

## PHÂN TÍCH SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN GIỮA CÁC GIỐNG LAN GIẢ HẠC (*Dendrobium anosmum*) DỰA TRÊN CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR

Huỳnh Hữu Đức\*, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Dương Hoa Xô

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*) là loài lan có giá trị kinh tế cao, có sự phân bố rộng và thích nghi với nhiều vùng sinh thái khác nhau ở nước ta. Nhằm mục tiêu đánh giá đa dạng di truyền giữa các nguồn gen từ các vùng sinh thái khác nhau phục vụ bảo tồn và lai tạo giống mới, 20 mẫu giống lan Giả hạc có nguồn gốc khác nhau được thu thập và đánh giá bằng chỉ thị phân tử SSR. Kết quả phân tích và đánh giá di truyền của các mẫu giống lan này dựa trên 18 SSR cho thấy tổng số alen thu được là 79, trong đó tổng số alen đa hình là 77 với giá trị trung bình 4,28 alen/loci. Kết quả phân tích 18 SSR cho 20 mẫu lan thu thập cho thấy có sự phân nhóm di truyền thành 7 nhóm chính với khoảng cách di truyền là 0,172. Trong đó, tính đa hình giữa các mẫu giống lan Giả hạc đạt từ 0,237 đến 0,992 với trung bình là 0,699. Các kết quả trên cho thấy rằng các mẫu giống lan Giả hạc có nguồn gốc từ các vùng sinh thái khác nhau có sự đa dạng di truyền nhất định, đây là nguồn gen có giá trị cần được bảo tồn và sử dụng cho mục tiêu lai tạo giống trong tương lai. Ngoài ra, các chỉ thị SSR được sàng lọc của nghiên cứu này hứa hẹn có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử trong việc đánh giá loài lan *Dendrobium anosmum* nói riêng và các loài lan thuộc chi *Dendrobium* nói chung.

*Từ khóa:* Lan Giả hạc, đa dạng di truyền, chỉ thị phân tử SSR.

### MỞ ĐẦU

Họ Lan hay họ Phong Lan (danh pháp khoa học: Orchidaceae) là một họ thực vật có hoa, thuộc bộ Măng tây (Asparagales), lớp thực vật một lá mầm. Đây là một trong những họ lớn nhất của thực vật, và phân bố nhiều nơi trên thế giới, nhưng tập trung chủ yếu ở vùng nhiệt đới (Dressler, 1993). Theo thống kê của Vườn Thực vật hoàng gia Kew, họ Lan gồm 880 chi và gần 22.000 loài được chấp nhận, nhưng số lượng chính xác vẫn chưa được xác định rõ, có thể nhiều tới 25.000 loài. Số lượng loài Lan cao gấp 4 lần số lượng loài động vật có vú hay hơn 2 lần số lượng loài chim. Lan chiếm khoảng 6 - 11% số lượng loài thực vật có hoa (Chase, 2005). Bên cạnh đó, khoảng 800 loài Lan mới được bổ sung thêm mỗi năm. Trong họ Lan, các chi lớn nhất là *Bulbophyllum* (khoảng 2.000 loài), *Epidendrum* (khoảng 1.500 loài), *Dendrobium* (khoảng 1.400 loài) và *Pleurothallis* (khoảng 1.000 loài). Orchidaceae phân bố rộng khắp trên thế giới, chúng có thể có mặt trong mọi môi trường sống ngoại trừ các sa mạc và sông băng. Các loài này phần lớn được tìm thấy ở khu vực nhiệt đới, chủ yếu là châu Á, Nam Mỹ và Trung Mỹ. Ở các vĩ độ cao hơn vùng Bắc cực, ở miền nam Patagonia ... cũng đã tìm thấy chúng. Orchidaceae phân bố rộng khắp như: châu Đại Dương 50-70 chi, châu Âu và ôn đới châu Á 40 - 60 chi, Bắc Mỹ 20 - 25 chi (De *et al.*, 2011).

