

SỬ DỤNG ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ MÃ VẠCH DNA ĐỂ NHẬN DẠNG LAN HÀI HẰNG (*Paphiopedilum hangianum*) CỦA VIỆT NAM

Nguyễn Thị Hải Yến¹, Ngô Xuân Quảng², Đỗ Tiến Phát^{3,4*}

¹ Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên,

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

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

⁴ Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Chi lan Hải *Paphiopedilum*, một trong những chi lan đặc biệt thuộc họ Lan có hoa đẹp, màu sắc rực rỡ và cấu trúc độc đáo. Hiện nay, chi lan này đang bị đe dọa nghiêm trọng do khai thác quá mức, nhiều loài có nguy cơ tuyệt chủng. Trong chi có khá nhiều loài khác nhau nhưng lại tương đồng về hình thái lá, rất dễ nhầm lẫn khi phân biệt bằng mắt thường. Chính vì vậy, phát triển các phương pháp để nhận diện lan Hải là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích chi tiết hình thái cấu tạo thân, lá, đặc biệt là hoa của lan Hải Hạng (*P. hangianum*) có nguồn gốc tại Tuyên Quang, Việt Nam. Bên cạnh đó, trình tự gen *rbcL* cũng được sử dụng như DNA mã vạch tiềm năng để nhận diện *P. hangianum*. Kết quả cho thấy đoạn gen *rbcL* được phân lập từ mẫu Hải Hạng có kích thước 708 bp. Trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcL* được phân tích và so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen NCBI. Độ tương đồng về trình tự nucleotide của mẫu nghiên cứu so với một số loài trong chi *Paphiopedilum* dao động từ 99,13 - 99,85% (GenBank: MK161066.1, AB176547.1, JQ182212.1, JQ182211.1, JN181467.1, JN181466.1 JN181465.1, JN181468.1, JQ182209.1). Trên sơ đồ phân loại hình cây thiết lập dựa trên trình tự gen *rbcL*, Hải Hạng (*P. hangianum*) có quan hệ gần gũi với Hải Việt (*P. vietnamense*) và Hải Hồng (*P. delenatii*).

Từ khóa: Mã vạch DNA, *P. hangianum*; hình thái thực vật, gen *rbcL*.

MỞ ĐẦU

Lan Hải (*Paphiopedilum*) là một chi lan rất đẹp và quý hiếm. Việt Nam là nước có sự đa dạng về lan hải lớn nhất thế giới với 22 trên tổng số khoảng 80 loài, trong đó có nhiều loài đặc hữu. Averyanov và đồng tác giả (2004) cho thấy trong 22 loài lan Hải được tìm thấy ở nước ta có bốn giống lai tự nhiên (Averyanov *et al.*, 2004). Hiện nay, hầu hết các loài lan hải của Việt Nam đang trong nguy cơ tuyệt chủng (The IUCN, 2019) thậm chí một số loài không còn tìm thấy trong tự nhiên nữa do vùng phân bố hẹp và khai thác không kiểm soát như hải Việt (*P. vietnamense*), hải mốc vàng (*P. armeniacum*), hải Mốc hồng (*P. micranthum*). Do đó, việc bảo vệ các giống lan hải trong tự nhiên là rất cấp bách. Để thực hiện điều đó, ngoài việc thiết lập các khu vực bảo tồn và đề xuất, xây dựng ra các quy định để cấm buôn bán bất hợp pháp thì việc trang bị những kiến thức nhằm định danh, phân biệt giữa các loại lan hải là rất cần thiết. Với số lượng trên hai mươi loài bản địa, lan Hải Việt Nam phân bố ở cả 2 miền Nam Bắc, thời điểm nở hoa lại rải rác trong năm. Việc phân biệt được các loài lan hải khi cây chưa ra hoa gặp nhiều hạn chế, nhất là đối với các loài có độ tương đồng cao về hình thái. Trong số 22 loài lan hải của Việt Nam, có tới gần một nửa các loài mang các đặc điểm về thân lá tương đồng, rất dễ nhầm lẫn. Ví dụ như *P. micranthum* và *P. armeniacum*, *P. concolor* và *P. delenatii*, *P. callosum* và *P. purpuratum*, *P. tranlienianum* và *P. henryanum*, *P. helenae* và *P. x hermannii*; *P. hangianum* và *P. emersonii*... (Huyen Trang Vu *et al.*, 2019)

