

USING MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DNA *trnH-psbA* GENE TO IDENTIFY SPECIES *Paphiopedilum gratixianum*

Nguyen Thi Hai Yen^{1*}, Ngo Xuan Quang^{2,5}, Chu Hoang Mau³, Do Tien Phat^{4,5}

¹TNU - University of Sciences, ²VAST - Institute of Tropical Biology, ³TNU - University of Education,

⁴VAST - Institute of Biotechnology, ⁵VAST - Graduate University of Sciences and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/5/2021	Orchid species of genus <i>Paphiopedilum</i> are greatly attractant due to their colour variety and special flower structures. To protect them, it is essential to develop methods to identify and distinguish their characteristics, especially this genus has many species with high morphological similarities. Research on methods to identify and distinguish them is extremely necessary, especially genus <i>Paphiopedilum</i> with many similar species in characteristics of leaf morphology. This work focus to investigate on the morphological analysis in combination with <i>trnH-psbA</i> gene sequence to identify of species <i>P. gratixianum</i> from Lao Cai province. The results of sequencing the <i>trnH-psbA</i> gene isolated from the species <i>P. gratixianum</i> samples indicated a gene fragment of 691 bp in size. When comparing to the sequences on the NCBI gene bank, the <i>trnH-psbA</i> gene sequence of species <i>P. gratixianum</i> is similar to the same species isolated in China up to 99.32% (code MV284890.1). On the taxonomy tree basing on the <i>trnH-psbA</i> gene sequence, species <i>P. gratixianum</i> was shown close relationship with the Vietnamese species (<i>P. tranlianianu</i> - MW794124.1), India endemic species (<i>P. spicerianum</i> - NC_502702.1) and the first recorded species in China (<i>P. barbigerum</i> - MN153814.1, NC_050870.1).
Revised: 03/6/2021	
Published: 21/6/2021	
KEYWORDS	
Identify	
<i>trnH-psbA</i>	
<i>P. gratixianum</i>	
Barcode	
Lao Cai	

SỬ DỤNG ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ GEN CHỈ THỊ *trnH-psbA* ĐỂ NHẬN DẠNG LAN HÀI ĐUÔI CÔNG (*Paphiopedilum gratixianum*)

Nguyễn Thị Hải Yến^{1*}, Ngô Xuân Quảng^{2,5}, Chu Hoàng Mậu³, Đỗ Tiến Phát^{4,5}

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên, ²Viện Sinh học nhiệt đới - Viện Hàn Lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam,

³Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên, ⁴Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt

Nam, ⁵Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/5/2021	Chi lan hài (<i>Paphiopedilum</i>) là chi lan đặc biệt được yêu thích bởi màu sắc đa dạng và cấu trúc hoa độc đáo. Để bảo vệ những loài lan này, việc phát triển các phương pháp nhận diện, phân biệt chúng là vô cùng cần thiết, đặc biệt <i>Paphiopedilum</i> là chi mang nhiều loài có độ tương đồng cao về hình thái thân lá. Bài báo trình bày kết quả phân tích chi tiết hình thái lan hài Đuôi công (<i>P. gratixianum</i>) có nguồn gốc tại Lào Cai, kết hợp với việc xác định trình tự gen <i>trnH-psbA</i> để nhận diện loài này. Kết quả giải trình tự gen <i>trnH-psbA</i> phân lập từ mẫu <i>P. gratixianum</i> nghiên cứu đã thu được đoạn gen có kích thước 691 bp. Khi so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen NCBI cho thấy trình tự đoạn gen <i>trnH-psbA</i> của <i>P. gratixianum</i> nghiên cứu có độ tương đồng lên đến 99,32% với gen <i>trnH-psbA</i> của <i>P. gratixianum</i> phân lập tại Trung Quốc (mã số MV284890.1). Trên sơ đồ phân loại hình cây thiết lập dựa vào trình tự gen <i>trnH-psbA</i> , <i>P. gratixianum</i> nghiên cứu có quan hệ họ hàng gần gũi với hài Trần liên của Việt Nam (<i>P. tranlianianu</i> - MW794124.1), <i>P. spicerianum</i> (loài đặc hữu của Ấn Độ - NC_502702.1) và <i>P. barbigerum</i> (loài hài được tìm thấy lần đầu ở Trung Quốc - MN153814.1, NC_050870.1).
Ngày hoàn thiện: 03/6/2021	
Ngày đăng: 21/6/2021	
TỪ KHÓA	
Nhận dạng	
<i>trnH-psbA</i>	
<i>P. gratixianum</i>	
Mã vạch	
Lào Cai	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4549>

