

DNA MARKERS BARCODE IDENTIFICATION OF SOME VENUS ORCHID SPECIES WITH CLOSE RELATIONSHIP AND MORPHOLOGICAL SIMILARITIES

Nguyen Thi Hai Yen^{1*}, Nguyen Thi Loan², Do Tien Phat³, Chu Hoang Mau⁴

¹TNU - University of Sciences, ²Hoa Lu University

³VAST - Institute of Biotechnology, ⁴TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 13/01/2023</p> <p>Revised: 05/4/2023</p> <p>Published: 13/4/2023</p>	<p><i>Paphiopedilum</i> is a genus in the subfamily Cypripedioideae with the highest diversity and division, divided into many subgenus and sections. Species in these sections are very closely related to each other, especially having morphological similarities. Currently, several approaches have been applied in determining taxonomy, from morphological-based techniques to classification by molecular markers or a combination of methods, in which DNA barcode presents many advantages. Four species in this study include <i>Paphiopedilum henryanum</i>, <i>Paphiopedilum coccinaum</i>, <i>Paphiopedilum helenae</i> and <i>Paphiopedilum × hermannii</i> belong to the standard section (<i>Paphiopedilum</i>) of the subgenus <i>Paphiopedilum</i>, which are highly similar morphological characteristics. This paper presents the results of plant morphological analysis of these species of venus orchid to analyze two DNA barcode sequences ITS and trnH-psbA to identify them. Our results indicated that morphological characteristics can be used to identify Comedy species in the study. The results of DNA barcode analysis of two ITS and trnH-psbA markers showed that they were suitable for studying the taxonomy of venus orchids, but they were not suitable for identifying each species except for the hybrid species <i>Paphiopedilum × hermannii</i>.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Similarity</p> <p><i>Paphiopedilum</i></p> <p>Barcode</p> <p>Sections</p> <p>Subgenus</p>	

PHÂN BIỆT MỘT SỐ LOÀI LAN HÀI CÓ QUAN HỆ GẦN GŨI VÀ HÌNH THÁI TƯƠNG ĐỒNG BẰNG CHỈ THỊ DNA BARCODE

Nguyễn Thị Hải Yến^{1*}, Nguyễn Thị Loan², Đỗ Tiến Phát³, Chu Hoàng Mậu⁴

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên, ²Đại học Hoa Lu

³Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 13/01/2023</p> <p>Ngày hoàn thiện: 05/4/2023</p> <p>Ngày đăng: 13/4/2023</p>	<p><i>Paphiopedilum</i> là một chi có độ đa dạng và phân hóa cao nhất trong phân họ lan Hải, được chia thành nhiều phân chi và section. Các loài trong cùng section có quan hệ rất gần gũi với nhau, đặc biệt có sự tương đồng về hình thái. Hiện nay, có nhiều cách tiếp cận trong việc xác định phân loại loài, từ kỹ thuật dựa trên hình thái đến phân loại bằng chỉ thị phân tử hoặc kết hợp nhiều phương pháp, trong đó DNA barcode đã phát triển và thể hiện nhiều ưu điểm. Bốn loài nghiên cứu <i>Paphiopedilum henryanum</i>, <i>Paphiopedilum coccinaum</i>, <i>Paphiopedilum helenae</i> và <i>Paphiopedilum × hermannii</i> thuộc section chuẩn (<i>Paphiopedilum</i>) của phân chi <i>Paphiopedilum</i>, là các loài có hình thái tương đồng cao. Bài báo này trình bày kết quả phân tích hình thái thực vật của 4 loài lan Hải này, đồng thời xác định và phân tích 2 trình tự DNA barcode ITS và trnH-psbA để phân loại và nhận diện chúng. Bảng kết quả phân tích hình thái có thể sử dụng để nhận diện các loài Hải trong nghiên cứu. Kết quả phân tích DNA barcode hai chỉ thị ITS và trnH-psbA cho thấy phù hợp khi nghiên cứu phân loại lan Hải, tuy nhiên không phù hợp để nhận diện từng loài nghiên cứu ngoại trừ loài lai <i>Paphiopedilum × hermannii</i>.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Tương đồng</p> <p><i>Paphiopedilum</i></p> <p>Barcode</p> <p>Section</p> <p>Phân chi</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7228>