Hải Hạng (*P. hangianum*) là loài đặc hữu của Việt Nam, phân bố vô cùng hẹp ở một số vùng núi thuộc tỉnh Bắc Kạn, Tuyên Quang, Hà Giang. Đây là loài cho hoa đẹp và rất được yêu thích, tuy nhiên về hình thái thân lá lại rất dễ nhầm lẫn với Hải Hạng lan (*P. emersonii*) do mức độ tương đồng cao về đặc điểm thân lá. Nếu không phải là người có kinh nghiệm và từng được quan sát kỹ hai loài thì rất khó có thể phân biệt được chúng. Do đó, cần có sự kết hợp giữa việc đánh giá thông qua hình thái học (De *et al.*, 2019) với việc phát triển các phương pháp định danh hiệu quả hơn cho lan Hải. Sử dụng mã vạch DNA (DNA barcode) là một trong những phương pháp phục vụ định danh loài chính xác, nhanh chóng, tự động hóa bằng cách thông qua một vùng DNA đặc hiệu hay còn gọi là chỉ thị DNA mã vạch. Ở thực vật, hệ gen lục lạp mang nhiều đặc điểm thích hợp đối với chỉ thị DNA. Để nhận diện các loài thực vật hiệu quả, phụ thuộc rất nhiều vào việc lựa chọn và sử dụng trình tự phù hợp. Chỉ thị *rbcL* mã hóa ribulose-1, 5- ribuloza carboxylase oxygenase là trình tự gen lục lạp, cùng với chỉ thị *MatK* là hai locus được nhiều tác giả sử dụng và cho thấy có hiệu quả tốt khi sử dụng đơn lẻ trong các nghiên cứu (Hollingsworth *et al.*, 2009). Do vậy, chúng được đánh giá là các chỉ thị tiềm năng trong việc nhận dạng thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cho thấy độ tin cậy cao trong nhận diện lan Hải Hạng (*P. hangianum*) trên cơ sở kết hợp nghiên cứu sử dụng trình tự DNA mã vạch *rbcL* với các đặc điểm mô tả hình thái.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lan Hải Hằng (*P. hangianum*) thu thập tại huyện Na Hang, tỉnh Tuyên Quang, được trồng thuần và nở hoa tại vườn thí nghiệm Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên. Cặp mồi nhân gen *rbcL*, hóa chất thiết bị dùng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái

Sử dụng phương pháp quan sát mô tả trực tiếp đối tượng lựa chọn đại diện kết hợp với phương pháp đối chiếu, so sánh với các tài liệu, khóa định loại đã có. Đây là phương pháp thông dụng được dùng trong nghiên cứu thực vật học. Dụng cụ và thiết bị hỗ trợ: máy ảnh, thước dây, thước kẹp (palme).

Phương pháp sinh học phân tử

Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp dùng CTAB (Collins & Symons, 1992) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Mẫu lá được nghiền nhanh trong ni tơ lỏng, bổ sung đệm tách và ủ 65°C trong 2 giờ. Đệm phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) để loại bỏ tạp chất và dùng isopropanol để tủa DNA. Gen *rbcL* được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu (trình tự mồi xuôi/mồi ngược: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'/5'-CGCGCATGGTGGATTCAATCC-3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 12 µl H₂O; 2 µl đệm 10x; 2µl MgCl₂ 25 mM, 1,6 µl dNTPs 2,5 mM; 0,8 µl mồi 10 pmol mỗi loại; 3 µl DNA tổng số (nồng độ 50 µmol) và 0,4 µl Taq DNA polymerase 1u/µl. Phản ứng được tiến hành trong máy PCR với chu trình nhiệt bao gồm các bước: 94°C/5 phút; 30 chu kỳ (94°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút); kết thúc ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch và sử dụng để xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotid tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Các trình tự được xử lý bằng các phần mềm DNASTar và BioEdit. So sánh, phân tích trình tự gen *rbcL* phân lập được với một số trình tự *rbcL* được công bố trên GenBank (NCBI).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm thực vật học của lan Hải Hằng

