

## A STUDY ON THE CORRELATION BETWEEN DNA MARKERS AND MORPHOLOGY CHARACTERISTICS FOR IDENTIFICATION OF *Paphiopedilum helenae* Aver. OF VIET NAM

Nguyen Thi Hai Yen<sup>1</sup>, Nguyen Dinh Trong<sup>2</sup>, Ngo Xuan Quang<sup>3,4</sup>, Do Tien Phat<sup>2,4\*</sup>, Chu Hoang Mau<sup>5</sup>

<sup>1</sup>TNU - University of Sciences, <sup>2</sup>VAST - Institute of Biotechnology, <sup>3</sup>VAST - Institute of Tropical Biology,

<sup>4</sup>VAST - Graduate University of Sciences and Technology, <sup>5</sup>TNU - University of Education

| ARTICLE INFO                       | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Received: 02/3/2022                | <i>Paphiopedilum</i> orchids are loved for their beautiful flowers but are now increasingly depleted in the wild due to over-exploitation. To support bio conservation, not only the establishment of regulations prohibiting exploitation and trade it is necessary to prioritize the development of identification and phylogenetic analysis because species of the <i>Paphiopedilum</i> genus have similar morphology, difficult to distinguish when the plant is small or not yet flowering. This study presents the results of correlation analysis between morphological features and markers <i>trnH-psbA</i> and ITS in the identification and taxonomy of <i>Paphiopedilum helenae</i> Aver. originated in Thai Nguyen, Vietnam. The results showed that the identification of Helen's orchid by two markers <i>trnH-psbA</i> and ITS was completely consistent with the comparative morphological method. the DNA barcoding of <i>Paphiopedilum helenae</i> has very high similarity with those in two species <i>Paphiopedilum tranlienianum</i> and <i>Paphiopedilum barbigerrum</i> (up to 99.98%). The molecular phylogeny tree was established by the MEGAX and evolutionary analysis was taken through the Maximum Likelihood method also shows the close relationship of three studied species. The combination of <i>trnH-psbA</i> and ITS markers is a candidate for DNA barcoding for rapid identification of <i>Paphiopedilum helenae</i> Aver. |
| Revised: 21/4/2022                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Published: 21/4/2022               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| KEYWORDS                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Comparative morphology             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| DNA barcode                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| ITS                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Paphiopedilum helenae</i> Aver. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>trnH-psbA</i>                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

## NGHIÊN CỨU SỰ TƯƠNG QUAN GIỮA CHỈ THỊ DNA VÀ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI PHỤC VỤ ĐỊNH DANH LAN HÀI HELEN (*Paphiopedilum helenae* Aver.) CỦA VIỆT NAM

Nguyễn Thị Hải Yến<sup>1</sup>, Nguyễn Đình Trọng<sup>2</sup>, Ngô Xuân Quảng<sup>3,4</sup>, Đỗ Tiến Phát<sup>2,4\*</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên, <sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

<sup>3</sup>Viện Sinh học nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

<sup>4</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, <sup>5</sup>Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

| THÔNG TIN BÀI BÁO          | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ngày nhận bài: 02/3/2022   | Lan hài thuộc chi <i>Paphiopedilum</i> được yêu thích bởi hoa rất đẹp, nhưng hiện nay đang ngày càng cạn kiệt trong tự nhiên do khai thác quá mức. Để bảo vệ lan hài, ngoài việc thiết lập các quy định cấm khai thác và buôn bán thì cần phải ưu tiên ứng dụng các phương pháp nhận diện và phân tích phát sinh loài, vì các loài thuộc chi <i>Paphiopedilum</i> có hình thái tương đồng, khó phân biệt khi cây nhỏ hoặc chưa ra hoa. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân tích tương quan giữa đặc điểm hình thái với chỉ thị <i>trnH-psbA</i> và ITS trong định danh, phân loại loài lan hài Helen ( <i>Paphiopedilum helenae</i> Aver.) có nguồn gốc tại Thái Nguyên, Việt Nam. Kết quả cho thấy việc nhận diện lan hài Helen bằng hai chỉ thị <i>trnH-psbA</i> và ITS hoàn toàn phù hợp với phương pháp hình thái so sánh. Trong đó trình tự mã vạch DNA của <i>Paphiopedilum helenae</i> có độ tương đồng rất cao với trình tự gen tương ứng của hai loài <i>Paphiopedilum tranlienianum</i> và <i>Paphiopedilum barbigerrum</i> (độ tương đồng lên tới 99,98%). Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ gần gũi của ba loài này. Sự kết hợp hai chỉ thị <i>trnH-psbA</i> và ITS là ứng cử viên mã vạch DNA để nhận diện nhanh loài lan hài Helen ( <i>Paphiopedilum helenae</i> Aver.). |
| Ngày hoàn thiện: 21/4/2022 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Ngày đăng: 21/4/2022       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| TỪ KHÓA                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hình thái so sánh          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| ITS                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Lan hài Helen              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Mã vạch DNA                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <i>trnH-psbA</i>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5607>