* Corresponding author. Email: yennth@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Chi lan hài (*Paphiopedilum*) là một chi đặc biệt trong họ Lan (Orchidaceae), được gọi là lan hài vì hoa mang một cánh môi ở giữa có hình cái túi giống như chiếc hài. Chi này chứa khoảng 80 loài đã được công nhận, trong đó có một số là loài lai tự nhiên, phân bố chủ yếu ở các khu vực Hoa Nam, Ấn Độ, Đông Nam Á và các đảo trên Thái Bình Dương, chúng tạo thành phân tông gọi là Paphiopedilinae chỉ chứa 1 chi này. Việt Nam là nước có sự đa dạng về lan hài lớn nhất thế giới với 22 loài, trong đó có nhiều loài đặc hữu và cả loài lai tự nhiên [1]. Hiện nay, hầu hết các loài lan Hài của Việt Nam đang bị đe dọa nghiêm trọng, trong đó một số loài đặc biệt nguy cấp như hài Việt (*P. vietnamense*), hài Mốc vàng (*P. armeniacum*), hài Mốc hồng (*P. micranthum*) do vùng phân bố hẹp và khai thác không kiểm soát [2].

Nhằm bảo vệ lan hài khỏi sự tuyệt chủng, tất cả các loài lan hài ở Việt Nam đều đã được đưa vào nhóm IA trong Nghị định 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ ngày 30/3/2006, được bảo vệ ngang hàng với những loại cây gỗ quý nhất và các loài động vật hoang dã tiêu biểu nhất. Để thực hiện tốt việc bảo vệ các loài động thực vật quý hiếm thì ngoài việc thiết lập các khu vực bảo tồn và xây dựng ra các quy định nghiêm ngặt để cấm khai thác buôn bán bất hợp pháp thì việc trang bị những kiến thức để làm căn cứ cho các nhà quản lý khi thực thi nhiệm vụ là rất cần thiết. Trong chi lan hài có khá nhiều loài tương đồng về hình thái, chúng phân bố ở tất cả các vùng miền đất nước, thời điểm nở hoa lại rải rác trong năm, việc phân biệt được các loài lan hài khi cây chưa có hoa gặp nhiều hạn chế.

Hài Đuôi công (*P. gratrixianum*) là loài hài có lá và hoa cỡ trung bình lớn trong danh sách lan hài tại Việt Nam, đây là loài cho hoa đẹp, màu sắc nổi bật với màu vàng ưu thế và mang các đốm tím bắt mắt. Hoa nở khoảng tháng 9, 10, 11 dương lịch. Trong tự nhiên, hài Đuôi công thường mọc thành những bụi lớn nên khi trở hoa nhìn vô cùng đẹp mắt. Hài đuôi công là loài có khu phân bố hẹp, nơi cư trú bị chia cắt rải rác với số lượng cá thể ít. Hài Đuôi công là loài đặc hữu Đông Dương, mọc ở Lào, Trung Quốc và Bắc Việt Nam, những nơi có độ cao từ 900-1900 m. Ở Việt Nam, hài Đuôi công thường bắt gặp ở một số nơi như Lào Cai, Vĩnh Phúc, Thái Nguyên [3].

Hiện nay, việc nhận diện, phân loại loài thường được thực hiện thông qua sự kết hợp giữa phương pháp truyền thống dựa vào các đặc điểm hình thái học [4] với các phương pháp tiên tiến thông qua định danh phân tử (mã vạch DNA – DNA barcode). DNA barcode là một trong những phương pháp phục vụ định danh loài chính xác, nhanh chóng, tự động hóa bằng cách thông qua một vùng DNA đặc hiệu. DNA barcode được biết đến lần đầu với công bố của Hebert và cộng sự năm 2003 [5]. Để thúc đẩy việc sử dụng DNA barcode cho các sinh vật nhân chuẩn, CBOL (Consortium for the Barcode of Life) đã được thành lập gồm hơn 120 tổ chức từ 45 quốc gia. CBOL chứa một cơ sở dữ liệu tham khảo công khai, được quản lý tốt về mã vạch DNA. Với sự hỗ trợ của CBOL, DNA barcode ngày càng phát triển và trở thành một phương pháp hữu hiệu phân loại và định danh loài mới [6]. Việc lựa chọn sử dụng các trình tự phù hợp sẽ tăng hiệu quả về khả năng nhận diện các loài thực vật. Hầu hết các mã vạch DNA thực vật đều nằm trong bộ gen lục lạp, có thể là các trình tự mã hóa (như *rbcL* và *matK*) hoặc trong các vùng liên gen (như *trnH-psbA*) [7], cũng có một số locus DNA nhân được sử dụng làm mã vạch DNA (ví dụ mã được phiên mã bên trong bộ đệm của DNA ribosome (*ITS*)) [8]. Trong thực tế, việc kết hợp nhiều chỉ thị để nhận diện phân loại loài thường được áp dụng [9]. Tuy nhiên, việc phân tích nhiều trình tự DNA để nhận diện 1 cá thể có thể không khả thi về mặt kỹ thuật (trong cài đặt thông lượng cao hơn, đặc biệt là khi phân tích các mẫu hỗn hợp loài) và gây tốn kém.

