

MORPHOLOGICAL AND SEQUENCE CHARACTERISTIC OF SOME TAXONOMIC GENES OF *Paphiopedilum canhii* FROM LAOS

Nguyen Thi Hai Yen^{1*}, Do Tien Phat^{2,4}, Chu Hoang Mau³

¹TNU - University of Sciences, ²VAST - Institute of Biotechnology

³TNU - University of Education, ⁴VAST - Graduate University of Sciences and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/9/2022	<i>Paphiopedilum</i> is a genus outstanding of Venus orchid. This is a small genus but has a complex taxonomy with many different views. Species <i>Paphiopedilum canhii</i> was discovered in 2010 and considered as a endemic species to Vietnam. Studies of the species <i>Paphiopedilum canhii</i> reveal their very distinct taxonomic position. To improve classification of this species, a combination of criteria had to be used. Currently, in addition to the traditional method of classification by morphology, the birth of DNA barcode has greatly supported taxonomic studies. This study presents the results of plant morphology analysis of <i>Paphiopedilum canhii</i> samples which were collected in Laos. Simultaneously identify and analyze 5 taxonomic gene sequences <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> , ITS and <i>trnH-psbA</i> . The results of analysis of gene sequences and taxa showed that ITS and <i>trnH-psbA</i> are suitable indicators when studying on the taxonomy of <i>Paphiopedilum</i> . The branches of the taxonomic tree clearly reflect the relationship of relatives and species. They are grouped in accordance with the sections, subgenus compared with the published taxonomic classification by the morphological of previous studies. Three indicators such as <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> for mixed grouping results between sections and subgenus.
Revised: 19/10/2022	
Published: 26/10/2022	
KEYWORDS	
Morphology	
<i>P. canhii</i>	
Taxonomic genes	
Lao	
Sections	
Subgenus	

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ MỘT SỐ GEN PHÂN LOẠI CỦA LAN HẢI CẢNH (*Paphiopedilum canhii*) THU THẬP TẠI LÀO

Nguyễn Thị Hải Yến^{1*}, Đỗ Tiến Phát^{2,4}, Chu Hoàng Mậu³

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên

²Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

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: 14/9/2022	<i>Paphiopedilum</i> là một chi nổi bật của nhóm lan Hải, đây là một chi nhỏ nhưng có hệ thống phân loại phức tạp với nhiều quan điểm khác nhau. <i>Paphiopedilum canhii</i> phát hiện năm 2010 và được coi là loài đặc hữu của Việt Nam. Các nghiên cứu về loài <i>Paphiopedilum canhii</i> cho thấy vị trí phân loại rất riêng biệt của chúng. Để phân loại chính xác loài này, người ta đã phải sử dụng nhiều tiêu chí kết hợp. Hiện nay, ngoài phương pháp phân loại truyền thống bằng hình thái, thì phương pháp phân loại bằng chỉ thị phân tử đã phát triển và thể hiện nhiều ưu điểm khi sử dụng cho các nghiên cứu phân loại học. Bài báo này trình bày kết quả phân tích hình thái thực vật của lan Hải Cảnh thu thập tại Lào; đồng thời xác định và phân tích 5 trình tự gen phân loại <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> , ITS và <i>trnH-psbA</i> . Kết quả phân tích cho thấy, hai chỉ thị ITS và <i>trnH-psbA</i> phù hợp khi nghiên cứu phân loại lan Hải, cây phân loại của chúng phản ánh rõ mối quan hệ họ hàng của các loài trong các tổ, phân chi đúng với hệ thống phân loại bằng hình thái. Ba chỉ thị <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> cho kết quả phân nhóm pha trộn giữa các tổ và phân chi.
Ngày hoàn thiện: 19/10/2022	
Ngày đăng: 26/10/2022	
TỪ KHÓA	
Hình thái	
<i>Paphiopedilum canhii</i>	
Gen phân loại	
Lào	
Tổ	
Phân chi	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6506>

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

1. Mở đầu

Lan Hải là một nhóm lan đặc biệt, chúng có thể dễ dàng được nhận ra bởi cấu trúc hoa với một cánh môi độc đáo. Đây là một nhánh tiến hóa cao thể hiện đặc tính thực vật có hoa thụ phấn nhờ côn trùng. Nhóm lan Hải có khoảng 150 loài được phân thành 5 chi bao gồm: *Cypripedium* L., *Mexipedium* V. A. Albert & M. W. Chase, *Paphiopedilum* Pfitzer, *Phragmipedium* Rolfe và *Selenipedium* Rchb.f [1], [2].