\* Corresponding author. Email: [phatmyzou81@gmail.com](mailto:phatmyzou81@gmail.com)

## 1. Mở đầu

*Paphiopedilum* là một chi lan đặc biệt và được ưa thích trong họ Orchidaceae. Trên thế giới, các loài lan hài được xếp vào 5 chi là *Cypripedium*, *Mexipedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* và *Selenipedium*. Trong 5 chi đó, *Paphiopedilum* có số lượng loài lớn nhất, khoảng 80 loài đã được công nhận trên thế giới, trong đó, một số là loài lai tự nhiên. Các loài thuộc chi *Paphiopedilum* phân bố chủ yếu ở các vùng nhiệt đới Châu Á từ Nam Ấn Độ, Đông Himalaya đến Philippines, New Guinea và quần đảo Solomon [1]. Chi *Paphiopedilum* ở Việt Nam có sự đa dạng cao với khoảng trên 22 loài, bao gồm các loài đặc hữu, loài du nhập và loài lai tự nhiên. Lan hài là một cấu phần không thể thiếu của rừng nguyên sinh, tuy nhiên quần thể này đang giảm đi một cách nhanh chóng dẫn tới việc khó có khả năng phục hồi được, trong đó một số loài rất nguy cấp đã được đưa vào nghị định, bảo vệ đặc biệt như *P. vietnamense* (hài bóng), *P. armeniacum* (hài Mốc vàng), *P. micranthum* (hài Mốc hồng) [2]. Hiện nay, có nhiều các khu bảo tồn được thành lập để bảo vệ các loài nguy cấp bao gồm cả lan hài. Tuy nhiên, các nhà thực thi nhiệm vụ thường gặp khó khăn trong nhận diện các loài lan hài, bởi đây là một nhóm có khá nhiều loài giống nhau về hình thái thân lá. Do đó, việc tìm kiếm, phát triển các phương pháp nhận diện loài và quan hệ họ hàng là rất cần thiết.

Các nghiên cứu trước đây căn cứ vào đặc điểm hình thái đã phân *Paphiopedilum* thành 3 subgenus là *Paphiopedilum*, *Parvisepalum* và *Brachypetalum*, trong đó Subgenus *Paphiopedilum* có số lượng loài đông đảo và tiến hóa hơn cả [1]. Subgenus *Paphiopedilum* lại được chia thành 5 section nhỏ là *Coryopetalum*, *Pardalopetalum*, *Barbata*, *Cochlopetalum* và *Paphiopedilum*. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp đặc biệt, sự giao thoa về hình thái đã gây khó khăn khi phân loại lan hài như trường hợp cây hài Cảnh (*P. canhii*). Do sự giao thoa về hình thái, giải phẫu nên khi phân loại, các nhà khoa học đã phải đề xuất section mới *Pygmaea* dưới subgenus *Paphiopedilum* [3] và sau đó đề xuất một subgenus mới *Megastaminodium* để chứa riêng loài này [4], [5]. Các phương pháp nhận diện loài lan hài mới về sau đều dựa trên hệ thống phân loại này.

Hài Helen (*Paphiopedilum helenae* Aver.) là loài đặc hữu của Việt Nam, được xem là loài lan hài có kích thước nhỏ nhất, chúng được phát hiện vào năm 1995 tại Cao Bằng [1] sau đó được ghi nhận ở Bắc Kạn và một số núi đá thuộc tỉnh Thái Nguyên [6]. Theo hệ thống phân loại của Averyanov và cộng sự (2004), *P. helenae* Aver. thuộc section *Paphiopedilum*; subgenus *Paphiopedilum* và chi *Paphiopedilum* [1]. Năm 2019, Vũ Huyền Trang và cs cũng đã phân loại sơ bộ lan hài Việt Nam dựa vào hình thái, theo đó *P. helenae* Aver. được xếp vào nhóm 2A gồm những loài hài lá nhỏ, dài, mềm và không có vân. Trong nhóm này, có một số loài rất khó nhận diện, thậm chí không phân biệt được với nhau khi sử dụng hình thái thân lá như *P. coccianum*, *P. henryanum*, *P. hecmanii*, *P. helenae* [7]. Việc sử dụng hình thái để phân loại lan hài cần kết hợp toàn bộ các đặc điểm như lá, thân, rễ, hoa... ở các giai đoạn khác nhau và phải được thực hiện bởi các nhà chuyên môn về phân loại thực vật học để đảm bảo tính chính xác của phân tích. Tuy nhiên, các loài lan hài thu thập ở các khu vực khác nhau, thời điểm nở hoa ngắn lại rải rác trong năm nên việc phân biệt được các loài lan hài này đặc biệt khi cây chưa có hoa hoặc giai đoạn cây còn nhỏ gặp nhiều khó khăn. Do vậy, cần có các phương thức hiệu quả để định danh loài lan hài quý hiếm này.

