

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DNA *trnH-psbA* GENE SEQUENCE IN THE TAXONOMY OF *P. hirsutissimum*

Nguyen Thi Hai Yen¹, Ngo Xuan Quang^{2,4}, Nguyen Dinh Trong³, Do Tien Phat^{3,4*}

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

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

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 08/9/2021	The <i>Paphiopedilum</i> is a small genus with about 80 species but stands out in the evolution of the family Orchidaceae. This genus is also quite special because of the complex taxonomy system with many subgenera, subdivisions and different taxonomic views. The advent of DNA barcodes has greatly supported taxonomic studies beyond traditional morphology-based methods. This paper presents the results of morphological analysis of plant materials of the Venu orchid species collected in Thai Nguyen province, combined with the <i>trnH-psbA</i> gene sequences to identify to species. The results found that the <i>trnH-psbA</i> gene sequence from the researched Venu orchid species samples obtained a gene fragment of 612 bp in size, nucleotide similarity reached 99.34% compared with the <i>trnH-psbA</i> sequence of species <i>P. hirsutissimum</i> (code. MN153815.1) on the Genbank. The taxonomic tree was established based on the <i>trnH-psbA</i> sequence of Venu orchid species with 19 sequences on the NCBI Genbank, showing that <i>trnH-psbA</i> sequence is a potential indicator in the identification and classification of The <i>Paphiopedilum</i> . The branches on the taxonomic tree clearly reflect the relationship of these species which are grouped to subgenera, subdivision much better than that in comparison with previous morphological taxonomy.
Revised: 19/10/2021	
Published: 25/10/2021	
KEYWORDS	
Taxonomy	
<i>trnH-psbA</i>	
<i>P. hirsutissimum</i>	
Barcode	
Thai Nguyen	

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ GEN *trnH-psbA* TRONG PHÂN LOẠI LAN HÀI VỆ NỮ (*P. hirsutissimum*)

Nguyễn Thị Hải Yến¹, Ngô Xuân Quảng^{2,4}, Nguyễn Đình Trọng³, Đỗ Tiến Phát^{3,4*}

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

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

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 08/9/2021	Lan hài (<i>Paphiopedilum</i>) là một chi nhỏ với khoảng 80 loài nhưng nổi bật trong quá trình tiến hóa của họ Lan. Chi này còn khá đặc biệt bởi hệ thống phân loại phức tạp với nhiều subgenus (phân chi), section (phân tổ) và các quan điểm phân loại khác nhau. DNA barcode ra đời đã hỗ trợ rất nhiều cho các nghiên cứu phân loại ngoài các phương pháp dựa trên hình thái truyền thống. Nghiên cứu trình bày kết quả phân tích hình thái thực vật của lan hài Vệ nữ thu thập tại Thái Nguyên, kết hợp với xác định trình tự gen <i>trnH-psbA</i> để nhận diện, phân nhóm loài lan này. Kết quả xác định trình tự gen <i>trnH-psbA</i> từ mẫu hài Vệ nữ nghiên cứu đã thu được đoạn gen có kích thước 612 bp, độ tương đồng nucleotide đạt 99,34% so với trình tự <i>trnH-psbA</i> loài <i>P. hirsutissimum</i> (mã số MN153815.1) trên Genbank. Cây phân loại được lập dựa trên trình tự <i>trnH-psbA</i> của hài Vệ nữ với 19 trình tự trên ngân hàng gen NCBI cho thấy, <i>trnH-psbA</i> là chỉ thị tiềm năng trong nhận diện và phân loại lan hài. Các nhánh trên cây phân loại phản ánh khá rõ mối quan hệ họ hàng, các loài đều được phân nhóm phù hợp với các section, subgenus so với những công bố phân loại bằng hình thái của nghiên cứu trước đó.
Ngày hoàn thiện: 19/10/2021	
Ngày đăng: 25/10/2021	
TỪ KHÓA	
Phân loại	
<i>trnH-psbA</i>	
<i>P. hirsutissimum</i>	
Mã vạch	
Thái Nguyên	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4958>