Hiện nay, chỉ thị phân tử đang được sử dụng rộng rãi để đánh dấu các vị trí và các vùng trong bộ gen trong một số chương trình chọn giống và lai tạo giống cây trồng. Các chỉ thị phân tử này liên kết chặt chẽ với nhiều tính trạng nông học cũng như các tính trạng kháng bệnh đối với các loại cây trồng chính (Gupta, Rustgi, 2000; Phillips, Vasil, 2013). Một số chỉ thị phân tử như: (i) đa hình chiều dài các giới hạn (RFLP), (ii) đa hình các đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD), đa hình chiều dài các đoạn khuếch đại (AFLP) và microsatellite hoặc các đoạn trình tự lặp lại đơn giản (SSR), và (iii) đa hình nucleotide đơn (SNP). Những chỉ thị phân tử này có thể được tạo ra với số lượng lớn và đã được chứng minh là rất hữu ích cho nhiều mục đích khác nhau trong việc cải thiện các giống cây trồng. Đối với các ứng dụng trong lai tạo giống, chỉ thị phân tử SSR được chứng minh và khuyến khích sử dụng trong chọn giống cây trồng do khả năng liên kết tính trạng cao (Gupta, Rustgi, 2000). Chỉ thị phân tử SSR đã cho thấy ưu thế về tính đa hình cao, tính ổn định, độ tinh cậy, cũng như khả năng tự động hoá hơn khi so sánh với các chỉ thị phân tử khác (Shariflou *et al.*, 2001).

Việc xác định nguồn gốc của các giống bố mẹ và đánh giá giống một cách đầy đủ về mặt hình thái và di truyền là một trong những yêu cầu bắt buộc và cực kỳ quan trọng trong công tác lai tạo giống và sản xuất giống cây trồng. Trong đó, việc phân loại truyền thống dựa trên các đặc tính hình thái đang được sử dụng mang lại hiệu quả chưa cao, chưa đảm bảo tính chính xác và tốn nhiều thời gian và công sức. Các marker phân tử như DNA barcode, SSR được sử dụng trong công tác đánh giá nguồn gen, xác định mối quan hệ di truyền, nguồn gốc bố mẹ và đánh giá giống đã và đang mang lại những kết quả khả quan và đầy triển vọng khi rút ngắn thời gian lai tạo đồng thời có thể đánh giá và xác định một cách chính xác nguồn gốc các giống lai tạo cũng như bảo hộ giống mới. Ngoài ra, việc đảm bảo lưu trữ và bảo tồn nguồn gen các giống Lan bố mẹ đã chọn lọc song song với các phân tích hình thái và di truyền cũng là một trong những yêu cầu bắt buộc của công tác lai tạo và nghiên cứu phát triển các giống Lan mới cũng như các giống Lan quý, có giá trị kinh tế.

**NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

**Vật liệu nghiên cứu**

20 mẫu giống lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*) được thu thập từ các vùng sinh thái khác nhau như: Đắc Lắc, Gia lai, Kom Tum, Lâm Đồng, Khánh Hòa, Hòa Bình, Phú Thọ (Bảng 1) được sử dụng cho mục tiêu phân tích đa dạng di truyền.

**Bảng 1. Danh sách 20 mẫu giống lan Giả hạc thu thập**

Ký hiệu	Tên thông thường	Tên khoa học	Nguồn gốc địa lý
D01	Giả hạc 1	<i>Dendrobium anosmum</i>	Kom Tum
D02	Giả hạc 2	<i>Dendrobium anosmum</i>	Lâm Đồng
D03	Giả hạc 3	<i>Dendrobium anosmum</i>	Đắc Lắc
D04	Giả hạc 4	<i>Dendrobium anosmum</i>	Hòa Bình
D05	Giả hạc 5	<i>Dendrobium anosmum</i>	Khánh Hòa
D06	Giả hạc 6	<i>Dendrobium anosmum</i>	Phú Thọ
D07	Giả hạc 7	<i>Dendrobium anosmum</i>	Phú Thọ
D08	Giả hạc 8	<i>Dendrobium anosmum</i>	Lâm Đồng
D09	Giả hạc 9	<i>Dendrobium anosmum</i>	Hòa Bình
D10	Giả hạc 10	<i>Dendrobium anosmum</i>	Lâm Đồng
D11	Giả hạc 11	<i>Dendrobium anosmum</i>	Phú Thọ
D12	Giả hạc 12	<i>Dendrobium anosmum</i>	Gia lai
D13	Giả hạc 13	<i>Dendrobium anosmum</i>	Hải Phòng
D14	Giả hạc 14	<i>Dendrobium anosmum</i>	Đắc Lắc
D15	Giả hạc 15	<i>Dendrobium anosmum</i>	Kom Tum
D16	Giả hạc 16	<i>Dendrobium anosmum</i>	Kom Tum
D17	Giả hạc 17	<i>Dendrobium anosmum</i>	Kom Tum
D18	Giả hạc 18	<i>Dendrobium anosmum</i>	Lâm Đồng
D19	Giả hạc 19	<i>Dendrobium anosmum</i>	Kom Tum
D20	Giả hạc 20	<i>Dendrobium anosmum</i>	Đắc Lắc

