

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN MỘT SỐ LOÀI LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus* sp.) TẠI THANH HÓA BẰNG CHỈ THỊ RAPD

Nguyễn Trọng Quyền¹, Nguyễn Thị Huyền², Bùi Văn Thắng²,
Nguyễn Thị Hải Hà², Hoàng Văn Sâm²

¹Viện Nông nghiệp Thanh Hóa

²Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Chi Lan Kim tuyến (*Anoectochilus*) thuộc họ Lan (Orchidaceae) có 17 loài được ghi nhận phân bố ở Việt Nam, trong đó nhiều loài đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên. Nhằm mục đích bảo tồn và phát triển nguồn gen các loài Lan Kim tuyến. Trong nghiên cứu này, sử dụng chỉ thị RAPD để đánh giá mức độ đa dạng di truyền nguồn gen của 8 cá thể thuộc 4 loài Lan Kim tuyến *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Anoectochilus calcareus* Aver, *Anoectochilus annamensis* Aver, *Anoectochilus setaceus* Blume thu thập tại các Khu bảo tồn thiên nhiên tỉnh Thanh Hóa. Kết quả với 18 mồi RAPD thu được 97 phân đoạn ADN được nhân bản với 71 phân đoạn đa hình chiếm 73,2%. Mức độ đa dạng di truyền giữa các loài nằm trong khoảng từ 9% đến 48%. Cây quan hệ di truyền của các mẫu Lan Kim tuyến chia thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm 3 mẫu, gồm loài *A. formosanus* Hayata thu tại khu bảo tồn các loài hạt trần quý hiếm Nam Động và loài *A. annamensis* Aver thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên với độ tương đồng di truyền 67% (tương ứng với sai khác 33%); nhóm 2 gồm 5 mẫu gồm loài *A. annamensis* Aver thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Luông và loài *A. setaceus* Blume với độ tương đồng di truyền là 79% (tương ứng với sai khác 21%). Sự khác biệt di truyền giữa các loài Lan Kim tuyến cũng như giữa các cá thể khác nhau trong cùng một loài cho thấy nguồn gen này cần được bảo tồn hữu hiệu để phục vụ tốt cho công tác chọn tạo và nhân giống trong tương lai.

Từ khóa: bảo tồn, chỉ thị RAPD, đa dạng di truyền, Lan Kim tuyến, Thanh Hóa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các loài thực vật thuộc chi Lan Kim tuyến (*Anoectochilus* Blume) thường mọc sâu trong các tầng rừng ẩm với khoảng 51 loài phân bố trên một khu vực khá rộng, từ vùng Himalaya đến Đông Nam Á, miền Nam Trung Quốc, Úc, Papua New Guinea và một số hải đảo thuộc quần đảo Thái Bình Dương; Việt Nam có 17 loài như *A. formosanus* Hayata, *A. calcareus* Aver, *A. annamensis* Aver, *A. setaceus* Blume... (Sách Đỏ Việt Nam, 2007; Nguyễn Trọng Quyền và cộng sự, 2020). Các loài thuộc chi Lan Kim tuyến hình thái đẹp có giá trị làm cảnh, đặc biệt giá trị dược liệu quý đối với sức khỏe con người (Võ Văn Chi, 2003; Chuan Gao, 2009). Các loài Lan Kim tuyến thường mọc rải rác ở các vùng phân bố bị chia cắt, số lượng cá thể của mỗi khu vực thường rất ít. Bên cạnh đó, do khả năng nảy mầm ngoài tự nhiên hạn chế cùng với sự khai thác bừa bãi của con người dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng đang ngày càng cao, quỹ gen tự nhiên ngày càng giảm sút nghiêm trọng. Để có cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen hữu hiệu, việc tiến hành đánh giá

đa dạng di truyền quần thể Lan Kim tuyến là rất cần thiết.

