

Analysis of genetic diversity of *Cymbidium finlaysonianum* based on SSR markers

Giang T. Nguyen^{1,2}, Thao P. Pham¹, Hien T. X. Nguyen¹, Biet V. Huynh³, & Duc H. Huynh^{1*}

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University,
Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: February 26, 2025

Revised: April 23, 2025

Accepted: May 07, 2025

Keywords

Cluster analysis

Cymbidium finlaysonianum

Genetic diversity

Primer

SSR markers

*Corresponding author

Huynh Huu Duc

Email:

hhduc.snn@tphcm.gov.vn

ABSTRACT

Cymbidium finlaysonianum is one of the Vietnamese orchid species, diverse in shape and color of flowers, with high economic value, but the genetic resources of this species have been depleted due to overexploitation. A total of 32 *C. finlaysonianum* samples were collected and evaluated for genetic diversity based on SSR markers. The results showed that 12 primers showed high polymorphism with an average polymorphic allele frequency of 0.22 and an average allele number of 3.5 alleles/primer, ranging from 2 to 6 alleles/primer. In addition, the high genetic diversity between these samples was also recorded through the polymorphic information content of 0.79, ranging from 0.58 to 0.94. The results of genetic relationship analysis showed that these samples had genetic diversity coefficients ranging from 0.02 to 0.4 with an average of 0.17. Cluster analysis displayed that 32 *C. finlaysonianum* samples were divided into 06 main groups. Group (Ia, Ib) consisted of 18 samples, group Ic comprised 04 samples, group IIa comprised 07 samples, group IIb comprised 02 samples, and group III showed only 01 sample. These results could be useful information for the genetic conservation and development of new *C. finlaysonianum* varieties in the future.

Cited as: Nguyen, G. T., Pham, T. P., Nguyen, H. T. X., Huynh, B. V., & Huynh, D. H. (2026). Analysis of genetic diversity of *Cymbidium finlaysonianum* based on SSR markers. *The Journal of Agriculture and Development* 25(2), 52-63.

Đánh giá đa dạng di truyền lan kiếm tiên vũ (*Cymbidium finlaysonianum*) dựa trên chỉ thị SSR**Nguyễn Trường Giang^{1,2}, Phạm Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Xuân Hiền¹, Huỳnh Văn Biết³****& Huỳnh Hữu Đức^{1*}**¹Trung Tâm Công Nghệ Sinh Học TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh²Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh³Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh**THÔNG TIN BÀI BÁO****Bài báo khoa học**

Ngày nhận: 26/02/2025

Ngày chỉnh sửa: 23/04/2025

Ngày chấp nhận: 07/05/2025

Từ khóa

Chỉ thị SSR

Cymbidium finlaysonianum

Đa dạng di truyền

Phân tích phân nhóm

Primer

***Tác giả liên hệ**

Huỳnh Hữu Đức

Email:

hhduc.snn@tphcm.gov.vn

TÓM TẮT

Lan kiếm tiên vũ (*Cymbidium finlaysonianum*) là một trong những loài lan kiếm bản địa Việt Nam, đa dạng về hình thái và màu sắc, có giá trị cao nhưng đang bị suy kiệt nguồn gen do sự khai thác quá mức. Nghiên cứu này đánh giá đa dạng di truyền 32 mẫu lan kiếm tiên vũ dựa trên chỉ thị sinh học phân tử SSR nhằm phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển giống. Kết quả cho thấy 12 primer SSR hiển thị tính đa hình cao với tần số alen đa hình trung bình là 0,22; số lượng alen trung bình 3,5 alen/primer, dao động từ 2 - 6 alen/primer. Bên cạnh đó, sự đa dạng di truyền cao giữa các mẫu lan kiếm cũng được ghi nhận qua hệ số đa hình (Polymorphic information content, PIC) là 0,79; dao động từ 0,58 đến 0,94. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền cho thấy các mẫu lan kiếm thu thập có khoảng cách đa dạng di truyền dao động từ 0,02 - 0,4 với giá trị trung bình là 0,17 và cây phân nhóm di truyền chia thành 06 nhóm chính, nhóm I (Ia, Ib) gồm 18 mẫu, nhóm Ic (04 mẫu), IIa (07 mẫu), IIb (02 mẫu) và III gồm 01 mẫu. Dữ liệu di truyền dựa trên chỉ thị SSR này hữu ích cho công tác lai tạo giống mới và bảo tồn nguồn gen lan kiếm tiên vũ nói riêng cũng như các loài thuộc chi *Cymbidium* nói chung.