Ly trích DNA tổng số dựa trên quy trình CTAB cơ bản (Doyle 1987) được cải tiến theo nhóm nghiên cứu. Kiểm tra chất lượng của các DNA bằng chạy điện di gel Agarose 0,8% và nồng độ DNA trên máy nanodrop.

**PCR và điện di**

Trước khi thực hiện đánh giá di truyền 20 mẫu giống lan Giả hạc, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc dựa trên 40 SSR được chọn lọc từ các nghiên cứu trước đây trên các loài thuộc chi lan *Dendrobium* (Boonsrangsom *et al.* 2012; Cai *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014) để xây dựng bộ chỉ thị SSR. Kết quả sàng lọc bằng PCR và điện di với các cặp mồi tương ứng cho thấy 27/40 SSR (67,5%) có sản phẩm khuếch đại, với số vạch (band) từ 1 – 9 vạch/SSR locus. Trong đó, 18/27 SSR có tính đa hình, với tổng số alen đa hình là 81 và đạt trung bình là 3 alen/SSR locus. Trên cơ sở kết quả trên, 18 chỉ thị phân tử SSR (Bảng 2) được tiếp tục sử dụng để phân tích và đánh giá đa dạng di truyền cho 20 mẫu giống lan Giả hạc (Bảng 1).

Thực hiện phản ứng PCR: Thành phần phản ứng cho 20 µl chứa 0,2 mM dNTP mix, enzyme DreamTaq polymerase 1 U, dream taq buffer 10 X, 0,4 µM primer xuôi, 0,4 µM primer ngược, nước cất 2 lần khử trùng, 50 ng DNA tổng số. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR-Thermal Cycler: Chu kỳ tiền biến tính 95°C trong 1 phút; 30 chu kỳ: 95°C trong 1 phút, 95°C trong 15 giây, T<sub>a</sub> (nhiệt độ bắt cặp theo từng cặp mồi) trong 30 giây, 72°C trong 40 giây; 1 chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phát hiện bởi điện di trên gel agarose 2%, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình trên máy geldoc.

**Phân tích và đánh giá đa dạng di truyền của một số mẫu giống lan Giả hạc**

Xác định sự hiện diện của các sản phẩm PCR, có sự hiện diện sản phẩm PCR mã hóa là 1, không có sự hiện diện sản phẩm PCR mã hóa là 0. Tổng số alen của mỗi chỉ thị được tính là tổng số các băng DNA có kích thước khác nhau mà phản ứng PCR khuếch đại được.

