

Đặc điểm di truyền trình tự loài lan Hải hồng *Paphiopedilum delenatii* đặc hữu Việt Nam

Vũ Thị Huyền Trang^{1,2}, Trần Anh Khoa¹, Vũ Quốc Luận³, Lê Thị Lý², Phạm Công Hoạt⁴, Trần Hoàng Dũng^{1*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Trường Đại học quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học Tây Nguyên

⁴Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 19/12/2018; ngày chuyển phản biện 24/12/2018; ngày nhận phản biện 25/1/2019; ngày chấp nhận đăng 12/2/2019

Tóm tắt:

Lan Hải là những loài lan đẹp và quý nên hiện nay bị khai thác quá mức và mua bán trái phép ở Việt Nam. Trong đó, Lan Hải hồng là loài lan Hải đặc hữu Việt Nam cũng gặp tình trạng tương tự. Việc ứng dụng mã vạch ADN để nhận diện các loài lan Hải thương mại, giúp hạn chế mua bán trái phép do định danh sai là điều cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu đặc điểm di truyền trình tự một số vùng ADN chỉ thị của loài lan Hải hồng, cung cấp trình tự ADN giúp nhận diện chính xác và bảo tồn loài lan quý này. Nghiên cứu đã thu được 3 mẫu lan Hải hồng đặc hữu và giải trình tự, phân tích đặc điểm di truyền cho 6 vùng trình tự gồm rpoB, rpoC1, trnH-psbA, ITS, matK và trnL, cho thấy tính thống nhất về mặt di truyền của loài.

Từ khóa: ITS, lan Hải hồng, matK, rpoB, rpoC1, trnH-psbA, trnL.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Lan Hải trên thế giới và ở Việt Nam là loài thực vật cảnh được yêu thích. Với vẻ đẹp tự nhiên cũng như những nét đặc biệt của nó nên lan Hải bị săn lùng và buôn bán rất nhiều, dẫn đến nguy cơ đe dọa tuyệt chủng. Việt Nam là một nước có số lượng loài lan Hải đứng hàng đầu thế giới. Nhưng theo thống kê của IUCN cho thấy, với 24 loài lan Hải Việt Nam thì có đến 23 loài nằm trong danh sách đe dọa tuyệt chủng. Tình trạng thu hái cũng như buôn lậu không thể kiểm soát đã dẫn đến việc ngày càng nhiều loài lan Hải bị tận diệt hơn. Việc nhận diện và kiểm soát kịp thời sẽ giúp hạn chế việc thu hái cũng như buôn bán trái phép, làm giảm nguy cơ tuyệt chủng. Phương pháp nhận diện loài bằng kỹ thuật phân tử có thể nói là hữu hiệu nhất. Bằng việc sử dụng một lượng mẫu rất nhỏ từ các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, phương pháp nhận diện phân tử cho ta kết quả với độ chính xác cao, giúp nhanh chóng cũng như chính xác trong việc nhận dạng loài lan Hải để kịp thời ngăn chặn nạn buôn bán trái phép và góp phần bảo tồn loài này.

Năm 2009, Yao và cs đã nghiên cứu trình tự mã vạch để phân định loài lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) nhờ trình tự mã hóa ADN trên vùng gen lục lạp trnH - psbA của 17 loài *Dendrobium*. Kết quả cho thấy, vùng gene trnH-psbA có thể sử dụng như một mã vạch để phân biệt *Dendrobium* với những loài khác [1].

Năm 2012, Parveen và cs nghiên cứu xây dựng hệ thống ADN barcode cho các loài lan Hải Ấn Độ có nguy cơ tuyệt chủng dựa

vào 5 vùng gen rpoB, rpoC1, rbcL, matK và ITS. Kết quả nghiên cứu cho thấy, matK là vùng phân định loài tốt nhất (đạt 100%), vùng trình tự gen matK còn có thể xác định chính xác bố mẹ của các giống lai giữa các loài, còn vùng ITS phân định loài là 50% [2].