1. Đặt Vấn Đề

Chi lan kiếm (*Cymbidium*) là một trong những chi quan trọng thuộc họ lan (Orchidaceae) bao gồm nhiều loài đã được lai tạo, trồng và thương mại hóa thành công. Có khoảng 50 loài lan thuộc chi *Cymbidium* thích nghi đa dạng với nhiều vùng khí hậu từ vùng cận nhiệt đới đến vùng nhiệt đới, trải dài từ Tây Bắc dãy núi Himalayas

đi qua Arunachal Pradesh, Bhutan, China, Japan, Malaysia và kéo dài đến phía Bắc nước Úc (Nayak và ctv., 2006; Yang và ctv., 2013). Trong đó, ở Việt Nam hiện ghi nhận được 21 loài với 4 loài lan kiếm lá cứng phổ biến là *Cymbidium aloifolium* (Lan kiếm Lô hội), *Cymbidium finlaysonianum* (Lan kiếm tiên Vũ), *Cymbidium bicolor* (Lan kiếm hai màu) và *Cymbidium atropurpureum* (Lan kiếm treo) (Tran, 2000). Lan kiếm tiên vũ

có nhiều giống mang các đặc tính đa dạng về cấu trúc, màu sắc hoa, cũng như hình dạng, kích thước và màu sắc thân, lá. Điều này đã chứng minh bằng sự đa dạng về các giống lan kiếm tiên vũ đã được thuần hóa, trồng và thương mại hóa trên thị trường. Tuy nhiên, bên cạnh những ưu điểm trên, tình trạng khai thác quá mức nguồn gen lan kiếm hoang dại cũng như việc phát triển các giống lan kiếm tiên vũ lai tạo mới còn hạn chế là vấn đề đặt ra cho các nhà phát triển giống và trồng lan. Điều này cho thấy sự cần thiết phải thực hiện việc đánh giá, phân tích di truyền nguồn gen lan kiếm này nhằm mục tiêu bảo tồn, lưu trữ, phát triển và lai tạo giống mới một cách hiệu quả.

Chỉ thị phân tử DNA như AFLP (amplified fragment length polymorphism), RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeats-SSR), DNA barcode, SNP (single nucleotide polymorphism), ISSR (inter-simple sequence repeats), cpDNA (polymorphism analysis cpDNA) đã và đang được sử dụng trong nghiên cứu, đánh giá đa dạng di truyền, xác định nguồn gốc bố mẹ, phân tích gen mục tiêu, phân tích sự biến đổi di truyền,... một cách có hiệu quả trên nhiều đối tượng cây trồng. Trong đó, chỉ thị phân tử SSR đã được sử dụng nhiều trong việc đánh giá đa dạng di truyền, xây dựng bản đồ di truyền, đánh giá nguồn gen và ứng dụng trong chọn tạo nhiều giống cây trồng (Silva & ctv., 2016). Đối

với hoa lan nói chung, việc sử dụng chỉ thị phân tử SSR đã được nghiên cứu trên nhiều loài lan thuộc các chi như *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Rhynchostylis* (Anuttato & ctv., 2017; Chung & ctv., 2017; Zhao & ctv., 2019). Đối với các loài lan thuộc chi *Cymbidium*, các thông tin về chỉ thị SSR đã được nghiên cứu và xác định trên một số loài như *C. ensifolium*, *C. Goeringii*, *C. sinense* (Xia & ctv., 2008; Moe & ctv., 2010; Lee & ctv., 2020). Các nghiên cứu này, đã đánh giá và chọn lọc một số primer SSR có hiệu quả trong việc đánh giá đa dạng di truyền, xây dựng bản đồ gen và ứng dụng trong lai tạo giống. Tuy nhiên, đối với loài lan kiếm tiên vũ, việc nghiên cứu và đánh giá đa dạng di truyền, phân tích nguồn gen chưa được nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, chỉ thị sinh học phân tử SSR được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen lan kiếm tiên vũ được thu thập tại các khu vực ở Việt Nam nhằm phục vụ công tác lưu trữ, bảo tồn và phát triển nguồn gen lan kiếm tiên vũ.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

Tổng số 32 mẫu lan kiếm tiên vũ (*C. finlaysonianum*) được thu thập ở một số địa phương gồm Đắk Lắk, Gia Lai, Quảng Nam, Tây Ninh, Kon Tum, Lâm Đồng, Bình Phước, Đắk Nông, Đà Nẵng, Thừa Thiên Huế và Quảng Trị (Bảng 1; Hình 1) được sử dụng trong đánh giá đa dạng di truyền.