Phương pháp phân tích đa dạng di truyền bằng các chỉ thị phân tử như RFLP, AFLP, SSR, RAPD... không phụ thuộc vào điều kiện môi trường và cho kết quả chính xác (Mace et al., 1999). Trong đó, chỉ thị RAPD được sử dụng khá phổ biến trên nhiều đối tượng sinh vật, bởi sự nhanh chóng, đơn giản nhưng vẫn cho kết quả tin cậy. Xuất phát từ thực tiễn trên, công trình này đề cập đến kết quả phân tích đa dạng di truyền của 8 mẫu Lan Kim tuyến thuộc 4 loài (*Anoectochilus formosanus* Hayata, *Anoectochilus calcareus* Aver, *Anoectochilus annamensis* Aver, *Anoectochilus setaceus* Blume) thu thập tại các khu bảo tồn thiên nhiên tỉnh Thanh Hóa, nhằm cung cấp thêm thông tin cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen các loài Lan Kim tuyến.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là mẫu lá thu từ 4 loài Lan kim tuyến (Loài *A. formosanus* thu 1 mẫu, loài *A. calcareus* Aver thu 1 mẫu, loài

A.annamensis Aver thu 2 mẫu và loài *A. setaceus* Blume thu 4 mẫu từ các khu bảo tồn

tỉnh Thanh hóa. Vị trí thu mẫu và ký hiệu mẫu như trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ký hiệu các mẫu lan Kim tuyến sử dụng cho nghiên cứu

TT	Kí hiệu	Tên loài	Địa điểm thu mẫu/Tọa độ VN2000, múi 3 ⁰ , KKT 105 ⁰
1	KT1	<i>Anoectochilus formosanus</i> Hayata	Khu bảo tồn các loài hạt trần quý hiếm Nam Động/Tọa độ X 488.379, Y2268.551
2	KT2	<i>Anoectochilus calcareus</i> Aver	Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Luông / Tọa độ X 507.683, Y 2271.314
3	KT3	<i>Anoectochilus annamensis</i> Aver	Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên/ Tọa độ X 518.246, Y 2201.246
4	KT4	<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume	Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên/ Tọa độ X 506.475, Y 2210.143
5	KT5	<i>Anoectochilus annamensis</i> Aver	Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên/ Tọa độ X 500.214, Y 2209.471
6	KT6	<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume	Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Hu / Tọa độ X 486.785, Y 2266.292
7	KT7	<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume	Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên/ Tọa độ X 516.949, Y 2193.322.
8	KT8	<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume	Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Luông / Tọa độ X522.661, Y2263.147

Hóa chất sử dụng để tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá: Kit tách chiết ADN tổng số (DNA isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN sử dụng Master mix của hãng iNtRon Biotechnology, Hàn Quốc; điện di trên

gel Agarose, DNA marker, Redsafe của hãng Norgen.

Các môi ngẫu nhiên có chiều dài 10 nucleotide được sử dụng trong nghiên cứu được mô tả như bảng 2.

Bảng 2. Trình tự các môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)
1	CP03	AGGTGACCGT	38
2	CP04	GTTTCGCTCC	38
3	CP06	TGCGCCCTTC	38
4	CP08	AGGGAACGAG	38
5	CP09	CCACAGCAGT	38
6	CP10	GTGAGGCGTC	36
7	CP11	CCGCATCTAC	36
8	CP13	TGGACCGGTG	38
9	CP15	AGTCAGCCAC	38
10	OPB10	CTGCTGGGAC	36
11	OPB18	CCACAGCAGT	35
12	OPD11	AGCGCCATTG	37
13	OPG13	CTCTCCGCCA	39
14	OPE14	TGCGGCTGAT	40
15	OPE20	AACGGTGACC	35
16	RA46	CCAGACCCTG	35
17	RA142	CCTTGACGCA	36
18	RA159	GTTACACGG	40

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá Lan Kim tuyến theo hướng dẫn của bộ Kit tách chiết ADN của hãng Norgen. Xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch ADN tổng số bằng phương pháp quang phổ kế trên máy Nanodrop 2000. Nhân bản đoạn gen bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ), mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng phản ứng 20 μ l, bao gồm: H₂O deion (8 μ l), 2x PCR Master mix Solution (10 μ l), 10 pmol/ μ l mỗi (1,0 μ l), ADN tổng số (1 μ l tương ứng 50 ng). Chu trình nhiệt PCR: biến tính 94°C 5 phút, tiếp theo 35 chu kỳ [94°C - 45 giây, 35 - 40°C (bảng 2) - 45 giây, 72°C - 1 phút], 72°C trong 7 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%, nhuộm gel bằng redsafe, soi dưới đèn UV và chụp ảnh bằng hệ thống Dolphin - Doc Image system của hãng Wealtec (Mỹ). Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Dựa vào hình ảnh điện di sản phẩm RAPD,