Chỉ thị *trnH-psbA* là chỉ thị khá phổ biến, nó được đánh giá là đặc hiệu với nhiều loài thực vật [8] nhưng một số nghiên cứu lại cho rằng khó khăn khi sử dụng chỉ thị này là việc nhân bản không đặc hiệu [10]. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhận diện lan hài Đuôi công (*P. gratrixianum*) trên cơ sở kết hợp nghiên cứu phân tích trình tự DNA mã vạch *trnH-psbA* với các đặc điểm mô tả hình thái.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lan hài Đuôi công (*P. gratrixianum*) thu thập tại tỉnh Lào Cai được trồng và trở hoa tại Thái Nguyên; Cặp mồi nhân gen *trnH-psbA* (F, 5'-GTTATGCATGAACGTAATTGCTC-3'/5'-CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'); Hóa chất thiết bị dùng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái

Sử dụng phương pháp quan sát mô tả trực tiếp đối tượng nghiên cứu kết hợp với phương pháp đối chiếu, so sánh với các tài liệu, khóa định loại đã có [11]. Đây là phương pháp thông dụng được dùng trong nghiên cứu phân loại thực vật. Dụng cụ và thiết bị hỗ trợ: máy ảnh, thước dây, thước kẹp (palme), dao lam, dao mổ, kim mũi mác.

2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử

Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp dùng CTAB (Collins & Symons, 1992) [12] có cải tiến cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Mẫu lá được nghiền trong nitor lỏng, bổ sung đệm tách và ủ 65°C trong 2 giờ. Dùng chloroform: isoamylalcohol (24:1) để loại bỏ tạp chất và dùng isopropanol để tủa DNA. Đoạn gen *trnH-psbA* được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu. Thành phần phản ứng PCR bao gồm 12 µl H₂O; 2 µl đệm 10x; 2 µl MgCl₂ 25 mM, 1,6 µl dNTPs 2,5 mM; 0,8 µl mỗi 10 pmol mỗi loại; 3 µl DNA tổng số và 0,4 µl Taq DNA polymerase 1u/µl. Phản ứng được tiến hành trong máy PCR với chu trình nhiệt bao gồm các bước: 94°C/5 phút; 30 chu kỳ (94°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút); kết thúc ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng để xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotid tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Các trình tự được so sánh bằng Blast trong NCBI, xử lý bằng các phần mềm Snapgene, BioEdit, cây phân loại dựa trên trình tự gen *trnH-psbA* được dựng bằng phần mềm MegaX.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm thực vật học của lan hài Đuôi công

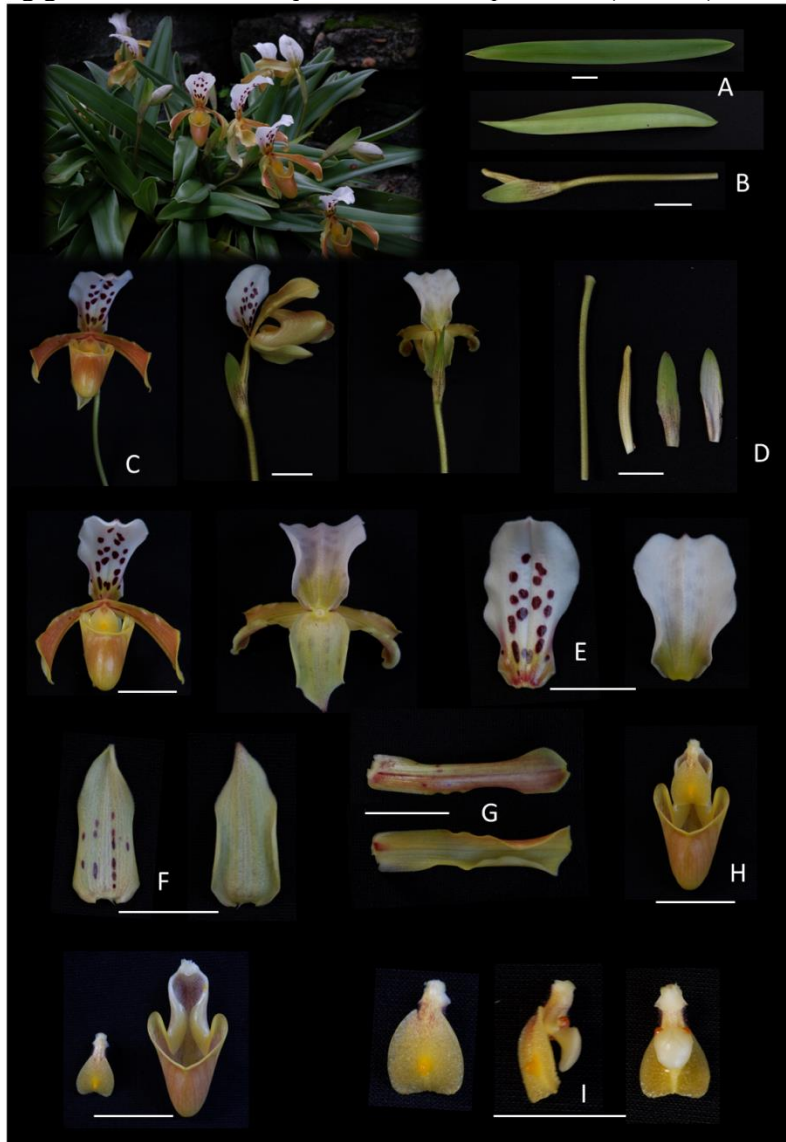
Thân lá: hài Đuôi công là một loài thực vật được xếp vào nhóm cây cỏ lâu năm, thân mang 6 - 10 lá xếp thành 2 dãy, các lá có xu hướng hẹp lại phía cổ lá làm cho thân cây có hình dẹt, các lá xếp chồng hơi lồng lèo và có xu hướng rũ sang ngang khi cảm theo chiều thẳng đứng. Lá có hình thuôn dài đầu lá hơi nhọn. Chiều dài lá 15 đến 20 cm và rộng từ 1,5 đến 2,5 cm. Mặt trên lá có màu xanh đậm đồng nhất, mặt dưới màu xanh nhạt (hình 1A,B). Lá bắc hình mũi mác hơi bầu, dài 4 cm, rộng 1 cm phía ngoài màu xanh lục có chấm nâu bản phía cuống chiếm ½ diện tích, mặt trong màu lục nhạt pha trắng trơn bóng mang các gân xanh đậm hơn (hình 1D).

