

SỬ DỤNG ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ MÃ VẠCH DNA ĐỂ ĐỊNH DANH LAN HẢI HƯƠNG LAN (*Paphiopedilum emersonii*)

Nguyễn Thị Hải Yến¹, Chu Hoàng Mậu², Đỗ Tiến Phát^{3,4*}

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên,

³Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Họ Lan (Orchidaceae) là một họ thực vật rất lớn với nhiều loài cho hoa đẹp, giá trị cao. Trong họ Lan, chi lan Hải (*Paphiopedilum*) có nhiều loài cho hoa đẹp đặc biệt được yêu thích. Hiện nay, chi lan này đang bị đe dọa nghiêm trọng do khai thác không kiểm soát, nhiều loài trong chi có nguy cơ tuyệt chủng. Việt Nam có 22 trong tổng số khoảng 80 loài *Paphiopedilum*. Nhiều loài trong chi có hình thái tương đồng về thân lá, rất dễ nhầm lẫn khi phân biệt bằng mắt thường khi cây không có hoa. Chính vì vậy, phát triển các phương pháp để nhận diện lan Hải là rất cần thiết. Bài báo trình bày kết quả phân tích hình thái cấu tạo thân, rễ, lá, đặc biệt là chi tiết hoa của lan Hải Hương lan (*P. emersonii*) có nguồn gốc tại Thái Nguyên, Việt Nam, kết hợp với việc xác định trình tự gen lục lạp *rbcL* để nhận diện *P. emersonii*. Kết quả cho thấy, đoạn gen *rbcL* được phân lập từ mẫu Hải Hương lan có kích thước 683 bp. Trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL* được phân tích và so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen NCBI. Độ tương đồng về trình tự nucleotide của mẫu nghiên cứu so với một số loài trong chi *Paphiopedilum* dao động từ 99,13% đến 99,98% (GenBank: NC_045278.1, KT388109.1, NC_041309.1, MK161066.1, MF983795.1, KJ524105.1, AB176547.1, JQ182212.1, JN181467.1, JN181466.1, JN181465.1, JQ182209.1, JN181468.1, AF074209.1). Trên sơ đồ phân loại hình cây thiết lập dựa trên trình tự gen *rbcL*, Hải Hương lan (*P. emersonii*) có quan hệ gần gũi với Hải Hồng (*P. delenatii*).

Từ khóa: DNA mã vạch; *P. emersonii*; hình thái thực vật; gen *rbcL*; Orchidaceae

Ngày nhận bài: 25/7/2020; Ngày hoàn thiện: 16/9/2020; Ngày đăng: 21/10/2020

USING MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DNA BARCODE TO IDENTIFY THE *Paphiopedilum emersonii*

Nguyen Thi Hai Yen¹, Chu Hoang Mau², Do Tien Phat^{3,4*}

¹TNU - University of Sciences, ²TNU - University of Education,

³VAST - Institute of Biotechnology, ⁴VAST - Graduate University of Sciences and Technology

ABSTRACT

Orchid genus *Paphiopedilum* is one of the special genus of the orchid family having beautiful flowers, vibrant colors and a unique structure. Recently, this orchid genus is seriously threatened due to overexploitation causing some of them to be endangered. About 22 specieses of *Paphiopedilum* have been discovered in Vietnam. Of which, many specieses are similar in leaf characteristics causing challenges and confusion for classification by morphological methods. Therefore, development of potential methods to identify species of this orchid genus is essential. In this study, we provided the details in characteristics of stem and leave morphological structures as well as flowers of species *P. emersonii* collected from Thai Nguyen province, Vietnam. In addition, the sequence of *rbcL* gene was also analyzed for the tested *P. Emersonii* species. In this result, a 683 bp fragment of the *rbcL* gene was amplified from the tested *P. emersonii* sample. The *rbcL* nucleotide sequence analysis using the BLAST software in the NCBI indicated that this orchid sample is belong to the *Paphiopedilum* genus. The similarity in the *rbcL* nucleotide sequences of this sample as compared to some species in genus *Paphiopedilum* ranged from 99.15% to 99.98% (GenBank: NC_045278.1, KT388109.1, NC_041309.1, MK161066.1, MF983795.1, KJ524105.1, AB176547.1, JQ182212.1, JN181467.1, JN181466.1, JN181465.1, JQ182209.1, JN181468.1, AF074209.1). According to the dendrogram tree of a the *rbcL* gene sequences, *P. emersonii* species was closely related to *P. delenatii* species.