Chi *Paphiopedilum* bao gồm khoảng 80 loài, trải dài từ dãy Himalaya và miền nam Trung Quốc qua Malaysia đến Guadalcanal. Ở Việt Nam, Averyanov và cộng sự (2004) đã thống kê ra 22 loài lan Hải, trong đó có bốn giống lai tự nhiên đều thuộc chi *Paphiopedilum*, chi này được chia thành 3 subgenus *Parvisepalum*, *Brachypetalum* và *Paphiopedilum*; trong đó subgenus *Paphiopedilum* có độ đa dạng về loài và mức độ chuyên hóa cao nhất. Subgenus *Paphiopedilum* lại được chia thành 5 tổ (Tổ chuẩn *Paphiopedilum* bao gồm 13 loài; Các tổ còn lại: *Barbata* - 27 loài; *Pardalopetalum* - 4 loài, *Cochlopetalum* - 5 loài và *Coryopetalum* - 11 loài) [2].

Năm 2010, loài Hải Cảnh (*Paphiopedilum canhii*) được tìm thấy ở Tây Bắc Việt Nam, tại một địa phương giáp với biên giới Lào, đây là loài lan hải có kích thước nhỏ nhất tại thời điểm phát hiện [3], [4]. *P. canhii* được cho là loài đặc hữu của Việt Nam. Cho đến nay, không có địa điểm nào khác ở Việt Nam tìm thấy loài này dù các nhà nghiên cứu thực vật cổ tình tìm kiếm [5]. Bên cạnh đó, quần thể rất nhỏ ở Tây Bắc Việt Nam nơi phát hiện loài hải này đã bị cạn kiệt và gần như tuyệt chủng không lâu sau khi được phát hiện. Lịch sử chi tiết về việc phát hiện, khai thác và tuyệt chủng *P. canhii* ở Việt Nam đã được trình bày trong một loạt công bố [5]-[7].

Năm 2014, Averyanov và cộng sự đã công bố loài *Paphiopedilum canhii* (được coi là đặc hữu của Việt Nam), xuất hiện ở một trong những khối núi đá vôi lớn nhất - Núi Phou Phachao ở Bắc Lào nằm cách nơi phát hiện lần đầu tiên trên lãnh thổ Việt Nam khoảng 180 km về phía Bắc. Đồng thời, các nghiên cứu sâu hơn về loài *Paphiopedilum canhii* cho thấy vị trí phân loại rất riêng biệt của loài này, do đó một số nhà phân loại học và những người chơi phong lan đã đề xuất phân loại nó theo bậc của một phần monotype riêng biệt – tổ mới *Pygmaea* dưới phân chi *Paphiopedilum* (*Paphiopedilum* sect. *Pygmaea* Aver.) [6], hoặc thậm chí là một phân chi riêng - *Megastaminodum* Braem và O. Gruss chỉ chứa loài này [8], [9]. Sự phân biệt như vậy một lần nữa nhấn mạnh mức độ phân loại rất cao của đặc hữu thực vật được tìm thấy trong các thành tạo đá vôi ở Đông Dương và cung cấp khả năng cho những phát hiện mới thú vị ở đây trong tương lai.

Phân loại thực vật bằng hình thái là phương pháp truyền thống, phương pháp phân loại này dựa vào hình thái thực vật, đặc biệt là cơ quan sinh sản nên gặp rất nhiều khó khăn khi cần xác định những mẫu vật không có hoa hoặc những mẫu vật không còn nguyên vẹn, đặc biệt những mẫu vật có sự tương đồng cao về hình thái. Hiện nay, ứng dụng mã vạch DNA (DNA barcode) vào nhận diện sinh vật thể hiện nhiều ưu điểm như cho phép xác định loài, phân loại sinh vật một cách nhanh chóng, không hạn chế về thời gian, trên các mẫu vật đã bị hư hại... Đây là phương pháp sử dụng một hoặc một vài chỉ thị là trình tự DNA đặc hiệu để nhận diện hoặc phân loại loài. Mức độ chính xác phụ thuộc khá nhiều vào việc lựa chọn các trình tự chỉ thị. Các mã vạch DNA thực vật phổ biến đều nằm hầu hết trong hệ gen lục lạp, có thể là các trình tự mã hóa (ví dụ *rbcL* và *matK*) hoặc trong các vùng liên gen (ví dụ *trnH-psbA*) [10], ngoài ra một số locus DNA nhân như ITS1, ITS2 cũng được nhiều nghiên cứu sử dụng [11]. Trong thực tế, nhiều nghiên cứu công bố sự kết hợp nhiều chỉ thị để nhận diện phân loại loài [11], [12]. Tuy nhiên, việc phân tích nhiều trình tự DNA để nhận diện một cá thể có thể khó khăn về mặt kỹ thuật và gây tốn kém. Mục tiêu của bài báo này là công bố kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái và một số đặc điểm trình tự gen phân loại để lựa chọn chỉ thị phân tử phù hợp cho nhận dạng và phân loại loài lan Hải Cảnh (*Paphiopedilum canhii*). 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.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Mẫu lan nghi hài Cảnh (*P. canhui*) tại Lào được thu thập thông qua các người đi rừng thu hái. Cây thu thập về tiến hành trồng, chăm sóc tại hộ gia đình.