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

1. Mở đầu

Phân họ Lan Hải (Cypripedioideae) thuộc họ Lan (Orchidaceae). Cypripedioideae và Apostasioideae là những phân họ lâu đời nhất của Orchidaceae [1], [2]. Hiện nay, hệ thống phân loại công nhận phân họ lan Hải gồm có năm chi: *Paphiopedilum* Pfitzer, *Phragmipedium* Rolfe, *Selenipedium* Rchb.f., *Cypripedium* L. và *Mexipedium* V. A. Albert & M. W. Chase [3]. *Paphiopedilum* Rolfe là chi lớn nhất trong họ lan Hải và cũng là chi có sự phân hóa mạnh nhất với hơn 90 loài được xếp thành 3 phân chi và nhiều section khác nhau. Phân chi *Parvisepalum* gồm 7 loài có môi phẳng, mỏng, staminode lõi hay gấp đôi và cột bao phần dạng hạt. Đây là nhóm Hải nguyên thủy, rất tách biệt và có các đặc điểm ít nhiều thể hiện sự trung gian giữa phân chi *Paphiopedilum* và chi *Cypripedium*. Dựa trên các kết cấu và màu sắc của lá, hình dạng các cánh hoa và môi, phân chi *Parvisepalum* có thể chia làm 2 section riêng, section *Parvisepalum* với 5 loài và section *Emersonianum* với 2 loài [3], [4].

Phân chi thứ 2 *Brachypetalum* có 4 loài, đặc trưng bởi hoa đồng màu trắng hay vàng nhạt, các cánh hoa hình bầu dục hoặc hơi tròn, môi hình trứng, lá có các vết khảm màu. Nhóm đồng nhất thể hiện 1 nhánh tiến hóa riêng, trong đó phần nào mang những đặc tính trung gian giữa các phân chi *Parvisepalum* và *Paphiopedilum*.

Phân chi *Paphiopedilum* là nhóm chuyên hóa nhất và tiến hóa hơn cả, nhóm này cũng là nhóm lớn nhưng không đồng nhất, bao gồm hơn 60 loài xếp thành 5 section: *Paphiopedilum*, *Barbata*, *Pardalopetalum*, *Cochlopetalum* và *Coryopetalum*. Section chuẩn *Paphiopedilum* bao gồm 13 loài với các đặc điểm như lá xanh đồng màu, cụm hoa mang 1 hoa, cánh hoa hình thìa và một staminode hình tim ngược thường có 1 núm hay mấu lõi bóng ở trung tâm. Các loài trong section này có mối quan hệ với các loài section *Barbata* với lá có các vết khảm màu, cụm hoa một hoa, môi rất phát triển, có thùy bên nhiều mụn và 1 staminode hình lưỡi liềm rộng không núm. Các loài của 3 section còn lại (*Pardalopetalum* – 4 loài, *Cochlopetalum* – 5 loài và *Coryopetalum* – 11 loài) có cụm hoa nhiều hoa, hoa biến đổi và chuyên hóa cao. Chúng được coi là tiến hóa nhất về hệ thống phát sinh [3], [5].

Có nhiều cách tiếp cận trong việc xác định phân loại loài, từ kỹ thuật dựa trên hình thái, dựa trên phản ứng PCR, dựa trên trình tự DNA. Các phương pháp phân tử cho kết quả chính xác hơn các phương pháp hình thái và không phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của cá thể loài. Hiện nay, ứng dụng mã vạch DNA (DNA barcode) vào nhận diện và phân loại sinh vật thể hiện nhiều ưu điểm [6]. Công dụng chính của mã vạch DNA là để nhận dạng loài, có thể nhận dạng và xác định loài trong tất cả các giai đoạn vòng đời của nó (quả, hạt, cây con, cá thể trưởng thành có khả năng sinh sản và vô sinh) cũng như trong các mẫu vật bị hư hỏng... mã vạch DNA đã trở thành một phương tiện nhận dạng phổ biến. Mã vạch phân tử tiêu chuẩn của thực vật gồm một chuỗi DNA có độ dài phù hợp khoảng 400 - 800 bp [7]. Sau khi thử nghiệm rộng rãi các vùng gen trong bộ gen ty thể, lục thể và nhân, bốn vùng gen chính của thực vật (*rbcL*, *matK*, trnH-psbA và ITS) được thống nhất là mã vạch DNA tiêu chuẩn đầu tiên và thường lựa chọn sử dụng trong các nghiên cứu định danh thực vật [8], [9]. Trong hai thập kỷ nghiên cứu, các mã vạch tiêu chuẩn chính đã được đề xuất gồm ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, psbA-trnH và *tral-traf*, giúp phân biệt các loài thực vật với độ chính xác cao [10], [11]. Tuy nhiên, mức độ chính xác khi sử dụng mã vạch DNA để phân loại thực vật phụ thuộc khá nhiều vào việc lựa chọn các trình tự chỉ thị phù hợp với mục đích thí nghiệm. Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng hai trình tự ITS và trnH-psbA để phân loại 4 loài lan Hải thuộc section *Paphiopedilum* có hình thái thân lá rất giống nhau đó là *Paphiopedilum coccineum*, *Paphiopedilum* × *hermannii*, *Paphiopedilum henryanum* và *Paphiopedilum helenae*. Kết quả của bài báo nhằm đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu trình tự nhận diện DNA barcode để nhận diện và phân biệt lan Hải ở Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Bốn loài lan Hải thuộc section *Paphiopedilum* có hình thái thân lá rất giống nhau, đó là *Paphiopedilum coccineum*, *Paphiopedilum* × *hermannii*, *Paphiopedilum henryanum* và *Paphiopedilum helenae*.