Thân: Hải Hằng (*P. hangianum*) thuộc dạng cây cỏ lâu năm. Thân của loài này khá ngắn, chỉ cao 4 - 7 cm, mang trên nó 3 - 8 lá xếp thành 2 dãy. Lá dài 15 - 20 cm, rộng 4 - 6 cm, hình thuôn dài, mép lá lượn sóng nhẹ. Mặt trên lá màu xanh đậm có độ bóng, nhìn thoáng qua gần như đồng màu, quan sát kỹ thấy có những vân xanh đậm nổi lên. Mặt dưới của lá màu xanh mờ đồng nhất, không có vân, có sống gân lá nổi rõ. Lá bắc dài 1,8 đến 2,5 cm, hình ô-van, phủ lớp lông ngắn. Phát hoa màu xanh sáng, cao từ 15 - 25 cm, che phủ bởi lớp lông ngắn, và thường chỉ có một hoa trên mỗi phát hoa (hình 1,2).

Hoa: Hoa của Hải Hằng thuộc hoa mẫu 3, hoa mọc đứng trên phát hoa, hoa to, cỡ 8 -12 cm, có hình trứng ngược, màu vàng hay vàng xanh. Đài hoa dễ phân biệt vì chúng chỉ có hai lá đài tương tự đa số các loài Hải khác gồm một lá đài sau và một lá đài dưới (mặt lưng), cũng còn được biết như là giả cánh hoa, được hình thành từ kết quả của sự hợp nhất của hai lá đài bên. Lá đài sau hình ô van, có đường sống gân tương đối nổi rõ, mặt trong có gân màu đỏ nhạt tỏa ra từ gốc lá đài. Mặt trong và mặt ngoài của lá đài được bao phủ bởi lớp lông ngắn. Toàn bộ lá đài giống như cái nắp và ngả về phía trước. Màu của lá đài là màu vàng đến vàng lục, dài 3,5 - 4 cm và rộng khoảng 2,5 - 3 cm (hình 3B). Lá đài dưới hình ô van nhưng có phần tròn hơn đài sau, đầu nhọn, có hai gân song song nổi rõ ở mặt lưng (hình 3A). Tràng hoa bao gồm 3 cánh (2 cánh hoa và cánh hoa thứ ba biến dạng thành cái túi - môi). Các cánh hoa có hình trứng ngang, càng về phía đỉnh càng rộng ra. Đầu cánh hoa hơi tròn. Cánh hoa dài 6 đến 6,5 cm, rộng 4 - 4,5 cm, mặt trong có chứa lông tơ ở phần gốc. Các cánh hoa hơi úp về phía trước và đôi khi hơi rủ xuống. Màu của cánh hoa là màu vàng sáng với một ít gân màu đỏ tía chạy từ cuống rồi tỏa ra phía ngoài (hình 3C).

Môi: Môi có chiều dài khoảng 4 cm, rộng 2 - 2,2 cm, chia làm ba thùy. Hai thùy bên cuộn vào trong, thùy giữa tạo thành một cái túi sâu (đép, hài), mặt ngoài của túi nhẵn phần lưng có rãnh nông chia túi thành 2 thùy. Môi có màu vàng nhạt, bóng, phần dưới nhạt hơn, phần gốc ngả màu trắng kem. Mặt trong túi có nhiều chấm nhỏ màu nâu đỏ (hình 3D). Khiên đậy trụ hoa (staminode) hình tam giác dài chừng 1,2 cm và rộng cỡ 0,8 cm, mặt trên có nhiều gân màu nâu đỏ giống như các mắt lưới (hình 3E). Mặt dưới khiên đậy trụ hoa chứa bao phấn hình cầu,



Hình 1. Hình ảnh cây *P. hangianum*

màu vàng đậm có viền nâu, kích thước khoảng 2 mm. Nhụy lớn màu vàng bóng, hình bầu dục đến hình trứng- elip kích thước khoảng 6 mm (hình 3E).

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

Giống như các giống lan hài lá xanh quanh năm, rễ của Hải Hằng được bao phủ bởi một lớp vỏ lụa mang nhiều lông hút, làm cho rễ có khả năng hấp thụ độ ẩm trong không khí. Đầu rễ non của cây *P. hangianum* có màu trắng ngà, còn màu của những rễ già trở nên sậm và nhiều lông hơn. Rễ chính xuất phát từ thân, chỗ bắt đầu phân lá, rồi phân ra các rễ phụ (hình 2). Rễ của *P. hangianum* rất dài có thể gấp nhiều lần chiều dài lá.