Các cặp mồi nhân gen *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, 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
<i>rbcL</i>	F,5'-ATGTCACCACAAACAGAAAC-3' R,5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC-3'	750	[8]
<i>MatK</i>	F,5'-CGATCTATTCATTCAATATTTTC-3' R,5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'	900	[8]
<i>rpoC1</i>	F,5'-GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3' R,5'-CCATAAGCATATCTTGAGTTGG-3'	600	[8]
<i>trnH-psbA</i>	F,5'-GTTATGCATGAACGTAATTGCTC-3' R,5'-CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'	600	[10]
ITS	F,5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG-3' R,5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'	900	[8]

2.2. Phương pháp

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm hình thái của lan Hài

Nghiên cứu đặc điểm hình thái được tiến hành tại Phòng thí nghiệm khoa Công nghệ Sinh học, trường Đại học Khoa học với các phân tích trực tiếp mẫu nghiên cứu về đặc điểm hình thái, đối chiếu với các tài liệu phân loại đã có [1], [4], [6]. Dụng cụ tiến hành gồm có thước dây, palme, dao lam, dao mổ, kim mũi mác, kính lúp và máy chụp ảnh.

2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp sử dụng CTAB của Collins và Symons (1992) [13].

Phản ứng PCR nhân các gen quan tâm được thực hiện với thành phần và chu kỳ nhiệt thể hiện trong bảng 2, 3.

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

Components	Barcode locus				
	<i>rbcL</i>	<i>MatK</i>	<i>rpoC1</i>	<i>trnH-psbA</i>	ITS
PCR Master Mix (2X)	12,5 µL (×1)	12,5 µL (×1)	12,5 µL (×1)	12,5 µL (×1)	
Môi xuôi/môi ngược	1 µL (10 µM)	1 µL (10 µM)	1 µL (10 µM)	1 µL (10 µM)	
Nước	4,5	4,5	4,5	4,5	
DNA (50 µg/µl)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	

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

	Barcode locus				
	<i>rbcL</i>	<i>MatK</i>	<i>rpoC1</i>	<i>trnH-psbA</i>	ITS
Biến tính ban đầu	94°C, 5 phút	94°C, 5 phút	94°C, 5 phút	94°C, 5 phút	94°C, 5 phút
Biến tính	94°C, 45 giây	94°C, 45 giây	94°C, 45 giây	94°C, 45 giây	94°C, 45 giây
Bắt cặp mồi	54°C, 30 giây	52°C, 30 giây	54°C, 30 giây	52°C, 30 giây	52°C, 30 giây
Kéo dài chuỗi	72°C, 50 giây	72°C, 40 giây	72°C, 60 giây	72°C, 50 giây	72°C, 40 giây
Kết thúc phản ứng	72°C, 7 phút	72°C, 7 phút	72°C, 7 phút	72°C, 7 phút	72°C, 7 phút

Trình tự nucleotide của các chỉ thị nghiên cứu được xác định trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Sử dụng Blast trong NCBI và các phần mềm Snapgene, BioEdit để so sánh và phân tích trình tự. Cây phân loại dựa trên các trình tự gen chỉ thị được dựng bằng phần mềm MegaX.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm thực vật học của lan Hải Cảnh