Hiện nay, mã vạch DNA (DNA barcode) được ứng dụng rộng rãi trong định danh loài với độ chính xác cao, nhanh chóng và có khả năng tự động hóa tốt [8]. Hiệu quả của việc nhận diện các loài thực vật phụ thuộc rất nhiều vào việc lựa chọn và sử dụng trình tự phù hợp. Các mã vạch DNA thực vật hiện nay đa số đều nằm trong hệ gen lục lạp, đó có thể là các trình tự mã hóa (như *rbcL* và *matK*) hoặc trong các vùng liên gen (như *trnH-psbA*) [9]. Một số locus gen nhân cũng được sử dụng làm mã vạch DNA, điển hình là ITS (internal transcribed spacer-ITS) [10]. Trong một số trường hợp đặc biệt, cần có kết hợp nhiều chỉ thị và nhiều tiêu chí mới có thể xác định chính xác loài [4], [5]. Ở thực vật, *trnH-psbA* và ITS đang được sử dụng khá phổ biến trong định danh loài thực vật đã cho thấy hiệu quả của cách tiếp cận này [10], [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận sự tương quan chặt của hai mã vạch DNA barcode *trnH-psbA* và ITS với đặc

điểm hình thái trong nhận diện, phân loại loài *P. helenae* Aver. Đây là cơ sở quan trọng để sử dụng các mã vạch barcode thay thế hoặc kết hợp với đặc điểm hình thái nhằm nhận diện lan hài một cách nhanh chóng và hiệu quả.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Ba mẫu lan hài cần phân loại, có thể là Helen (*P. helenae* Aver.) thu thập tại huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên kí hiệu là HL01, HL02 và HL03 (bảng 1).

**Bảng 1.** Mẫu lan hài thu thập được sử dụng trong nghiên cứu

| Kí hiệu | Nơi thu thập          | Nuôi trồng và lưu trữ | Tình trạng cây   |
|---------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| HL01    | Đồng Hỷ - Thái Nguyên | Vườn thí nghiệm       | Cây đã cho hoa   |
| HL02    | Đồng Hỷ - Thái Nguyên | Vườn thí nghiệm       | Cây trưởng thành |
| HL03    | Đồng Hỷ - Thái Nguyên | Vườn thí nghiệm       | Cây mang hoa     |

Cặp mồi nhân đoạn trình tự *trnH-psbA*, ITS (bảng 2).

**Bảng 2.** Trình tự và thông tin các cặp mồi dùng trong nghiên cứu

| Cặp mồi                        | Trình tự mồi                                                               | Nhiệt độ gắn mồi | Kích thước dự kiến |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|
| <i>trnH-psbA_F/trnH-psbA_R</i> | 5'-GTTATGCATGAACGTAATTGCTC-3'<br>5'-CGCGCATGGTGGATTACACAATCC-3'            | 52               | 600 bp             |
| <i>ITS_F/ITS_R</i>             | 5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG-3'<br>5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3' | 56               | 900 bp             |

Thí nghiệm sinh học phân tử sử dụng các hóa chất và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm gen - Viện Công nghệ sinh học.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của lan hài

Đối tượng nghiên cứu được quan sát và mô tả trực tiếp, kết hợp với so sánh đối chiếu trong các tài liệu, các khóa định loại [12]. Các dụng cụ sử dụng hỗ trợ gồm thước kẹp, máy ảnh, thước dây, (palme), dao mổ, dao lam.

#### 2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử

DNA được tách chiết dựa theo phương pháp của Collins và Symons (1992) [13].

Phản ứng PCR được thực hiện với thành phần bao gồm 2 µl đệm 10x; 2 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,8 µl mồi 10 pmol mỗi loại; 100 ng DNA tổng số 1,6 µl dNTPs 2,5 mM; 0,4 µl Taq DNA polymerase (1 u/µl) và 12 µl H<sub>2</sub>O. Chu trình nhiệt: 94°C/5 phút; (94°C/45", 52°C/30" (*trnH-psbA*) hoặc 56°C/30" (ITS), và 72°C/40") lặp lại 30 chu kì; 72°C/10 phút.