Hoa của lan hài Đuôi công thuộc hoa mẫu 3, hoa mọc đứng trên phát hoa, kích thước khoảng 5-6 cm, màu sắc độc đáo, chủ đạo là màu vàng đậm, cánh đài trên màu trắng mang các chấm nâu tím khá đẹp mắt.

Cánh đài trên (còn gọi là lá đài sau) có hình elip hơi bầu, viền lượn sóng nhẹ và vênh ra phía sau, còn toàn bộ cánh đài lại úp về phía trước. Cánh đài trên có chiều dài 5 cm, rộng 3 cm. Mặt trước màu trắng bóng hơi ánh nhũ, phía cuống có lem màu vàng hơi nâu xen tím nhạt, phía trên có các chấm màu tím nâu kích thước khoảng 2 mm tập trung ở giữa, lá đài không có lông bao phủ (hình 1E). Mặt sau có màu sắc ưu thế là trắng, phía gốc có màu xanh lục vàng, được bao phủ bởi lớp lông ngắn. Sóng gân nổi rõ, mang nhiều lông hơn các vùng xung quanh (hình 1 E)

Cánh đài dưới (còn gọi là lá đài kết hợp) hình thuôn dài, hơi nhọn phía đầu, dài 4 cm, rộng 1,8 cm. Mặt trong có màu vàng nhạt hơi xanh, nhìn thấy ánh nhũ, mang các đốm thưa và nhỏ hơn cánh đài trên (kích thước khoảng 1*0,5 mm), có ít lông ngắn màu nâu tím phía gốc cánh đài. Mặt

ngoài màu xanh nhạt hơi vàng, có các lông ngắn màu nâu bầm bao phủ, tập trung khu vực sống lưng. Có 2 đường gân nổi rõ, đó là kết quả của sự kết hợp 2 lá đài (hình 1F).



Hình 1. Hình ảnh đặc điểm hình thái, cấu trúc cây, hoa lan hài Đuôi công (*P. gratrixianum*)
A,B,C. Hình thái lá, phát hoa và hoa của hài Đuôi công; D. Cấu trúc phát hoa, bầu và lá bắc; E,F,G. Mặt trước và mặt sau của lá đài trước, lá đài sau và tràng hoa; H. Môi; I. Staminode mang bao phấn và nhụy
(Bar = 2 cm)

Cánh hoa (tràng hoa) dài 5 cm, rộng 1,5 cm có hình thuôn dài hơi tròn phía đầu, mép vênh ra phía sau và lượn sóng nhẹ. Mặt trước màu nâu hơi pha vàng, có 2-5 chấm nhỏ màu nâu tím cỡ 0,2 mm, phía gốc có mang ít lông ngắn màu nâu tím. Mặt sau màu vàng đậm hơi nâu, ánh nhũ, không có lông (hình 1G).

Môi (cánh hoa thứ ba biến dạng) dài 5 cm rộng 2 cm, trơn bóng, màu vàng nhạt xen nâu tím nhạt. Hai thùy bên nhọn và vênh lên, thùy giữa lõm xuống, mang các gân tím nhạt hai bên và nhiều lông ngắn ở mặt trong, mặt ngoài trơn bóng, không có lông (hình 1H). Staminode (khiên đỡ trụ hoa) dài 2 cm, rộng 1 cm hình tim ngược màu vàng nhũ rất đẹp, ở giữa có một đốm nhỏ hình hạt màu vàng đậm nổi lên. Staminode có cuống hơi dài, mang các lông ngắn màu nâu tím.

