khu Nông nghiệp Công nghệ cao Củ Chi	CC
3	Ninh Thuận	NT
4	Buôn Mê Thuột	BMT
5	Đắk Lắk	DKL
6	Campuchia	CPC
7	Gia Lai	GL
8	Lâm Đồng	LĐ
9	Tây Nguyên	TN
10	An Giang	AG

### 2.2. Tách chiết DNA

DNA tổng số được chiết xuất từ lá của các mẫu lan theo quy trình của Doyle và Doyle [8]. Chất lượng DNA sau đó được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE Tris-Acetate-EDTA 1X và nhuộm bằng thuốc nhuộm Gelred (Biotium, Mỹ). DNA được quan sát dưới tia cực tím bằng máy đọc gel Quantum-ST4 3000 (Montreal - Biotech, Canada) để kiểm tra độ nguyên vẹn của DNA thu được. Nồng độ DNA sau đó được xác định bằng máy quang phổ (Optima SP 3000 nano UV-VIS, Nhật Bản) ở bước sóng 260 nm.

### 2.3. Phản ứng PCR và giải trình tự DNA

Vùng ITS được khuếch đại bằng cách sử dụng thành phần của phản ứng PCR như sau: 7,5  $\mu$ L 2X Mytaq Red Mix (Bioline, Anh), 20 ng DNA, 0,2  $\mu$ M primer (ITS18S\_F 5' AGGAGAAGTCGAACAAAG 3' và ITS26S\_R 5' GTTTCTTTTCCTCCGCT 3'), và nước PCR

cho thể tích cuối cùng là 15  $\mu$ L. Điều kiện phản ứng PCR như sau: biến tính ban đầu ở 94 °C trong 2 phút; sau đó 35 chu kỳ 30 giây ở 94 °C, 30 giây ở 55 °C, 1 phút ở 72 °C, và cuối cùng là 5 phút ở 72 °C để hoàn thành phản ứng. Tất cả các phản ứng đều được thực hiện trong máy luân nhiệt SureCycler 8800 (Agilent, Mỹ). Các sản phẩm PCR được điện di bằng cách sử dụng gel agarose 1% và so sánh với thang chuẩn 1kb (Bioline, UK) để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại. Các sản phẩm khuếch đại PCR sau đó được tinh sạch bằng cách sử dụng ISOLATE II PCR và Gel Kit (Bioline, UK) và sau đó được thực hiện phản ứng với bộ giải trình tự BigDye™ Terminator (Applied Biosystems, Mỹ). Tiếp theo, các sản phẩm được phân tích trên máy ABI 3100 (Applied Biosystems, Mỹ). Các trình tự DNA được kiểm tra chất lượng bằng phần mềm FinchTV (Digital World Biology Products, Mỹ), chỉ có những vùng có chỉ số PHRED cao hơn 20 mới được sử dụng cho phân tích. Các trình tự sau đó được cập nhật lên ngân hàng gen quốc tế (GenBank) với các mã số ở Bảng 2.