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng QIAquick PCR Purification Kit. Xác định trình tự nucleotide trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Các trình tự được xử lý bằng phần mềm Snapgene, Blast trong NCBI, sử dụng phần mềm MEGA X để dựng cây phân loại.

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Đặc điểm thực vật học của mẫu lan hài thu thập được

Thân của mẫu lan hài thu thập được mang 4 - 6 lá xếp thành 2 dãy, lá vươn hướng lên trên, cổ lá xếp chông lổn lẻo và có xu hướng ngả xuống. Lá thuôn dài, đầu lá hơi nhọn với chiều dài khoảng 4 - 5 cm hoặc hơn, chiều rộng lá 1- 1,2 cm, mặt trên có màu xanh đậm, mặt dưới xanh bạc.



**Hình 1.** Hình ảnh cấu trúc cây, hoa của mẫu lan thu thập được

A: Hình ảnh hoa trên phát hoa; B: Cấu trúc phát hoa, bầu và lá bắc; C, D và E: Mặt trước và mặt sau của lá đài trước, lá đài sau và cánh hoa; F: Môi; G: Khiên đẩy trụ hoa; H: Cấu tạo thân lá và rễ (Bar = 1 cm)

Hoa mọc ở đầu phát hoa, cụm hoa mang 1 hoa. Kích thước hoa khá to khoảng 5 cm, màu vàng hơi đậm và ngả nâu, cánh đài trên mang viền trắng, cánh đài trên dài 2,2 cm, rộng 2 cm, hình tròn hơi thuôn ở phía cuống, viền cánh đài hơi vênh ra phía sau, còn toàn bộ cánh đài lại úp về phía trước. Mặt trước cánh đài sau màu vàng có viền nhỏ màu trắng cỡ 1 mm chạy bao nửa phía trên, phía gốc cánh đài mang những tia màu nâu tím tỏa ra, mặt trước cánh đài trên không có lông bao phủ. Mặt sau vàng đậm hơn mặt trước, có viền tương tự mặt trước. Phía gốc cánh đài mang nhiều tia màu nâu hơn mặt trước. Sống gân nổi rõ, có lông ngắn bao phủ toàn bộ mặt sau cánh đài (hình 1C). Cánh đài dưới có hình tròn hơi nhọn được hình thành từ 2 lá đài phụ, còn gọi là lá đài kết hợp với kích thước khoảng 1,8 x 1,5 cm. Mặt trong có màu vàng xanh, có lông mảnh bao phủ, mặt ngoài xanh nhạt hơi vàng mang các lông ngắn màu nâu bản ở khu vực sống lưng. Cả mặt trước và mặt sau không rõ đường gân (hình 1D). Cánh hoa hình thuôn dài không có lông kích thước 2,7 x 0,8 cm, màu vàng có các gân chìm màu tím nâu chạy song song (hình 1E). Môi đài, trơn bóng, gồm các mảng vàng nhạt xen tím nhạt, hình tròn hơi elip, kích thước 3 x 2 cm (hình 1F). Staminode (khiên đẩy trụ hoa) dài 1 cm, rộng 0,7 cm hình tim, cuống hơi dài. Staminode có màu xanh cốm nhạt, bóng, mặt trên có chứa các chấm nhỏ màu nâu. Bao phấn màu nâu hình cầu với đường kính tầm 0,5 mm. Noãn có hình tròn, kích thước 3 x 3 mm màu trắng bóng (hình 1G). Bầu màu xanh lục nhạt xen các đốm dài màu nâu, bao phủ bởi lông ngắn màu nâu tím bản, chiều dài khoảng 2,5 và đường kính tầm 2 - 2,5 mm (hình 1B).

Hệ rễ được bao phủ bởi một lớp vỏ lụa mang nhiều lông hút, đầu rễ non có màu trắng ngà, các rễ già có màu sậm và nhiều lông hơn. Các rễ mọc ngay dưới các bẹ lá, rồi phân ra các rễ thứ cấp. Lan hài là nhóm có rễ khá dài, gấp nhiều lần chiều dài lá do thích nghi với đặc điểm sinh trưởng của chúng là bò trên bề mặt các tầng đá trong rừng.

Như vậy, về mặt hình thái, các mẫu lan hài thu thập tại Thái Nguyên có độ tương đồng hoàn toàn với mẫu lan hài Helen (*Paphiopedilum helenae* Aver.) đã được đề cập trong các công bố trước đây [1], [13]. Các mẫu này tiếp tục được lựa chọn cho phân tích các trình tự DNA mã vạch.