Bảng 1. Danh sách 32 mẫu lan kiếm tiên vũ được thu thập từ các địa điểm

TT	Mã hóa	Tên tiếng Việt	Tên khoa học	Địa điểm thu thập mẫu
01	CF01	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Kon Tum (Vườn Quốc Gia Chư Mơ Ray)
02	CF02	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Gia Lai (Vườn Quốc Gia Kon Ka Kinh)
03	CF03	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Lắk (Vườn Quốc Gia Chư Yang Sin)
04	CF04	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Nông (Vườn Quốc Gia Tà Đùng)
05	CF05	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Lâm Đồng (Vườn Quốc Gia Bidoup Núi Bà)
06	CF06	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Lắk (Vườn Quốc Gia Yok Đôn)
07	CF07	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Bình Phước (Vườn Quốc Gia Bù Gia Mập)
08	CF08	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Kon Tum (Vườn Quốc Gia Chư Mơ Ray)
09	CF09	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Gia Lai
10	CF10	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Tây Ninh (Vườn Quốc Gia Lò Gò-Xa Mát)
11	CF11	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Kon Tum
12	CF12	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Gia Lai
13	CF13	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Bình Phước
14	CF14	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đà Nẵng
15	CF15	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Quảng Nam (Vườn Quốc Gia: Sông Thanh)
16	CF16	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đà Nẵng (Bà Nà-Núi Chúa)
17	CF17	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Quảng Nam (Vườn Quốc Gia: Sông Thanh)
18	CF18	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Quảng Trị
19	CF19	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đà Nẵng
20	CF20	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Lắk
21	CF21	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Lắk
22	CF22	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Quảng Nam
23	CF23	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Kon Tum
24	CF24	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Quảng Nam
25	CF25	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Bình Phước
26	CF26	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đà Nẵng
27	CF27	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Lắk
28	CF28	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Lâm Đồng
29	CF29	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Thừa Thiên Huế
30	CF30	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Gia Lai (Vườn Quốc Gia Kon Ka Kinh)
31	CF31	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Kon Tum
32	CF32	Lan kiếm Tiên vũ	<i>C. finlaysonianum</i>	Đắk Lắk (Khu dự trữ thiên nhiên Nam Kar)



Hình 1. Đặc điểm hình thái của một số mẫu giống lan kiếm tiên vũ (*C. finlaysonianum*) được sử dụng trong nghiên cứu.

2.1. Ly trích DNA tổng số

Lá của 32 mẫu lan kiếm tiên vũ được sử dụng để tách chiết DNA tổng số bằng Kit GeneJET Plant genomic DNA Purification (ThermoFisher

Scientific, Hoa Kỳ). Độ tinh sạch và nồng độ của các dịch chiết DNA được kiểm tra bằng phương pháp điện di gel agarose 0,8% và trên máy Nano drop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ).

2.2. Chọn lọc chỉ thị sinh học phân tử SSR để đánh giá đa dạng di truyền lan kiểm tiền vũ

DNA tổng số của mẫu lan kiểm tiền vũ được gộp thành 03 nhóm mẫu DNA (mỗi nhóm gồm

DNA của mẫu có đặc điểm hình thái tương tự nhau) được sử dụng để thực hiện PCR sàng lọc với 32 primer SSR.

Bảng 2. Danh sách 32 primer SSR được sử dụng để sàng lọc trong đánh giá đa dạng di truyền lan kiểm tiền vũ