Bao phần hình cầu, màu vàng đậm kích thước khoảng 1 mm, noãn hình tròn màu trắng bóng kích thước 5x5 mm (hình 1I). Bầu dài 4,5 cm rộng cỡ 0,5 cm, hình dài, đỉnh thu nhỏ, đầu tù, có 3 mặt. Màu xanh lục nhạt được phủ kín bởi lớp lông ngắn màu nâu tím (hình 1C).

Quả của *P. gratrixianum* được phát triển từ bầu, quả thuộc dạng quả nang hình trụ dài, hẹp, gân, có mỏ ngắn, quả dài khoảng 4 - 5 cm và rộng 5 - 7 mm. Lá bắc dài 4 đến 5,5 cm, hình mũi mác hơi bầu, phủ lớp lông ngắn. Mặt ngoài màu xanh sang phía gốc có xen các chấm nâu tím nhỏ, mặt trong màu trắng.

Hệ rễ: Giống như các giống lan hài lá xanh quanh năm, rễ của *P. gratrixianum* được bao phủ bởi một lớp vỏ lụa mang nhiều lông hút, làm cho rễ có khả năng hấp thụ độ ẩm trong không khí. Đầu rễ non của cây *P. gratrixianum* có màu trắng ngà, còn màu của những rễ già trở nên sậm và nhiều lông hơn. Rễ chính xuất phát từ thân, chỗ bắt đầu phân lá, rồi phân ra các rễ thứ cấp. Rễ của *P. gratrixianum* rất dài, gấp nhiều lần chiều dài lá.

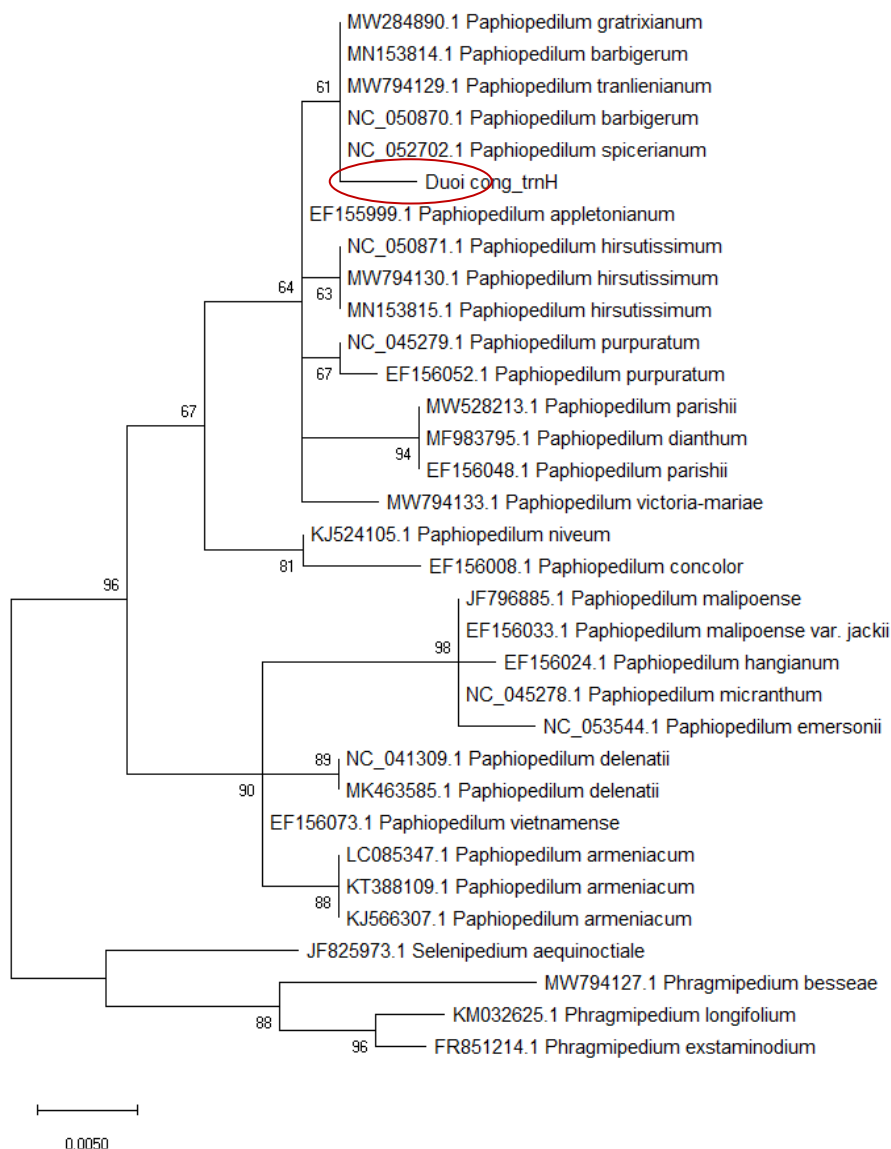
Sử dụng đặc điểm hình thái để phân loại thực vật là một phương pháp truyền thống và rất phổ biến. Đã có nhiều khóa định loại thực vật đã được xây dựng và phát triển dựa trên cấu trúc hình thái thực vật như thân, rễ, lá, hoa nhằm phục vụ cho việc phân loại được dễ dàng hơn. Đối với họ Lan (Orchidaceae), hầu hết những công bố loài mới đều dựa trên các mô tả về hình thái thực vật [13], [14]. Ngoài ra, đặc điểm hình thái còn đóng vai trò quan trọng trong xác định mối quan hệ họ hàng giữa các loài và hỗ trợ nghiên cứu về sự sinh trưởng, sinh sản để giúp bảo tồn các loài phong lan quý hiếm. Khi phân tích mối liên quan giữa hình thái lan hài với đặc điểm sinh trưởng của chúng, Gruss và cộng sự (2018) nhận thấy, các loài hài có lá đồng màu thường sinh trưởng thích nghi với vùng khí hậu lạnh, còn những loài trên lá có vân thường chịu nóng tốt hơn và thích nghi với biên độ nhiệt độ rộng hơn. Đặc biệt, hình thái, cấu tạo rễ có liên quan chặt chẽ với điều kiện môi trường sống [15].