Keywords: DNA barcode; *P. emersonii*; botanical morphology; *rbcL* gene; Orchidaceae

Received: 25/7/2020; **Revised:** 16/9/2020; **Published:** 21/10/2020

* Corresponding author. Email: dtphat@ibt.ac.vn

1. Mở đầu

Họ Lan (Orchidacea) là một họ thực vật rất lớn với nhiều loài cho hoa đẹp, giá trị cao. Trong họ Lan thì chi lan Hải (*Paphiopedilum*) được đặc biệt yêu thích vì hoa đẹp với màu sắc rực rỡ và cấu trúc độc đáo. Việt Nam là nước có sự đa dạng về lan Hải lớn nhất thế giới với 22 trên tổng số khoảng 80 loài, trong đó có nhiều loài đặc hữu [1]. Hiện nay, hầu hết các loài lan Hải của Việt Nam đang trong nguy cơ tuyệt chủng [2], trong đó một số loài đặc biệt nguy cấp như Hải Việt (*P. vietnamense*), hải Mốc vàng (*P. armeniacum*), hải Mốc hồng (*P. micranthum*) do vùng phân bố hẹp và khai thác không kiểm soát. Do đó việc bảo tồn các giống lan Hải là rất cần thiết và cấp bách. Để thực hiện điều đó, ngoài việc thiết lập các khu vực bảo tồn và xây dựng ra các quy định để cấm khai thác buôn bán bất hợp pháp thì việc trang bị những kiến thức nhằm định danh, phân biệt giữa các loại lan Hải là rất cần thiết. Với số lượng trên hai mươi loài bản địa, lan Hải Việt Nam phân bố ở tất cả các miền đất nước, thời điểm nở hoa lại rải rác trong năm. Việc phân biệt được các loài lan Hải khi cây chưa có hoa gặp nhiều hạn chế, nhất là đối với các loài có độ tương đồng cao về hình thái. Trong số 22 loài lan Hải của Việt Nam, có tới gần một nửa các loài mang các đặc điểm về thân lá tương đồng, rất dễ nhầm lẫn. Ví dụ như *P. micranthum* và *P. armeniacum*, *P. concolor* và *P. delenatii*, *P. callosum* và *P. purpuratum*, *P. tranlienianum* và *P. henryanum*, *P. helenae* và *P. x hermannii*, *P. hangianum* và *P. emersonii*.

Hải Hương lan (*P. emersonii*) là loài đặc hữu của Việt Nam, phân bố hẹp ở một số vùng núi thuộc tỉnh Bắc Kạn, Thái Nguyên. Đây là loài cho hoa rất đẹp, có hương thơm và rất được yêu thích. Tuy nhiên, chúng lại rất dễ nhầm lẫn với Hải Hăng (*P. hangianum*) do mức độ tương đồng cao về đặc điểm hình thái thân lá. Trong tự nhiên rất khó phân biệt khi cây chưa có hoa hoặc còn nhỏ. Do đó, để phân biệt