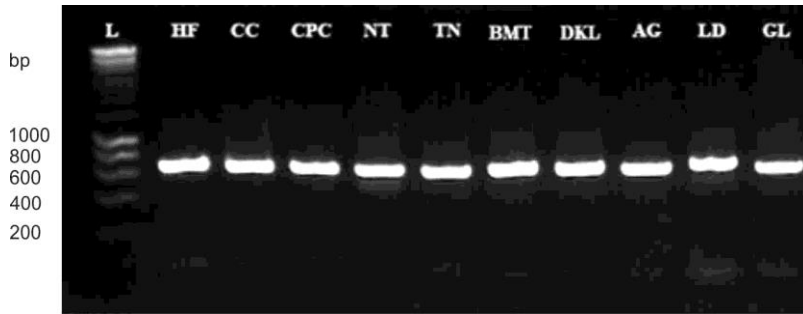
## 2.4. Phân tích số liệu

Các trình tự DNA được sử dụng để định danh loài bằng công cụ BLAST theo chương trình BLASTN (Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, Mỹ). Sau đó các trình tự được so sánh bằng phương pháp CLUSTAL trong phần mềm MEGA 6.0. Các kiểu thay thế nucleotide cũng được xác định bằng phần mềm này. Cây quan hệ di truyền giữa các trình tự được xây dựng dựa trên 2 phương pháp bao gồm Neighbor-Joining và Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1000. Mức độ tin cậy của cây quan hệ di truyền được đánh giá thông qua giá trị bootstrap như sau: tin cậy cao (> 85%), tin cậy trung bình (70–85%), tin cậy yếu (50–69%) và tin cậy kém (<50%) [9]. Để ước tính độ nhận diện loài của phương pháp, phương pháp của Sikdar và cộng sự được sử dụng, cụ thể như sau: khả năng nhận diện loài cao nếu các cá thể cụ thể được nhóm lại thành một nhánh đơn riêng biệt trong cây phát sinh loài với giá trị bootstrap cao. Ngược lại, nếu các cá thể trong cùng một loài phân bố ở nhiều nhánh khác nhau thì loài này được coi là không thể phân biệt được [10].

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả PCR và giải trình tự DNA vùng ITS

Đã có nhiều nghiên cứu đánh giá thấp về khả năng thành công trong việc sử dụng vùng ITS để phân biệt các loại cây trồng do sự khó khăn trong khuếch đại vùng DNA này qua phản ứng PCR. Năm 2010, nhóm nghiên cứu từ Trung Quốc xác định hiệu quả của PCR ở vùng ITS thấp hơn các vùng *psbA-trnH* và ITS2 khi nghiên cứu trên các cây thuộc họ Rutaceae [11], một nghiên cứu khác ở chi *Orinus* thuộc họ Poaceae cũng cho thấy hiệu quả PCR của vùng ITS thấp hơn các vùng *matK* và *trnH-psbA* [12]; tiếp theo đó nghiên cứu từ Australia cũng cho rằng khả năng thành công của vùng ITS là rất thấp khi sử dụng để xác định các loài cỏ xâm lấn ở nước này [13]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, hiệu quả của các phản ứng PCR là đáng tin cậy cho vùng ITS với các phản ứng PCR đạt tỷ lệ thành công 100%, các sản phẩm khuếch đại rõ ràng và không có sản phẩm phụ (Hình 1). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên cây lan [6, 7, 14].



Hình 1. Kết quả khuếch đại vùng ITS các mẫu lan Hoàng thảo (L: thang chuẩn 1000 bp).

### 3.2. Kết quả định danh các mẫu lan dựa vào vùng ITS

Kết quả giải trình tự cho thấy các peak rõ ràng và cách đều nhau chứng tỏ kết quả giải trình tự đáng tin cậy. Sau khi loại bỏ các vùng nhiễu ở hai đầu trình, các trình tự này được đưa lên Genbank và có mã số gen như ở Bảng 2. Kết quả định danh bằng phương pháp BLAST cho độ tương đồng về trình tự cao từ 99,85 đến 100%. Đặc biệt trong 10 mẫu phân tích, mẫu HF thu ở Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh được xác định thuộc loài *Dendrobium catenatum*, mẫu CC thu thập từ Khu Nông nghiệp Công nghệ cao Củ Chi được xác định thuộc loài *Dendrobium aphyllum* hay còn gọi là lan Hạc vĩ, Y ngọc lan, Thạch hộc không lá, lan Hoàng thảo hạc vĩ. Tám mẫu còn lại thuộc loài *Dendrobium anosmum* hay còn có các tên gọi khác ở nước ta như Lan phi điệp, Giả hạc, Giả hạc Hawaii [15]. Nghiên cứu trước đây trên 15 mẫu lan Hoàng thảo có sử dụng vùng ITS đã khẳng định tiềm năng của vùng gen này trong việc nhận diện loài lan *Dendrobium anosmum* [1]. Ngoài ra, nghiên cứu của nhóm tác giả Đỗ Thị Gấm và cộng sự cũng cho thấy vùng ITS có khả năng cao nhất để phân biệt năm loài lan kim tuyến bao gồm *Anoectochilus lylei*, *Anoectochilus anamensis*, *Goodyera hispida*, *Anoectochilus roxburghii* và *Ludisia discolor* [16].