Cặp mồi nhân đoạn gen ITS, trnH-psbA với các thông số chi tiết như bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi	Kích thước dự kiến	Tài liệu tham khảo
trnH-psbA	F,5'-GTTATGCATGAACGTAATTGCTC-3' R,5'-CGCGCATGGTGGATTCAATCC-3'	600	[10]
ITS	F,5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG-3' R,5'-TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'	900	[10]

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát các đặc điểm hình thái của lan Hải nghiên cứu

Đặc điểm hình thái của bốn loài lan Hải được quan sát trực tiếp, các thông số về kích thước thân, lá, hoa... được đo bằng các loại thước dây, thước kẹp. Các đặc điểm chi tiết nhỏ được quan sát qua kính lúp. Tất cả được ghi chép lại và so sánh đối chiếu với các tài liệu phân loại lan Hải [1], [12].

2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử

Tiến hành tách chiết DNA tổng số của bốn loài lan Hải nghiên cứu bằng phương pháp có sử dụng CTAB [13]. Tiến hành phản ứng PCR nhân các gen quan tâm với thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt tương ứng trong bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR nhân gen quan tâm

Components	Barcode locus	
	trnH-psbA	ITS
PCR Master Mix (2X)	12,5 μ L (\times 1)	12,5 μ L (\times 1)
Môi xuôi/môi ngược	1 μ L (10 μ M)	1 μ L (10 μ M)
Nước deion khử trùng	4,5	4,5
Hàm lượng DNA (50 μ g/ μ l)	1 μ L	1 μ L

Bảng 3. Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR nhân gen quan tâm

	Barcode locus	
	trnH-psbA	ITS
Biến tính cục bộ	94°C trong 5 phút	94°C trong 5 phút
Biến tính chu kỳ	94°C trong 45 giây	94°C trong 45 giây
Bắt cặp mồi	52°C trong 30 giây	52°C trong 30 giây
Kéo dài chuỗi	72°C trong 50 giây	72°C trong 40 giây
Kết thúc phản ứng	72°C trong 7 phút	72°C trong 7 phút

Sử dụng máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer để xác định trình tự nucleotide. Các trình tự nghiên cứu được Blast trong NCBI. Cây phân loại dựa trên các trình tự gen chi thị được dựng bằng phần mềm MegaX.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm thực vật học của các mẫu lan Hải nghiên cứu

Quan sát trực tiếp các mẫu lan Hải nghiên cứu, mô tả các đặc điểm thực vật học (thân lá, rễ, hoa...) và trình bày theo bảng 4.

Bảng 4. Đặc điểm thực vật học của các mẫu lan Hải nghiên cứu

Đặc điểm	Hải Hecman	Hải Cocci	Hải Henry	Hải Helen
Thân				
Chiều cao	2 - 3 cm	3 - 5 cm	5 - 7 cm	2 - 3 cm
Đặc điểm sắp xếp lá	Xếp 2 hàng lỏng lẻo	Xếp 2 hàng lỏng lẻo	Xếp 2 hàng lỏng lẻo	Xếp 2 hàng lỏng lẻo