Năm 2012, Guo và cs đã nghiên cứu sự tiến hóa và phân bố địa lý sinh vật của lan Hải. Kết quả cho thấy đã giải quyết tốt các nhánh đơn ngành (Monophyletic branch) cho tất cả các loài trong nghiên cứu dựa vào trình tự phân tích 6 hệ gen lục lạp: matK, rbcL, ycf1, ycf2, rpoC1, rpoC2 và 2 hệ gene nhân: ACO, LFY [3].

Năm 2013, Kim và cs đã nghiên cứu về việc xác định phân tử của các loài lan Hải (*Cypripedium*, *Orchidaceae*) của Hàn Quốc có nguy cơ bị tuyệt chủng và liên quan đến đơn vị phân loại (taxa). Trong nghiên cứu này, tác giả đã sử dụng 2 vùng của hệ gen lục lạp rpoC2 và vùng giữa gen atpH-aptF để tạo ra hệ thống nhận dạng phân tử đối với một số loài trong chi *Cypripedium* [4].

Năm 2015, Ying và cs đã xây dựng thành công cây phát sinh loài và nhận diện các loài lan châu Á bằng 6 trình tự gồm vùng nhân (nrITS, low-copy Xdh) và vùng lục lạp (matK, psbA-trnH, trnL-F, trnS-trnG) [5].

Trong nước, năm 2009, Phan Kế Long và cs đã nhận diện một số loài lan Hải đặc hữu của Việt Nam và đã nghiên cứu mối liên hệ với các loài lan trên thế giới dựa trên vùng ITS để bảo tồn bền vững các loài lan có nguy cơ tuyệt chủng. Kết quả phân tích cho thấy, vùng ITS-rDNA của 5 loài lan Hải Việt Nam dao động 659-

*Tác giả liên hệ: Email: tranhoangdung1975@gmail.com

Genetic characteristics of the endemic orchid species *Paphiopedilum delenatii* in Vietnam

Thi Huyen Trang Vu^{1,2}, Anh Khoa Tran¹,
Quoc Luan Vu³, Thi Ly Le², Cong Hoat Pham⁴,
Hoang Dung Tran^{1*}

¹Nguyen Tat Thanh University

²International University, Vietnam National University Ho Chi Minh city

³Tay Nguyen Institute of Biology

⁴Ministry of Science and Technology

Received 19 December 2018; accepted 12 February 2019

Abstract:

Paphiopedilum delenatii is known as an endemic orchid species of Vietnam. The other species of *Paphiopedilum* genus are all valuable but in overexploitation. This study aimed to find out more about this species's genetic characteristics from some of sequence regions of its genome. Three samples of *Paphiopedilum delenatii* from the wild nature were collected for this study. The nucleotide characteristics of six regions *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *ITS*, *matK*, and *trnL* were sequenced and analysed, and the results exhibited the genetic uniformity of the species.

Keywords: *ITS*, *matK*, *Paphiopedilum delenatii*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *trnL*.

Classification number: 4.6

700 bp. Hai mẫu *Paphiopedilum villosum* lấy từ hai cây riêng biệt hoàn toàn không có sự khác nhau. Chiều dài ITS của các mẫu ở Việt Nam khá giống với trình tự đã được công bố trên Genbank [6].

Năm 2010, Nguyễn Thị Mỹ Duyên và cs đã nghiên cứu phá hệ các giống, loài lan (Orchidaceae) dựa trên phân tích các vùng trình tự ITS, kết quả cho thấy 5 loài lan Hải *Paphiopedilum delenatii*, *P. concolor*, *P. paishii*, *P. hirsutissimum*, *P. primulium* có quan hệ họ hàng xa về phân tích kiểu gen, mặc dù về hình thái chúng được xếp cùng một nhóm [7].

Khuất Hữu Trung và cs cũng đã sử dụng trình tự vùng ITS (gồm ITS1, 5.8 S, ITS2) để phân biệt 16 loài và 2 thứ dưới loài của chi *Paphiopedilum* Việt Nam. Nghiên cứu kết luận rằng, các vùng có độ biến thiên cao ở vùng ITS rất hữu ích cho việc phân tích phát sinh loài [8].