Sử dụng đặc điểm hình thái để nhận dạng, phân loại thực vật từ xưa đến nay đã được xem là một kỹ thuật quan trọng. Có rất nhiều khóa định loại thực vật đã được xây dựng và phát triển nhằm phục vụ cho việc phân loại được dễ dàng hơn. Đối với họ lan (Orchidaceae), hầu hết những công bố loài mới đều dựa trên các mô tả về hình thái thực vật (Leonid *et al.*, 2010; Olaf *et al.*, 2018). Ngoài ra, hình thái còn đóng vai trò quan trọng trong xác định mối quan hệ họ hàng giữa các loài và hỗ trợ nghiên cứu về sự sinh trưởng, sinh sản để giúp bảo tồn các loài phong lan quý hiếm. Năm 2018, Kasutjjaningati và Firgiyanto đã mô tả đặc điểm hình thái của một số loài lan Vanda của Indonesia đang có nguy cơ tuyệt chủng phục vụ cho việc bảo tồn và nhân giống. Việc phân tích và so sánh hình thái của quả và phần hoa làm cơ sở cung cấp thông tin trong nghiên cứu quá trình thụ phấn, qua đó có thể làm tăng hiệu quả thụ phấn của một số hoa lan (Singer *et al.*, 2001). Phân tích hình thái chức năng các cơ quan sinh dưỡng có thể suy đoán được điều kiện sinh trưởng và phát triển của cây trong tự nhiên. Đối với lan Hải, những quan sát hình thái và sinh trưởng đã cho thấy các loài Hải có lá đồng màu thường sinh trưởng thích nghi với vùng khí hậu lạnh, còn những loài lá có vân thường chịu nóng tốt hơn và thích nghi với biên độ nhiệt độ rộng hơn. Đặc biệt, hình thái, cấu tạo rễ có liên quan chặt chẽ với điều kiện môi trường sống (Einzmann *et al.*, 2019).

Khi sử dụng đặc điểm hình thái để phân loại họ lan nói chung và lan Hải nói riêng thì cấu trúc hoa là tiêu chí xác định loài chính xác nhất (De *at al.*, 2019; Tsiftsis, 2016; Zhang *et al.*, 2016), bởi vì hoa có đặc điểm rất riêng biệt, đặc trưng từ màu sắc đến hình, ngay cả các loài rất gần gũi trong chi (Cribb, 1987; Cribb, 1998). Kết quả bài báo đã mô tả chi tiết cấu trúc hoa của *P. hangianum*, qua đó có thể nhận diện chính xác đây là Hải Hằng với tên khoa học là *P. hangianum*. Tuy nhiên, trong thực tế, hầu hết các loài lan nói chung và lan Hải nói riêng thời gian ra hoa rất ngắn, chỉ khoảng 2 tuần/năm, vì vậy để nhận dạng nhanh và chính xác các loài lan khi còn nhỏ hoặc lúc không có hoa thì cần phải phát triển các phương pháp định loại hiệu quả hơn. Do đó chúng tôi tiếp tục phân tích trình tự gen *rbcl* để có thể nhận diện lan Hải Hằng một cách nhanh chóng và chính xác.



Hình 2. Hình thái thân, lá và hoa của *P. Hangianum*

A, B, C. Hoa của Hải Hằng; B. Phát hoa mang bầu được bao bởi lá bắc; D. Các bộ phận tách rời của phát hoa, bầu và lá bắc; E, F. Mặt trước và sau của cây; H, G. Mặt trước và sau của lá