Hải Cảnh là loài hải có kích thước nhỏ nhất khi chúng được phát hiện. Thân mang 4 - 7 lá xếp thành 2 hàng một cách lỏng lẻo, lá hình elip đến hình elip thuôn dài, cuống hẹp còn đầu lá tròn, lá dài 5-7 cm, rộng 1,5-2,5 cm. Mặt trên lá khảm với 2 màu lục đậm - nhạt, mặt dưới màu lục nhạt và có khảm tím nâu (hình 1A). Cụm hoa mọc thẳng, một hoa; cuống dài 8-10 cm, mảnh, màu xanh hơi ngả tím, bầu có lông màu tím ô liu bần. Lá bắc hình mũi mác hơi bầu có đầu nhọn, dài 1,2-1,4 cm, rộng 0,5 cm, màu xanh lục nhạt khảm nâu tím (hình 1C).



Hình 1. Hình ảnh đặc điểm hình thái lan Hải Cảnh (*P. canhui*)
A, B, C. Hình ảnh cây, hoa và phát hoa; D, E, F. Mặt trước và mặt sau của lá dài trước, lá dài sau và cánh hoa; G. Môi; H. Staminode (Bar = 2 cm).

Hoa ngang 4-5 cm màu sắc độc đáo. Lá dài lưng hình trứng rộng, đầu vót nhọn; dài 2-2,5 cm, rộng 1,5-1,8 cm; màu trắng, hơi xanh ở gốc, có các tia gân màu tím tỏa ra từ gốc; mặt ngoài có nhiều lông. Lá dài dưới hình ovan hẹp đầu hơi tù, dài 1,5-2 cm, rộng 0,6-1 cm; mặt trong màu xanh lục nhạt đồng đều; mặt ngoài màu đậm hơn có khảm chút màu nâu đỏ, có lông ngắn cứng bao phủ. Cánh hoa dài 3-4 cm, rộng 0,5-0,7 cm ở gốc và thu hẹp dần về phía đỉnh; Cánh hoa kích thước nhỏ hơn nhiều so với các bộ phận khác, chiều dài gấp nhiều lần chiều rộng. Cánh hoa

có màu xanh lục nhạt ở gốc, màu tím xám lan dần lên đỉnh; mặt trước đậm hơn mặt sau. Trên nền màu cánh có 7–9 sọc màu tím chạy theo chiều dọc cánh hoa; phần gốc cánh hoa có nhiều lông nhú dài màu tím sẫm dày đặc ở mép dưới đối diện với lối vào môi.

Môi dài 2–2,5 cm, rộng 0,8–1,4 cm, màu xanh lục nhạt pha chút nâu nhạt ở các thùy bên, môi nhẵn và bóng; phần gốc bên trong môi có lông rậm. Staminode lớn, dài 1,2–1,6 cm, rộng 0,6–0,8 cm; toàn bộ, bóng, rộng từ hình trứng đến hình trứng hình elip, phẳng, gần như không rõ ràng và có rãnh ở đỉnh màu xanh lục sáng có vân xanh đậm. Cột nhị nhụy ngắn và rộng, dài 3–4 mm, nhị hoa với đỉnh hình sợi nhọn kéo dài; màu xanh lá cây dạng sợi; bao phấn hình cầu, màu vàng đến cam. Vòi nhụy màu từ trắng đến lục nhạt, với các đường gân màu vàng lục hoặc xanh lục không đều.

Bầu nhụy dài 2–3 cm, màu xanh đậm, mọc dày đặc có lông màu ô liu bần. Quả khô hình elip hẹp, có gân, quả nang có mỏ ngắn, dài khoảng 2 cm và đường kính 4–5 mm.

Những kết quả phân tích hình thái cho thấy, loài Hải Cảnh thu thập tại Lào có hình thái tương đồng cao so với công bố đầu tiên khi chúng phát hiện ra, có chút thay đổi về màu sắc hoa. Ở công bố của Averyanov và cộng sự (2010) [3], hoa của loài *P. canhii* ít màu xanh hơn, cánh hoa có phần dài hơn và đài trên không tròn bằng. Đây có thể là những khác biệt do môi trường sống tạo nên.

3.2. Phân tích trình tự gen phân loại

Các đoạn trình tự nghiên cứu được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu từ DNA tổng số. Các đoạn gen nhân được bằng phản ứng PCR nếu có kích thước phù hợp với dự tính lý thuyết được tinh sạch và sử dụng để xác định trình tự nucleotide trực tiếp.