sự xuất hiện các băng điện di được ước lượng kích thước và thống kê các băng điện di với từng mẫu nghiên cứu. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 để xác định mức độ tương đồng di truyền trong các mẫu nghiên cứu dưới dạng ma trận băng và sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Lan kim tuyến. Hàm lượng thông tin tính đa hình (Polymorphism information content – PIC) của mỗi môi sử dụng được tính theo công thức $PIC = 1 - \sum p_i^2$, trong đó P_i là tần số của allele thứ i của kiểu gen được kiểm tra. Phạm vi giá trị PIC từ 0 (không đa hình) tới 1 (đa hình hoàn toàn).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích đa hình ADN của các mẫu Lan Kim tuyến

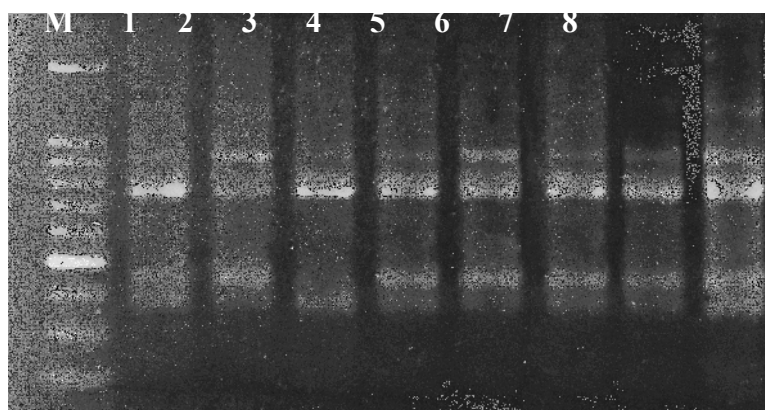
ADN tổng số của các mẫu Lan Kim tuyến sau khi tách chiết được kiểm tra bằng điện di và đo OD, kết quả cho thấy tất cả các mẫu ADN đều có độ nguyên vẹn và độ sạch cao ($OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8 - 2,0$). Các mẫu ADN được pha loãng để thực hiện phản ứng RAPD.

Bảng 3. Kết quả phân tích đa hình mỗi RAPD trong nghiên cứu

TT	Tên môi	PIC	Tổng số phân đoạn ADN	Số phân đoạn ADN đa hình	Tỉ lệ % số phân đoạn ADN đa hình
1	CP03	0,19	7	4	57,1
2	CP04	0,33	6	5	83,3
3	CP06	0,33	7	4	57,1
4	CP08	0,51	5	4	80,0
5	CP09	0,49	5	3	60,0
6	CP10	0,68	4	3	75,0
7	CP11	0,46	3	2	66,7
8	CP13	0,71	4	3	75,0
9	CP15	0,74	8	5	62,5
10	OPB10	0,54	7	6	85,7
11	OPB18	0,70	4	3	75,0
12	OPD11	0,52	10	8	80,0
13	OPG13	0,56	4	3	75,0
14	OPE14	0,08	3	1	33,3
15	OPE20	0,27	6	3	50,0
16	RA46	0,50	5	4	80,0
17	RA142	0,35	3	2	66,7
18	RA159	0,50	6	5	83,3
Tổng trung bình		0,46	97	71	73,2

Phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu Lan Kim tuyến bằng 18 chỉ thị RAPD ngẫu nhiên thu được 97 phân đoạn ADN, trong đó có 71 phân đoạn ADN đa hình, chiếm tỉ lệ 73,2%. Kết quả RAPD cho thấy tất cả các môi sử dụng đều đa hình; tuy nhiên, mức độ đa hình của các môi rất khác nhau, dao động từ 33,3 - 85,7%, trong đó môi OPB10 có mức độ đa hình cao nhất với 6/7 phân đoạn ADN đa hình, chiếm tỉ lệ 85,7%; môi có tỉ lệ đa hình thấp nhất là môi OPE14 (33,3%). Hầu hết các môi có mức độ đa hình các phân đoạn ADN được nhân bản ngẫu nhiên $\geq 50\%$. Có thể thấy rằng, các môi sử dụng có khả năng phản ánh

mức độ đa dạng di truyền của các mẫu nghiên cứu. Khi phân tích hàm lượng thông tin đa hình thể hiện ở giá trị PIC (Polymorphism information content), cho thấy giá trị PIC dao động giữa các môi từ 0,08 đến 0,74 và đạt trung bình giữa các môi là 0,46 phản ánh phù hợp với mức độ đa hình của các môi. Giá trị PIC thấp nhất 0,08 (môi OPE14) và cao nhất là 0,74 (môi CP15). Trong đó, 10/18 môi có giá trị PIC $\geq 0,5$. Kết quả này một lần nữa khẳng định tính đa hình của các môi sử dụng và mức độ đa dạng di truyền giữa các mẫu Lan Kim tuyến nghiên cứu.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR – RAPD với môi OPE20.