**Bảng 2. Danh sách 18 cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu**

STT	Locus	Primer xuôi/primer ngược	Trình tự	Ta
1	Den-SSR1	F	CGATCTTTCACCTCTCCATCAC	57
		R	ACAAAAGGGGAGAGAGCATGAG	
2	Den-SSR2	F	CTCTCCATCTTGCCATCCTC	57
		R	AGCTTGTGGGGAAGGCTGG	
3	Den-SSR3	F	AGAGGGAGAGTGCAAGAG	58
		R	CGCTATTTCCATCCCTCC	
4	Den-SSR4	F	ACTTGGTGGTCGACGAGGTC	56
		R	GAGCAAGGGGAGGGATAGAG	
5	Den-SSR5	F	CGATAACTATCTATATCCCCCTA	56
		R	AGAGAGCAACAGGAGGAATG	
6	Den-SSR6	F	TAGGATGATGCACGGGAAA	50
		R	GGGGGTTTTTATCATTGAGGA	
7	Den-SSR7	F	GGAACGGAGAAGATTAAGACAACC	51
		R	TGCCCTCACATGCCGTATT	
8	Den-SSR8	F	GATTTATGTAGCCGACCCC	54
		R	CCTGCTCCACTCACCTGTT	
9	Den-SSR9	F	AGCAACGATGGAGCAAGA	52
		R	GCTGACCACGCTAACCTC	
10	Den-SSR10	F	GCATTCTTTGCCTAATTCAGGAA	50
		R	TCCACCCTTTCATCCAATACTTC	
11	Den-SSR11	F	ACAGCGTTAACATAAACCATAGC	50
		R	CTGCCCGCAGATTGAGC	
12	Den-SSR12	F	AAATGGGGAAAAAGGAAAGGAC	50
		R	ATCCCTCCCCTCGCTCTCTC	
13	Den-SSR13	F	CATCCCAGCCTTTTTCAC	54
		R	GAGAGCAAGAGGAGGATGGAA	
14	Den-SSR14	F	GGAAGGGCCTAAGTGGATG	55
		R	GCGTACCATGCTTAACATTCA	
15	Den-SSR15	F	AGGGGACAAGCAATTGAGTTGAAT	56
		R	TCGGCTAGTAGCAAGGCATCTTC	
16	Den-SSR16	F	CGCTCAAATTAACACAAAGAT	55
		R	CGCCAACATAAGAACTTAGG	
17	Den-SSR17	F	CAGCGACAGCCCAAATCCT	60
		R	CTTCAGCCTCGTCATCCACC	
18	Den-SSR18	F	ACAAAAGAGGGATTGAACT	50
		R	CTTCTCAACCTTGTCACCTA	

Hệ số đa dạng di truyền (Polymorphic information content –PIC) của mỗi SSR được tính theo công thức  $PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2$ . Trong đó,  $p_{ij}$  tần số xuất hiện alen thứ  $i$  của locus  $j$ . Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) đến 1 (đa hình hoàn toàn).

Xây dựng cây phát sinh loài: Trên cơ sở ma trận đồng hình di truyền, phân tích hệ số tương đồng Jaccard, xây dựng cây phân nhóm di truyền theo kiểu phân UPGMA dựa trên phần mềm phần mềm NTSYS-pc 2.1. để đánh giá mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu giống lan Giả hạc.

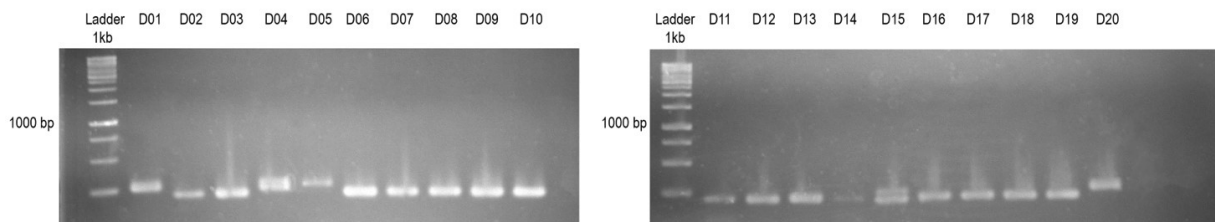
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ly trích DNA tổng số

DNA tổng số sau khi tách chiết được định lượng và kiểm tra độ tinh sạch bằng máy Nano Drop cho kết quả tỉ lệ OD260/OD280 của 20 mẫu nằm trong khoảng 1,8 – 1,95 cho thấy DNA tổng số thu được là tinh sạch. Nồng độ DNA tổng số ở các mẫu nằm trong khoảng 245,5 - 291 ng/μl đảm bảo cho phép sử dụng cho các bước tiếp theo.