được từng loài cần phát triển các phương pháp định danh hiệu quả hơn. Hiện nay, sự kết hợp giữa việc nhận diện thông qua hình thái học [3] với việc phát triển các phương pháp định danh phân tử đang được quan tâm. Sử dụng mã vạch DNA (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 hay còn gọi là chỉ thị DNA mã vạch. DNA barcode được biết đến lần đầu với công bố của Hebert và cs năm 2003 [4]. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc xác định loài bằng chỉ thị DNA có hiệu quả cao trong việc phân biệt các loài thực vật [5]. Để nhận diện loài hiệu quả, phụ thuộc rất nhiều vào việc lựa chọn và sử dụng trình tự phù hợp. Ở thực vật, hệ gen lục lạp mang nhiều đặc điểm thích hợp đối với chỉ thị DNA. Chỉ thị *rbcL* mã hóa ribulose-1, 5- ribulose carboxylase oxygenase là trình tự gen lục lạp, cùng với chỉ thị *MatK* là hai locus được nhiều tác giả sử dụng và cho thấy có hiệu quả tốt khi sử dụng đơn lẻ trong các nghiên cứu [6]. Do vậy, chúng được đánh giá là các chỉ thị tiềm năng trong việc nhận dạng thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cho thấy độ tin cậy cao trong nhận diện lan Hải Hương lan (*P. emersonii*) trên cơ sở kết hợp nghiên cứu sử dụng trình tự DNA mã vạch *rbcL* với các đặc điểm mô tả hình thái.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lan Hải Hương lan (*P. emersonii*) thu thập tại huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên. Cặp môi nhân gen *rbcL*, 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 lựa chọn đại diện kết hợp với

phương pháp đối chiếu, so sánh với các tài liệu, khóa định loại đã có. Đây là phương pháp thông dụng được dùng trong nghiên cứu thực vật học. Dụng cụ và thiết bị hỗ trợ: máy ảnh, thước dây, thước kẹp (palme).

2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử

Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp dùng CTAB (Collins & Symons, 1992) [7] có cải tiến cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Mẫu lá được nghiền nhanh trong nitor lỏng, bổ sung đệm tách và ủ 65°C trong 2 giờ. Dùng phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) để loại bỏ tạp chất và dùng isopropanol để tủa DNA. Gen *rbcL* được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu (trình tự mồi xuôi/mồi ngược: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'/5'-CGCGCATGGTGGATTCAATCC-3').

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 mồi 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 xử lý bằng các phần mềm DNASTAR và BioEdit. So sánh, phân tích trình tự gen *rbcL* phân lập được với một số trình tự *rbcL* được công bố trên GenBank (NCBI).

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm thực vật học của lan Hải Hương lan

Hải Hương Lan là dạng cây cỏ lâu năm, thân mang 4 - 7 lá xếp thành 2 dãy. Lá có hình thuôn dài đầu lá hơi bầu dục. Lá dài khoảng 15 đến 20 cm và rộng từ 3 đến 5 cm. Lá của Hải Hương lan rất giống *P. hangianum*, mặt trên lá có màu xanh lục, bóng hơn lá Hải Hằng và có chứa những vân đậm nhạt xen kẽ,

mặt dưới lá màu xanh nhạt. Phát hoa màu xanh sáng, cao từ 15 đến 20 cm mang lông mịn. Cụm hoa gồm 1 đến 2 hoa mọc trên đỉnh phát hoa. Lá bắc hình bầu dục rộng, cỡ 2,8 - 3 x 1,2 - 2 cm hình ô van, bao phủ bởi lớp lông ngắn, màu xanh trắng (Hình 1).