TT	Primer	Trình tự lặp lại	Kích thước dự kiến (bp)	Trình tự primer 5' --> 3'	Ta (°C)	Nguồn
1	SSR01	(AC) ₈	400 - 500	AACGCCATGTCCAATACCC GGAGGGCTTATTTGCAGCG	54	(Li & ctv., 2014)
2	SSR03	(AC) ₈	400 - 500	GACCGCAGCGTTAATGACC CTCGGTTTCATTTGCAGCCC	55	
3	SSR08	(AC) ₁₀	100 - 200	TGCTGGAATACATGCGAGAC GTTTGCCGAAGCCAGTGC	55	
4	SSR18	(AG) ₁₁	300	TGAAACGGTTGGCTCTAGTTC AGCAAGCACTGACCTGAAAC	54	
5	SSR21	(GT) ₈	300 - 500	TGGGCGACAGATCGAGTTC ACATGGACCACAGCATTC	55	
6	SSR22	(GT) ₉	200 - 300	TATGCGTCTCTCCCAACCG AAGCTAGTGGCCTTTGGTG	54	
7	SSR26	(AAG) ₇	100 - 250	GCTTTATGCGACATCTGCG CGTCGGTTCATGCACATC	53	
8	SSR34	(AGG) ₆	700 - 900	GAGAGGGAATTGCAGTGGC ACCGAGCTAGCACTTCATC	54	
9	SSR36	(ATC) ₅	400 - 500	AGTATTGGACCCCTCCAGGC AGAGGATCATGGTGTTAGGC	54	
10	SSR43	(CCG) ₅	200 - 300	GACGACATATCGCGTTCGG CTCAGCCACACCCAAGAGG	55	
11	SSR44	(CCG) ₅	500	GGAGCTGCATACGCAAGTG AGCTTCTCACTGCCTCCAG	54	
12	SSR62	(CGG) ₆	300 - 400	GGTGGGTTAGACCAGCTCC TCCTCAAGGCAAAGCTCCC	56	
13	SSR64	(CGG) ₆	400 - 500	CGCTCAAAGAGATGGCACG TAGTACGGCGCTGCTTGAG	55	
14	CG2	(AG) ₁₆	114 - 138	TGATTAAGCAGCCATTCAAGG TGGCTCTCAATCTCCCTCAC	54	(Hyun & ctv., 2012)
15	CG280	(AAAG) ₇	101 - 132	CCCCACAAAAGAATCACAAAG CAGCTGGAGAAAGATAAGGTCTCC	53	
16	CG415	(AG) ₁₂	117 - 150	CTTCCAACAACCCCTTCTGTC CTTTGCTACGGAGGTCATGC	55	
17	CG428	(AG) ₂₄	130 - 178	AGACATCAAATTCACCAAGAGAG TCAGCTCACTGATTAGGAAAATCC	54	
18	CG450	(AG) ₁₈	89 - 160	CCAAACTGCCTTAACCTACTTACA ACTTGGGGCCTTACAACCTGATA	54	
19	CG709	(AG) ₁₃	148 - 193	TTGACCGATTGAGGAAGTATCA CATGCCATCAATCATCATCC	51	
20	CG722	(AG) ₁₂	160 - 197	TGGTGCAAGCAGTTGGAATA CAGGTTGCCTCATCTCCACT	54	
21	Cym 9	(GA) ₃₃	105 - 172	CGCTACTGAAATAGAATAA GATCAACTGATACTAAAGCTC	45	(Xia & ctv., 2008)
22	Cym 12	(CAGA) ₉	174 - 215	TTAAGCAGGAGCCGTCACAG AGTTGCGGGTCAGTGTAAC	55	
23	Cym 15	(CT) ₃₆	129 - 180	TTCAAAGATAAATATGCTCC GTTGTGAAATACTTTAAAGGTG	46	
24	Cym 18	(GT) ₈	124 - 126	GATCAAGTTGTCTTTCAGACTG CAAACCTCGAAGAATTACC	47	
25	Cym 344	(CA) ₆₃	216 - 222	TAGTGCCATCTAATCTAATG TTTTCTTGTGCTCGAAG	45	(Moe & ctv., 2010)
26	Cym 371	(GT) ₃₅	171 - 178	GTGAAAGCCACCTCCATG GATGGATACCTCGCACTGG	53	
27	KNU-CC-32	(AG) ₂₇	114 - 248	AAAACCTTGATCCTCACAAAGA TGGGTCGACATGATCTGTT	51	
28	KNU-CC-43	(CT) ₁₄	135 - 295	TCGCTGCGCCTATACAGT CTCAGCTGTTGCCTCCAC	55	
29	KNU-CC-40	(GA) ₃₂	140 - 260	AAGCTCTGTCTTCATCCTTCAA TGGTGTGGAGAGAGGTTTTT	52	
30	KNU-CC-55	(CAA) ₁₄	105 - 315	AAGGTTGCATTTCCCTCA ACTAGGTGGGGTCGGCTA	54	
31	KNU-CC-35	(TC) ₁₀ , (GT) ₁₃	119 - 263	TCTCAGGCAATGCCGTAT TTTGTGTGTGGCATTCGA	52	
32	KNU-CC-203	(TG) ₁₃	136 - 380	AACCTAATCAAGGGTTTCTAACTC CCACCCAACAAAGCGATA	51	

Phản ứng PCR được thực hiện với thành phần hóa chất cho mỗi phản ứng trong thể tích 20 μL bao gồm 1X Mastermix (10 μL Dream Taq Green PCR Master Mix -ThermoFisher Scientific-Hoa kỳ); 0,4 μL primer xuôi (20 μM); 0,4 μL primer ngược (20 μM) (tổng hợp tại Integrated DNA technologies (IDT)); 8,2 μL nước cất 2 lần khử trùng; 1 μL DNA khuôn mẫu (50 ng/ μL). Chu kỳ PCR được thực hiện như sau tiến biến tính 95°C trong 1 phút, 30 chu kỳ (biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp (Ta: theo từng cặp primer) trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 40 giây), chu kỳ hoàn thành 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel polyacrylamide nồng độ 6% và chụp hình trên máy chụp gel (GelDoc-It®2315 imager UVP, Mỹ).

2.3. Đánh giá đa dạng di truyền lan kiểm tiên vũ dựa trên chỉ thị sinh học phân tử SSR

Dựa trên các primer SSR đã được chọn lọc để đánh giá đa dạng di truyền lan kiểm tiên vũ. Sản phẩm PCR của từng chỉ thị SSR trên các mẫu nghiên cứu được mã hóa sang hệ nhị phân để phân tích. Các băng DNA được ghi nhận dựa trên sự có mặt của chúng trên băng điện di của các mẫu nghiên cứu theo DNA thang chuẩn (DNA ladder). Nếu một phân đoạn DNA xuất hiện ở mẫu i nhưng không xuất hiện mẫu j hoặc đồng thời xuất hiện ở cả i và j nhưng không xuất hiện ở các mẫu khác thì phân đoạn DNA này gọi là phân đoạn đa hình. Ngược lại, nếu phân đoạn DNA nào xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu thì gọi là phân đoạn đồng hình. Các đoạn được mã hóa bằng số tự nhiên 0 và 1, khi đó mẫu nào xuất hiện đoạn DNA thì ký hiệu là 1, còn không xuất hiện thì ký hiệu là 0. Các số liệu nhị phân này được đưa vào xử lý bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 (numerical taxonomy and multivariate analysis system) để tính giá trị đa

hình di truyền và xây dựng cây phân nhóm đa hình di truyền giữa các mẫu nghiên cứu.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ly trích DNA tổng số

DNA tổng số thu được từ lá của 32 mẫu lan kiểm tiên vũ cho thấy tỉ lệ OD260/280 đạt từ 1,57 - 2,13; nồng độ DNA tổng số thu được từ 101,13 - 249,09 ng/ μL . Kết quả điện di DNA tổng số trên gel agarose 0,8% cho thấy band DNA tổng số thu được rõ và không bị đứt gãy. Các DNA tổng số được pha về nồng độ 50 ng/ μL để thực hiện phản ứng PCR-SSR.