Khi sử dụng đặc điểm hình thái để phân loại họ Lan nói chung và lan Hài nói riêng thì cấu trúc hoa là tiêu chí xác định loài chính xác nhất [4], [16], [17] bởi vì hoa của các loài lan có đặc điểm rất riêng biệt, có tính đặc trưng loài từ màu sắc đến cấu trúc, ngay cả các loài rất gần gũi trong chi [16]. Kết quả phân tích của chúng tôi đã mô tả chi tiết cấu trúc hoa của lan hài Đuôi công (*P. gratrixianum*). Tuy nhiên, trong thực tế, hầu hết các loài lan hài có thời gian ra hoa rất ngắn, chỉ khoảng 15 - 20 ngày/năm, vì vậy để nhận diện nhanh và chính xác các loài lan khi còn nhỏ hoặc lúc không có hoa thì cần ứng dụng các phương pháp định loại phân tử. Do đó, chúng tôi tiếp tục phân tích trình tự gen *trnH-psbA* để nhận diện lan hài Đuôi công.

3.2. Phân tích trình tự vùng gen *trnH-psbA*

Tách chiết DNA tổng số từ mẫu lá và kiểm tra độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ. Kết quả kiểm tra tỷ số OD260 nm/OD280 nm nằm trong khoảng 1,86 - 2,0, đảm bảo yêu cầu cho thí nghiệm nhân gen. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu được một phân đoạn DNA có kích thước khoảng 600 bp rất đặc hiệu, hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Vì vậy, phân đoạn này được sử dụng để xác định trình tự nucleotide. Tiến hành xác định trình tự bằng máy xác định trình tự tự động ABI PRISM®3100 Avant Genetic Analyzer, sau đó sử dụng BLAST của NCBI để so sánh các trình tự thu được. Kết quả khẳng định, phân đoạn DNA nhân bản được là trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của lan hài Đuôi công (*P. gratrixianum*), độ tương đồng trình tự nucleotide lên đến 99,32% với loài *P. gratrixianum* phân lập tại Trung Quốc (mã số MV284890.1) với độ dài phân tích được là 591 nucleotid.

Sơ đồ phân loại hình cây được xây dựng dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *trnH-psbA* của mẫu nghiên cứu với 32 trình tự vùng gen *trnH-psbA* của các loài thuộc chi *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Selenipedium* đã được công bố trên Genbank bằng phần mềm MegaX. Phân tích tiến hóa thông qua phương pháp Maximum Likelihood. Lịch sử tiến hóa được đưa ra dựa trên việc sử dụng phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei [18]. Cây phân loại dựa trên hệ số likelihood lớn nhất (-1102,40) được lựa chọn trình bày như hình 2.