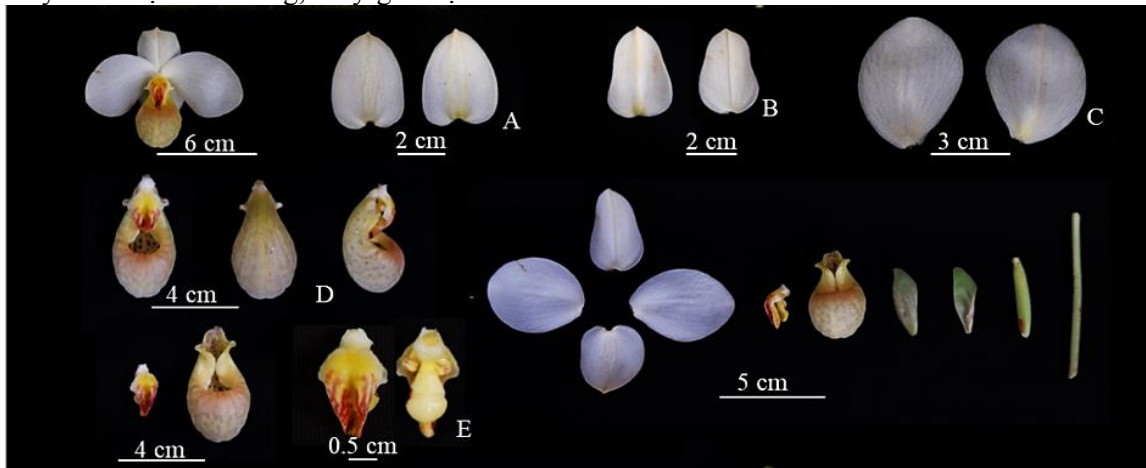
Hình 1. Cây lan Hải Hương lan, hình thái thân, lá và hoa của lan Hải Hương lan (*P. emersonii*). A,B,C. Hoa của Hải Hương lan; B. Phát hoa mang bầu được bao bởi lá bắc; D. Các bộ phận tách rời của phát hoa, bầu và lá bắc; E,F. Mặt trước và sau của cây; G,H. Mặt trước và sau của lá

Hoa của *P. emersonii* thơm dịu. Hoa mọc đứng trên phát hoa, hoa to cỡ 8 – 8,5 cm; lá đài và cánh hoa mỏng, màu trắng, có lông mịn ở cả 2 mặt; Giống *P. hangianum* và đa số các loài Hải, đài hoa của *P. emersonii* cũng chỉ có hai lá đài gồm một lá đài sau và một lá đài dưới. Lá đài sau hình bầu dục với đầu thuôn nhọn hơi vênh ra sau, cỡ 2,5 - 3,5 x 2,4 - 3,5 cm. Mặt trong và mặt ngoài của lá đài được bao phủ bởi lớp lông ngắn và thưa. Toàn bộ lá đài giống như cái nắp và ngả về

phía trước. Lá dài dưới hình bầu dục - trứng, cỡ 3 - 4,5 x 2 - 3 cm nhưng có phần tròn hơn dài sau, đầu nhọn, mặt sau lá dài có hai gân song song nổi rõ ở mặt lưng (Hình 2A). Tròng hoa bao gồm 3 cánh (2 cánh hoa và cánh hoa thứ ba biến dạng thành cái túi – môi). Cánh hoa hình bầu dục rộng, đầu cánh hơi tròn. Cánh hoa dài 4 đến 5,5 cm, rộng 2,5 đến 3,5 cm, mặt trong có gân mờ màu trắng. Các cánh hoa hơi úp về phía trước và hơi rủ xuống. Màu của cánh hoa là màu trắng trong mang các đường gân mờ chạy từ cuống rồi tỏa ra phía ngoài (Hình 2C).

Môi màu vàng hay da cam nhạt, kích thước 3,5 - 4,5 x 2 - 3 cm, chia làm ba thùy, hai thùy bên cuộn vào trong, thùy giữa tạo thành

một cái túi giống với chiếc hài. Khác với *P. hangianum*, mặt ngoài của môi không phẳng mà gồ gề phần lưng, có rãnh nông chia túi thành 2 thùy. Môi có màu vàng nhạt hơi cam in các chấm nâu mờ từ phía trong, phần dưới nhạt hơn. Mặt trong túi có nhiều chấm nhỏ màu nâu đậm nổi rõ (Hình 2D). Khiên đầy trụ hoa hình tam giác hơi dài, kích thước chừng 1,5 cm x 0,8 cm, mặt trên màu vàng có gân đỏ phía đỉnh giống như các mắt lưới (Hình 2E). Mặt dưới khiên đầy trụ hoa chứa bao phấn hình cầu, màu vàng nhạt, kích thước khoảng 2 mm. Nhụy lớn màu vàng bóng, hình bầu dục đến hình trứng-elíp kích thước khoảng 6 mm (Hình 2E).