3.2. Chọn lọc chỉ thị sinh học phân tử SSR để đánh giá đa dạng di truyền lan kiểm tiên vũ

Trong tổng số 32 primer SSR được sử dụng để chọn lọc trong nghiên cứu, có 26/32 primer SSR khuếch đại được sản phẩm PCR với tỷ lệ khuếch đại đạt 81,25%. Trong 26 primer SSR khuếch đại thành công chỉ có 12 primer đa hình với tổng số đoạn khuếch đại là 618 (trung bình 3,5 đoạn khuếch đại/primer, số đoạn khuếch đại dao động từ 2 - 6 đoạn khuếch đại/primer). Primer SSR34, SSR26 cho số lượng alen cao nhất (06 alen), tiếp theo primer SSR01 với 03 alen; 09 primer đa hình còn lại có 02 alen/primer. Kích thước sản phẩm PCR, đa số tương ứng với kích thước sản phẩm PCR dự kiến, ngoại trừ một số mẫu có nhiều hơn số lượng sản phẩm PCR như SSR21, SSR26, SSR34 và Cym371. Đồng thời có 02 primer có kích thước sản phẩm PCR lớn hơn so với dự kiến như SSR08 (1.100 - 1.300 bp), KNU-CC-43 (1.400 - 1.500 bp). Đối với primer KNU-CC-43, các đoạn có kích thước lớn hơn 1.500 bp được loại bỏ và giữ lại những đoạn có kích thước 1.400 - 1.500 bp để phân tích. Trong nghiên cứu này, primer SSR08 và KNU-CC-43 vẫn được để

sử dụng trong đánh giá đa dạng di truyền. Kích thước dự kiến (100 - 380 bp) của 2 primer này được đánh giá trên *C. goeringii*, *C. Sinensis*, *C. Hybridium* và 09 loài thuộc chi *Cymbidium* nên khi phân tích đánh giá trên *C. finlaysonianum* cho sản phẩm kích thước khác so với dự kiến. Các kết quả nghiên cứu trước đây đã xác định được một số primer đa hình để đánh giá di truyền, cấu trúc quần thể của một số mẫu trong chi *Cymbidium*. Xia & ctv. (2008) đã xác định được 09 primer đa hình trên 30 cá thể thuộc loài *Cymbidium sinense* từ 11 primer SSR. Li & ctv. (2014) đã chọn được 55 primer SSR đa hình trên 9 loài *Cymbidium* với 59 mẫu cá thể từ 62/80 primer khuếch đại thành công. Theo Moe & ctv. (2010) đã phát triển 14 primer SSR để nghiên cứu đa dạng di truyền trên chi *Cymbidium* với 96 mẫu thuộc 3 loài gồm *C. goeringii* (72 mẫu), *C. sinensis* (4 mẫu) và *C.*

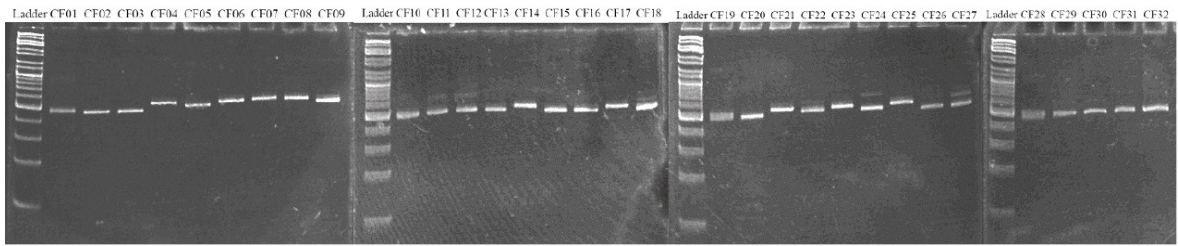
hybridium (20 mẫu). Huang & ctv. (2011) đã xác định được 15 primer đa hình từ 38/48 primer SSR khuếch đại thành công trên 24 cá thể của hai quần thể *Cymbidium* để đánh giá đa dạng di truyền trên *C. goeringii*. Điều này cho thấy, kết quả của nghiên cứu này có sự tương đồng nhất định so với một số nghiên cứu đã được công bố của các tác giả. Tuy nhiên, những công bố này nghiên cứu này tập trung lên những loài như *C. sinense*, *C. goeringii*, *C. Sinensis*, *C. hybridium* và *C. ensifolium*.