### PCR và điện di

Kết quả khuếch đại các chỉ thị phân tử SSR trên 20 mẫu giống lan Giả hạc như sau:



**Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại chỉ thị SSR với cặp mồi Den-SSR11-F và Den-SSR11-R trên 20 mẫu lan**

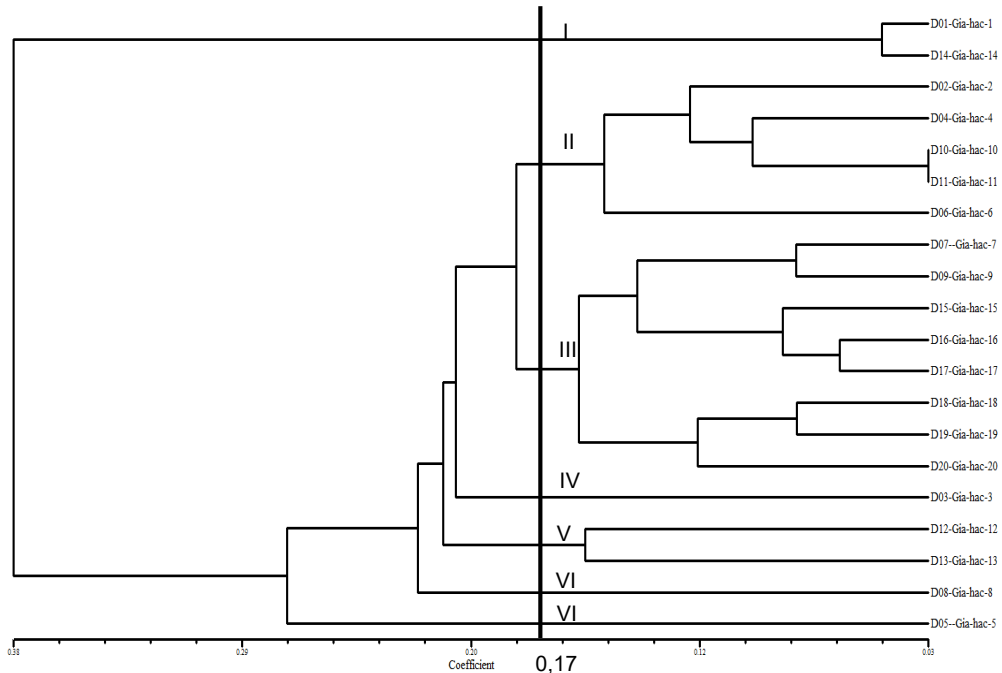
Kết quả khuếch đại 18 chỉ thị phân tử SSR trên 20 mẫu giống lan Giả hạc cho thấy tất cả các locus đã được khuếch đại thành công, tỷ lệ khuếch đại đạt 100%. Các band sản phẩm PCR xuất hiện rõ và có kích thước các sản phẩm PCR có sự sai khác so với kích thước dự kiến. Yue và cộng sự đã xác định 42 giống *Dendrobium* lai dựa trên chỉ thị phân tử SSR với 15 cặp mồi kết quả cho thấy tỷ lệ khuếch đại đạt 93,3% (14/15 cặp mồi cho sản phẩm PCR) (Yue *et al.*, 2006)

**Bảng 3. Kết quả phân tích đa hình, giá trị PIC của 20 mẫu lan Giả hạc dựa trên 18 chỉ thị phân tử SSR**

STT	Locus	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Số alen	Allen đa hình	Tỷ lệ allen đa hình	Tần số alen đa hình	PIC
1	Den-SSR1	250-1000	3	3	100	0,64	0,365
2	Den-SSR2	1000-2000	4	4	100	0,05	0,990
3	Den-SSR3	150-1000	7	6	85,7	0,37	0,754
4	Den-SSR4	170-1500	9	9	100	0,83	0,237
5	Den-SSR5	100-2000	7	7	100	0,49	0,651
6	Den-SSR6	150-1500	7	7	100	0,11	0,979
7	Den-SSR7	150-2000	2	2	100	0,40	0,680
8	Den-SSR8	250-2000	7	7	100	0,35	0,673
9	Den-SSR9	400-1500	3	3	100	0,23	0,895
10	Den-SSR10	150-750	2	2	100	0,10	0,980
11	Den-SSR11	100-250	3	3	100	0,33	0,698
12	Den-SSR12	150-750	3	3	100	0,07	0,992
13	Den-SSR13	100-750	6	6	100	0,73	0,313
14	Den-SSR14	120-1100	5	5	100	0,50	0,500
15	Den-SSR15	150-750	2	1	50,0	0,24	0,913
16	Den-SSR16	100-1200	5	5	100	0,08	0,990
17	Den-SSR17	150-200	2	2	100	0,60	0,480
18	Den-SSR18	280-300	2	2	100	0,50	0,500
<b>Tổng số</b>			<b>79</b>	<b>77</b>			
<b>Trung bình</b>			<b>4,39</b>	<b>4,28</b>		<b>0,368</b>	<b>0,699</b>