Bảng 2. Kết quả định danh các mẫu lan Hoàng thảo và số hiệu của các trình tự tương ứng

Ký hiệu	Mã số trình tự	Độ dài trình tự (bp)	Kết quả định danh	Độ tương đồng BLAST (%)	Tỷ lệ bao phủ của trình tự (%)
HF	MW494995	733	<i>Dendrobium catenatum</i>	100	100
CC	MW494996	724	<i>Dendrobium aphyllum</i>	99,41	100
NT	MW494997	735	<i>Dendrobium anosmum</i>	100	99
BMT	MW494998	728	<i>Dendrobium anosmum</i>	99,85	100
DKL	MW494999	738	<i>Dendrobium anosmum</i>	99,85	100
CPC	MW495000	734	<i>Dendrobium anosmum</i>	100	100
GL	MW495001	785	<i>Dendrobium anosmum</i>	100	100
LĐ	MW495002	788	<i>Dendrobium anosmum</i>	99,85	100
TN	MW495003	733	<i>Dendrobium anosmum</i>	99,85	100
AG	MW495004	764	<i>Dendrobium anosmum</i>	100	100

### 3.3. Phân tích mối quan hệ di truyền 10 mẫu lan thuộc chi *Dedrobium* dựa trên trình tự ITS

Tiếp theo đó, các sự thay đổi trong thành phần nucleotide giữa các trình tự được tính toán, đây là một thông số quan trọng có thể phản ánh xu hướng tiến hóa của các trình tự DNA. Trong nghiên cứu này, sự thay thế của các nucleotide khác nhau trong các vùng phân tích được đánh giá và kết quả được trình bày trong Bảng 3. Nhìn chung, sự thay thế cùng kiểu base (transition) cao hơn sự thay thế khác kiểu base (transversion) với tỷ lệ lần lượt là 14,83% và 5,09%.

*Bảng 3.* Kết quả phân tích các kiểu thay thế của các nucleotide trong trình tự vùng ITS của 10 mẫu lan (%)

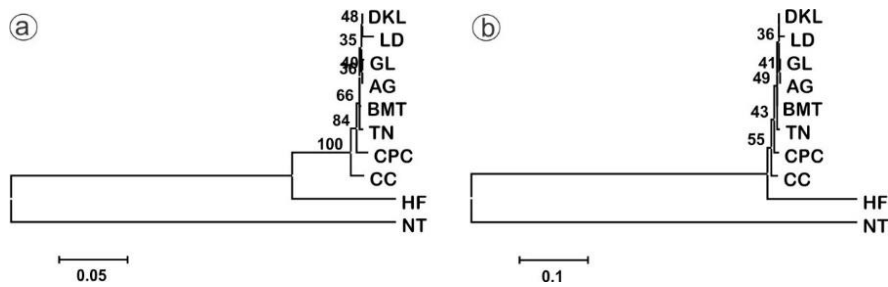
	A	T	C	G
A	-	5,09	5,09	<b>14,83</b>
T	5,09	-	<b>14,83</b>	5,09
C	5,09	<b>14,83</b>	-	5,09
G	<b>14,83</b>	5,09	5,09	-

Khoảng cách di truyền giữa các mẫu lan dựa trên phân tích Kimura-2 (K2P) được trình bày trong Bảng 4. Khoảng cách thấp nhất là 0,000, trong khi cao nhất là 0,047. Khoảng cách di truyền biến động mạnh cho thấy mối quan hệ di truyền khá phân tán trong các mẫu nghiên cứu. Các mẫu thu từ Đắk Lắk (ĐKL, BMT), Gia Lai (GL) và An Giang (AG) có sự giống nhau gần như tuyệt đối về trình tự vùng DNA nghiên cứu. Điều này có thể do các mẫu lan này có chung nguồn gốc. Trong khi đó, mẫu thu từ Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh (HF) và mẫu thu từ Ninh Thuận (NT) có sự khác biệt lớn về trình tự vùng ITS với biến động từ 0,14 đến 1,14.