3.3. Đánh giá đa dạng di truyền lan kiểm tiên vũ dựa trên chỉ thị sinh học phân tử SSR

Tổng số 12 primer SSR đa hình được chọn lọc để đánh giá mối quan hệ di truyền của 32 mẫu lan kiểm tiên vũ, kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Danh sách 12 primer SSR được chọn lọc để đánh giá đa dạng di truyền 32 mẫu lan kiểm tiên vũ

TT	Primer	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Tổng số đoạn khuếch đại	Tổng số đoạn khuếch đại đa hình	Tỷ lệ đa hình (%)	Tần số alen đa hình	PIC
1	SSR01	380 - 500	68	60	88,24	0,22	0,78
2	SSR08	1.100 - 1.300	38	26	68,42	0,23	0,77
3	SSR18	280 - 290	43	21	48,84	0,23	0,77
4	SSR36	350 - 900	34	32	94,12	0,06	0,94
5	SSR26	120 - 210	131	66	50,38	0,19	0,81
6	SSR34	420 - 1.200	37	25	67,57	0,22	0,78
7	SSR44	500 - 520	38	26	68,42	0,16	0,84
8	CG415	100 - 150	37	27	72,97	0,19	0,81
9	CG709	200 - 250	37	27	72,97	0,17	0,83
10	CG722	150 - 300	42	22	52,38	0,25	0,75
11	Cym 371	150 - 200	52	12	23,08	0,30	0,70
12	KNU-CC-43	1.400 - 1.500	61	14	22,95	0,42	0,58
Dao động			34 - 131	12 - 66	22,95 - 94,12	0,06 - 0,42	0,58 - 0,94
Tổng			618	358	67,96		
Trung bình				0,22	0,78		

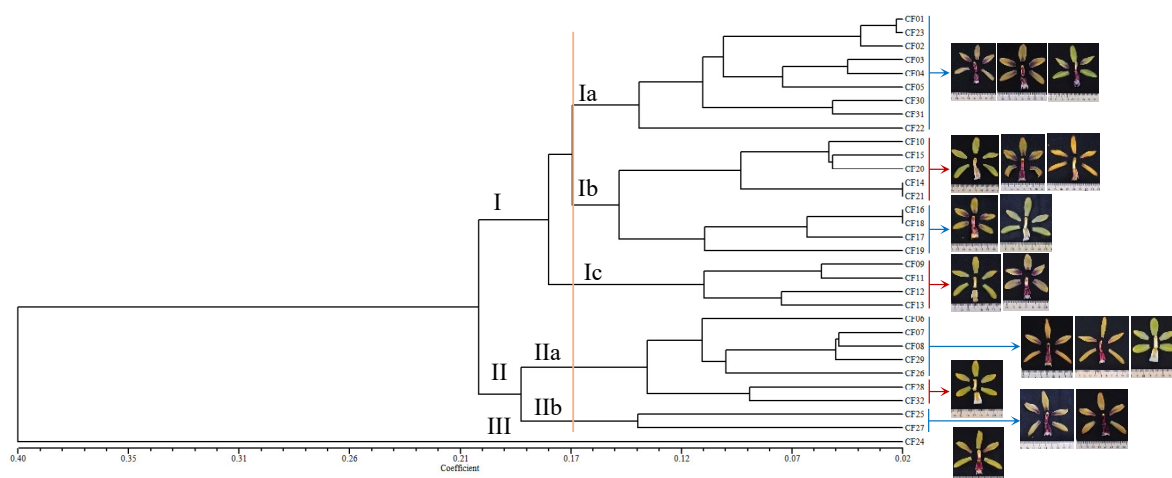


Hình 2. Sản phẩm PCR của cặp mỗi SSR44 điện di trên gel polyacrylamide nồng độ 6%.

Ladder: 1 kp (Thermo Scientific™ GeneRuler DNA Ladder Mix-SM0331), CF01 - CF32: mẫu lan kiểm tiên vũ.

Phân tích tần số alen, chỉ số PIC dựa trên 12 primer SSR cho 32 mẫu lan kiểm tiên vũ cho thấy số sản phẩm khuếch đại từ 2 - 6 alen/primer, 358 đoạn khuếch đại đa hình (tổng các đoạn khuếch đại đa hình của 32 mẫu trên 12 primer SSR) và dao động từ 12 - 66, tần số alen đa hình trung bình là 0,22 và biến thiên từ 0,06 - 0,42; chỉ số PIC trung bình là 0,78 biến thiên từ 0,58 đến 0,94. Trong đó, ở primer SSR36 có chỉ số PIC cao nhất là 0,94; tiếp theo là các primer còn lại có chỉ số PIC từ 0,70 đến 0,83; ngoại trừ primer có giá trị PIC thấp nhất là KNU-CC-43 với 0,58 (Bảng 3). Điều này cho thấy có sự đa dạng di truyền của các mẫu lan kiểm tiên vũ trong nghiên cứu này. Một số công bố trước đây của các tác giả đã xác định được một số primer SSR đa hình có hiệu quả trong phân tích đa dạng di truyền cho một số loài thuộc chi *Cymbidium*. Xia &