Kết quả phân tích di truyền của 20 mẫu giống lan dựa trên 18 chỉ thị phân tử SSR cho thấy số sản phẩm khuếch đại từ 1 - 9 sản phẩm/cặp mồi. Tổng số alen được phát hiện là 79 từ 18 locus với giá trị trung bình là 4,39 alen/locus, trong đó tổng số alen đa hình là 77 với giá trị trung bình là 4,28 alen/locus. Loci Den-SSR4 cho số alen nhiều nhất là 9 và kích thước từ 170 - 1.500 bp; loci Den-SSR3, Den-SSR5, Den-SSR6, Den-SSR7 khuếch đại với các cặp mồi tương ứng cho số alen là 7. Theo nghiên cứu của Boonsrangsom và cộng sự cho thấy số

alen trên mỗi loci là 4 - 7 alen, trung bình 5,25 alen/loci khi đánh giá mối quan hệ di truyền của 49 mẫu lan *Dendrobium* lai dựa trên chỉ thị phân tử SSR với 8 cặp mồi (Boonsrangsom *et al.*, 2012). Cai và cộng sự đã đánh giá sự đa dạng di truyền của 96 mẫu lan *Dendrobium* dựa trên 12 chỉ thị phân tử SSR cho thấy có 98 alen được xác định với mỗi loci có từ 3-22 alen với số alen trung bình trên mỗi loci là 8,2 (Cai *et al.*, 2012). Chỉ số PIC đánh giá mức độ đa hình của các chỉ thị, với 18 chỉ thị phân tử SSR cho thấy giá trị trung bình PIC là 0,699 biến thiên từ 0,237 đến 0,992. Chỉ số PIC thấp nhất ở locus Den-SSR4 và cao nhất ở locus Den-SSR12. Chỉ thị phân tử SSR có thể sử dụng để phân biệt các quần thể biến đổi của *Dendrobium* và có thể xác định giống lan và đánh giá mối quan hệ di truyền (Liu *et al.*, 2014).



**Hình 2. Cây phân nhóm di truyền của 20 mẫu giống lan Giả hạc dựa trên 18 chỉ thị phân tử SSR**

Cây phân nhóm di truyền của 20 mẫu giống lan dựa trên 18 chỉ thị phân tử SSR cho thấy với hệ số di truyền 0,38 điều này cho thấy các mẫu giống lan Giả hạc có sự đa dạng về mặt di truyền. Với mức độ tương đồng di truyền ở mức 0,172 chia các mẫu giống ra làm 07 nhóm chính. Nhóm I bao gồm 2 mẫu giống lan Giả hạc, cả hai mẫu đều được thu thập tại tỉnh Đắk Lắk. Nhóm 2 gồm 5 mẫu trong đó 2 mẫu thu thập tại Di Linh tỉnh Lâm Đồng, 2 mẫu thu thập tại tỉnh Phú Thọ và 1 mẫu thu thập tại tỉnh Hòa Bình. Nhóm III gồm 8 mẫu trong đó 4 mẫu thu thập tại tỉnh Kom Tum 1 mẫu tại Di Linh, 1 mẫu tại Đắk Lắk, 1 mẫu tại tỉnh Phú Thọ và 1 mẫu thu thập tại tỉnh Hòa Bình. Nhóm IV gồm 1 mẫu thu thập tại tỉnh Đắk Lắk. Nhóm V gồm 2 mẫu trong đó 1 mẫu từ tỉnh Gia Lai, 1 mẫu từ Hải Phòng. Nhóm VI gồm 1 mẫu từ Di Linh-Lâm Đồng. Nhóm VII gồm 1 mẫu thu từ Nha Trang. Kết quả cho thấy các mẫu giống lan ở các địa điểm thu thập có mối quan hệ di truyền gần nhau. Kết quả đánh giá đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị phân tử SSR của đề tài là cơ sở dữ liệu đáng tin cậy phục vụ cho công tác đánh giá đa dạng di truyền, bảo tồn và lai tạo giống lan Giả hạc.