Như vậy có nhiều vùng trình tự được sử dụng trên các đối tượng khác nhau của hoa lan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử

dụng 6 vùng trình tự *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *ITS*, *matK* và *trnL* để phân tích đặc điểm trình tự và nhận diện loài lan Hải hồng đặc hữu Việt Nam cũng như một số các loài lan Hải Việt Nam lân cận khác.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Thu thập, xử lý và bảo quản mẫu

Mẫu lá tươi thu tại cây ở Viện Sinh học Tây Nguyên, được đưa về phòng thí nghiệm, tiến hành rửa sạch bụi bẩn bám trên lá bằng nước sạch. Sau đó tiếp tục rửa lại mẫu bằng nước cất khử ion. Dùng bông gòn thấm cồn 70⁰ lau sạch cả hai bề mặt lá. Loại bỏ các mẫu bị hư hại, dập, nhũn, bệnh, đốm đen, khô héo hay dị dạng. Để khô mẫu, sau đó giữ trong túi zip ghi ký hiệu đánh dấu mẫu và bảo quản ở -20⁰C. Mẫu được định danh hình thái bởi các chuyên gia hình thái dựa vào cây có hoa.

Khuếch đại các vùng trình tự nhận diện lan Hải hồng

Một số vùng trình tự chúng tôi sử dụng các cặp mồi của các nghiên cứu trước để khuếch đại. Một số vùng trình tự chúng tôi tiến hành thiết kế các cặp mồi mới nhằm đạt hiệu quả khuếch đại cao hơn ở những vùng có độ biến thiên di truyền cao, phù hợp với mục đích nhận diện trình tự. Đối với các cặp mồi được thiết kế mới, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm trên một số đối tượng lan Hải rồi mới áp dụng rộng rãi cho nghiên cứu [9] (bảng 1).

Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên vùng trình tự	Tên mồi dự kiến	Trình tự mồi	Trích dẫn
ITS (900 bp)	IT1-LH-F	AGTCGTAACAAGGTTTC	[10]
	IT2-LH-R	GTAAGTTTCTCTCTCTCC	
matK (1.200 bp)	F56-mo	CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	[9]
	R1326-mo	GTTCTAGCACAAGAAAGTCG	
trnL (700 bp)	trnL-F	GGTAGAGTACTACGACTTGATT	
	trnL-R	CGGTATTGACATGTAAAATGGGACT	
rpoB (600 bp)	2F	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	
	4R	GATCCCAGCATCACAAATTC	
rpoC1 (600 bp)	1.1F	GTGGATACTTCTTGATAATGG	[11]
	1.3R	TGAGAAAACATAAGTAAAGGCC	
trnH-psbA (900 bp)	psbA3'f	CGCGCATGGTGGTTTCAATCC	
	trnHf	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	

Giải và hiệu chỉnh trình tự

Sau khi PCR, những sản phẩm cho ra kết quả tốt trên băng soi đặc hiệu sẽ được gửi đi giải trình tự tại Công ty FirstBase Singapore. Kết quả nhận được file trình tự của các vùng được khuếch đại cả hai chiều xuôi và ngược. Sau khi thu được kết quả trình tự thô, phần mềm Finch TV sẽ giúp đọc trình tự theo tín hiệu huỳnh quang để kiểm tra tín hiệu của sản phẩm.

Trình tự ADN thường được giải trình tự 2 chiều mỗi xuôi và mỗi ngược. Việc giải theo hai chiều giúp hạn chế tối đa việc đọc sai base. Do trình tự được giải theo 2 chiều nên một trong hai trình tự cần đổi đầu lại trên phần mềm Finch TV trước khi tiến hành việc so sánh. Các trình tự 2 chiều được đưa vào phần mềm Seaview, chọn công cụ Align để sắp giống cột thẳng hàng tự động [12]. Các vị trí sắp giống cột chưa phù hợp sẽ được điều chỉnh thủ công sau đó.