Tiến hành so sánh bằng BLAST trên NCBI các trình tự *rbcL*, *matK*, *rpoC1*, *trnH-psbA* và ITS của mẫu nghiên cứu, xác định và thu thập các loài có trình tự tương đồng gần để phân tích (bảng 4). Sơ đồ phân loại hình cây được xây dựng 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 4. Các trình tự gen sử dụng để phân tích quan hệ di truyền

T	Loài	Mã số truy cập trong GenBank				
	<i>Paphiopedilum</i>	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>rpoC1</i>	<i>trnH-psbA</i>	ITS
1.	<i>P. canhii</i>	-	JQ660904.1	-	-	-
Tổ <i>Paphiopedilum</i> – Phân chi <i>Paphiopedilum</i>						
2.	<i>P. barbigerum</i>	MN315106.1	MT518601.1	MN153814.1	MN153814.1	AY643442.1
3.	<i>P. hirsutissimum</i>	JN181466.1	MK792672.1	NC_050871.1	MN153815.1	KX931031.1
4.	<i>P. tranlienianum</i>	NC_058208.1	KX886262.1	MW794129.1	MW794129.1	KX931033.1
Tổ <i>Barbata</i> – Phân chi <i>Paphiopedilum</i>						
5.	<i>P. purpuratum</i>	NC_045279.1	NC_045279.1	NC_045279.2	EF156052.1	KX931030.1
Tổ <i>Emersonianum</i> – Phân chi <i>Pavisepalum</i>						
6.	<i>P. emersonii</i>	-	NC_053544.1	NC_053544.1	NC_053544.1	MH550876.1
7.	<i>P. hangianum</i>	-	MK792656.1	-	EF156024.1	MH550873.1
Tổ <i>Pavisepalum</i> – Phân chi <i>Pavisepalum</i>						
8.	<i>P. micranthum</i>	NC_045278.1	NC_045278.1	NC_054278.1	NC_045278.1	GU993849.1
9.	<i>P. vietnamense</i>	JQ182212.1	MK787425.1	-	EF156073.1	MH550871.1

Kết quả phân tích độ tương đồng di truyền dựa trên các trình tự nucleotide của các chi thị nhận thấy, trình tự nucleotide mẫu *P. canhii* nghiên cứu có độ tương đồng cao với *P. tranlienianum*, *P. barbigerum* và *P. hirsutissimum* (thuộc tổ *Paphiopedilum*, phân chi *Paphiopedilum*). Tùy từng chi thị mà hệ số sai khác có sự thay đổi, hệ số sai khác thấp nhất là 0,002–0,008 khi so với *P. tranlienianum* ở 4 chỉ thị *matK*, *rbcL*, *rpoC1* và *trnH-psbA*, riêng chỉ thị ITS cho hệ số sai khác khá cao với tất cả các trình tự so sánh. Ngoài ra, trình tự loài nghiên cứu cũng có độ tương đồng khá với *P. purpuratum* thuộc tổ *Barbatar* (phân chi *Paphiopedilum*).