Hình 3. Cấu tạo hoa của *P. hangianum*

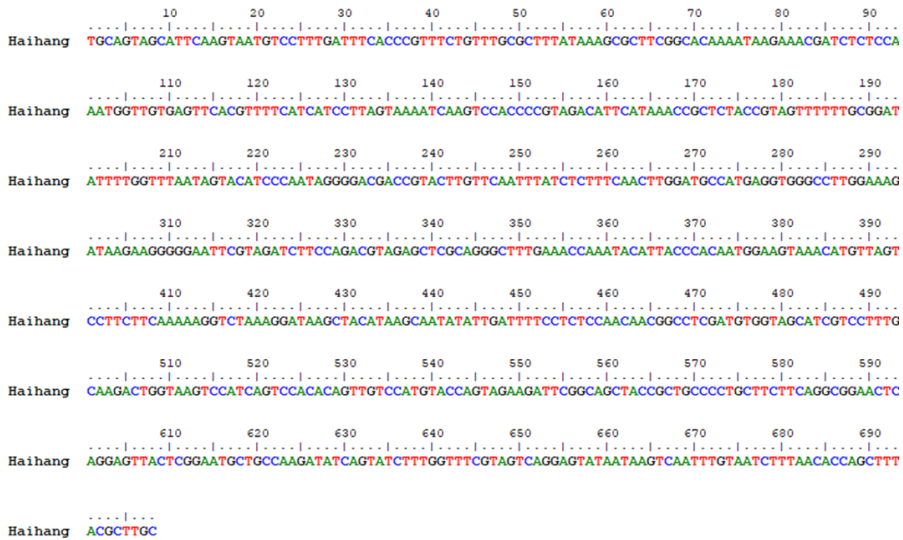
A. Mặt trong và mặt ngoài của lá đài dưới; B. Mặt trong và mặt ngoài của lá đài sau; C. Mặt trong và mặt ngoài của cánh hoa; D. Hình ảnh cánh môi; E. Khiên đậy trụ hoa chứa bao phấn và nhụy

Phân tích trình tự gen *rbcl*

Nhân bản và xác định trình tự gen *rbcl* của cây Hải Hằng

Lá Hải Hằng được thu thập, tách chiết DNA tổng số và kiểm tra độ tinh sạch bằng đo quang phổ. Kết quả kiểm tra tỷ số OD260nm/OD280nm nằm trong khoảng 1,86 - 2,0, đảm bảo yêu cầu cho thí nghiệm nhân gen *rbcl*. Điện di sản phẩm PCR thu được một phân đoạn DNA có kích thước khoảng 700bp rất đặc hiệu, hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Vì vậy, phân đoạn này được sử dụng để xác định trình tự nucleotide.

Tiến hành xác định trình tự bằng máy xác định trình tự tự động ABI PRIMS®3100 Avant Genetic Analyzer sau đó sử dụng BLAST của NCBI để so sánh các trình tự thu được. Kết quả khẳng định phân đoạn DNA nhân bản được là trình tự đoạn gen *rbcl* Với độ dài phân tích được là 708 nucleotid (hình 4).



Hình 4. Trình tự gen *rbcl* của mẫu Hải Hằng trong nghiên cứu

So sánh trình tự gen *rbcl* của một số loài lan Hải khác nhau

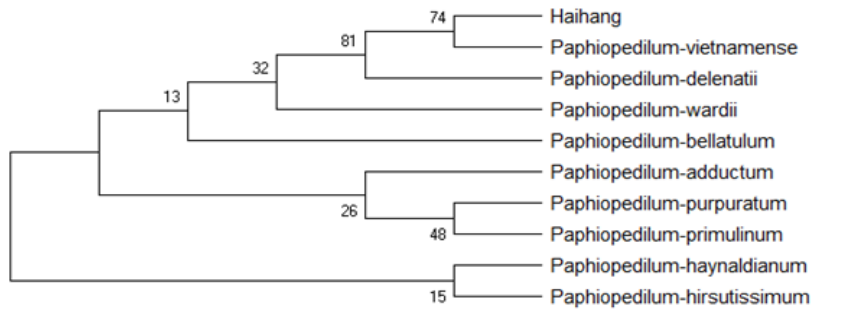
Kết quả so sánh trình tự vùng gen *rbcl* của mẫu nghiên cứu với 9 trình tự vùng gen *rbcl* của các loài thuộc chi *Paphiopedilum* đã được công bố trên Genbank thấy có tỷ lệ tương đồng cao (độ tương đồng giao động từ 99,13% đến 99,85% (bảng 1). Sự sai khác giao động từ 0,15 - 0,87). Trong đó, trình tự vùng gen *rbcl* của mẫu cây Hải Hằng có độ tương đồng 99,85% so với vùng *rbcl* mã số JQ182212.1 (*P. vietnamense*) và JQ182211.1 (*P. delenatii*) trên ngân hàng gen quốc tế. Kết quả đã khẳng định đối tượng nghiên cứu là thuộc họ lan Hải (*Paphiopedilum*).