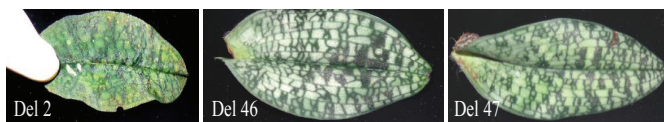
Phân tích tính đặc trưng trình tự

Phương pháp so sánh đa hình trình tự sử dụng chức năng variable sites (các điểm biến dị) của phần mềm Mega 7.0 để xác định các vị trí đột biến. Ghi nhận thủ công các vị trí mất đoạn (deletion), chèn đoạn (insertion), mất hoặc chèn một nucleotide (mononucleotide Indel).

Kết quả và thảo luận

Kết quả thu mẫu

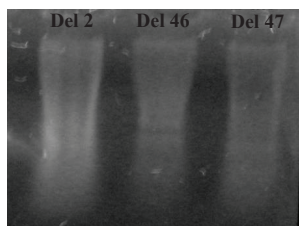
Chúng tôi thu được lá của 3 mẫu lan Hải hồng gồm 3 mẫu Hải hồng nguyên thể được đánh mã số Del 2, Del 46 và Del 47 (hình 1). Các mẫu được thu tại Viện Sinh học Tây Nguyên đã được định danh hình thái.



Hình 1. Lá của các mẫu Hải hồng thu được trong nghiên cứu.

Kết quả khuếch đại và giải trình tự các mẫu lan Hải hồng

ADN tổng số của 3 mẫu lan Hải hồng Del 2, Del 46 và Del 47 (hình 2) được sử dụng để khuếch đại cả 6 vùng trình tự gồm vùng ITS trong nhân, các vùng rpoB, rpoC1, trnH-psbA, matK, trnL trong lục lạp. Các sản phẩm khuếch đại được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

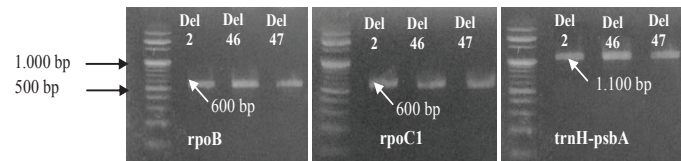


Hình 2. Kết quả tách ADN tổng số trên 3 mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: vệt màu sáng đậm dài và rõ thể hiện nồng độ ADN cao, ADN sau khi tách do đứt gãy thành các kích thước khác nhau nên thể hiện thành vệt trải dài từ trên xuống dưới sau khi điện di.

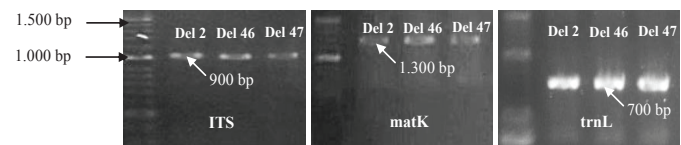
Kết quả điện di cho thấy, các sản phẩm PCR ở 5 vùng trình tự rpoB, rpoC1, ITS, matK, trnL (hình 3, 4) đều được khuếch đại thành công với chiều dài sản phẩm đúng với dự kiến, tương ứng là 600, 600, 900, 1.300 và 700 bp. Kết quả giải trình tự đều cho tín hiệu tốt ở cả chiều xuôi và chiều ngược. Sau khi sắp giống cột

và hiệu chỉnh độ tin cậy dựa vào phần mềm Seaview, các trình tự được cắt bỏ bớt hai đầu nhiễu, ghép chiều xuôi và chiều ngược thành một trình tự thống nhất, chiều dài các vùng trình tự còn 500, 500, 750, 1.500 và 550 bp ở các vùng tương ứng trên. Kết quả trình tự được so sánh với các trình tự lan Hải hồng tham khảo từ GenBank để phân tích đặc điểm đa hình trình tự.