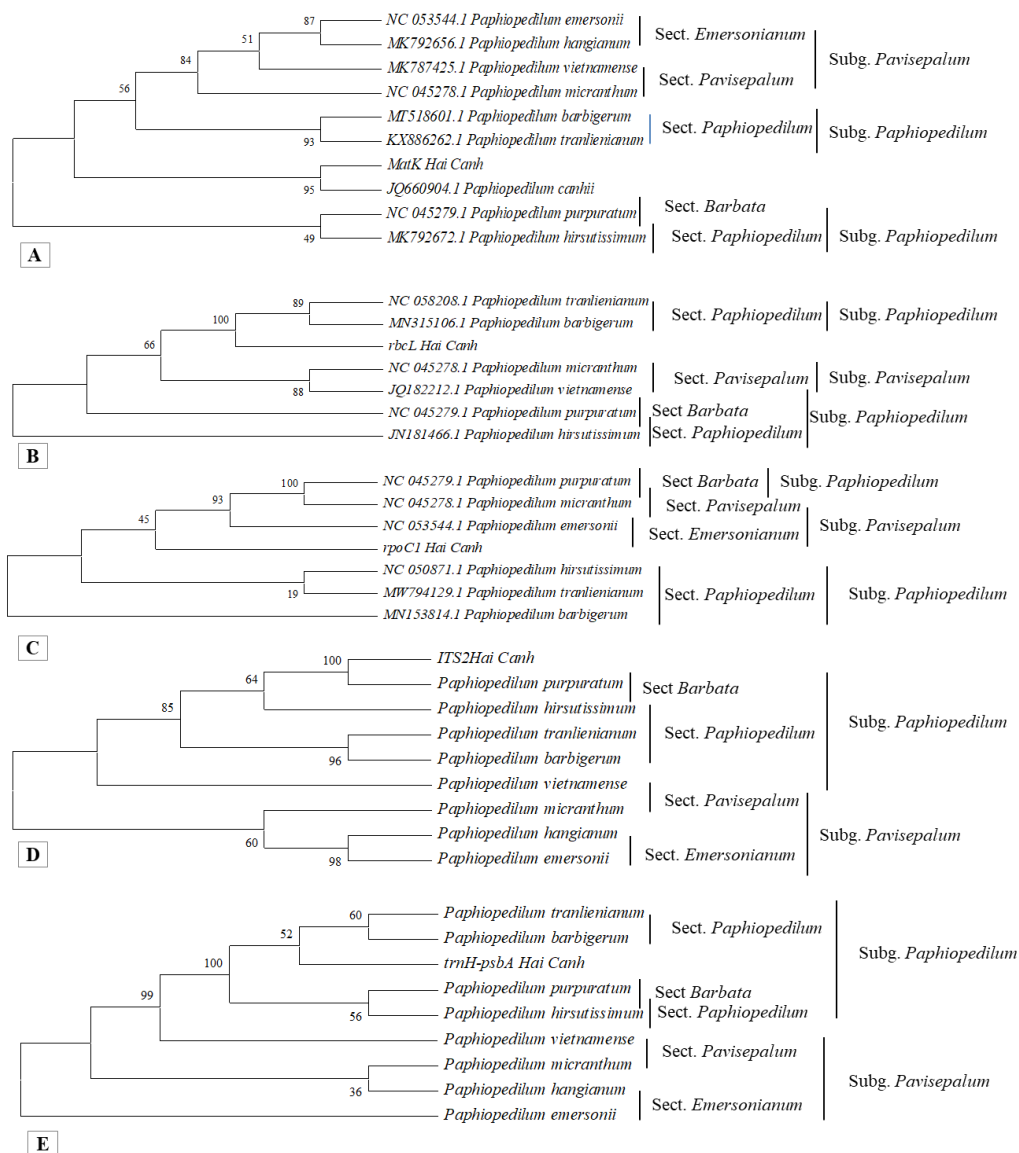
Đối với những loài còn lại, hệ số sai khác với *P. canhii* là khá cao, đó là những loài thuộc phân chi *Pavisepalum* gồm *P. vietnamense*, *P. micranthum*, *P. emersonii*, *P. hangianum* (bảng 5).