Đặc điểm	Hài Hecman	Hài Cocci	Hài Henry	Hài Helen
Lá				
Số lá trên cây	4 - 6 lá	4 - 6 lá	4 - 6 lá	4 - 6 lá
Hình dạng đầu lá				
Hình dạng lá	Lá dài hẹp cứng, vươn	Lá dài hẹp mềm, rủ	Lá dài hẹp mềm	
Chiều dài lá	7 - 10 cm	10 - 15 cm	10 - 17 cm	4 - 5 cm
Chiều rộng lá	0,5 - 1 cm	1 - 1,2 cm	2,2 - 1,6 cm	1 - 1,2 cm
Hình thái viền lá	Viền thẳng, cứng và sắc	Viền thẳng, mềm	Viền thẳng, cứng và sắc	
Màu sắc mặt trên lá	Xanh lục đậm	Xanh lục đậm	Xanh lục đậm, viền lá hơi vàng	Xanh lục đậm
Màu sắc mặt dưới lá	Xanh lục nhạt có đốm tím ở gốc	Xanh lục nhạt có đốm tím ở gốc	Xanh lục nhạt có đốm tím ở gốc	Xanh lục nhạt
Hoa				
Chiều dài phát hoa	10 - 12 cm	15 - 20 cm	10 - 12 cm	5 - 7 cm
Lá bắc	3,5×1 cm hình mũi mác hơi bầu	2,5×1 cm hình mũi mác hơi bầu		
Hình dáng và kích thước	7,5×6 cm, úp về phía trước	7,5×6 cm úp về phía trước	5,5×7 cm	4 × 5 cm
Lá dài trên	Kích thước 3,5×3 cm, hình tròn với đỉnh cuộn lại và nhọn hẳn lên. Viền lượn sóng, viền có màu xanh nõn chuối rộng khoảng 1 cm, phía giữa màu nâu tím	Kích thước 4,7×3,5 cm, hình tròn hơi quạt với đỉnh cuộn lại và nhọn hẳn lên, cuống dài vênh ra phía sau, viền trắng rộng khoảng 1 cm, phía giữa màu nâu tím	Kích thước 3,5×3,5 cm, hình bán cầu, đầu hơi nhọn và giữa lưng cong lại, sóng gân nổi rõ, màu vàng nhạt, mặt trước có nhiều đốm nâu to	Kích thước 2,2×2 cm, hình tròn hơi thuôn, viền cánh dài hơi vênh ra sau, mặt trước màu vàng có viền trắng nhỏ, phía gốc mang tia màu nâu tím, mặt sau vàng đậm hơn, sóng gân nổi rõ
Lá dài dưới	Kích thước 2,5×1,5 cm, hình elip với đầu nhọn, màu xanh nõn chuối hơi vàng, hai sóng gân màu phớt nâu	Kích thước 3,5×2,5 cm, hình elip với đầu nhọn, cuống rộng, viền lá dài lượn sóng nhẹ và vênh ra sau, màu xanh nõn chuối hơi vàng, hai sóng gân mờ hơi lõm xuống	Kích thước 2,7×1,6 cm, mặt trong nhẵn, mặt ngoài nhiều lông, mép nhiều lông mịn, có màu tương tự lá dài trên nhưng ít chấm hơn	Kích thước khoảng 1,8×1,5 cm, có hình tròn hơi nhọn, mặt trong có màu vàng xanh, mặt ngoài xanh nhạt hơi vàng. Cả mặt trước và mặt sau không rõ đường gân
Cánh hoa	Kích thước 4×1,0 cm, hình thuôn dài mép lượn sóng rõ, màu nâu tím hơi pha xanh có các đường gân đậm	Kích thước 4×1,0 cm, hình thuôn dài mép lượn sóng rõ, màu nâu vàng có các đường gân	Kích thước 3,6×1,6 cm, hình ô van hẹp, đầu cánh hoa hơi tròn mép lượn sóng rõ, mặt trước màu nâu hồng đậm, với viền kem. Phần chân có những chấm màu nâu đỏ, mặt sau màu vàng chiếm ưu thế	Kích thước 2,7×0,8 cm hình thuôn dài không có lông, màu vàng có các gân chìm màu tím nâu chạy song song
Môi	Kích thước 4,5×2,2 cm, màu tím hơi pha vàng nhạt, hai thùy bên nhọn và vênh lên, viền	Kích thước 4,5×3 cm, màu vàng nhạt phía dưới pha nâu tím phía trên, hai thùy bên nhọn và	Kích thước 4,2×2 cm, có màu hồng đậm với một vành tròn quanh mép màu nâu vàng, hai	Môi dài, tròn bóng, gồm các mảng vàng nhạt xen tím nhạt, hình tròn hơi elip, kích

Đặc điểm	<i>Hài Hecman</i>	<i>Hài Cocci</i>	<i>Hài Henry</i>	<i>Hài Helen</i>
	vàng, thùy giữa lõm xuống	vênh lên có viền thùy cuộn lại, viền vàng, thùy giữa lõm xuống	thùy bên nhọn và vênh lên có viền thùy cuộn lại, viền vàng, thùy giữa lõm xuống	thước 3×2 cm
Staminode	Kích thước 0,7×0,7 cm hình tròn hơi khuyết ở đáy, màu vàng nhũ, cuống màu vàng đậm mang các lông rất ngắn màu nâu tím	Kích thước 1,7×1 cm hình tròn hơi khuyết ở đáy, màu vàng nhũ, cuống hơi dài màu vàng mang các lông rất ngắn màu nâu tím	Staminode hình tim ngược hơi bầu, kích thước 1,5×0,7 cm, màu vàng nhạt bóng, cuống hơi dài	Kích thước 1×0,7 cm hình tim, cuống hơi dài, màu xanh cốm nhạt, bóng
Bao phấn và noãn	Bao phấn hình cầu, màu vàng đậm kích thước khoảng 1 mm. Noãn hình tròn màu trắng bóng, kích thước 5×5 mm.	Bao phấn hình cầu, màu vàng đậm kích thước khoảng 1 mm. Noãn hình tròn màu trắng bóng, kích thước 7×7 mm	Bao phấn hình cầu, màu vàng đậm kích thước khoảng 1 mm. Noãn hình dài màu trắng bóng, kích thước 7×3 mm	Bao phấn màu nâu hình cầu với đường kính tầm 0,5 mm. Noãn có hình tròn, kích thước 3×3 mm, màu trắng bóng



Hình 1. Hình ảnh đặc điểm hình thái bốn loài lan hài nghiên cứu

A1-A4. Hình ảnh cây, hoa và lá của hài Cocci; B1-B4. Hình ảnh cây, hoa và lá của hài Hecman;

C1-C4. Hình ảnh cây, hoa và lá của hài Henry; D1-D4. Hình ảnh cây, hoa và lá của hài Helen.