Ghi chú: M-Marker 100 bp, giếng 1-8: mẫu theo thứ tự 1-8 như mô tả ở bảng 1.

Nguyễn Thị Thơ và cộng sự (2014) nghiên cứu tính đa dạng di truyền loài Kim tuyến đá vôi (*Anoectochilus calcareus* Aver.) tại Quận Bạ, Hà Giang cho thấy mức độ đa hình giữa các môi cũng rất khác nhau dao động từ 3,23 - 79,79%. Sự đa hình ở các môi RAPD cho thấy có sự đa dạng di truyền giữa các cá thể Lan Kim tuyến *A. calcareus* Aver không cao nằm trong khoảng 2 - 25%. Điều này cho thấy, mặc dù các loài cùng trong chi *Anoectochilus* nhưng các loài khác nhau hay các xuất xứ khác nhau thì mức độ đa dạng truyền giữa các cá thể trong quần thể là rất khác biệt.

3.3. Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các loài Lan kim tuyến nghiên cứu

Từ kết quả điện di, phân tích sự biến động

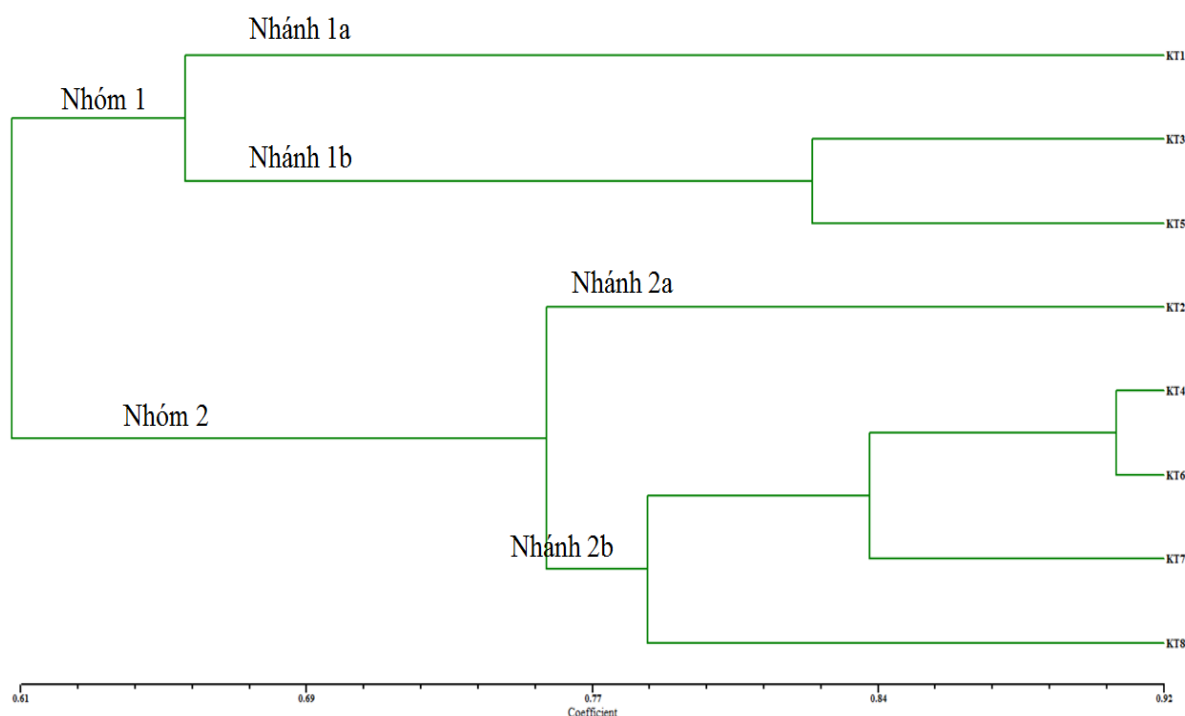
di truyền của các mẫu Lan Kim tuyến nghiên cứu phụ thuộc vào sự giống nhau hay khác nhau về số phân đoạn ADN và kích thước của các phân đoạn ADN thu được từ phản ứng RAPD với 18 môi ngẫu nhiên. Việc phân tích các phân đoạn ADN thu được dựa trên sự có mặt hay vắng mặt ở các mẫu nghiên cứu. Số liệu sau khi mã hóa 0 (phân đoạn ADN không xuất hiện) và 1 (phân đoạn ADN xuất hiện) được xử lý bằng phần mềm NTSYSpc v2.1. Ma trận hệ số tương đồng và cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa theo hệ số tương đồng di truyền Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA, kết quả hệ số tương đồng di truyền được trình bày như bảng 4.