Hình 2. Cấu tạo hoa của *P. emersonii*.

A. Mặt trong và mặt ngoài của lá dài dưới; B. Mặt trong và mặt ngoài của lá dài sau; C. Mặt trong và mặt ngoài của cánh hoa; D. Hình ảnh cánh môi; E. Khiên đầy trụ hoa chứa bao phấn và nhụy

Quả của *P. emersonii* được phát triển từ bầu, quả thuộc dạng quả nang hình trụ dài, hẹp, gân, có mỏ ngắn, quả dài khoảng 4 - 6 cm và rộng 5 - 7 mm. Lá bắc dài 1,8 đến 2,5 cm, hình ô-van, phủ lớp lông ngắn, có sống gân, mặt ngoài và mặt trong gần như giống nhau, có màu xanh sáng (Hình 1E).

Giống như các giống lan hài lá xanh quanh năm, rễ của Hải Hương lan 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. emersonii* 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 phụ (Hình 1F, G). Rễ của *P. emersonii* rất dài, gấp nhiều lần chiều dài lá.

Sử dụng đặc điểm hình thái từ xưa đến nay đã được xem là một tiêu chí quan trọng để nhận dạng, phân loại thực vật. Có rất nhiều khóa định loại thực vật đã được xây dựng và phát triển 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 [8], [9]. Ngoài ra, 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. Việc phân tích và so sánh hình thái của quả và phần hoa làm cơ sở cung cấp thông tin trong nghiên cứu quá trình thụ phấn, qua đó có thể làm tăng hiệu quả thụ phấn của một số hoa lan [10]. Phân tích hình thái chức năng các cơ quan sinh dưỡng có thể suy đoán được điều kiện sinh trưởng và phát triển của cây trong tự nhiên. Đối với lan Hải, những nghiên cứu quan sát hình thái và sinh trưởng đã chỉ ra rằng, các loài Hải có lá đồng màu thường sinh trưởng thích nghi với vùng khí hậu lạnh, còn những loài 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 [11].

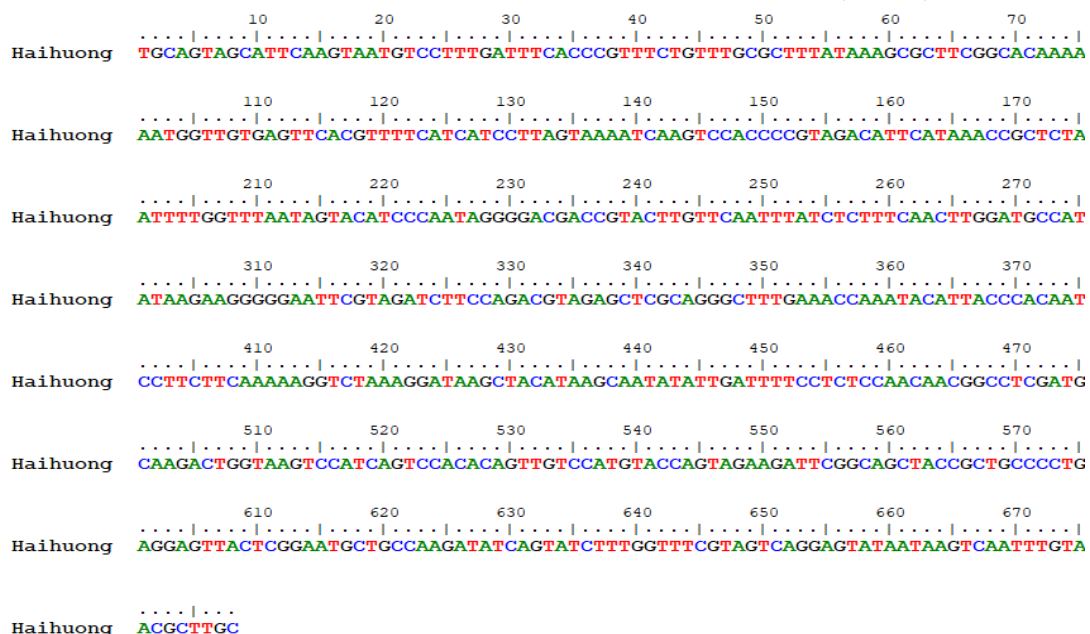
Khi sử dụng đặc điểm hình thái để phân loại họ Lan nói chung và lan Hải nói riêng thì cấu trúc hoa là tiêu chí xác định loài chính xác nhất [3], [12], [13] bởi vì hoa của các loài lan có đặc điểm rất riêng biệt, đặc trưng từ màu sắc đến tạo hình, ngay cả các loài rất gần gũi trong chi [12], [14]. Kết quả bài báo đã mô tả chi tiết cấu trúc hoa của Hải Hương lan với tên khoa học là *P. emersonii*. Tuy nhiên,