Hình 3. Kết quả khuếch đại vùng rpoB, rpoC1 và trnH-psbA trên 3 mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: sản phẩm PCR khuếch đại thành công sẽ thể hiện thành một băng sáng gọn rõ nét sau khi điện di và xem dưới ánh sáng huỳnh quang. Sản phẩm PCR được điện di cùng thang ADN để biết được kích thước của chiều dài đoạn khuếch đại.



Hình 4. Kết quả khuếch đại vùng ITS, matK và trnL trên 3 mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: sản phẩm PCR khuếch đại thành công sẽ thể hiện thành một băng sáng gọn rõ nét sau khi điện di và xem dưới ánh sáng huỳnh quang. Sản phẩm PCR được điện di cùng thang ADN để biết được kích thước của chiều dài đoạn khuếch đại.

Riêng vùng trnH-psbA mặc dù cuối cùng khuếch đại thành công cả 3 mẫu nhưng phải lặp lại phản ứng PCR nhiều lần và chỉ giải trình tự được một đoạn dài khoảng 200 bp chiều F, 600 bp chiều R, tín hiệu xấu không thể sử dụng để phân tích được. Kết quả này có thể giải thích là do vùng trnH-psbA là vùng nằm giữa hai gen (intergenic spacer - IGS) nên tính biến thiên của vùng rất cao và không ổn định, dẫn đến trình tự mỗi phổ quát có thể không trùng khớp hoàn toàn với trình tự của mẫu, do đó phản ứng khuếch đại có tỷ lệ thành công thấp. Đồng thời, do phản ứng PCR được thực hiện bằng cặp mồi theo hai chiều xuôi và ngược, trong khi đặc điểm của phản ứng giải trình tự Sanger chỉ thực hiện theo một chiều, dẫn đến kết quả giải trình tự không phải luôn đặc hiệu như kết quả khuếch đại mà các peak tín hiệu có thể bị nhiễu hoặc không đọc được tín hiệu. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với một số công bố trước đây [13, 14]. Như vậy, vùng trnH-psbA không phù hợp để làm trình tự nhận diện cho các loài lan Hải hồng.

So sánh tính đa hình trình tự của lan Hải hồng Việt Nam trong nghiên cứu và trình tự của lan Hải hồng trên Genbank

Chiều dài sắp giống cột của các vùng rpoB, rpoC1, ITS, matK và trnL tương ứng là 485, 306, 700, 750 và 521 bp. Khi phân tích đa hình nucleotide, các mẫu của Việt Nam giống với nhau hoàn toàn theo từng vùng ở cả 5 trình tự là rpoB, rpoC1, ITS, matK và trnL. Từ đó rút ra được trình tự nucleotide chung cho loài Hải hồng Việt Nam ở các vùng nghiên cứu như sau:

rpoB:

ACTGGGTTAGAAAGGCCAAACGGCTCTAGATT
 CGGGTATTTTACGCTATAGCCGAACACAAGGG
 AAAAAATCATTATATACTGATACTCACAAAGATCG
 TTTTCTCAAGTAATGGGGATACTCTAAGCATT
 CCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAGAA
 TACTTGTATGCATCAAAAAACTCAGGTTTCGG
 CGGGGTAATATATTA AAAAGGGACAAATTA
 TAGCGGGCGGTGCGGCCACAGCTGGTGGAG
 AACTCGCTTTAGGAAAAAATGTATTAGTAGC
 TTATATGCCATGGGAAGGTTACAATTTTGAAGACG
 CAGTACTAATTAGTGAACGTCTGGTTTATGAAGATA
 TTTATACTTCTTTTACATCCGGAAATATGAAAT
 TCAGACTCATGTAACAAGCCAAGGTCCTGAAAGA
 ATAATAAAGAGATTCCGCATTTAGAGGCTCATTTA
 CTCGAAATTTAGACAGAAATGGAATTGT

rpoC1:

CGGGTCGATTATTCGGGACGTTCTGTCAATTG
 TCGTGGGTCCTTTGCTTTTATTACATCAATGT
 GGATTACCTCGAGAAATAGCAATAGAGCTCT
 TCCAAACATTTGTAATTCGTGGTCTAATCAG
 ACAACATGTTGCTTCTAACACAGGGATTGCT
 AAAAGCAAAATTAGGGAAAAAGATTCCATTGTA
 TGGGAAATACTTCAAGAAGTTATGCGGGGACAT
 CCTATATTGTTGAATAGAGCACCTACCCTCCATA
 GATTAGGCATACAGGCGTTCCAACCCATTTTAGTG
 GAAGGGCGCGCTATT

ITS:

CCTCCTTGGGAGCTTTCTTGCCGGCGATCTAA
 CCCTTGCCCGGCGCAGTTTTGCGCCAAGTCA
 ATGACACATAAATGGTGAAGGGCACGGCCCTTT
 GTGAATTC AAGGAGGTGAAGGGCATGTGGCCT
 TGAGCCTACACTCCCTCCCCCTCTCAAATATTT
 TTTGAACAACCTCTCAGCAACGGATATCTCGGCT
 CTTGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
 TAAGTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACC
 ATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGG
 CCATCAGGCCAAGGGCACGCCTGCCTGGGCATT
 GCGAGTCATATCTCTCCCTTAACGAGGCTGTCC
 AGGCATACCTGTTTCAGCCGGTGC GGGTGTGAGT
 TTGGCCCTTGTCTTTGGTGCTGGGGGTCTAA
 GAGCTGCAGGGGCTTTTGTATGGTCTTAAATTCG
 GCAAGAGGTGGACGCAACGCGCTACAACAAAC
 TGTGTGCGAATGCCCCGGGTTGTCGTATTAGATG
 GGCCAGCATAATCTAAACACCCTTGTGAACCCCA
 TTGGAGGCCATCAACCCATGATCAGTTGATGGC
 CATTGGTT

matK:

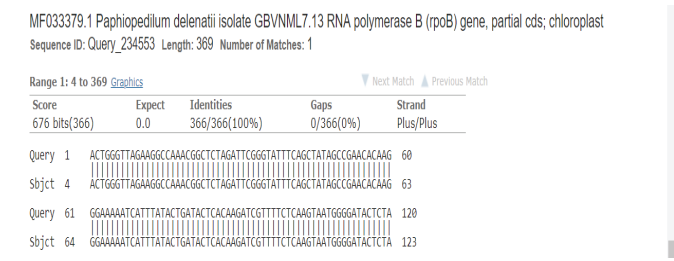
GAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCA
 ATTAATATCTTCTTCTGAATCTTCTGAAGAAA
 AAAAAATACTAAATATCATAATTTACGATCTA
 TTCATTCAATATTTCCCTTTTTAGAGGACAAA

TTTTTACATTTGAATTATGTGTCAGATCTACTA
 ATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTTGGT
 TCAAGTACTTCAATGCTGGATCAAGGATGTTT
 CTTCTTTGCATTTATTGCGATTTCTTTTCCACG
 AATATCATAATTTGAATAGTCTCATTACTTCA
 AAAGAATTCAATTTACGCCTTTTCAAAAAGA
 AAGAAAAGATTCTTTGGTTTCTATATAATTC
 TTATGTATATGAATGCGAATATTTATTCTGT
 TTATTCGTAAACAGTCTTCTTATTACGATCAA
 CATCCTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACAT
 TTCTATGTAAAAATAGAGCATCTTATAGTAGTGT
 GTTGTAATCTTTTTCAGAAAGATCCTATGCTTTC
 TCAAGGATACTTTCATGCATTATGTTTCGATATC
 AAGGAAAGGCAATTCTGGCTTCAAAGGGAAC
 TCTTATTCTGATGAATAAATGGAAATTTTCATCTT
 GTGCATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGGC
 TCAACCGTATAGGATTCATATAAAGCAATTATCCA
 ACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGGTATTTTTCAAGTG
 TACTAGAAAATCGTTTGGTAGTAAGAAAT

trnL:

GATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTT
 GCTAAGTGGTAACTTCCAAATTCAGAGAAACC
 CTGGAACTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC
 TTTATAAAAAATGAAAATGAGAATAAAAAGGGAT
 AGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGA
 ATGAAATTGACTACGTTACGTTAGTAGCAAAAAT
 CTTTCTATCAAATGATAGAAATGACAGTAAAGGA
 TAAGCTTATATACCTAATACATACTGACATAGGA
 AAGATTAATTACAACCCTCTATTTTCGATATTTAGAT
 TCTTTCTATATTAATTAGAATGATAGAGATCAAAT
 AATCATTCTAAAGATCAGAAAATCTATGAAAAAA
 GGAAGAATTATTCTTAATCCATTCCCATTTTCCA
 ATTGAAGTTTAAATTGGAATCGAATTCTAATATTCA
 TTGATCAAATGATTCATTCCAGAGTTTCATAGATCC
 TTTGAAAATTAATCGGACGAGATAAAG
 AGAGAGTCCCATTT

Khi so sánh với các trình tự ở GenBank thì các trình tự ở 4 vùng *rpoB*, *rpoC1*, *ITS* và *trnL* mẫu của Việt Nam cũng tương đồng với các trình tự của thế giới với độ tương đồng 100% (hình 5-8).



Hình 5. So sánh trình tự vùng *rpoB* của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paphiopedilum delenatii isolate GBVNM7.13 RNA polymerase beta' subunit (rpoC1) gene	566	566	100%	2e-157	100.00%	MF033380.1
Paphiopedilum delenatii RNA polymerase beta' subunit (rpoC1) gene, partial cds: chloroplas	566	566	100%	2e-157	100.00%	KX265004.1

Hình 6. So sánh trình tự vùng rpoC1 của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paphiopedilum delenatii voucher KFBG2047B internal transcribed spacer 1, partial sequence	1110	1110	100%	0.0	100.00%	KY966634.1
Paphiopedilum delenatii voucher KFBG2047A internal transcribed spacer 1, partial sequence	1110	1110	100%	0.0	100.00%	KY966633.1
Paphiopedilum delenatii internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1110	1110	100%	0.0	100.00%	JQ829314.1
Paphiopedilum delenatii internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1110	1110	100%	0.0	100.00%	JX088548.1
Paphiopedilum delenatii internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1110	1110	100%	0.0	100.00%	GU481600.1
Paphiopedilum delenatii voucher KDAIS Pap-73 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1110	1110	100%	0.0	100.00%	EF156096.1

Hình 7. So sánh trình tự vùng ITS của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paphiopedilum delenatii voucher KDAIS Pap-73 rRNA-L eu (trnL) gene, intron: chloroplast	963	963	100%	0.0	100.00%	EF156011.1

Hình 8. So sánh trình tự vùng trnL của mẫu Hải hồng nghiên cứu với trình tự GenBank cho kết quả tương đồng identity 100%.

Riêng đối với vùng matK, trong số các trình tự GenBank của *P. delenatii* có 3 trình tự có nucleotide biến dị so với của Việt Nam, trong đó hai trình tự *P. delenatii* AY368379 và *P. delenatii* JQ182193.1 khác biệt ở một số vị trí nucleotide (hình 9), độ tương đồng đạt 99,60-99,87%. Đây là hai trình tự thu thập từ GenBank nên mang tính chất tham khảo, sự khác biệt có thể do đa hình di truyền địa lý hoặc do sự lai giống trong tự nhiên, hoặc do các vấn đề về định danh cá thể.