* Corresponding author. Email: phatmyzou81@gmail.com

1. Mở đầu

Họ Lan (Orchidaceae) từ lâu được biết đến là một họ thực vật rất đa dạng và quý hiếm, có giá trị cao về thẩm mỹ. Trong họ Lan, chi Lan hài (*Paphiopedilum*) là một chi đặc biệt bởi hoa của chúng mang một cánh môi ở giữa giống như chiếc hài. Lan hài là một nhánh nhỏ nhưng nổi bật trong quá trình tiến hóa của họ Lan, thể hiện là một trong những dòng chuyên hóa nhất của thực vật có hoa thụ phấn nhờ côn trùng. Lá dài giữa, các cánh hoa bên, nhị lép và môi đóng vai trò chính trong việc lôi cuốn các tác nhân đến thụ phấn, các phần này của hoa thường có màu sắc sặc sỡ. Môi có chức năng như một sân hạ cánh của các côn trùng, mặt trong môi thường trơn và có nhiều lông. Côn trùng khi tới tìm mật sẽ lọt xuống môi và phải bám theo các đường lông để ra ngoài, khi đó sẽ đi qua bao phấn. Hai bao phấn hữu thụ nằm hai bên của cột nhị nhụy, nhị đực giữa nằm ở đỉnh cột là bất thụ, nó biến thành một cấu trúc hình ô nhị lép đóng vai trò ngăn chặn lối vào trực diện của tác nhân thụ phấn từ mặt trước vào trung tâm hoa [1].

Chi *Paphiopedilum* 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. Về phân loại học thực vật của Lan hài, Averyanov và cộng sự đã nghiên cứu hệ thống phân loại Lan hài khá sớm, các tác giả chia chi *Paphiopedilum* thành 3 subgenus (phân chi) là *Parvisepalum*, *Brachypetalum* và *Paphiopedilum*; trong đó subgenus *Paphiopedilum* chiếm số loài đông đảo nhất chuyên hóa nhất và tiến hóa hơn cả. Subgenus *Paphiopedilum* được chi thành 5 section (tổ) là *Paphiopedilum*, *Barbata*, *Pardalopetalum*, *Cochlopetalum* và *Coryopetalum* [2]-[4].

Năm 2010, loài hài Cảnh (*P. canhii*) sau khi được phát hiện và mô tả đã gây phân vân về xếp loại bởi hình thái hoa khác biệt của loài này. Các nhà khoa học đã đề xuất section mới *Pygmaea* dưới subgenus *Paphiopedilum* [5], hoặc thậm chí một subgenus mới *Megastaminodium* để chứa loài này [6], [7]. Các nghiên cứu phân loại Lan hài về sau đều được phát triển dựa trên hệ thống phân loại ban đầu này.

Hiện nay, việc nhận diện, phân loại loài các loài động thực vật nói chung thường được thực hiện thông qua sự kết hợp giữa phương pháp truyền thống dựa vào các đặc điểm hình thái học [7], [8] với các phương pháp hiện đại thông qua định danh phân tử. Bằng sử dụng một vùng DNA đặc hiệu, người ta đã có thể định danh một loài chính xác và nhanh chóng. Các trình tự gen chỉ thị nếu được lựa chọn phù hợp sẽ tăng hiệu quả về khả năng nhận diện các loài. Hầu hết các gen chỉ thị dùng cho DNA barcode 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*), cũng có một số locus DNA nhân được sử dụng (ITS1 và ITS2) [9]. Trong thực tế, việc kết hợp nhiều chỉ thị để nhận diện phân loại loài thường được áp dụng [10]. Tuy nhiên, việc phân tích nhiều trình tự DNA để nhận diện một cá thể có thể gây khó khăn 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 [9], tuy nhiên một số nghiên cứu lại cho rằng đây là vùng gen nhân bản không đặc hiệu [10]. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân tích các đặc điểm hình thái và chỉ thị gen phân loại *trnH-psbA* của Lan hài Vệ nữ thu thập tại Thái Nguyên, kết quả nghiên cứu sẽ đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu phân loại Lan hài của Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Lan hài Vệ nữ (*P. hirsutissimum*) được thu trên địa bàn huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên thông qua những người đi rừng thu hái lan.