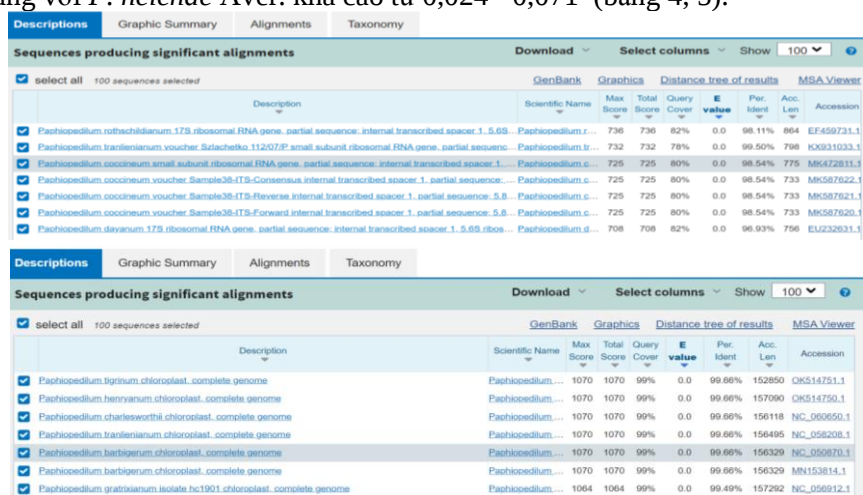
### 3.2. Phân tích đặc điểm mã vạch DNA của lan hài Helen

Kết quả điện di sản phẩm PCR của hai chỉ thị *trnH-psbA*, ITS đều thu được một phân đoạn DNA đặc hiệu, có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết. Kết quả giải trình tự cho thấy, hai chỉ thị *trnH-psbA*, ITS của *P. helenae* Aver. có độ tương đồng rất cao với trình tự chỉ thị tương ứng các loài *Paphiopedilum* của Việt Nam và thế giới (hình 2). Sơ đồ phân loại hình cây được xây dựng dựa trên kết quả so sánh trình tự đoạn *trnH-psbA*, ITS của mẫu nghiên cứu với 8 loài thuộc chi *Paphiopedilum* (bảng 3).

**Bảng 3.** Mã số trình tự chỉ thị của các loài *Paphiopedilum* sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Loài<br><i>Paphiopedilum</i> | Mã số truy cập <i>trnH-psbA</i> trong<br>GenBank | Mã số truy cập ITS trong<br>GenBank |
|-----|------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1.  | <i>P. barbigerrum</i>        | MN153814.1                                       | AY643442.1                          |
| 2.  | <i>P. emersonii</i>          | NC_053544.1                                      | MH550876.1                          |
| 3.  | <i>P. hangianum</i>          | EF156024.1                                       | MH550873.1                          |
| 4.  | <i>P. hirsutissimum</i>      | MN153815.1                                       | KX931031.1                          |
| 5.  | <i>P. micranthum</i>         | NC_045278.1                                      | GU993849.1                          |
| 6.  | <i>P. purpuratum</i>         | EF156052.1                                       | KX931030.1                          |
| 7.  | <i>P. tranlienianum</i>      | MW794129.1                                       | KX931033.1                          |
| 8.  | <i>P. vietnamense</i>        | EF156073.1                                       | MH550871.1                          |

Kết quả phân tích trình tự nhận thấy *P. helenae* Aver. trong nghiên cứu có độ tương đồng rất cao với *P. tranlienianum* (mã số MW794129.1, KX931033.1), *P. barbigerrum* (mã số MN153814.1, AY643442.1) và *P. hirsutissimum* (mã số MN153815.1, KX931031.1) hệ số sai khác chỉ 0,002 - 0,62. Đây là các loài thuộc section *Paphiopedilum*, subgenus *Paphiopedilum*. Đối với những loài còn lại, thuộc subgenus *Pavisepalum* gồm *P. vietnamense* (mã số EF156073.1, MH550871.1), *P. hangianum* (mã số EF156024.1, MH550873.1), *P. emersonii* (mã số NC\_053544.1, MH550876.1) và *P. micranthum* (mã số NC\_045278.1, GU993849.1) thì hệ số sai khác của chúng với *P. helenae* Aver. khá cao từ 0,024 - 0,071 (bảng 4, 5).