ctv. (2008) cho thấy chỉ số đa hình trung bình là 0,47 và dao động từ 0,18 - 0,9 khi đánh giá đa dạng di truyền *Cymbidium sinense* dựa trên 9 primer SSR đa hình. Li & ctv. (2014) đã phân tích đa dạng di truyền 59 cá thể của 9 loài thuộc chi *Cymbidium* với 55 primer đa hình cho thấy chỉ số đa dạng di truyền PIC trung bình là 0,407 dao động từ 0,033 đến 0,863. Theo Moe & ctv. (2010) cho thấy chỉ số đa dạng di truyền và PIC cao, đạt tương ứng là 0,394 (dao động từ 0,213 đến 0,931) và 0,639 (dao động từ 0,209 đến 0,927) khi phân tích đa dạng di truyền cho 30 cá thể thuộc chi *Cymbidium* dựa trên 9 primer đa hình. Điều này cho thấy, kết quả của nghiên cứu này có sự tương quan với một số nghiên cứu trước đây đã được công bố và chứng tỏ các primer được lựa chọn có hiệu quả trong việc đánh giá đa dạng trên một số loài *C. finlaysonianum*.



Hình 3. Cây phân nhóm di truyền của các mẫu lan kiểm tiên vũ dựa trên 12 primer SSR.

Cây phân nhóm di truyền của 32 mẫu lan kiểm tiên vũ được xây dựng dựa trên 12 primer SSR cho thấy giá trị khoảng cách đa dạng di truyền dao động từ 0,02 đến 0,40. Với giá trị trung bình đạt 0,17, cây phân nhóm di truyền chia 32 mẫu lan kiểm tiên vũ thành 6 nhóm gồm nhóm Ia gồm các mẫu CF01 - CF06, CF22, CF23, CF30, CF31, nhóm Ib gồm các mẫu CF10, CF15 - CF21, CF24; nhóm Ic gồm các mẫu CF09, CF11 - CF13, nhóm IIa gồm các mẫu CF6 - CF8, CF26, CF28, CF29, CF32, nhóm IIb gồm các mẫu CF25, CF27. Nhóm III gồm mẫu CF24 (Hình 3). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy có sự đa dạng di truyền các mẫu lan kiểm tiên vũ thu thập ở các khu vực khác nhau. Khi xét về đặc điểm hình thái cũng cho thấy các mẫu lan kiểm tiên vũ có sự đa dạng di truyền, đặc biệt có sự đa dạng về màu sắc hoa, hình dạng cánh hoa, đài hoa. Quan sát về màu sắc hoa như đài hoa, cánh hoa, môi được thu mặt trong của hoa và dựa trên bảng so màu (RHS Colour Chart) (Chandra & ctv., 2015). Cụ thể màu sắc chính của cánh hoa và màu sắc hoa với nhiều màu khác nhau như Dark Purplish Red (PN79A), Dark Greenish Yellow (YG152D),

Greyish Purple (PN77A), Brilliant Yellow (Y7A), White (WNN155C), Strong Greenish Yellow (YG151A), Moderate Purplish Red (RP59C), Dark Red (RP59A), Brilliant Yellow (Y7A), White (WNN155C). Màu sắc của cánh môi chủ yếu 03 màu chính là Dark Red (RP59A), Brilliant Yellow (Y7A), White (WNN155C) và một số màu phụ khác. Điều này cho thấy màu sắc hoa ở lan kiểm tiên vũ có sự đa dạng. Li & ctv. (2014) đã cho thấy sự đa dạng di truyền 59 cá thể của 9 loài thuộc *Cymbidium* dựa trên 55 primer SSR (Li & ctv., 2014). Hyun & ctv. (2012) cho thấy 04 quần thể thuộc loài *Cymbidium goeringii* có sự đa dạng di truyền khi phân tích dựa trên với 21 primer SSR và chia các mẫu thành 4 nhóm chính (Hyun & ctv., 2012). Kết quả phân loại di truyền dựa trên 12 primer SSR cho thấy có sự đa dạng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu này.

Cây phân nhóm di truyền trên cho thấy mẫu CF24 có sự khác biệt so với các mẫu còn lại với khoảng cách đa dạng di truyền là 0,4. Với khoảng cách đa dạng di truyền từ 0,02 - 0,4 cho thấy đối với các mẫu trong cùng một nhóm vẫn có sự

khác biệt nhất định. Đối với nhóm Ia, mẫu CF22 nằm riêng một nhóm so với các mẫu trong nhóm này. Ở mẫu này có đặc điểm màu sắc hoa là Strong Greenish Yellow (YG151A) và Moderate Purplish Red (RP59C). Màu sắc của cánh môi với 02 màu chính là Dark Red (RP59A), Brilliant Yellow (Y7A) và màu phụ White (WNN155C). Nhóm IIb, mẫu CF25 và CF27 nằm chung một nhóm và có sự phân nhóm nhỏ với các mẫu còn lại trong nhóm. Đối với nhóm III chỉ có mẫu CF24 và có sự khác biệt lớn so với các mẫu còn lại và có sự đa hình về alen so với các mẫu khác. Ở mẫu này có sự khác biệt lớn về màu sắc hoa, cụ thể màu sắc đài hoa và cánh hoa tập trung chủ yếu hai màu chính là Moderate Yellow (YG161A), Dark Purplish Red (PN79B), màu sắc của cánh môi chủ yếu 03 màu chính là Dark Red (RP59A), Brilliant Yellow (Y7A), White (WNN155C). Đây là cơ sở dữ liệu di truyền hữu ích phục vụ cho công tác lưu trữ, bảo tồn nguồn gen lan kiếm tiền vũ và lai tạo giống mới.