Cặp mẫu nhân gen *trnH-psbA* (F, 5'-GTTATGCATGAACGTAATTGCTC-3'/5'-CGCGCATGGTGGATTCAATCC-3').

Thiết bị máy móc dùng trong nghiên cứu thuộc Phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các hóa chất sử dụng được nhập khẩu từ các hãng nổi tiếng trong và ngoài nước.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của lan Hải

Mẫu lan thu thập về được trồng tại vườn ươm, khi cây phát triển thuần và ra hoa, tiến hành phân tích các đặc điểm thông qua mô tả trực tiếp. Kết quả được đối chiếu với các tài liệu phân loại đã có [1]. Dụng cụ và thiết bị hỗ trợ gồm: máy ảnh, thước dây, thước kẹp (palme), dao lam, dao mổ, kim mũi mác.

2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử

Tiến hành tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Collins và Symons (1992) [11].

Thực hiện phản ứng PCR nhân gen:

- Thành phần phản ứng PCR: 12 μ l H₂O; 2 μ l đệm 10x; 2 μ l MgCl₂ 25 mM; 1,6 μ l dNTPs 2,5 mM; 0,8 μ l mỗi 10 pmol mỗi loại; 100 ng DNA tổng số và 0,4 μ l Taq DNA polymerase 1u/ μ l.

- Chu trình nhiệt: 94°C/5 phút; (94°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút) $\times_{30}$; 72°C/10 phút.

Trình tự nucleotide của vùng gen *trnH-psbA* được xác định bằng máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Các trình tự được Blast trong NCBI, xử lý bằng các phần mềm Snapgene, BioEdit, cây phân loại dựa trên trình tự gen được dựng bằng phần mềm MegaX.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm thực vật học của Lan hải Vệ nữ (*P. hirsutissimum*)



Hình 1. Hình ảnh đặc điểm hình thái, cấu trúc cây, hoa Lan hải Vệ nữ (*P. hirsutissimum*)
A,B,C. Hình thái lá, phát hoa và hoa của hải Vệ nữ; D, D,E,F. Mặt trước và mặt sau của lá đài trước, lá đài sau và tràng hoa; G. Môi; H. Staminode mang bao phấn và nhụy (Bar = 2 cm).

Hài Vệ nữ được xếp vào nhóm cây cỏ, chúng mọc trên đất hoặc khe đá nhiều mùn, cây phát triển lâu năm thành bụi lớn. Thân mang 5 - 7 lá xếp thành 2 hàng, lá dài hẹp, đầu lá hơi nhọn hoặc tù. Chiều dài lá 20 đến 40 cm và rộng từ 1,5 đến 2 cm. Mặt trên lá có màu xanh đậm đồng nhất, mặt dưới màu xanh nhạt, phía cuống có một ít chấm tím (Hình 1B). Lá bắc hình mũi mác hơi bầu, dài 3 cm, rộng 1,5 cm phía ngoài màu xanh lục có chấm nâu nhỏ, phủ lông dày mặt trong màu lục nhạt pha trắng trơn bóng mang các gân xanh đậm hơn (Hình 1C).