	36	79	83	242	328	332	404	413	551	588	674	741
Del 2	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
Del 46	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
Del 47	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
<i>P. delenatii</i> EU490699.1	A	A	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
<i>P. delenatii</i> JQ660905.1	A	A	T	G	G	C	T	A	A	A	G	G
<i>P. delenatii</i> JQ929368.1	-	-	-	G	G	C	T	A	A	C	G	G
<i>P. delenatii</i> AY368379.1	G	C	T	G	G	C	T	A	A	C	G	G
<i>P. delenatii</i> JQ182193.1	A	A	G	T	A	A	C	G	G	C	A	A

Hình 9. Các vị trí đa hình trình tự trong vùng matK giữa các mẫu lan Hải hồng.

Chú thích: các vị trí mang dấu gạch ngang (-) là các nucleotide ở đầu trình tự chưa xác định. Các mẫu mang mã số accession number là mẫu tham khảo từ GenBank. Hình so sánh thể hiện các vị trí nucleotide khác biệt.

Kết luận

Các trình tự của 3 mẫu lan Hải hồng Việt Nam trong nghiên cứu đều giống nhau về đa hình nucleotide ở những vùng trình tự rpoB, rpoC1, ITS, matK và trnL. Điều này cho thấy tính thống nhất về mặt di truyền của loài. Đồng thời, trình tự của loài ở Việt Nam cũng tương đồng cao với trình tự cùng loài trên thế giới. Vùng trnH-psbA là vùng khó khuếch đại và giải trình tự nên cần xem xét việc sử dụng vùng này trong nhận diện các loài lan Hải.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU thông qua đề tài mã số 2017.01.53. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Yao, et al. (2009), "Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region", *Planta Med.*, **75**, pp.667-669.
- [2] I. Parveen, et al. (2012), "DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species", *Mol. Ecol. Resour.*, **12**, pp.82-90.
- [3] Y.Y. Guo, et al. (2012), "Evolution and biogeography of the slipper orchids: Eocene vicariance of the congeneric genera in the Old and New World Tropics", *PLoS One*, **7**, e38788.
- [4] H.M. Kim, et al. (2013), "DNA barcoding of Orchidaceae in Korea", *Mol. Ecol. Resour.*, **14**, pp.499-507.
- [5] T.Y. Ying, et al. (2015), "Phylogeny and classification of the East Asian *Amitostigma* alliance (Orchidaceae: Orchideae) based on six DNA markers", *BMC Evolutionary Biology*, **15**, p.96.
- [6] Phan Kế Long, Nguyễn Giang Sơn, Đặng Tất Thế (2009), "Mối quan hệ di truyền của một số loài lan Hải thuộc chi *Paphiopedilum* ở Việt Nam", *Tuyển tập báo cáo Hội nghị sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 3*.
- [7] Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Trọng Ngón, Trần Nhân Dũng (2010), "Quan hệ giữa các giống, loài hoa lan (Orchidaceae) dựa trên đặc điểm hình thái", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **5**, pp.165-175.
- [8] K.H Trung, T.D. Khanh, L.H. Ham, T.D. Duong, N.K. Truong (2013), "Molecular phylogeny of the endangered Vietnamese *paphiopedilum* species based on the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA", *Advanced Studies in Biology*, **5(7)**, pp.337-346.
- [9] Đặng Văn Khải, Nguyễn Thị Nhã, Vũ Thị Huyền Trang (2017), "Lựa chọn, thiết kế, thử nghiệm và ứng dụng một số môi trường khuếch đại các vùng trình tự tiềm năng để nhận diện các loài lan Hải (*Paphiopedilum*) Việt Nam", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, tr.113-118.
- [10] C.C. Tsai (2003), *Molecular Phylogeny, Biogeography, and Evolutionary Trends of the genus Phalaenopsis (Orchidaceae)*.
- [11] CBOL (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, pp.12794-12797.
- [12] M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel (2010), "SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building", *Mol. Biol. Evol.*, **27**, pp.221-224.
- [13] W. Dong, et al. (2015), "Ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants", *Scientific Reports*, **5**, p.8348.
- [14] G. Gigot, et al. (2007), "Finding a suitable DNA barcode for Mesoamerican orchids", *Lankesteriana*, **7**, pp.200-203.