**Hình 2.** Hình ảnh Blast trình tự ITS (A) và *trnH-psbA* (B) của mẫu *P. helenae* Aver. nghiên cứu

Cây phân loại (hình 3A-C) được xây dựng bằng phần mềm Mega X dựa trên trình tự *trnH-psbA* và ITS của mẫu nghiên cứu với các trình tự đã được công bố trên Genbank (bảng 3). Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei để phân tích tiến hóa [14]. Nhận thấy, *P. helenae* Aver. cùng với các loài thuộc subgenus *Paphiopedilum* có quan hệ chặt chẽ gần gũi với nhau, nằm trong cùng nhánh kể cả khi dùng chỉ thị *trnH-psbA* hay ITS hoặc kết hợp cả hai chỉ thị *P. helenae* Aver. và các loài thuộc subgenus *Paphiopedilum* tách biệt với các loài *P. vietnamense* (hài Việt), *P. emersonii* (hài Hương), *P. hangianum* (hài Hăng) và *P. micranthum* (hài Mốc hồng), thuộc subgenus *Pavisepalum* với hệ số bootstrap từ 91 - 98%.

**Bảng 4.** Hệ số sai khác giữa *P. helenae* Aver. với 8 loài nghiên cứu dựa trên trình tự *trnH-psbA*

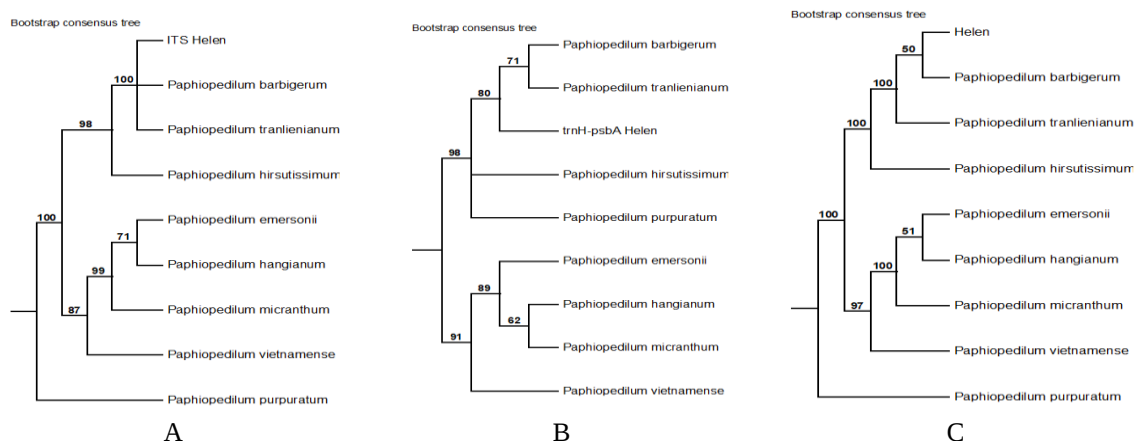
|                           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 <i>trnH-psbA</i> Helen  |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2 <i>P. vietnamense</i>   | 0,020 |       |       |       |       |       |       |       |
| 3 <i>P. tranlienianum</i> | 0,002 | 0,019 |       |       |       |       |       |       |
| 4 <i>P. purpuratum</i>    | 0,007 | 0,020 | 0,006 |       |       |       |       |       |
| 5 <i>P. micranthum</i>    | 0,024 | 0,009 | 0,022 | 0,024 |       |       |       |       |
| 6 <i>P. hirsutissimum</i> | 0,006 | 0,019 | 0,004 | 0,006 | 0,022 |       |       |       |
| 7 <i>P. hangianum</i>     | 0,026 | 0,011 | 0,024 | 0,026 | 0,002 | 0,024 |       |       |
| 8 <i>P. emersonii</i>     | 0,028 | 0,013 | 0,026 | 0,028 | 0,004 | 0,026 | 0,006 |       |
| 9 <i>P. barbigerum</i>    | 0,002 | 0,019 | 0,000 | 0,006 | 0,022 | 0,004 | 0,024 | 0,026 |

**Bảng 5.** Hệ số sai khác giữa *P. helenae* Aver. với 8 loài nghiên cứu dựa trên trình tự ITS

|                           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 ITS Helen               |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2 <i>P. barbigerum</i>    | 0,006 |       |       |       |       |       |       |       |
| 3 <i>P. vietnamense</i>   | 0,075 | 0,068 |       |       |       |       |       |       |
| 4 <i>P. tranlienianum</i> | 0,011 | 0,006 | 0,075 |       |       |       |       |       |
| 5 <i>P. purpuratum</i>    | 1,312 | 1,324 | 1,392 | 1,342 |       |       |       |       |
| 6 <i>P. micranthum</i>    | 0,059 | 0,053 | 0,041 | 0,059 | 1,338 |       |       |       |
| 7 <i>P. hirsutissimum</i> | 0,062 | 0,055 | 0,103 | 0,062 | 1,278 | 0,087 |       |       |
| 8 <i>P. hangianum</i>     | 0,059 | 0,053 | 0,053 | 0,059 | 1,342 | 0,017 | 0,080 |       |
| 9 <i>P. emersonii</i>     | 0,071 | 0,065 | 0,065 | 0,071 | 1,350 | 0,029 | 0,093 | 0,011 |