4. Kết Luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự đa dạng di truyền cao giữa 32 mẫu lan kiếm tiền vũ (*C. finlaysonianum*) dựa trên 12 primer SSR. Hệ số khoảng cách đa dạng dao động từ 0,02 - 0,4, với trung bình khoảng cách đa dạng di truyền là 0,17. Cây phân nhóm đa dạng di truyền chia 32 mẫu lan kiếm thành 06 nhóm (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb và III). Trong đó, mẫu CF24 có sự khác biệt so với các mẫu còn lại với khoảng cách đa dạng di truyền là 0,4. Kết quả đạt được của nghiên cứu này sẽ là những thông tin hữu ích cho công tác bảo tồn nguồn gen và phát triển giống lan kiếm mới trong tương lai.

Lời Cam Đoan

Nhóm tác giả cam đoan kết quả nghiên cứu trong bài báo này do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí theo hợp đồng số 07/2023/HĐ-QKCN ngày 09 tháng 03 năm 2023 giữa Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ TP. HCM và Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh về việc thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ "Nghiên cứu bảo tồn và đánh giá nguồn gen lan kiếm lá cứng (*Cymbidium* spp.) Việt Nam", 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 (References)

- Anuttato, S., Boonruangrod, R., Kongsamai, B., & Chanprame, S. (2017). Morphological characterization of wild *Rhynchostylis gigantea* in Thailand. *Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 23(2), 20-32.
- Chandra, D. L., Pathak, P., Rao, A. N., & Rajeevan, P. K. (Eds.). (2015). Commercial orchids. Berlin, Germany: De Gruyter Open.
- Chung, Y. L., Kuo, Y. T., & Wu, W. L. (2017). *Development of SSR markers in Phalaenopsis orchids, their characterization, cross-transferability and application for identification*. Singapore: World Scientific.
- Huang, J. L., Zeng, C. X., Li, H. T., & Yang, J. B. (2011). Isolation and characterization of 15 microsatellite markers from the spring orchid (*Cymbidium goeringii*) (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 98(4), e76-e77. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.00477.x>

- org/10.3732/ajb.1000446.
- Hyun, Y. S., Kim, J., & Chung, K. W. (2012). Development of polymorphic microsatellite markers for *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 99(5), e193-e198. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100505>.
- Lee, H. J., Park, H. R., Lee, A. J., Nam, D. E., Lee, D. G., Do, Y., & Chung, K. W. (2020). Genetic authentication of cultivars with flower-variant types using SSR markers in spring orchid, *Cymbidium goeringii*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 61(3), 577-590.
- Li, X., Jin, F., Jin, L., Jackson, A., Huang, C., Li, K., & Shu, X. (2014). Development of *Cymbidium ensifolium* genic SSR markers and their utility in genetic diversity and population structure analysis in cymbidiums. *BMC Genetics* 15, 124. <http://doi.org/10.1186/s12863-014-0124-5>.
- Moe, K. T., Zhao, W., Song, H. S., Kim, Y. H., Chung, J. W., Cho, Y. I., Park, P. H., Park, H. S., Chae, S. C., & Park, Y. J. (2010). Development of SSR markers to study diversity in the genus *Cymbidium*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38(4), 585-594.
- Nayak, N. R., Tanaka, M., Teixeira, D., & Silva, J. (Eds.). (2006). *Biotechnology of Cymbidium - An overview of recent progress and future opportunities*. Isleworth, UK: Global Science Books.
- Silva, T. J. A., Jin, X., Dobránszki, J., Lu, J., Wang, H., Zotz, G., Cardoso, J. C., & Zeng, S. (2016). Advances in *Dendrobium* molecular research: Applications in genetic variation, identification and breeding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 95, 196-216. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.012>.
- Tran, H. (Ed.). (2000). *The orchids of Vietnam*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Xia, K., Ye, X., & Zhang, M. (2008). Isolation and characterization of nine microsatellite markers for *Cymbidium sinense*. *HortScience* 43(6), 1925-1926. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.6.1925>.
- Yang, J. B., Tang, M., Li, H. T., Zhang, Z. R., & Li, D. Z. (2013). Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. *BMC Evolutionary Biology* 13, 84. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-84>.
- Zhao, T. M., Zheng, S. G., Hu, Y. D., Zhao, R. X., Li, H. J., Zhang, X. Q., & Chun, Z. (2019). Classification of interspecific and intraspecific species by genome-wide SSR markers on *Dendrobium*. *South African Journal of Botany* 127, 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.051>.