Bảng 5. Hệ số sai khác giữa *P. canhii* với các trình tự *Paphiopedilum* trên GenBank dựa trên các trình tự gen nghiên cứu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>matK</i> Haicanh									
2 <i>P. emersonii</i>	0,035								
3 <i>P. purpuratum</i>	0,008	0,035							
4 <i>P. micranthum</i>	0,989	0,971	0,992						
5 <i>P. barbigerrum</i>	0,008	0,032	0,006	0,973					
6 <i>P. hirsutissimum</i>	0,008	0,035	0,006	0,986	0,006				
7 <i>P. hangianum</i>	0,034	0,008	0,035	0,981	0,032	0,035			
8 <i>P. vietnamense</i>	0,025	0,016	0,026	0,973	0,023	0,026	0,016		
9 <i>P. tranlienianum</i>	0,008	0,032	0,006	0,973	0,000	0,006	0,032	0,023	
10 <i>P. Canhii</i>	0,001	0,033	0,007	0,992	0,007	0,007	0,033	0,024	0,007
1 <i>rbcL</i> Haicanh									
2 <i>P. tranlienianum</i>	0,002								
3 <i>P. purpuratum</i>	0,674	0,669							
4 <i>P. micranthum</i>	0,682	0,678	0,003						
5 <i>P. barbigerrum</i>	1,002	0,000	1,669	0,678					
6 <i>P. vietnamense</i>	0,683	0,669	0,003	0,002	0,679				
7 <i>P. hirsutissimum</i>	0,674	0,679	0,000	0,003	0,669	0,003			
1 <i>rpoC1</i> Haicanh									
2 <i>P. emersonii</i>	0,013								
3 <i>P. hirsutissimum</i>	0,004	0,009							
4 <i>P. purpuratum</i>	1,159	1,140	1,146						
5 <i>P. micranthum</i>	1,171	0,152	1,158	0,011					
6 <i>P. tranlienianum</i>	0,004	0,009	0,000	1,146	1,158				
7 <i>P. barbigerrum</i>	0,004	0,009	0,000	1,146	1,158	0,000			
1 <i>ITS</i> Haicanh									
2 <i>P. vietnamense</i>	1,372								
3 <i>P. tranlienianum</i>	1,318	0,063							
4 <i>P. purpuratum</i>	0,029	1,394	1,339						
5 <i>P. micranthum</i>	1,349	0,030	0,055	1,370					
6 <i>P. hirsutissimum</i>	1,297	0,084	0,055	1,318	0,008				
7 <i>P. hangianum</i>	1,343	0,042	0,058	1,365	0,017	0,073			
8 <i>P. emersonii</i>	1,339	0,050	0,066	1,360	0,025	0,081	0,012		
9 <i>P. barbigerrum</i>	1,318	0,055	0,007	1,339	0,047	0,047	0,050	0,058	
1 <i>trnH-psbA</i> Haicanh									
2 <i>P. vietnamense</i>	0,019								
3 <i>P. tranlienianum</i>	0,006	0,016							
4 <i>P. purpuratum</i>	0,011	0,018	0,005						
5 <i>P. micranthum</i>	0,023	0,008	0,192	0,021					
6 <i>P. hirsutissimum</i>	0,010	0,016	0,003	0,005	0,019				
7 <i>P. hangianum</i>	0,024	0,010	0,021	0,023	0,002	0,021			
8 <i>P. emersonii</i>	0,026	0,011	0,023	0,024	0,003	0,023	0,005		
9 <i>P. barbigerrum</i>	0,006	0,016	0,000	0,005	0,019	0,003	0,021	0,023	

Phân tích cây phân loại dựa trên năm trình tự nghiên cứu nhận thấy, các chi thị có sự khác nhau về độ tương đồng với phân loại hình thái của các loài phân tích, tương tự mối quan hệ giữa *P. canhii* với các loài khác nhau cũng khác nhau. Ở chỉ thị ITS (hình 2D), trnH-psbA (hình 2E) *P. canhii* có quan hệ rất gần với các loài trong phân chi *Paphiopedilum*. Đây cũng là 2 chỉ thị có mức độ phân loại rõ ràng nhất trong 5 chỉ thị, các loài đều được phân nhóm đúng tổ và phân chi

như cách phân loại truyền thống. Ba chi thị còn lại, mức độ phân nhóm có sự pha trộn so với phân loại truyền thống, trong đó chi thị *rpoC1* (hình 2C) có sự pha trộn nhiều nhất, *P. canhii* có quan hệ gần gũi với cả 2 phân chi là *Paphiopedilum* và *Parvisepalum*. Điều này cũng phù hợp khi nghiên cứu phân loài của *P. canhii* bởi đặc điểm giao thoa giữa nhiều tổ khác nhau, các nghiên cứu đã đề xuất 1 tổ mới cho loài Hải Cảnh nằm trong phân chi *Paphiopedilum* hoặc đề xuất 1 phân chi mới chỉ chứa riêng loài này (Braem và Gruss (2011)) [4].



Hình 2. Cây phân loại xây dựng dựa trên trình tự gen *matK* (A), *rbcL* (B), *rpoC1* (C), *ITS* (D) và *trnH-psbA* (E) của Hải Cảnh và các trình tự trên GenBank

Nhận diện, phân loại sinh vật gặp rất nhiều khó khăn khi cần xác định những mẫu vật còn nhỏ chưa có hoa hoặc những mẫu vật có nhiều điểm tương đồng ở bậc phân loại thấp, các mẫu vật cần giám định không còn nguyên vẹn... Do vậy, việc phân loại sẽ chính xác hơn khi được hỗ trợ bởi các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại. Hiện nay, chỉ thị phân tử là một công cụ được sử dụng phổ biến và có vai trò quan trọng để nhận diện các loài sinh vật. Chỉ thị DNA đã được áp dụng để nhận diện nhiều loài trong nhiều chi khác nhau của họ Lan như *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Grammatophyllum*, *Spathoglottis* và *Vanda* [15]-[19]. Đối với lan Hải Cảnh, nghiên cứu