Hoa mọc đứng trên phát hoa, cuống dài 15 - 18 cm, màu xanh phủ lông dày đặc. Hoa to, rộng khoảng 8 - 10 cm, màu sắc độc đáo, chủ đạo là màu vàng đậm hơi nâu pha tím hồng (Hình 1A). Cánh đài trên có hình elip hơi bầu, viền lượn sóng nhiều và vênh ra phía sau. Cánh đài trên có chiều dài khoảng 5 cm, rộng 3,5 cm. Mặt trước màu nâu với viền vàng, xen các chấm nhỏ, bóng, không có lông bao phủ. Mặt sau có màu sắc ưu thế là vàng hơi nâu, được bao phủ bởi lớp lông ngắn. Sóng gân nổi rõ, mang nhiều lông hơn các vùng xung quanh (Hình 1D). Cánh đài dưới (còn gọi là lá đài kết hợp) hình tương tự lá đài trên nhưng nhỏ hơn khá nhiều với chiều dài khoảng 2,5 cm và rộng 2 cm. Mặt trong có màu vàng nhạt có các gân chìm, mang các đốm nâu đỏ dày đặc phía cuống (kích thước khoảng 1*0,5 mm). Mặt ngoài màu vàng nâu không có đốm, hai đường gân nổi rõ là kết quả của sự kết hợp 2 lá đài (Hình 1E). Cánh hoa dài 5 cm, rộng 1,5 cm có hình thuôn dài hơi tròn phía đầu, mép lượn sóng và xoắn vặn, mức độ lượn sóng và xoắn tùy thuộc tuổi hoa, càng già, cánh hoa càng xoắn lại. Màu sắc cánh hoa rất độc đáo, pha trộn giữa màu vàng, nâu và tím hồng về phía đỉnh cánh. Mặt trước và mặt sau màu sắc khá tương đồng, viền cánh mang ít lông tơ mảnh (Hình 1F).

Môi dài 5 cm, rộng 2 cm, trơn bóng, màu vàng đến vàng xanh có nhiều chấm đỏ nhỏ li ti. Hai thùy bên nhọn và vênh lên, thùy giữa lõm xuống. Môi được bao phủ bởi nhiều lông ngắn ở cả mặt trong và mặt ngoài (Hình 1G). Staminode (khiên đậy trụ hoa) dài 1,5 cm, rộng 1 cm hình chữ nhật. Staminode có cuống ngắn, mang các lông ngắn. Bao phấn hình cầu, màu vàng đậm kích thước khoảng 1 mm, noãn hình tròn màu trắng bóng kích thước 7x7 mm (Hình 1H). Bầu dài khoảng 5 cm, rộng cỡ 0,5 cm, hình dài, đỉnh thu nhỏ, đầu tù, có 3 mặt. Màu nâu tím được phủ kín bởi lớp lông dày (Hình 1C).

Quả của *P. hirsutissimum* là dạng quả nang. Quả hình trụ dài, có gân, có mỏ ngắn, kích thước 4 - 5 cm x 5 - 7 mm.

Đối với thực vật nói chung, mô tả hình thái là phương pháp kinh điển và chủ yếu nhất xưa nay được sử dụng để phân loại các loài [12], [13]. Trong phân loại hình thái, đặc điểm cấu trúc hoa được xem là tiêu chí cơ bản và chính xác để xác định, phân loại vì hoa có tính đặc trưng cao [14]. Tuy nhiên, đối với lan Hài đa số chỉ cho hoa một lần trong năm với thời gian nở hoa ngắn, khoảng 15 - 20 ngày/năm, do đó cần phải phát triển các phương pháp nhận diện các loài hài khi chúng còn nhỏ hoặc khi không mang hoa, đặc biệt Hài là nhóm có khá nhiều loài tương đồng về hình thái thân lá. Vì vậy, việc phân tích trình tự gen *trnH-psbA* để nhận diện Lan hài Vệ nữ được tiến hành.

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

3.2.1. Nhân bản và xác định trình tự gen *trnH-psbA* của Lan hài Vệ nữ

Mẫu lá Lan hài Vệ nữ được thu thập và tách chiết DNA tổng số, sử dụng máy đo quang phổ để kiểm tra độ tinh sạch của DNA, kết quả thu được tỷ số OD260nm/OD280nm đạt yêu cầu cho thí nghiệm nhân gen (không biểu diễn kết quả). Đoạn gen *trnH-psbA* được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, thu được một phân đoạn DNA hoàn toàn phù hợp với lý thuyết, kích thước khoảng 600bp. Do đó sản phẩm PCR được sử dụng để xác định trình tự nucleotide trực tiếp. Tiến hành xác định trình tự gen *trnH-psbA* trên máy ABI PRIMS®3100 Avant Genetic Analyzer. Trình tự thu được sau khi BLAST trên NCBI để so sánh với các trình tự trên GenBank cho thấy, phân đoạn DNA nhân bản được là đoạn gen *trnH-psbA* của Lan hài Vệ nữ (*P. hirsutissimum*), độ tương đồng trình tự nucleotide lên đến 99,34% với loài *P. hirsutissimum* mã số MN153815.1 với độ dài phân tích được là 612 nucleotid.