trong thực tế, hầu hết các loài lan Hải 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 phải phát triển các phương pháp định loại phân tử. Do đó chúng tôi tiếp tục phân tích trình tự gen *rbcL* để nhận diện lan Hải Hương lan.

3.2. Phân tích trình tự gen *rbcL*

3.2.1. Nhân bản và xác định trình tự gen *rbcL* của cây Hải Hương lan

Lá Hải Hương lan được thu thập, tách chiết DNA tổng số và kiểm tra độ tinh sạch bằng đo quang phổ. Kết quả kiểm tra tỷ số OD260nm/OD280nm nằm trong khoảng 1,86 - 2,0, đảm bảo yêu cầu cho thí nghiệm nhân gen *rbcL*. Điện di sản phẩm PCR thu được một phân đoạn DNA có kích thước khoảng 700bp 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 *rbcL* với độ dài phân tích được là 683 nucleotid (Hình 3).



Hình 3. Trình tự gen *rbcL* của mẫu Hải Hương lan trong nghiên cứu

3.2.2. So sánh trình tự gen *rbcL* của một số loài lan Hải khác nhau

Kết quả so sánh trình tự vùng gen *rbcL* của mẫu nghiên cứu với 14 trình tự vùng gen *rbcL* của các loài thuộc chi *Paphiopedilum* đã được công bố trên Genbank thấy có tỷ lệ tương đồng cao (độ tương đồng dao động từ 99,13% đến 99,98%) (Bảng 1). Sự sai khác dao động từ 0,02 – 0,77). Trong đó, trình tự vùng gen *rbcL* của mẫu cây Hải Hương lan có độ tương đồng 99,85% so với vùng *rbcL* mã số JQ182212.1 (*P. vietnamense*) và NC_041309.1 (*P. delenatii*) trên GenBank. Kết quả đã khẳng định đối tượng nghiên cứu là thuộc họ lan Hải (*Paphiopedilum*).

Bảng 1. Mức độ tương đồng của vùng *rbcL* của mẫu *P. hangianum* nghiên cứu với một số trình tự trên Genbank