**KẾT LUẬN**

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 20 mẫu giống lan Giả hạc dựa trên 18 chỉ thị phân tử đã cho thấy có sự khác nhau nhất định giữa các giống thu thập từ các vùng sinh thái khác nhau của loài này ở Việt Nam. Trong đó, 77/79 alen đa hình cho 18 locus, với giá trị trung bình là 4,389 alen/locus và giá trị alen đa hình là 4,278 alen/locus. Mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu giống lan Giả hạc còn được thể hiện ở hệ số đa dạng di truyền PIC cao đạt 0,699. Ngoài ra, nghiên cứu này đã sàng lọc và phát hiện được 12/18 chỉ thị phân tử SSR có hệ số đa dạng di truyền cao (hệ số PIC>0,65) có thể được ứng dụng trong các nghiên cứu tiếp theo trong việc phân tích, đánh giá giống và xác định nguồn gốc giống. Các kết quả trên cho thấy các mẫu giống lan Giả hạc có nguồn gốc từ các vùng sinh thái khác nhau có sự đa dạng di truyền nhất định, đây là nguồn gen quý cần được bảo tồn đồng thời có thể sử dụng trong việc lai tạo ra các giống lan mới trong tương lai.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp kinh phí theo hợp đồng số 12/2019/HĐ-QPTKHCN để thực hiện nghiên cứu trên. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Boonsrangsom T, Pongtongkam P, Masuthon S, Peyachoknagul S (2012). Development of microsatellite markers for *Dendrobium* orchids. *Genom Genet* 1: 47-56.
- Cai X, Feng Z, Hou B, Xing W, Ding X (2012). Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Dendrobium loddigesii* Rolfe, an endangered orchid in China. *Biochem Sys Ecol* 43: 42-47.
- Chase MW (2005). Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Bot Mag* 22: 2-7.
- De Hert K, Jacquemyn H, Van Glabeke S, Roldán-Ruiz I, Vandepitte K, Leus L, Honnay O (2011). Patterns of hybridization between diploid and derived allotetraploid species of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) co-occurring in Belgium. *Amer J Bot* 98: 946-955.
- Doyle JJ (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Dressler RL (1993). Phylogeny and classification of the orchid family. *Cambridge University Press*.
- Gupta PK, Varshney R (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Liu Y, Chen R, Lin S, Chen Y, Chin S, Chen F, Lee C (2014). Analysis of sequence diversity through internal transcribed spacers and simple sequence repeats to identify *Dendrobium* species. *Genet Mol Res* 13: 2709-2717.
- Phillips RL, Vasil IK (2013). DNA-based markers in plants, Vol 6. *Springer Science & Business Media*.
- Shariflou M, Hassani M, Sharp P (2001). A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the Wx-D1 gene of wheat. *Plant Breed* 120: 121-124.
- Yue GH, LAM-CHAN L, Hong Y (2006). Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. *Mol Ecol Res* 6: 832-834.

## ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY WITHIN *Dendrobium anosmum* SPECIES BASED ON SSR MARKERS

Huynh Huu Duc\*, Nguyen Truong Giang, Nguyen Hoang Cam Tu, Duong Hoa Xo

*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City*

**SUMMARY**

*Dendrobium anosmum* is a valuable orchid species, widely distributed and adapted to various ecogeological regions in Vietnam. To evaluate genetic resource diversity of this orchid species for conservation and breeding purposes, 20 accessions were collected, and then analysed based on SSR markers. The results showed that a total of 79 alleles were detected from 18 SSRs, among them 77 alleles were polymorphic, with an average of 4.28 alleles per locus. From the analysis of 18 SSRs on 20 orchid accessions, 7 main groups were clustered, with the genetic distance of 0.172. The polymorphic values among the collected samples obtained from 0.237 to 0.992 with an average of 0.699. The results indicated that the *Dendrobium anosmum* collections from different ecological regions showed high genetic diversity, which are valuable germplasms need to conserve and can be used for further breeding purposes. Moreover, the screened SSRs of this study promisingly could be used as effective markers for assessing *Dendrobium anosmum* species in particular and other species of *Dendrobium* genus in general.

*Keywords:* *Dendrobium anosmum*, genetic diversity, SSR markers.

\* Author for correspondence: Tel: +84-967.137.046; Email: huuduchuyh82@gmail.com