Alignment: C:\Users\Ad\Desktop\trnH

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          10         20         30         40         50
trnH- Venu CATA CAGGTA GGAACCTTGC TAAGTGGTAA CTTC CAAATT CAGAGAAACC
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          60         70         80         90        100
trnH- Venu CTGGA ACTAA AAATGGGCAA TCCTGAGCCA AATCTTTATA AAAAATGGAA
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          110        120        130        140        150
trnH- Venu AATTAGAATA AAAAGGGATA GGTGCAGAGA CTCAATGGAA GCTGTTCTAA
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          160        170        180        190        200
trnH- Venu CGAATGAAAT TGACTACGTT ACGTTAGTAG CAAAAATCCT TCTATCAAAT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          210        220        230        240        250
trnH- Venu GATAGAAATG ACAGTAAAGG ATAAGCTTAT ATACCTAATA CATACTGAGA
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          260        270        280        290        300
trnH- Venu TAGGAAAGAT TAATCACAAC CCTCTATTTC GATATTTCTGA TATTGAGATT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          310        320        330        340        350
trnH- Venu CATCTATAT TAATTAGAAT GATAGAGATC AAATAATCAT TCTAAAGATC
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          360        370        380        390        400
trnH- Venu AAAAAATCTA TGAAAAAAGG AAGAGTTATT CTGAATCCAT TCCCATTTC
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          410        420        430        440        450
trnH- Venu CAATTGAAGT TTAAATTGAA ATAGAATTTCG AATATTCATT GATCAAATGA
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          460        470        480        490        500
trnH- Venu TTAATTCAG AGTTTCATAG ATCTTTTGAA AATTAATCGG ACGAGAATAA
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          510        520        530        540        550
trnH- Venu AGAGAGAGTC CCATTTTACA TGTCAATACC GACAACAATG AAATTTATAG
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          560        570        580        590        600
trnH- Venu TAAGAGGAAA ATCCGTCGAC TTTTAAAATC GTGAGGGTTC AAGTCCATCC
      ....|....| ..
          610
trnH- Venu TATCCCCCTA GA

```

Cây phân loại được dựng thành công dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA* của mẫu nghiên cứu với 19 trình tự vùng gen *trnH-psbA* của các loài thuộc ba phân chi trong chi *Paphiopedilum* là *Paphiopedilum*, *Parvisepalum*, *Brachypetalum* đã được công bố trên Genbank (Bảng 1) 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 [15]. Cây phân loại dựa trên hệ số likelihood lớn nhất (-1102,40) được lựa chọn trình bày như hình 2.