Kết quả phân tích hình thái (bảng 4 và hình 1) cho thấy, những loài Hài nghiên cứu thuộc nhóm lá nhỏ xanh quanh năm không rụng lá theo mùa, lá có màu xanh đồng nhất không có đốm/khảm. Kích thước lá của 4 loài nghiên cứu gần tương tự nhau, sai khác không đáng kể, đều thuộc nhóm có lá nhỏ và dài, mặt trên màu xanh lục đậm, mặt dưới màu xanh nhạt. Chúng có thể khác nhau không nhiều về kích thước và độ cứng của lá (bảng 4). Theo nghiên cứu phân loại dựa vào hình thái của Vũ Huyền Trang và cs (2019) [12] thì 4 loại nghiên cứu thuộc nhóm 2 và 2A. Tác giả đã chia lan Hài Việt Nam thành 2 nhóm chính dựa vào đặc điểm vân lá; trong đó, những loài có vân thuộc nhóm 1, những loài không vân thuộc nhóm 2. Trong nhóm 2 còn chia ra một số loài thuộc nhóm 2A và 2B, trong đó *Paphiopedilum helenae* và *Paphiopedilum henryanum* thuộc

nhóm 2, *Paphiopedilum coccineum* thuộc nhóm 2A, tác giả không phân nhóm *Paphiopedilum* × *hermannii*.

3.2. Phân loại lan Hải nghiên cứu bằng chỉ thị phân tử

Các đoạn trình tự gen được khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng để xác định trình tự nucleotide trực tiếp.

Sử dụng BLAST trên NCBI để so sánh các trình tự trnH-psbA và ITS của bốn mẫu nghiên cứu, xác định và thu thập các loài có trình tự tương đồng gần để phân tích (bảng 5). Phân tích độ tương đồng di truyền và lập cây phân loại bằng phần mềm MegaX dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide. Sử dụng phương pháp Maximum Likelihood và mô hình Tamura-Nei để phân tích tiến hóa và đưa ra lịch sử tiến hóa [14]. Cây phân loại được lựa chọn trình bày dựa trên hệ số likelihood lớn nhất (-1102,40).

Bảng 5. Các trình tự gen sử dụng để phân tích quan hệ di truyền

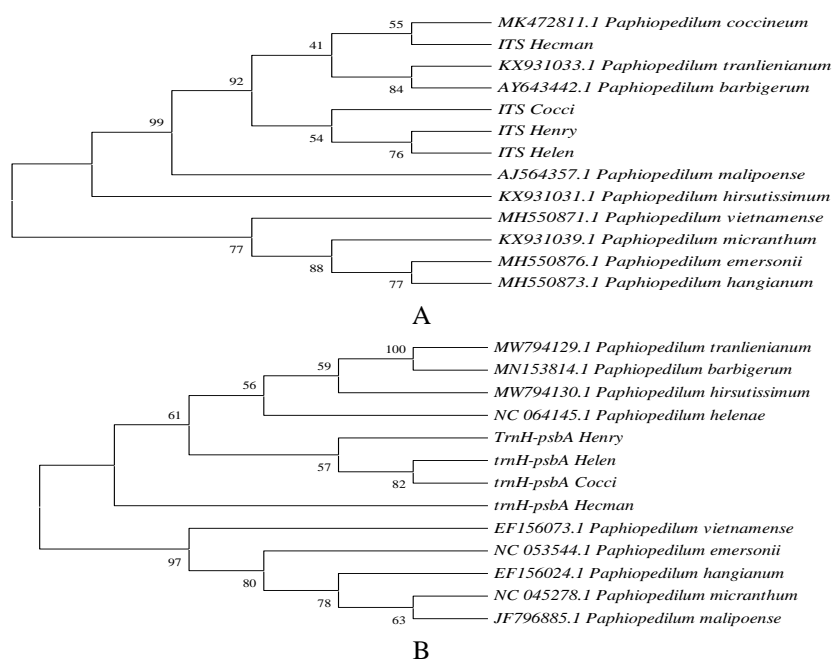
STT	Loài <i>Paphiopedilum</i>	Mã số truy cập trnH-psbA trong GenBank	Mã số truy cập ITS trong GenBank
Section <i>Paphiopedilum</i> - Subgenus <i>Paphiopedilum</i>			
1.	<i>Paphiopedilum barbigerum</i>	MN153814.1	AY643442.1
2.	<i>Paphiopedilum hirsutissimum</i>	MN153815.1	KX931031.1
3.	<i>Paphiopedilum tranlienianum</i>	MW794129.1	KX931033.1
4.	<i>Paphiopedilum helenae</i>	NC064145.1	-
5.	<i>Paphiopedilum coccineum</i>	-	MK472811.1
Section <i>Emersonianum</i> - Subgenus <i>Pavisepalum</i>			
6.	<i>Paphiopedilum emersonii</i>	NC_053544.1	MH550876.1
7.	<i>Paphiopedilum hangianum</i>	EF156024.1	MH550873.1
Section <i>Pavisepalum</i> - Subgenus <i>Pavisepalum</i>			
8.	<i>Paphiopedilum micranthum</i>	NC_045278.1	GU993849.1
9.	<i>Paphiopedilum malipoense</i>	JF796885.1	AJ564357.1
10.	<i>Paphiopedilum vietnamense</i>	EF156073.1	MH550871.1