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

| Mã số tra cứu trên Genbank | Loài | Giá trị E | Độ tương đồng (%) |
|----------------------------|------------------------------------|-----------|-------------------|
| MK161066.1 | <i>Paphiopedilum purpuratum</i> | 0,0 | 99,29 |
| AB176547.1 | <i>Paphiopedilum haynaldianum</i> | 0,0 | 99,15 |
| JQ182212.1 | <i>Paphiopedilum vietnamense</i> | 0,0 | 99,85 |
| JQ182211.1 | <i>Paphiopedilum delenatii</i> | 0,0 | 99,85 |
| JN181467.1 | <i>Paphiopedilum wardii</i> | 0,0 | 99,27 |
| JN181466.1 | <i>Paphiopedilum hirsutissimum</i> | 0,0 | 99,27 |
| JN181465.1 | <i>Paphiopedilum bellatulum</i> | 0,0 | 99,27 |
| JN181468.1 | <i>Paphiopedilum primulinum</i> | 0,0 | 99,13 |
| JQ182209.1 | <i>Paphiopedilum adductum</i> | 0,0 | 99,13 |

Sơ đồ phân loại hình cây dựa trên kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *rbcl* (hình 5) cho thấy 10 loài thuộc chi *Paphiopedilum* được chia thành 2 nhóm chính. Nhóm thứ nhất gồm các loài *P. haynaldianum*; *P. hirsutissimum* và nhóm thứ 2 gồm 8 loài còn lại, trong đó có Hải Hằng. Cây phân loại di truyền cũng cho thấy trình tự gen *rbcl* của Hải Hằng có độ tương đồng cao với Hải Việt (*P. vietnamense*), Hải Hồng (*P. delenatii*). Sự khác biệt giữa ba loài lan hải này của Việt Nam cũng được thể hiện trong cây phân loại.

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



Hình 5. Sơ đồ phân loại hình cây được xây dựng dựa trên trình tự gen *rbcl* của Hải Hằng phân lập được với một số loài thuộc chi *Paphiopedilum* công bố trên ngân hàng GenBank

Sử dụng mã vạch DNA có vai trò quan trọng trong việc nhận diện các mẫu thực vật. Đối với họ lan (Orchidaceae), mã vạch DNA cũng đã được áp dụng để nhận diện nhiều loài trong các chi *Dendrobium* (De *et al.*, 2019; Ludan *et al.*, 2019), *Phalaenopsis* (Cribb, 1987; De *et al.*, 2019; Tsiftsis, 2016), *Cypripedium* (Kim *et al.*, 2015), *Grammatophyllum*, *Cymbidium* (Siripiyasing, 2012), *Vanda* (Khew & Chia, 2011), và *Spathoglottis* (Ginibun *et al.*, 2010). Đối với chi Lan Hải, nghiên cứu nhận dạng các loài dựa vào mã vạch lần đầu được tiến hành bởi nhóm tác giả Parveen *et al.* (2012). Thí nghiệm trên tám loài *Paphiopedilum* của Ấn Độ, sử dụng năm mã vạch tiềm năng (*rpoB*, *rpoC1*, *rbcl*, *matK*, và *ITS*) (Parveen *et al.*, 2012). Khi nghiên cứu về DNA barcode ở thực vật, Hollingsworth *et al.*, 2009 đã xác nhận *rbcl* và *matK* có hiệu quả phân biệt tốt khi sử dụng đơn lẻ. *rbcl* có ưu điểm dễ dàng khuếch đại tuy nhiên lại khá bảo thủ trong khi đó *matK* có sự biến đổi rộng nhưng khuếch đại kém. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về sử dụng mã vạch DNA trong nhận diện lan Hải cũng đã được tiến hành với một số chỉ thị khác nhau như *ITS*, *LEAFY*, *ACO*, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* (Huyen Trang Vu *et al.*, 2020). Tuy nhiên, thông tin về trình tự gen *rbcl* của lan Hải cũng như ứng dụng chỉ thị *rbcl* trong nhận diện lan Hải vẫn chưa được công bố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định trình tự *rbcl* trên mẫu Hải Hằng và phân tích khả năng nhận diện lan Hải của chỉ thị này. Kết quả nghiên cứu này đã có đóng góp thêm vào cơ sở dữ liệu về trình tự DNA mã vạch trong nghiên cứu các loài lan Hải của Việt Nam.