Kết quả Blast trong NCBI và phân tích sơ đồ phân loại hình cây (Hình 2) cho kết quả loài hài Vệ Nữ thu thập tại Thái Nguyên có tên khoa học là *Paphiopedilum hirsutissimum* nằm trong phân chi *Paphiopedilum*, tổ *Paphiopedilum*.

Phân tích cây phân loại dựa trên trình tự chỉ thị *trnH-psbA* nhận thấy, đây là chỉ thị rất tiềm năng trong phân loại Lan hài, phản ánh khá rõ mức độ quan hệ họ hàng của các loài Lan hài. Dựa trên cây phân loại, 20 loài phân tích đều được phân nhóm theo đúng subgenus, section so với các

công bố phân loại bằng hình thái trước đó [1]-[3]. Theo kết quả phân tích trình tự gen *trnH-psbA*, subgenus *Paphiopedilum* gồm đại diện của 4 section, được phân nhánh rõ ràng. Section *Paphiopedilum* gồm 6 loài là *P. gratixianum*, *P. spicerianum*, *P. tranlienianum*, *P. barbigerum* và hài Vệ Nữ (*P. hirsutissimum*). Section *Pardalopetalum* gồm 2 loài *P. parishii* và *P. dianthum*. Section *Cochlopetalum* gồm 1 loài *P. victoria-mariae*. Tuy nhiên, loài *P. purpuratum* thuộc section *Barbata* [1] lại xếp cùng nhánh với các loài trong section *Paphiopedilum*. Subgenus *Brachypetalum* gồm 2 loài *P. niveum* và *P. concolor* nằm thành 1 nhánh. Nhánh còn lại khá riêng biệt gồm các loài thuộc subgenus *Parvisepalum*. Theo các nghiên cứu về phân loại dựa trên hình thái học của Averyanov và cộng sự (2004) [1], subgenus này gồm 2 section, trong đó section *Emersonianum* chỉ chứa 2 loài *P. hangianum* và *P. emersonii*, các loài còn lại thuộc section *Parvisepalum*. Tuy nhiên, kết quả phân tích dựa trên trình tự *trnH-psbA* của chúng tôi lại cho thấy một số loài (*P. malipoense*, *P. malipoense* var. *jackii* và *P. micranthum* thuộc section *Parvisepalum* nhưng nằm cùng nhánh với *P. hangianum* và *P. emersonii*. Do đó, có thể cần phải bổ sung những thử nghiệm với các chỉ thị khác nhau nhằm tìm ra chỉ thị phù hợp nhất để phân loại lan hài bằng DNA barcode

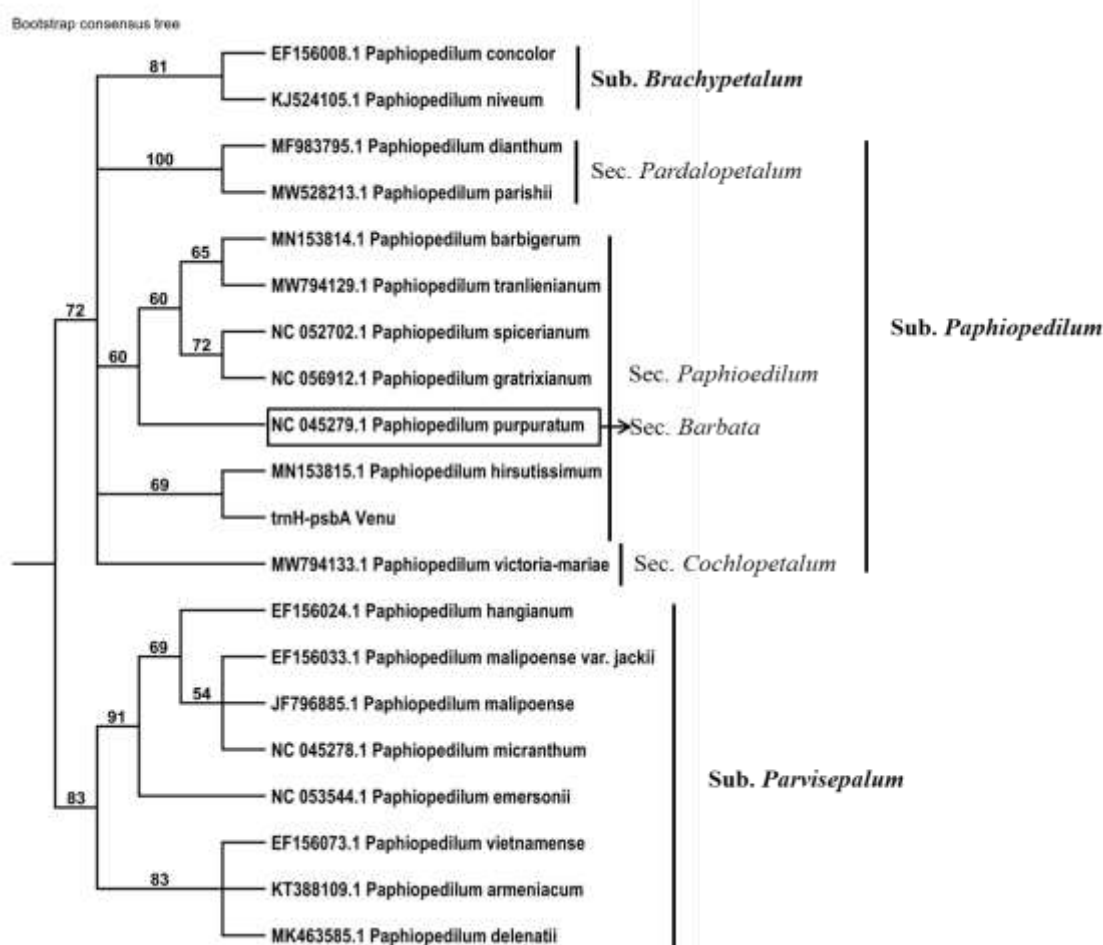
Bảng 1. Các trình tự gen *trnH-psbA* đại diện cho chi *Paphiopedilum* sử dụng để phân tích quan hệ di truyền. Các subgenus được phân loại theo Averyanov và cộng sự (2004) [1]

STT	Mã số	Tên loài	Query Cover	Per. Ident	Total score
Subgenus <i>Paphiopedilum</i>					
1	MN153814.1	<i>Paphiopedilum barbigerum</i>	98%	97,51%	1020
2	MN153815.1	<i>Paphiopedilum hirsutissimum</i>	98%	99,34%	1088
3	NC_056912.1	<i>Paphiopedilum gratixianum</i>	98%	97,35%	1014
4	MW794129.1	<i>Paphiopedilum tranlienianum</i>	98%	97,51%	1020
5	NC_052702.1	<i>Paphiopedilum spicerianum</i>	98%	97,35%	1014
6	MW794133.1	<i>Paphiopedilum victoria-mariae</i>	98%	97,35%	1014
7	MW528213.1	<i>Paphiopedilum parishii</i>	98%	96,85%	998