sử dụng chỉ thị DNA được công bố lần đầu vào năm 2012. Nghiên cứu đã tiến hành phân loại các loài trong chi *Paphiopedilum* Ấn Độ khi sử dụng 5 chỉ thị *rbcL*, *matK*, *rpoB*, *rpoC1* và ITS [20]. Nghiên cứu sử dụng chỉ thị DNA để nhận diện, phân loại lan Hải Việt Nam cũng đã được các tác giả tiến hành trên cả các chỉ thị DNA nằm trên lục lạp như *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* và chỉ thị DNA trong nhân như ITS, LEAFY, ACO [21]-[24]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, năm chỉ thị *matK*, *rbcL*, *rpoC1* ITS và *trnH-psbA* đã được tiến hành trên mẫu Hải Cảnh. Kết quả phân tích cho thấy, hai chỉ thị ITS và *trnH-psbA* phù hợp khi nghiên cứu phân loại lan Hải, cây phân loại của chúng phản ánh rõ mối quan hệ họ hàng của các loài trong các tổ, phân chi đúng với hệ thống phân loại bằng hình thái. Ba chỉ thị *matK*, *rbcL*, *rpoC1* cho kết quả phân nhóm pha trộn giữa các tổ, phân chi.

4. Kết luận

Đã phân tích mô tả được hình thái thực vật và đặc điểm của năm trình tự gen phân loại *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, ITS và *trnH-psbA* của lan Hải Cảnh thu thập ở Lào. Hai chỉ thị *trnH-psbA* cho thấy độ nhận diện cao và phù hợp khi nghiên cứu phân loại mẫu lan Hải trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] 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.
- [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.
- [3] L. Averyanov, "The Orchids of Vietnam, Illustrated survey. Part 2. Subfamily Orchidoideae," *Turczaninowia*, vol. 13, no. 2, pp. 5-98, 2010.
- [4] G. J. Braem and G. R. Gruss, "Paphiopedilum subgenus Megastaminodium Braem & Gruss, a new subgenus to accommodate Paphiopedilum canhii," *Orchid Dig.*, vol. 76, pp. 32-35, 2011.
- [5] L. Averyanov, V. T. Pham, K. L. Phan, T. H. Nguyen, X. C. Chu, T. V. Nguyen, and Q. H. Nguyen, "Paphiopedilum canhii – from Discovery to Extinction," *Orchid Planet*, vol. 24, pp. 16-44, 2011a.
- [6] L. Averyanov, K. L. Phan, T. H. Nguyen, X. C. Chu, and T. V. Nguyen, "Assessment of Current Natural Status of Critically Endangered Species - Paphiopedilum canhii for its Conservation," Unpublished report for The Rufford Small Grant Foundation & Chicago Zoological Society, Chicago Board of Trade Endangered Species Fund, 2011b.
- [7] L. Averyanov, "New and rare orchids (Orchidaceae) in the flora of Cambodia and Lao PDR," *Turczaninowia*, vol. 16, no. 4, pp. 26-46, 2013.
- [8] G. J. Braem and O. Gruss, "Paphiopedilum megastaminodum G.J. Braem & O. Gruss. A new Subgenus to Accommodate Paphiopedilum canhii," *Orchid Digest*, vol. 75, no. 3, pp. 164-165, 2011.
- [9] M. Gorniak, D. L. Szlachetko, A. K. Kowalkowska, J. Bohdanowicz, and X. C. Chu, "Taxonomic placement of Paphiopedilum canhii (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on cytological, molecular and micromorphological evidence," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 70, pp. 429-441, 2014.
- [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] P. M. Hollingsworth, L. L. Forrest, and J. L. Spouge, "A DNA barcode for land plants," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 106, pp. 12794-12797, 2009.
- [12] 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.
- [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] 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] 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.
- [17] 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.
- [18] 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. plr018, pp. 1-12, 2011, doi: 10.1093/aobpla/plr018.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [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, doi: 10.3390/biology901000.
- [23] T. H. Y. Nguyen, X. Q. Ngo, D. T. Nguyen, T. P. Do, and H. M. Chu, "A study on the corelation between DNA markers and morphology characteristics for identification of *Paphiopedilum helenae* Aver. of Viet Nam," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 05, pp. 178-185, 2022.
- [24] T. H. Y. Nguyen, X. Q. Ngo, D. T. Nguyen, and T. P. Do, "Morphological characteristic and DNA *trnH-psbA* gene sequence in the taxonomy of *P. hirsutissimum*," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 14, pp. 153-160, 2021.