Hình 2. Sơ đồ phân loại hình cây được xây dựng dựa trên trình tự gen *trnH-psbA* của hải Đuôi công nghiên cứu với một số loài thuộc chi *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Selenipedium* công bố trên GenBank

Phân tích sơ đồ phân loại hình cây (hình 2) nhận thấy, 33 loài nghiên cứu được chia thành 2 nhánh lớn, trong đó 4 loài thuộc chi *Phragmipedium*, *Selenipedium* đứng thành một nhánh riêng biệt và 28 loài chi *Paphiopedilum* đứng trong nhánh còn lại. Điều đó cho thấy, trình tự *trnH-psbA* phản ánh rất rõ mức độ quan hệ họ hàng của các loài hải. Xét trong chi *Paphiopedilum*, 28 loài lại được chia ra thành 2 nhánh lớn. Nhánh thứ nhất gồm đại diện một số loài đặc hữu của Việt Nam như hải Hồng (*P. delenatii*), hải Việt (*P. vietnamense*), hải Hằng (*P. hangianum*) và một số loài không đặc hữu nhưng phổ biến ở Việt Nam như hải Ráp (*P. malipoense*), hải Jacki (*P. malipoense* var. *jackii*) với hệ số bootstrap rất cao lên tới 98%. Nhóm thứ hai đông đảo loài hơn bao gồm chủ yếu các loài đặc hữu hoặc có nguồn gốc xuất xứ của nước ngoài. Hải Đuôi công trong nghiên cứu nằm ở nhóm thứ hai, nó có quan hệ họ hàng chặt chẽ với hải Trần liên của Việt

Nam (*P. tranlienianu*) và 2 loài hải trên thế giới là *P. spicerianum* (hải đặc hữu của Ấn Độ) và *P. barbigerum* (được tìm thấy lần đầu ở Trung Quốc) với hệ số bootstrap là 61%.

Như vậy, kết quả phân tích dựa vào cây phân loại lập trên trình tự gen *trnH-psbA* đã cho thấy rõ sự phân nhóm trong quan hệ họ hàng các loài các loài lan hải khác nhau. Điều đó chứng tỏ đây là chỉ thị rất tiềm năng trong việc sử dụng để nhận dạng lan hải bằng mã vạch DNA. Kết hợp giữa phân tích DNA mã vạch và đặc điểm hình thái sẽ cung cấp thông tin chính xác trong định danh cũng như đánh giá đa dạng của các loài lan Hải.

Sử dụng mã vạch DNA để nhận diện các loài thực vật đã trở nên phổ biến và có vai trò quan trọng trong phân loại thực vật ngày nay. Đối với họ Lan (Orchidaceae), mã vạch DNA cũng đã được áp dụng để nhận diện nhiều loài trong các chi *Dendrobium* [19], [20], *Phalaenopsis* [4], [21], *Cypripedium* [22], *Grammatophyllum*, *Cymbidium* [19], *Vanda* [23] và *Spathoglottis* [24]. Đối với chi lan Hải, nghiên cứu nhận dạng các loài dựa vào mã vạch lần đầu được tiến hành vào năm 2012 bởi nhóm tác giả Parveen và cộng sự. Thí nghiệm đã tiến hành trên tám loài *Paphiopedilum* của Ấn Độ và sử dụng năm mã vạch tiềm năng là *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, và *ITS* [25]. Khi nghiên cứu về DNA barcode ở thực vật, Hollingsworth và cộng sự 2009 đã xác nhận *rbcL* và *matK* có hiệu quả phân biệt tốt khi sử dụng đơn lẻ. *rbcL* có ưu điểm dễ dàng khuếch đại tuy nhiên lại khá bảo thủ; trong khi đó, *matK* có sự biến đổi rộng nhưng khuếch đại kém [9]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về sử dụng mã vạch DNA trong nhận diện lan Hải cũng đã được tiến hành với một số chỉ thị khác nhau như *ITS*, *LEAFY*, *ACO*, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* [26]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, gen *trnH-psbA* trên mẫu hải Đuôi công được phân tích và cho thấy khả năng nhận diện lan Hải rất tốt của chỉ thị này. Kết quả nghiên cứu này đã đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu về trình tự DNA mã vạch trong nghiên cứu các loài lan Hải của Việt Nam.

4. Kết luận

Kết hợp giữa đặc điểm hình thái và sử dụng chỉ thị gen *trnH-psbA* có khả năng định danh chính xác cây lan hải Đuôi công (*P. gratixianum*) của Việt Nam. Nghiên cứu cũng cho thấy tiềm năng sử dụng DNA mã vạch này trong việc định danh lan hải, đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu về trình tự DNA mã vạch trong các nghiên cứu về lan hải của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. Averyanov, P. Cribb, K. L. Phan, and T. H. Nguyen, *Slipper Orchids of Vietnam*. Bird Life, Royal Botanic Gardens KEW; World Bank: Ho Chi Minh City, Vietnam, 2004, p. 308.
- [2] U.C.N. The IUCN, *Red List of Threatened Species*, IUCN: Gland, Switzerland, 2019.
- [3] Vietnam Red Book - Plant – pp 461, 2007
- [4] L. C. De, D. R. Singh, and R. K. Singh, "Morphological characterization in Mokara Orchids," *Int. J. Biosci.*, vol. 15, pp. 31-41, 2019.
- [5] P. D. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Proc Biol Sci*, vol. 270, pp. 313-321, 2003.
- [6] CBOL Plant Working Group, "A DNA barcode for land plants," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 106, pp. 12794-12797, 2009, doi: 10.1073/pnas.0905845106.
- [7] W. J. Kress and D. L. Erickson, "A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 6, 2007, Art. no. e508, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>.
- [8] M. Bolson, E. Smidt, M. L. Brotto, and V. Silva-Pereira, "ITS and *trnH-psbA* as efficient DNA Barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from southern Brazilian Atlantic rainforests," *PLOS ONE*, vol. 10, 2015, Art. no. e0143049, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143049>.
- [9] P. M. Hollingsworth, L. L. Forrest, and J. L. Spouge, "A DNA barcode for land plants," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 106, pp. 12794-12797, 2009.
- [10] T. H. T. Vu, A. K. Tran, Q. cL. Vu, T. L. Le, C. H. Pham, and H. D. Tran, "Genetic characteristics of the endemic orchid species *Paphiopedilum delenatii* in Vietnam," *Viet Nam Journal of science and Technology*, vol. 5, pp. 60-64, 2019.