8	MF983795.1	<i>Paphiopedilum dianthum</i>	98%	96,85%	998
9	NC_045279.1	<i>Paphiopedilum purpuratum</i>	98%	97,51%	1020
Subgenus <i>Parvisepalum</i>					
10	NC_053544.1	<i>Paphiopedilum emersonii</i>	98%	95,52%	953
11	EF156024.1	<i>Paphiopedilum hangianum</i>	90%	95,84%	885
12	NC_045278.1	<i>Paphiopedilum micranthum</i>	98%	95,85%	965
13	JF796885.1	<i>Paphiopedilum malipoense</i>	98%	95,35%	944
14	EF156033.1	<i>Paphiopedilum malipoense</i> var. <i>jackii</i>	90%	96,02%	891
15	MK463585.1	<i>Paphiopedilum delenatii</i>	98%	95,85%	965
16	KT388109.1	<i>Paphiopedilum armeniacum</i>	98%	95,85%	965
17	EF156073.1	<i>Paphiopedilum vietnamense</i>	90%	96,38%	902
Subgenus <i>Brachypetalum</i>					
18	EF156008.1	<i>Paphiopedilum concolor</i>	90%	97,75%	913
19	KJ524105.1	<i>Paphiopedilum niveum</i>	98%	96,68%	992

Như vậy, dựa trên phân tích trình tự gen *trnH-psbA* cho thấy đây là chỉ thị tiềm năng trong sử dụng để nhận dạng lan hài bằng mã vạch DNA. Khi kết hợp đồng thời giữa phân tích đặc điểm hình thái với DNA mã vạch để định danh cũng như đánh giá đa dạng của các loài Lan hài sẽ thu được kết quả đáng tin cậy.

Ngày nay, DNA barcode là một công cụ được sử dụng để nhận diện các loài thực vật đã trở nên phổ biến và có vai trò quan trọng trong phân loại thực vật. Đối với họ Lan (Orchidaceae), DNA barcode khi áp dụng để nhận diện các loài trong nhiều chi khác nhau như *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cypripedium*, *Grammatophyllum*, *Cymbidium*, *Vanda* và *Spathoglottis* đã thu được những kết quả khả quan [16]-[20]. Nghiên cứu nhận dạng lan Hài dựa vào DNA barcode được tiến hành lần đầu tiên vào năm 2012 trên các loài *Paphiopedilum* của Ấn Độ. Nghiên cứu đã sử dụng năm mã vạch *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK* và *ITS* cho kết quả phân loài rất tốt [21]. Năm 2013, Gorniak và cộng sự khi kết

hợp đặc điểm hình thái, phân tích tế bào học và chỉ thị gen DNA barcode đã phân loại thuyết phục loài hài Cảnh (*P. canhii*), mà trước đó có nhiều tranh cãi về phân loại vì loài này mang nhiều các đặc điểm giao thoa giữa các phân chi khác nhau [7]. Tại Việt Nam, sử dụng mã vạch DNA trong nghiên cứu nhận diện lan Hải cũng đã được tiến hành khá phổ biến. Các chỉ thị thường được sử dụng để nhận dạng lan Hải bao gồm cả chỉ thị DNA lục lạp (*matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*) và chỉ thị DNA nhân (*ITS*, *LEAFY*, *ACO*) [22], [23]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, gen *trnH-psbA* của mẫu Hải Vệ nữ được phân tích và cho thấy đây là chỉ thị có tiềm năng nhận diện và phân loại lan hải tốt. Kết quả này đã đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu về nghiên cứu áp dụng DNA barcode trong phân loại lan hải của Việt Nam.