Bảng 4. Hệ số tương đồng di truyền khi so sánh theo từng cặp của 8 mẫu Lan kim tuyến

	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8
KT1	1,00							
KT2	0,67	1,00						
KT3	0,67	0,73	1,00					
KT4	0,52	0,76	0,56	1,00				
KT5	0,64	0,74	0,83	0,59	1,00			
KT6	0,53	0,77	0,59	0,91	0,58	1,00		
KT7	0,61	0,75	0,57	0,87	0,58	0,81	1,00	
KT8	0,61	0,72	0,60	0,79	0,61	0,76	0,78	1,00

Kết quả thu được cho thấy rằng, hệ số tương đồng di truyền giữa các mẫu Lan Kim tuyến nghiên cứu nằm trong khoảng từ 0,52 giữa mẫu KT1 (*A. formosanus* Hayata) thu tại Khu bảo tồn các loài hạt trần quý hiếm Nam Động và mẫu KT4 (*A. setaceus* Blume) thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên, đến 0,91 khi so sánh giữa mẫu KT4 thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên và mẫu KT6 thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Hu, cả 2 mẫu này

đều thuộc loài *A. setaceus* Blume. Hệ số tương đồng di truyền giữa 2 mẫu càng lớn thì mức độ đa dạng di truyền càng nhỏ và ngược lại, 2 mẫu có hệ số tương đồng càng thấp thì mối quan hệ di truyền giữa chúng càng xa nhau. Hay nói cách khác mức độ đa dạng của các mẫu nghiên cứu khá cao nằm trong khoảng 0,09 (1 - 0,91) đến 0,48 (1 - 0,52), tương ứng từ 9% đến 48%.



Hình 2. Sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ di truyền của 8 mẫu Lan Kim tuyến nghiên cứu.

Từ giá trị so sánh hệ số tương đồng di truyền, phần mềm NTSYSpc v2.1 tự động sắp xếp sơ đồ hình cây tính theo hệ số Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA đã chỉ ra mức độ sai khác di truyền giữa mẫu Lan Kim tuyến. Mức

độ khác nhau được biểu hiện bằng hệ số sai khác giữa các mẫu. Các mẫu có hệ số tương đồng di truyền cao sẽ được xếp vào một nhóm, giữa các nhóm lại có sự liên hệ với nhau (hình 3). Kết quả cho thấy, 8 mẫu Lan Kim tuyến

nghiên cứu được chia thành 2 nhóm chính (kí hiệu Nhóm 1 và Nhóm 2) với mức độ tương đồng di truyền là 0,61 (tương ứng 61%). Nhóm 1 gồm có 3 mẫu chia thành 2 nhánh: nhánh 1a là mẫu KT1 loài *A. formosanus* Hayata thu tại Khu bảo tồn các loài hạt trần quý hiếm Nam Động có mức độ tương đồng di truyền với nhánh 2 là 0,67 (tương ứng 67%). Nhánh 2a gồm 2 mẫu KT3 và KT5 đều thuộc loài *A. annamensis* Aver được thu tại các vị trí khác nhau trong Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên có độ tương đồng di truyền là 0,83 (tương ứng 83%). Nhóm 2 gồm 5 mẫu còn lại được chia thành 2 nhánh nhỏ với mức độ tương đồng di truyền là 0,79 (tương ứng 79%). Nhánh 1b chỉ có 1 mẫu KT2 loài *A. annamensis* Aver thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Luông và nhánh 2b bao gồm 4 mẫu còn lại KT4, KT6, KT7 và KT8 đều thuộc cùng một loài *A. setaceus* Blume. Trong đó, có 2 mẫu KT4 và KT6 có độ tương đồng di truyền cao 0,91 (tương ứng 91%).