Phân tích độ tương đồng trình tự nucleotide của các chỉ thị nhận thấy, trình tự nucleotide của 4 mẫu lan Hải nghiên cứu có độ tương đồng cao với nhau và với các loài cùng nhóm [11]. Những loài có độ tương đồng cao bao gồm *Paphiopedilum tranlienianum*, *Paphiopedilum barbigerum* và *Paphiopedilum hirsutissimum* (thuộc section *Paphiopedilum*, subgenus *Paphiopedilum* [1]). Điều này phù hợp với thực tế phân loại hình thái, trong đó Hải Hecman (*Paphiopedilum* × *hermannii*) được cho là con lai giữa cây bố là Hải Vệ Nữ (*Paphiopedilum hirsutissimum*) và cây Hải Helen (*Paphiopedilum helenae*) mẹ, một số quan điểm cho rằng cây mẹ cũng có thể là *Paphiopedilum barbigerum*. Tùy từng chỉ thị mà hệ số sai khác có sự thay đổi, trong đó hệ số sai khác cao nhất là giữa hai loài Hecman và Henry ở cả hai chỉ thị nghiên cứu (0,113 đối với chỉ thị ITS và 0,015 đối với chỉ thị trnH-psbA), hệ số sai khác thấp nhất từ 0,000 - 0,006 khi so Hải Henry với Hải Helen và Hải Cocci ở 2 chỉ thị nghiên cứu, trong đó ITS cho hệ số sai khác cao hơn trnH-psbA (bảng 6).

Phân tích cây phân loại được xây dựng dựa trên các trình tự nucleotide (hình 2A,B) nhận thấy, cả hai chỉ thị đều có sự phân loại khá tốt, các loài đều được phân loại theo nhóm đúng với phân loại hình thái. Cây phân loại có hai nhóm chính, một nhánh bao gồm 4 loài nghiên cứu và các loài thuộc section *Paphiopedilum*, subgenus *Paphiopedilum*; nhánh còn lại là các loài thuộc Subgenus *Pavisepalum*. Các phân nhánh nhỏ hơn cũng thể hiện những phân nhóm nhỏ hơn trong phân loại hình thái như *Paphiopedilum emersonii* và *Paphiopedilum hangianum* thuộc Section *Emersonianum* - Subgenus *Pavisepalum* nằm cùng nhánh (hình 2A).