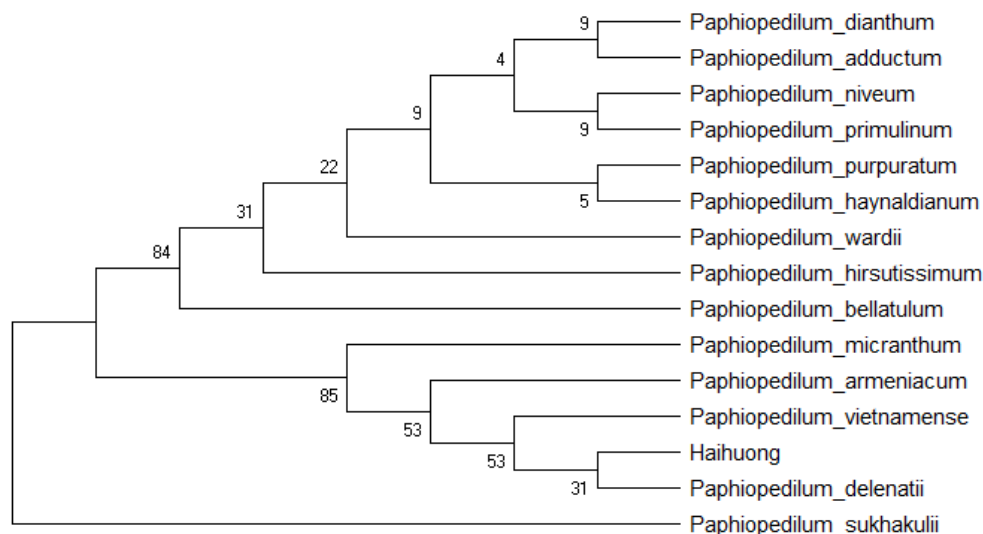
Mã số tra cứu trên Genbank	Loài	Giá trị E	Độ tương đồng (5%)
NC_045278.1	<i>Paphiopedilum micranthum</i>	0,0	99,85
KT388109.1	<i>Paphiopedilum armeniacum</i>	0,0	99,85
NC_041309.1	<i>Paphiopedilum delenatii</i>	0,0	99,85
MK161066.1	<i>Paphiopedilum purpuratum</i>	0,0	99,27
MF983795.1	<i>Paphiopedilum dianthum</i>	0,0	99,27
KJ524105.1	<i>Paphiopedilum niveum</i>	0,0	99,27
AB176547.1	<i>Paphiopedilum haynaldianum</i>	0,0	99,13
JQ182212.1	<i>Paphiopedilum vietnamense</i>	0,0	99,85
JN181467.1	<i>Paphiopedilum wardii</i>	0,0	99,27
JN181466.1	<i>Paphiopedilum hirsutissimum</i>	0,0	99,27
JN181465.1	<i>Paphiopedilum bellatulum</i>	0,0	99,27
JQ182209.1	<i>Paphiopedilum adductum</i>	0,0	99,13
JN181468.1	<i>Paphiopedilum primulinum</i>	0,0	99,13
AF074209.1	<i>Paphiopedilum sukhakulii</i>	0,0	98,98

Sơ đồ phân loại hình cây dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL* (Hình 4) cho thấy, 15 loài thuộc chi *Paphiopedilum* được chia thành 2 nhóm chính. Nhóm thứ nhất chỉ gồm loài *P. sukhakulii* và nhóm thứ 2 gồm 13 loài còn lại, trong đó có Hải Hương lan. Cây phân loại di truyền dựa trên trình tự gen *rbcL* cho thấy, Hải Hương lan có quan hệ gần gũi với Hải Hồng (*P. delenatii*), hải Mốc vàng (*P. armeniacum*), Hải Mốc hồng (*P. micranthum*) và Hải Việt (*P. vietnamense*).

Như vậy, kết quả phân tích dựa vào trình tự gen *rbcL* đã chỉ ra sự sai khác giữa các loài lan Hải khác nhau. Điều này cho thấy vùng gen *rbcL* là trình tự DNA mã vạch có tiềm năng để nhận diện loài nhanh và chính xác loài lan Hải Hương lan. Kết hợp giữa phân tích DNA mã vạch và đặc điểm hình thái sẽ cung cấp thông tin chính xác hơn trong định danh cũng như đánh giá đa dạng của các loài lan Hải.