Như vậy, dựa vào kết quả phân tích mối tương quan di truyền bằng 18 chỉ thị RAPD cho thấy có sự đa dạng di truyền giữa các mẫu Lan Kim tuyến. Mức độ đa dạng di truyền giữa 4 loài Lan Kim tuyến *A. formosanus* Hayata, *A. calcareus* Aver, *A. annamensis* Aver và *A. setaceus* Blume là khá cao; còn các cá thể trong cùng một loài Lan Kim tuyến *A. setaceus* Blume mặc dù được thu tại các vị trí khác nhau nhưng có mức độ đa dạng di truyền thấp 0,09 - 0,22 (tương ứng 9 - 22%).

Tương tự, Nguyễn Thị Thơ và cộng sự (2014) đánh giá tính đa dạng di truyền loài Lan Kim tuyến đá vôi *Anoetochilus calcareus* Aver. tại Quận Bạ, Hà Giang bằng chỉ thị RAPD cho thấy mức độ sai khác di truyền giữa các mẫu nghiên cứu trong cùng một loài thấp từ 2 - 25%. Ngoài việc sử dụng chỉ thị RAPD để đánh mức độ đa dạng di truyền các loài Lan Kim tuyến, Cheng và cs (1997) đã sử dụng chỉ thị RAPD để phân biệt sự khác nhau giữa 2 loài Lan kim tuyến *A. formosanus*, *A. koshunensis*, thông qua sàng lọc 40 môi RAPD ngẫu nhiên, đã tìm ra được

9 môi đặc trưng cho loài *A. formosanus* và 10 môi đặc trưng cho loài *A. koshunensis*; các chỉ thị RAPD này có thể được áp dụng cho cả việc xác định loài *A. formosanus*, *A. koshunensis* và đánh giá mức độ lai tạo giữa 2 loài này. Ngoài sử dụng chỉ thị RAPD, Lin và cộng sự (2007) sử dụng chỉ thị ISSR và AFLP trong nghiên cứu mức độ biến đổi di truyền của 20 dòng tái sinh từ cùng một cá thể mẹ thuộc loài *Anoetochilus formosanus* Hayata, cho thấy sự biến đổi di truyền giữa các dòng nằm trong khoảng 0 - 5,43%. Zhang và cộng sự (2010) khảo sát tính ổn định di truyền các cây con vi nhân giống của loài *Anoetochilus formosanus* Hayata bằng kỹ thuật ISSR, cho thấy mức độ tương đồng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu là trên 94%, tỉ lệ đa hình là 2,76% trong tổng số 1810 phân đoạn DNA được nhân bản với 17 chỉ thị ISSR. Các kết quả nghiên cứu thu được đã cung cấp thêm thông tin khoa học về mức độ đa dạng di truyền của các loài Lan Kim tuyến góp phần định hướng công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây này hiệu quả.

4. KẾT LUẬN

Đánh giá đa hình ADN của 8 mẫu Lan Kim tuyến với 18 môi RAPD thu được 71/97 phân đoạn ADN đa hình, chiếm tỉ lệ 73,2%. 18 môi đều cho kết quả đa hình ADN với các mẫu Lan Kim tuyến giao động từ 33,3 - 85,7%.

Phân tích mức độ đa dạng di truyền của 8 mẫu Lan Kim tuyến thuộc 4 loài *A. formosanus* Hayata, *A. calcareus* Aver, *A. annamensis* Aver và *A. setaceus* Blume với 18 môi RAPD có sự sai khác khá cao từ 9% đến 48%. Cây quan hệ di truyền phân tách các mẫu nghiên cứu thành 2 nhóm: nhóm 1 gồm 3 mẫu, mẫu KT1 loài *A. formosanus* Hayata thu tại khu bảo tồn các loài hạt trần quý hiếm Nam Động và 2 mẫu KT3 và KT5 đều thuộc loài *A. annamensis* Aver thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên có độ tương đồng 67%; nhóm 2 gồm 5 mẫu là KT2 loài *A. annamensis* Aver thu tại Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Luông và 4 mẫu KT4, KT6, KT7 và KT8 đều thuộc loài *A. setaceus* Blume có độ tương đồng di