- [11] L. V. Averyanov, P. Cribb, K. L. Phan, and T. H. Nguyen, *Slipper Orchids of Vietnam, with an Introduction the flora of Vietnam*, Royal Botanic Gardens, Kew. Compass Press Limited. 308 p. ISBN 1 84246 047 1, 2003.
- [12] G. G. Collins and R. H. Symons, "Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by modified procedure," *Plant Mol Bio Rept*, vol. 10, pp. 233-235, 1992.
- [13] V. L. Averyanov, O. Gruss, C. X. Canh, P. K. Loc, B. X. Dang, and N. T. Hiep, "*Paphiopedilum canhii* - a new species from Northern Vietnam," *Orchids*, vol. 79, no. 5, pp. 289-290, 2010.
- [14] O. Gruss, V. L. Averyanov, C. X. Canh, and N. H. Tuan, "A new variety of a natural hybrid of the genus *Paphiopedilum* from Vietnam: *Paphiopedilum* × *aspersum* var. *trantuanhii*," *Die Orchidee*, vol. 4, pp. 52-54, 2018.
- [15] H. Einzmann, N. Schickenberg, and G. Zotz, "Variation in root morphology of epiphytic orchids along small-scale and large-scale moisture gradients," *Acta Brasiliica Botanica*, vol. 34, pp. 66-73, 2020.
- [16] S. Tsiftsis, "Morphological variability of *Himantoglossum* s.s. (Orchidaceae) in Greece," *Phytotaxa*, vol. 245, pp. 17-30, 2016.
- [17] F. P. Zhang, J. L. Huang, and S. B. Zhang, "Trait evolution in the slipper orchid *Paphiopedilum* (Orchidaceae) in China," *Plant Signaling & Behavior*, vol. 11, 2016, Art. no. e1149668.
- [18] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, pp. 512-526, 1993.
- [19] P. Siripiyasing, K. Kaenratana, P. Mookamul, T. Tanee, R. Sudmoon, and A. Chaveerach, "DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand," *Afr J Agric Res*, vol. 7, pp. 393-404, 2012.
- [20] A. L. Dian, G. Perwitasari, S. Rohimah, T. Ratnasari, B. Sugiharto, and M. Su'udi, "DNA Barcoding of Medicinal Orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar Using *rbcL* and ITS genes," *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, vol. 31, no. 1, p. 8, 2020.
- [21] P. Cribb, *The genus Paphiopedilum: A kew magaine monograph*. The Royal Botanic Gardens, Kew/Timber Press, 1987.
- [22] J. S. Kim, H. T. Kim, S. W. Son, and J. H. Kim, "Molecular identification of endangered Korean lady's slipper orchids (*Cypripedium*, Orchidaceae) and related taxa," *Botany*, vol. 93, pp. 603-610, 2015.
- [23] G. S. W. Khew and T. F. Chia, "Parentage determination of *Vanda Miss Joaquim* (Orchidaceae) through two chloroplast genes *rbcL* and *matK*," *AoB Plants*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1093/aobpla/plr018.
- [24] F. C. Ginibun, M. R. M. Saad, T. L. Hong, R. Y. Othman, N. Khalid, and S. Bhassu, "Chloroplast DNA Barcoding of *Spathoglottis* Species for Genetic Conservation," *Acta Hortuc*, vol. 878, pp. 453-460, 2010.
- [25] I. Parveen, H. K. Singh, S. Malik, S. Raghuvanshi, and S. B. Babbar, "DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species," *Mol Ecol Resour*, vol. 12, pp. 82-90, 2012.
- [26] H. T. Vu, Q. L. Vu, T. D. Nguyen, N. Tran, T. C. Nguyen, P. N. Luu, D. D. Tran, T. K. Nguyen, and L. Le, "Genetic Diversity and Identification of Vietnamese *Paphiopedilum* Species Using DNA Sequences," *Biology*, vol. 9, no. 1, p. 9, 2020, doi: 10.3390/biology901000.