Sử dụng mã vạch DNA có vai trò quan trọng trong việc nhận diện các mẫu thực vật. Đối với họ Lan (Orchidaceae), mã vạch DNA cũng đã được áp dụng để nhận diện nhiều loài trong các chi *Dendrobium* [15], [16], *Phalaenopsis* [3], [12], [17], *Cypripedium* [18],

Grammatophyllum, *Cymbidium* [14], *Vanda* [19] và *Spathoglottis* [20]. Đối với chi Lan Hải, nghiên cứu nhận dạng các loài dựa vào mã vạch lần đầu được tiến hành bởi nhóm tác giả Parveen và cs (2012). Thí nghiệm trên tám loài *Paphiopedilum* của Ấn Độ, sử dụng năm mã vạch tiềm năng (*rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, và *ITS*) [21]. Khi nghiên cứu về DNA barcode ở thực vật, Hollingsworth và cs 2009 đã xác nhận *rbcL* và *matK* có hiệu quả phân biệt tốt khi sử dụng đơn lẻ [6]. *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 [6]. 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 chi thị khác nhau như *ITS*, *LEAFY*, *ACO*, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* [22]. Tuy nhiên, thông tin về trình tự gen *rbcL* của lan Hải cũng như ứng dụng chỉ thị *rbcL* trong nhận diện lan Hải vẫn chưa được công bố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định trình tự *rbcL* trên mẫu Hải Hương lan và phân tích khả năng nhận diện lan Hải của chỉ thị này. Kết quả nghiên cứu này nhằm đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu về trình tự DNA mã vạch trong nghiên cứu các loài lan Hải của Việt Nam.



Hình 4. Sơ đồ phân loại hình cây được xây dựng dựa trên trình tự gen *rbcL* của Hải Hương lan phân lập được với một số loài thuộc chi *Paphiopedilum* công bố trên GenBank

4. Kết luận

Lan Hải Hương lan (*P. emersonii*) thu thập tại Thái Nguyên, Việt Nam đã được mô tả chi tiết. Kết hợp trình tự đoạn gen *rbcL* cho thấy tiềm năng sử dụng DNA mã vạch này với đặc điểm hình thái trong định danh chính xác cây hoa Hải Hương lan của nước ta.

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]. L. C. De, D. R. Singh, and R. K. Singh, "Morphological characterization in Mokara Orchids," *Int. J. Biosci.*, vol. 15, pp. 31-41, 2019.
- [4]. 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.
- [5]. S. V. Shekhovtsova, I. N. Shekhovtsovad, and S. E. Peltek, "DNA Barcoding: Methods and Approaches," *Biology Bulletin Reviews*, vol. 9, pp. 475-483, 2019.
- [6]. 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.
- [7]. 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.
- [8]. 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.
- [9]. 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. *trantuananhii*," *Die Orchidee*, vol. 4, pp. 52-54, 2018.
- [10]. R. B. Singer, and M. Sazima, "Flower Morphology and pollination mechanism in three sympatric goodyerinae orchids from Southeastern Brazil," *Annals of Botany*, vol. 88, pp. 989-997, 2001.
- [11]. H. Einzmann, N. Schickenberg, and G. Zotz, "Variation in root morphology of epiphytic orchids along small-scale and large-scale moisture gradients," *Acta Brasilica Botanica*, vol. 34, pp. 66-73, 2020.
- [12]. S. Tsiftsis, "Morphological variability of *Himantoglossum* s.s. (Orchidaceae) in Greece," *Phytotaxa*, vol. 245, pp. 17-30, 2016.
- [13]. 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, p. e1149668, 2016.
- [14]. 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.
- [15]. 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.
- [16]. L. Ludan, Y. Jiang, L. Yuanyuan, N. Zhitaio, X. Qingyun, L. Wei, and D. Xiaoyu, “The large single-copy (LSC) region functions as a highly effective and efficient molecular marker for accurate authentication of medicinal *Dendrobium* species,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.012>.
- [17]. P. Cribb, *The genus Paphiopedilum: A kew magaine monograph*. The Royal Botanic Gardens, Kew/Timber Press, 1987.
- [18]. 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.
- [19]. 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, plr018, pp. 1-12, 2011, PMID: 22476488, doi: 10.1093/aobpla/plr018
- [20]. 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.
- [21]. 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.
- [22]. 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, PMCID: PMC7168009; doi: 10.3390/biology9010009.