truyền là 79%. Sự khác biệt di truyền giữa các loài Lan Kim tuyến cũng như giữa các cá thể khác nhau trong cùng một loài cho thấy các nguồn gen này cần được bảo tồn hữu hiệu để phục vụ tốt cho công tác chọn tạo và nhân giống trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). Sách đỏ Việt Nam. Phần II Thực vật. NXB Khoa học và Công nghệ, Hà Nội, 401-402.
2. Cheng Kur-ta, Li-Chung Fu, Chang-Sheng Wang, Feng-Lin Hsu, Hsin-Sheng Tsay (1993). Identification of *Anoectochilus koshunensis* species with RAPD markers. *Planta Medica*, 64: 46-49.
3. Chuan Gao (2009) Identification of *Anoectochilus* based on rDNA ITS sequences alignment and SELDI-TOF-MS, *Int J Biol Sci.*, 5(7): 727-735.
4. Lin Shun-Fu, Tsay Hsin-Sheng, Chou Tsui-wei, Yang Ming-Jing, Cheng Kur-ta (2007). Genetic variation of *Anoectochilus formosanus* revealed by ISSR and AFLP analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(2): 156-162.

5. Mace E. S., Lester R. N., Gebhardt C. G. (1999). AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 626-633.
6. Nguyễn Thị Thơ, Nguyễn Thị Hải Hà, Phùng Văn Phê, Vũ Quang Nam, Đỗ Quang Trung, Hồ Hải Ninh (2014). Tính đa dạng di truyền loài Kim tuyến đá vôi (*Anoectochilus calcareus* Aver.) tại Quận Bạ, Hà Giang. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2: 20-24.
7. Nguyễn Trọng Quyền, Hoàng Văn Sâm, Bùi Văn Thắng (2020). Đa dạng và phân bố các loài thuộc chi Lan kim tuyến (*Anoectochilus* Blume) tại Thanh Hóa, Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. 12: 80-86.
8. Võ Văn Chi (2003). Từ điển thực vật thông dụng, tập I, NXB Khoa học và kỹ thuật: 296-297.
9. Zhang Fusheng, Yali Lv, Hailing Dong, Shunxing Guo (2010). Analysis of genetic stability through intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a medicinal plant. *Biol. Pharm. Bull.*, 33(3): 384-388.

GENETIC DIVERSITY OF *Anoectochilus* sp. IN THANH HOA PROVINCE

Nguyen Trong Quyen¹, Nguyen Thi Huyen², Bui Van Thang²,
Nguyen Hai Ha², Hoang Van Sam²

¹Thanh hoa Agriculture Institute

²Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Anoectochilus (Orchidaceae) has 17 species recorded in Vietnam, many of them are in danger of extinction in the wild due to their low natural regeneration and over exploitation. Assessment genetic diversity of *Anoectochilus* may contribute to the evaluation and conservation as well as provide genetic information. For the purpose of conservation and development genetic resources of species in *Anoectochilus*. In this study, using RAPD molecular indicator to evaluate genetic diversity of 8 individuals belongs 4 *Anoectochilus* species, including: *Anoectochilus formosanus* Hayata, *Anoectochilus calcareus* Aver, *Anoectochilus annamensis* Aver, *Anoectochilus setaceus* Blume that have been collected at the Nature Reserve of Thanh Hoa province. Results with 18 RAPD primers obtained 97 DNA segments that were randomly cloned with 71 polymorphic DNA segments accounting for 73.2%. Genetic diversity between species ranges from 9% to 48%. Genetic relationship of *Anoectochilus* sample are divided into 2 groups: group 1 includes 3 samples, including *A. formosanus* Hayata collected in Nam Dong nature reserve and species *A. annamensis* Aver in Xuan Lien nature reserve with genetic similarity of 67%. Group 2 includes 5 samples including *A. annamensis* Aver collected in Pu Luong natural reserve and *A. setaceus* Blume species with genetic similarity of 79%. Genetic differences among species of *Anoectochilus* as well as between different individuals of the same species shows that these genetic resources need to be conserved effectively for future development.

Keywords: *Anoectochilus* sp., conservation, genetic diversity, RAPD, Thanh Hoa.

Ngày nhận bài : 13/11/2020

Ngày phản biện : 20/3/2021

Ngày quyết định đăng : 25/3/2021