Bảng 6. Hệ số sai khác giữa các loài *Paphiopedilum* nghiên cứu và trên GenBank dựa trình tự ITS và trnH-psbA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 ITS_Henry												
2 ITS_Helen	0.0000											
3 ITS_Hecman	0.0113	0.0113										
4 ITS_Cocci	0.0056	0.0056	0.0056									
5 MK472811.1_ <i>Paphiopedilum coccineum</i>	0.0113	0.0113	0.0028	0.0056								
6 MH550876.1_ <i>Paphiopedilum emersonii</i>	0.0709	0.0709	0.0678	0.0709	0.0647							
7 MH550873.1_ <i>Paphiopedilum hangianum</i>	0.0556	0.0556	0.0525	0.0556	0.0495	0.0142						
8 MH550871.1_ <i>Paphiopedilum vietnamense</i>	0.0712	0.0712	0.0680	0.0712	0.0649	0.0683	0.053					
9 KX931039.1_ <i>Paphiopedilum micranthum</i>	0.0587	0.0587	0.0556	0.0587	0.0526	0.0347	0.020	0.044				
9 KX931033.1_ <i>Paphiopedilum tranlienianum</i>	0.0056	0.0056	0.0085	0.0113	0.0056	0.0647	0.049	0.065	0.053			
10 KX931031.1_ <i>Paphiopedilum hirsutissimum</i>	0.0584	0.0584	0.0553	0.0584	0.0523	0.0958	0.080	0.103	0.090	0.052		
11 AY643442.1_ <i>Paphiopedilum barbigerum</i>	0.0056	0.0056	0.0085	0.0113	0.0056	0.0647	0.049	0.065	0.053	0.000	0.052	
12 AJ564357.1_ <i>Paphiopedilum malipoense</i>	0.0257	0.0257	0.0228	0.0257	0.0199	0.0678	0.052	0.068	0.056	0.020	0.052	0.020
1 trnH-psbA_Henry												
2 trnH-psbA_Helen	0.006											
3 trnH-psbA_Hecman	0.015	0.011										
4 trnH-psbA_Cocci	0.006	0.002	0.009									
5 NC_064145.1_ <i>Paphiopedilum helenae</i>	0.009	0.009	0.019	0.009								
6 NC_053544.1_ <i>Paphiopedilum emersonii</i>	0.034	0.034	0.046	0.036	0.033							
7 NC_045278.1_ <i>Paphiopedilum micranthum</i>	0.031	0.031	0.042	0.033	0.029	0.004						
8 MW794130.1_ <i>Paphiopedilum hirsutissimum</i>	0.011	0.011	0.023	0.013	0.009	0.027	0.023					
9 MW794129.1_ <i>Paphiopedilum tranlienianum</i>	0.007	0.008	0.019	0.009	0.006	0.027	0.023	0.004				
9 MN153814.1_ <i>Paphiopedilum barbigerum</i>	0.007	0.008	0.019	0.009	0.006	0.027	0.023	0.004	0.000			
10 JF796885.1_ <i>Paphiopedilum malipoense</i>	0.031	0.031	0.042	0.033	0.029	0.004	0.000	0.023	0.023	0.023		
11 EF156073.1_ <i>Paphiopedilum vietnamense</i>	0.027	0.027	0.038	0.029	0.025	0.013	0.009	0.019	0.019	0.019	0.009	
12 EF156024.1_ <i>Paphiopedilum hangianum</i>	0.032	0.033	0.044	0.034	0.031	0.006	0.002	0.025	0.025	0.025	0.002	0.011



Hình 2. Cây phân loại xây dựng dựa trên trình tự ITS (A) và trnH-psbA (B) của các loài nghiên cứu và các trình tự trên GenBank

Đối với chi lan Hải, nghiên cứu phân loại các loài dựa vào mã vạch lần đầu được tiến hành bởi nhóm tác giả Parveen và cộng sự (2012). Tác giả đã thực hiện nhận diện tám loài *Paphiopedilum* Ấn Độ, bằng năm chỉ thị *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK* và ITS. Kết quả cho thấy, *matK* với giá trị phân kỳ giữa các loài trung bình là 0,9% mang lại độ phân giải loài 100% các loài được nhận dạng, trong khi ITS chỉ đạt 50%; do đó công bố đã khuyến cáo sử dụng *matK* làm mã vạch để phân biệt loài *Paphiopedilum* [15]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về sau với số lượng mẫu dày đặc hơn đã cho kết quả khác. Guo và cộng sự (2016) [16] đã sử dụng bộ dữ liệu trình tự nhiều gen của *Paphiopedilum* để phân tích giới hạn của các mã vạch DNA. Tổng số 107 mẫu đại diện cho 77 loài *Paphiopedilum* đã được sử dụng để kiểm tra độ phân giải của các mã vạch, 22 loài trong số đó được đại diện bởi hai hoặc nhiều cá thể và các giống được coi là mẫu trong cùng một loài. Những dữ liệu này đã được bổ sung từ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), tổng cộng có 359 trình tự ITS, 116 trình tự *matK*, 60 trình tự *ycf1* và 44 trình tự *rbcL* đã được tải xuống từ GenBank. Nghiên cứu đã phân tích dữ liệu, đánh giá độ phân giải của tám vùng DNA đơn locus (*accD*, *matK*, *rbcL*, *rpoC2*, *ycf1*, *trnS-trnfM*, *atpF-atpH*, *atpI-atpH*), sáu tổ hợp hai locus (*rbcL + accD*, *rbcL + matK*, *ycf1 + rpoC2*, *ycf1 + atpF-atpH*, *rpoC2 + atpF-atpH*, *matK + atpFatpH*), hai tổ hợp ba locus (*rbcL + matK + atpF-atpH*, *trnS-trnfM + atpI-atpH + atpF-atpH*) và tám vùng cpDNA kết hợp. Tóm tắt về độ phân giải mã vạch đơn và đa điểm được liệt kê cho thấy, ITS là mã vạch đơn lẻ có khả năng phân biệt cao nhất (52,27%). Khi phân tích năm vùng gen DNA lục lạp có mã hóa thì *rpoC2* có độ phân giải cao nhất (25,74%), tiếp theo là *ycf1*, *matK* và *accD* (lần lượt là 22,42%, 15,88% và 14,01%), trong khi *rbcL* có độ phân giải thấp nhất (3,77%). Trong ba vùng liên gen thì *atpF-atpH* có độ phân giải cao nhất (22,42%), tiếp theo là *atpI-atpH* và *trnS-trnfM* (19,62% và 13,33%). Trong số các tổ hợp đa locus, ngoại trừ hai tổ hợp hai locus, những tổ hợp có *rbcL* có độ phân giải tương đối thấp hơn (14,14% và 18,86%) và khả năng phân biệt của các tổ hợp khác là tương tự nhau, từ 25,74% đến 29,52%. Độ phân giải không tăng đáng kể khi bổ sung độ dài trình tự phân tích. Trong một số các nghiên cứu khác, tuy hạn chế hơn về số loài cũng như tỉ lệ mẫu thí nghiệm, nhưng cũng cho thấy ITS là chỉ thị DNA nhân đơn lẻ phù hợp làm mã vạch phân loại *Paphiopedilum* [11], [17], [18], trong khi trnH-psbA được cho là hạn chế khi khuếch đại gen đối với lan Hải [11]. Nghiên cứu của chúng tôi cho rằng, hai chỉ thị ITS và trnH-psbA là phù hợp khi sử dụng để phân loại bốn loài gần gũi trong cùng section (trong đó có một loài lai tự nhiên của những loài trong section đó),