*Bảng 4.* Kết quả đánh giá sự khác biệt tiến hóa giữa các trình tự của 10 mẫu lan dựa vào phương pháp Kimura-2-parameter (K2P).

	HF	CC	NT	BMT	ĐKL	CPC	GL	LĐ	TN
HF									
CC	0,15								
NT	1,14	1,02							
BMT	0,14	0,02	1,04						
ĐKL	0,14	0,02	1,03	0,00					
CPC	0,15	0,02	1,07	0,01	0,01				
GL	0,14	0,02	1,04	0,00	0,00	0,01			
LĐ	0,15	0,03	1,05	0,01	0,01	0,02	0,01		
TN	0,14	0,02	1,03	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	
AG	0,14	0,02	1,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01

Dựa trên kết quả về độ khác biệt thành phần trong các trình tự gen, cây phân nhóm di truyền được xây dựng bằng cách sử dụng MEGA 6.0 với phương pháp Neighbor-Joining và Maximum Likelihood, kết quả phân nhóm được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Cây phân nhóm di truyền dựa vào trình tự ITS của 10 mẫu lan Hoàng thảo bằng phương pháp Neighbor-Joining (a) và Maximum Likelihood (b).

Cả hai phương pháp xây dựng cây quan hệ di truyền đều cho cấu trúc cây tương tự nhau, trong đó các mẫu phân tích được chia thành 2 nhóm lớn. Mẫu NT tách biệt riêng thành một nhánh và chín mẫu còn lại tập trung vào một nhánh chính, trong nhóm này có hai nhóm phụ: nhóm phụ thứ nhất là mẫu HF, nhóm phụ thứ hai bao gồm tám mẫu còn lại. Mặc dù cả hai phương pháp phân tích đều được sử dụng phổ biến trong phân tích phát sinh loài, NJ có thể dễ dàng được thực hiện trong thời gian ngắn bằng máy tính cá nhân trong khi ML được coi là phương pháp chuyên nghiệp trong phân tích phát sinh loài, vì nó có thể xem xét khả năng xảy ra đồng thời của tất cả các sự kiện và tạo ra cây, được hỗ trợ ở xác suất cao hơn so với các phương pháp khác [17]. Qua phân tích BLAST, mẫu NT được xác định thuộc loài *Dendrobium anosmum* nhưng lại được tách thành một nhóm riêng ở cây quan hệ di truyền. Điều này có thể do mẫu đã trải qua nhiều quá trình đột biến và được tích lũy qua nhiều thế hệ nên trình tự gen đã thay đổi nhiều so với các trình tự ban đầu [7].

#### 4. KẾT LUẬN

Các kết quả thu được trong nghiên cứu này chứng minh rằng việc sử dụng mã vạch DNA dựa trên vùng ITS có khả năng để phân biệt các loài lan trong chi lan Hoàng thảo. Kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm khai thác hiệu quả hơn tiềm năng của các loại mã vạch DNA trong công tác nhận diện, bảo tồn và phát triển các loài cây trồng quý ở nước ta.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Đình Duy - Sử dụng trình tự nucleotide vùng gen nhân (ITS-rRNA) để xác định loài lan thuộc chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*), Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới **18** (2019) 3-12.
2. Wang S., Hou F., Zhao J., Cao J., Peng C., Wan D., Guo J. - Authentication of Chinese herbal medicines *Dendrobium* species and phylogenetic study based on nrDNA ITS sequence, International Journal of Agriculture & Biology **20** (2018) 369-374.
3. Rajaram M.C., Yong C.S.Y., Gansau J.A., Go R. - DNA barcoding of endangered *Paphiopedilum* species (Orchidaceae) of Peninsular Malaysia, Phytotaxa **387** (2) (2019) 94-104.
4. Sandamali P.M.H., Senanayake S.P., Rajapakse S. - Phylogenetic relationships of selected Sri Lankan Orchids based on Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence analysis, Tropical Plant Research **7** (1) (2020) 76-85.
5. La Việt Hồng, Nguyễn Nguyệt Quỳnh, Đào Văn Kiên, Chu Hoàng Hà - DNA barcoding và nhân nhanh In vitro *Dendrobium transparens* Wall.ex Lindl, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ **33** (2) (2017) 37-45.

6. Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Trường Giang, Dương Hoa Xô, Hà Thị Loan, Phan Đình Yên, Trần Trọng Tuấn, Đỗ Đăng Giáp - Nghiên cứu sử dụng một số DNA barcode trong phân tích di truyền và nhận diện một số loài lan kim tuyến (*Anoectochilus* spp.), Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ **55** (1) (2019) 14-23.
7. Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Trường Giang, Dương Hoa Xô, Hà Thị Loan, Huỳnh Hữu Đức - Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài lan giả hạc (*D. anosum*), long tu (*D. primulinum*) và trầm (*D. parishii*) dựa trên chỉ thị phân tử DNA barcode, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc (2020) 118-124.
8. Doyle J.J., Doyle J.L. - A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochemical Bulletin **19** (1987) 11-15.
9. Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. - Use of DNA barcodes to identify flowering plants, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102** (23) (2002) 8369-8374
10. Sikdar S., Tiwari S., Thakur V.V., Sapre S. - An *in silico* approach for evaluation of *rbcL* and *matK* loci for DNA barcoding of Fabaceae family, International Journal of Chemical Studies **6** (6) (2018) 2446-2451.
11. Kun L., Shilin C., Li C.K., Yuan J., Hui Y., Ye M.X., Jie Z.Y., Hui P.X., Hua Y., Wen L.X., Xhen L. - Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family, Science China Life Sciences **53** (2010) 701-708.
12. Su X., Liu Y.P., Chen Z., Chen K.L. - Evaluation of candidate barcoding markers in *Orinus* (Poaceae), Genetics and Molecular Research **15** (2) (2015) gmr.7714.
13. Wang A., Gopurenko D., Wu H., Lepschi B. - Evaluation of six candidate DNA barcode loci for identification of five important invasive grasses in eastern Australia, Plos One **12** (4) (2016) e0175338.
14. Xu S., Li D., Li J., Xiang X., Jin W., Huang W., Jin X., Huang L. - Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia, PLoS One **10** (1) (2015) e0115168.
15. Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Trọng Ngôn, Trần Nhân Dũng – Quan hệ giữa các giống, loài hóa lan (Orchidaceae) dựa trên đặc điểm hình thái, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ **22a** (2012) 165-175.
16. Đỗ Thị Gấm, Hoàng Đăng Hiếu, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà - Phân tích quan hệ di truyền của một số loài lan tại Việt Nam, Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ **7** (2017) 113-119.
17. Felsenstein J. - Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach, Journal of Molecular Evolution **17** (6) (1981) 368-376.

**ABSTRACT**

CHARACTERIZATION OF ITS REGION FOR IDENTIFICATION  
AND DETERMINATION OF GENETIC RELATIONSHIP  
OF SOME SPECIES IN *Dendrobium* GENUS

Huynh Thi Truc Phuong, Ho Viet The\*

*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

\*Email: *thehv@hufi.edu.vn*

*Dendrobium* is a large genus in the orchid family in which many species is highly valueable due to their beauty or high medicinal properties. However, the species classification is often difficult because there are many similarities between species. In this study, ITS-based DNA barcode was used to analyze the genetic structure of 10 *Dendrobium* samples collected from different regions. Results showed that there is genetic diversity of 10 orchid samples in ITS region. Based on analysis by the Kimura 2- parameter model, the genetic distance between orchid samples ranged from 0.00 to 1.14. Through identification by BLAST, in ten orchid samples, one sample belongs to *Dendrobium catenatum*, one sample belongs to *Dendrobium aphyllum* and the remaining eight samples are identified as *Dendrobium anosmum*. Thus, the ITS region-based DNA barcoding holds great promise for identification and taxonomy as well as providing information on the genetic relationships between orchids species in the *Dendrobium* genus.

*Keywords:* *Dendrobium* spp., DNA barcode, diversity, ITS, molecular markers.