Xét trong cùng subgenus *Paphiopedilum*, khi sử dụng chỉ thị *trnH-psbA* hoặc ITS đơn lẻ, *P. helenae* Aver. không phân biệt được với 2 loài gần gũi là *P. tranlienianum* và *P. barbigerum*, chúng nằm cùng nhánh trên sơ đồ phân loại với hệ số bootstrap từ 80 - 100% (hình 3A, B). Khi kết hợp chỉ thị *trnH-psbA* và ITS, kết quả thu được cho thấy *P. helenae* Aver. có thể phân biệt được với loài *P. tranlienianum* (hệ số bootstrap 100%), tuy nhiên vẫn không phân biệt được với loài *P. barbigerum* (hình 3C).

### 3.3. Thảo luận

**Hình 3.** Cây phân loại được xây dựng dựa trên trình tự *trnH-psbA* (A), ITS (B) và kết hợp *trnH-psbA* với ITS (C) của loài *P. helenae* Aver nghiên cứu với một số loài thuộc chi *Paphiopedilum*

Phương pháp phân loại thực vật dựa vào các đặc điểm hình thái tuy là cổ điển nhưng rất có giá trị. Các nhà khoa học đã xây dựng và phát triển nhiều khóa định loại thực vật dựa trên hình thái. Do đó, đối với họ Lan (Orchidaceae), những công bố loài mới xưa nay hầu hết đều dựa trên các mô tả về hình thái [13], [15]-[17]. Averyanov và cộng sự (1996) bằng phân loại hình thái học đã

phát hiện được loài *P. helenae* Aver. Kết quả công bố cũng cho thấy loài này có nhiều đặc điểm tương đồng và rất gần gũi với *P. barbigerum* [13], *P. tranlienianum* [17]. Các loài này, cùng với một số loài khác trong subgenus *Paphiopedilum* rất khó phân biệt khi cây còn nhỏ, chúng đều có kiểu lá thuôn dài, nhỏ, xanh lục đồng màu. Khi cây trưởng thành, có thể nhận dạng dễ hơn do các đặc điểm về kích cỡ thân lá biểu hiện rõ. Mặc dù vậy, chúng chỉ có thể phân biệt rõ ràng với nhau dựa vào cấu trúc hoa.

Trong phân loại hình thái, đặc điểm cấu trúc hoa là tiêu chí rất quan trọng. Tuy nhiên, đối với lan Hải, là những loài có chu kỳ sinh trưởng dài, thời gian ra hoa ngắn, chỉ 1 lần trong năm, thậm chí có những cây khó ra hoa khi điều kiện sống không thuận lợi. Ngoài ra, lan Hải là nhóm có rất nhiều loài tương đồng về hình thái. Do đó, gây nhiều khó khăn khi nhận diện bằng hình thái thông thường. Để phân biệt những loài gần gũi, phải là các nhà thực vật học có chuyên môn và nhiều kinh nghiệm. Điều này gây khó khăn đối với công tác bảo tồn và thương mại lan Hải, chính vì điều đó, cần phát triển phương pháp nhận diện thuận lợi hơn.

Hiện nay, DNA barcode được sử dụng phổ biến để nhận diện nhanh các loài sinh vật và có vai trò quan trọng trong phân loại thực vật. Đối với họ Lan (Orchidaceae), sử dụng DNA barcode trong phân loại đã được tiến hành trên nhiều chi *Dendrobium* [18], [19], *Phalaenopsis* [20], *Cypripedium* [21], *Grammatophyllum*, *Cymbidium* [18], *Vanda* [22] và *Spathoglottis* [23]. Nghiên cứu sử dụng DNA barcode nhận dạng các loài trong chi *Paphiopedilum* lần đầu được Parveen và cộng sự công bố (2012). Nghiên cứu đã sử dụng 5 chỉ thị tiềm năng là *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK* và ITS trên tám loài *Paphiopedilum* của Ấn Độ, kết quả cho thấy *matK* là chỉ thị đơn lẻ tiềm năng nhất [24]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về sử dụng mã vạch DNA trong nhận diện, phân loại lan hải cũng đã được tiến hành với nhiều chỉ thị (ITS, LEAFY, ACO, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*) và trên các loài khác nhau [25].