cả hai chi thị đều phù hợp theo các hệ thống phân loại hình thái trước đây. Tuy nhiên, để nhận diện riêng lẻ từng loài trong nhóm loài gần gũi đó thì chưa phù hợp, trong 4 loài nghiên cứu, chỉ có loài lai tự nhiên *Paphiopedilum × hermannii* tách thành nhánh riêng khi sử dụng hai chi thị này, các loài còn lại đều được phân thành cùng nhóm, không nhận diện được.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân tích mô tả được hình thái thực vật của 4 loài lan Hải có quan hệ gần gũi, bảng mô tả chi tiết đặc điểm hình thái có thể sử dụng để nhận diện các loài này.

ITS và trnH-psbA là chi thị phù hợp để nghiên cứu phân loại lan Hải, tuy nhiên không phù hợp trong phân biệt 3 loài có quan hệ gần gũi là *Paphiopedilum helenae*, *Paphiopedilum hennryanum* và *Paphiopedilum coccineum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] R. Dressler, *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1981.
- [2] A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, and F. N. Rasmussen, *Genera orchidacearum, Volum 1: Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford University Press, 1999.
- [3] L. Averyanov, C. Phillip, K. L. Phan, and T. H. Nguyen, *Slipper Orchids of Vietnam, With an Introduction to the Flora of Vietnam*, Royal Botanic Gardens, Kew. Compass Press Limited, p. 308, ISBN 1 84246 047 1, 2003.
- [4] R. W. Pemberton, "Pollination of Slipper orchids (Cyripedioideae): A review," *Lankesteriana*, vol. 13, no. 1–2, pp. 65-73, 2013.
- [5] L. Averyanov, "The Orchids of Vietnam, Illustrated survey. Part 2. Subfamily Orchidoideae," *Turczaninowia*, vol. 13, no. 2, pp. 5-98, 2010.
- [6] S. Zhu, Q. Liu, S. Qiu, J. Dai, and X. Gao, "DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances," *Chinese Medicine*, vol. 17, no. 112, 2022, doi: 10.1186/s13020-022-00655-y.
- [7] P. M. Hollingsworth, S. W. Graham, and D. P. Little, "Choosing and using a plant DNA barcode," *PLoS ONE*, vol. 6, 2011, Art. no. e19254.
- [8] CBOL Plant Working Group, "A DNA barcode for land plants," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 106, pp. 12794–12797, 2009.
- [9] X. Li, Y. Yang, R. J. Henry, M. Rossetto, Y. Wang, and S. Chen, "Plant DNA barcoding: from gene to genome," *Biol Rev Camb Philos Soc*, vol. 90, pp. 157-166, 2015.
- [10] 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.
- [11] H. T. Vu, A. K. Tran, Q. L. Vu, 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [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] 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.
- [16] Y. Y. Guo, L. Q. Huang, Z. J. Liu, and X. Q. Wang, "Promise and challenge of DNA barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*)," *PloSone*, vol. 11, no. 1, 2016, Art. no. e0146880.
- [17] H. T. Khuat, D. K. Tran, H. H. Le, D. D. Tran, and K. Tran, "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.
- [18] M. C. Rajaram, C. S. Y. Yong, J. A. Gansau and R. Go, "DNA Barcoding of Endangered *Paphiopedilum* species (Orchidaceae) of Peninsular Malaysia," *Phytotaxa*, vol. 387, no. 2, pp. 094-104, 2019, doi: 10.11646/phytotaxa.387.2.2.