Hình 2. Hình ảnh cây phân loại lan Hải xây dựng dựa trên trình tự gen *trnH-psbA* của loài hải Vệ nữ với một số loài thuộc chi *Paphiopedilum* công bố trên GenBank

4. Kết luận

Đã phân tích mô tả được hình thái thực vật của Lan hải Vệ nữ thu thập ở Thái Nguyên. Việc kết hợp giữa đặc điểm hình thái với chỉ thị gen *trnH-psbA* cho thấy khả năng nhận diện và phân loại khá tốt đối với cây Lan hải Vệ nữ (*P. hirsutissimum*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. Averyanov, C. Phillip, P. K. Loc, and N.T. Hiep, *Slipper Orchids of Vietnam. With an Introduction to the Flora of Vietnam*. Royal Botanic Gardens, Kew. Compass Press Limited. 308 p. ISBN 1 84246 047 1, 2003.

- [2] 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.
- [3] L. Averyanov, "The Orchids of Vietnam. Illustrated survey. Part 1. Subfamilies Apostasioideae, Cypripedioideae and Spiranthoideae," *Turczaninowia*, vol. 11, no. 1, pp. 5-168, 2008.
- [4] L. Averyanov, "The Orchids of Vietnam. Illustrated survey. Part 2. Subfamily Orchidoideae," *Turczaninowia*, vol. 13, no. 2, pp. 5-98, 2010.
- [5] L. Averyanov, V. T. Pham, P. K. Loc, N. T. Hiep, C. X. Canh, N. T. Vinh, and N. Q. Hieu, "Paphiopedilum canhii – from Discovery to Extinction," *Orchid Planet*, vol. 24, pp. 16-44, 2011.
- [6] G. J. Braem and G. R. Gruss, *Paphiopedilum* subgenus *Megastaminodium* Braem & Gruss, a new subgenus to accommodate *Paphiopedilum canhii*. *Orchid Dig.* 3-164, 2011.
- [7] 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.
- [8] M. Bolson, E. Smidt, C. de, 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: [10.1371/journal.pone.0143049](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. L. 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] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] F. P. Zhang, J. L. Huang, and S. B. Zhang, "Trait evolution in the slipper orchid *Paphiopedilum* (Orchidaceae) in China," *Plant Signaling and Behavior*, vol. 11, p. e1149668, 2016.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [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*, plr018, 2011, pp. 1-12, doi: [10.1093/aobpla/plr018](https://doi.org/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] K. H. Trung, T. D. Khanh, L. H. Ham, T. D. Duong, and T. Khoa, "Molecular Phylogeny of the Endangered Vietnamese *Paphiopedilum* Species Based on the Internal Transcribed Spacer of the Nuclear Ribosomal DNA," *Adv. Stud. Biol.*, vol. 5, pp. 337-346, 2013.
- [23] 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/biology9010009](https://doi.org/10.3390/biology9010009).