Trong nghiên cứu này, khả năng nhận diện *P. helenae* Aver. của hai chỉ thị *trnH-psbA* và ITS có độ tương đồng cao với việc sử dụng các đặc điểm hình thái của loài lan này. Hai chỉ thị này có thể sử dụng thay thế hoặc kết hợp với đặc điểm hình thái để định danh lan hải *P. helenae* Aver. Việc sử dụng các chỉ thị phân tử trong định danh loài cho kết quả ổn định, chính xác, dễ thực hiện và cho kết quả nhanh chóng. Các chỉ thị phân tử có độ chính xác cao sẽ đáp ứng nhu cầu phát hiện, phân loại nhanh các loài lan hải của Việt Nam. Mặc dù vậy, để nhận diện và phân biệt lan hải *P. helenae* Aver. với các loài gần gũi một cách chính xác hơn cần phải tiến hành phân tích thêm các chỉ thị DNA barcode khác. 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 nước ta và trên thế giới.

#### 4. Kết luận

Đặc điểm hình thái của lan hải Helen (*P. helenae* Aver.) thu thập tại Thái Nguyên đã được mô tả. Sử dụng chỉ thị barcodes *trnH-psbA* và ITS trong nhận diện lan hải Helen (*P. helenae* Aver.) thu thập tại Thái Nguyên cho kết quả tương đồng với việc sử dụng các đặc điểm hình thái. Các chỉ thị phân tử này có thể dùng thay thế hay kết hợp với các đặc điểm hình thái trong định danh lan hải (*P. helenae* Aver.) một cách nhanh chóng và hiệu quả.

#### 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, pp. 100-120, 308, 2004.
- [2] *The IUCN, Red List of Threatened Species*, IUCN: Gland, Switzerland, 2019.
- [3] L. Averyanov, V. T. Pham, K. L. Phan, T. H. Nguyen, X. C. Chu, T. V. Nguyen, and Q. H. Nguyen, "Paphiopedilum canhui— from Discovery to Extinction," *Orchid Planet*, vol. 24, pp. 16-44, 2011.
- [4] G. J. Braem and G. R. Gruss, "Paphiopedilum subgenus Megastaminodium Braem & Gruss, a new subgenus to accommodate Paphiopedilum canhui," *Orchid Dig*, 67<sup>th</sup> Santa Barbara International Orchid Show, 2012, pp. 32-35.

- [5] M. Gorniak, D. L. Szlachetko, A. K. Kowalkowska, J. Bohdanowicz, and C. X. Canh, "Taxonomic placement of *Paphiopedilum canhii* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on cytological, molecular and micromorphological evidence," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 70, pp. 429-441, 2014.
- [6] T. B. Nguyen, D. L. Tran, T. Nguyen, V. D. Vu, N. T. Nguyen, V.T. Nuyen, V. K. Nguyen, *Vietnam Red Book - Part II. Plants*, Natural Science and Technology Publishing House, pp. 461, 2007.
- [7] H. T. Vu, M. H. Bui, Q. L. Vu, T. D. Nguyen, H. Tran, H. T. Khuat, and L. Le, "Identification of Vietnamese *Paphiopedilum* Species Using Vegetative Morphology," *Annual Research & Review in Biology*, vol. 34, no. 1, pp. 1-14, 2019.
- [8] 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.
- [9] 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, p. e508, 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000508.
- [10] M. Bolson, E. de C. 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, p. e0143049, 2015, doi: [10.1371/journal.pone.0143049](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143049).
- [11] 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.
- [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] L. V. Averyanov, "Paphiopedilum helenae (Orchidaceae) - new slipper orchid from the North Vietnam/Paphiopedilum helenae (Orchidaceae)" - *Botanicheskiy Zhurnal*, vol. 81, no. 9, pp. 205-210, 1996.
- [14] 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.
- [15] V. L. Averyanov, O. Gruss, X. C. Chu, K. L. Phan, X. D. Bui, and T. H. Nguyen, "Paphiopedilum canhii - a new species from Northern Vietnam," *Orchids*, vol. 79, no. 5, pp. 289-290, 2010.
- [16] O. Gruss, V. L. Averyanov, X. C. Chu, and H. T. Nguyen, "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.
- [17] V. L. Averyanov, "Three new slipper orchids from Vietnam," *Komarovia*, vol. 2, pp. 17-18, 2002.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] P. Cribb, *The genus Paphiopedilum: A kew magaine monograph*. The Royal Botanic Gardens, Kew/Timber Press, 1987.
- [21] 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.
- [22] G. S. W. Khew and T. F. Chia, "Parentage determination of Vanda Miss Joaquim (Orchidaceae) through two chloroplast genes *rbcL* and *matK*," *AoB Plants*, pp. 1-12, 2011, doi: 10.1093/aobpla/plr018.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.