KẾT LUẬN

Bảng mô tả chi tiết đặc điểm hình thái lan Hải Hằng (*P. Hangianum*) của Việt Nam đã xây dựng thành công. Việc hoàn thiện trình tự đoạn gen *rbcl* cho thấy tiềm năng sử dụng DNA mã vạch này kết hợp với đặc điểm hình thái trong định danh chính xác cây hoa Hải Hằng của nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Averyanov L, Cribb P, Phan KL, Nguyen TH (2004) Slipper Orchids of Vietnam. *Bird Life, Royal Botanic Gardens KEW; World Bank: Ho Chi Minh City, Vietnam*; p. 308
- Collins GG, Symons RH (1992) Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by modified procedure. *Plant Mol Bio Rept* 10: 233-235.
- Cribb P (1987) The genus *Paphiopedilum*: A kew magazine monograph. *The Royal Botanic Gardens, Kew/Timber Press*.
- Cribb P (1998) The Genus *Paphiopedilum*. 2nd ed. *Natural History Publications* (Borneo).
- De L, Singh DR, Singh R (2019) Morphological characterization in Mokara Orchids. *Int J Biosci* 15(3): 31-41.
- Dian AI Ghifari Perwitasari, Siti Rohimah, Tri Ratnasari, Bambang Sugiharto, dan Mukhamad Su'udi (2020) DNA Barcoding of Medicinal Orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar Using *rbcl* and *ITS* genes. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat* 31(1): 8-20.
- Einzmann H, Schickenberg N, Zotz G (2019) Variation in root morphology of epiphytic orchids along small-scale and large-scale moisture gradients. *Acta Bot Bras* 34(1): 66-73.
- Ginibun FC, Saad MRM, Hong TL, Othman RY, Khalid N, Bhassu S (2010) Chloroplast DNA Barcoding of *Spathoglottis* Species for Genetic Conservation. *Acta Hortuc* 878: 453-460
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M Chase MW, Cowan RS, Erickson DL, Fazekas AJ (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12794-12797.
- Huyen Trang Vu, My Huyen Bui, Quoc Luan Vu, Thanh Diem Nguyen, Hop Tran, Huu Trung Khuat, Ly Le (2019) Identification of Vietnamese *Paphiopedilum* Species Using Vegetative Morphology. *Annu Res Rev Biol* 34(1), doi: 10.9734/arrb/2019/v34i130145.

Huyen Trang Vu, Quoc Luan Vu, Thanh Diem Nguyen, Ngan Tran, Thanh Cong Nguyen, Phuong Nam Luu, Duy Duong Tran, Truong Khoa Nguyen and Ly Le (2020), Genetic Diversity and Identification of Vietnamese *Paphiopedilum* Species Using DNA Sequences. *Biology* 9(9), doi:10.3390/biology9010009.

Kasutjaniangati K, Firgiyanto R (2018) Characterization of morphology from orchid *Vanda* sp. as a genetic information source for preservation and agribusiness of orchids in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth Environ Sci* 207,012006, doi:10.1088/1755-1315/207/1/012006.

Khew GSW, Chia TF (2011) Parentage determination of *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae) through two chloroplast genes *rbcL* and *matK*. *AoB Plants* 2012, plr018, doi: 10.1093/aobpla/plr018.

Kim JS, Kim HT, Son SW, Kim JH (2015) Molecular identification of endangered Korean lady's slipper orchids (Cypripedium, Orchidaceae) and related taxa. *Botany* 93: 603-610.

Leonid V, Averyanov, Olaf Gruss, Canh Chu Xuan, Loc Phan Ke, Dang Bui, Hiep Nguyen Tien (2010) *Paphiopedilum canhii* - a new species from Northern Vietnam. *Orchids* 288-290.

Ludan Li, Yu Jiang, Yuanyuan Liu, Zhitao Niu, Qingyun Xue, Wei Liu, Xiaoyu Ding (2019) The large single-copy (LSC) region functions as a highly effective and efficient molecular marker for accurate authentication of medicinal *Dendrobium* species. *Acta Pharmacol Sin*, doi: 10.1016/j.apsb.2020.01.012.

Olaf GRUSS, Leonid V. AVERYANOV, Chu Xuan CANH and Nguyen Hoang Tuan (2018) A new variety of a natural hybrid of the genus *Paphiopedilum* from Vietnam: *Paphiopedilum* × *aspersum* var. *trantuananhhii* O. Gruss, Aver, CX Canh et NH Tuan *Die Orchidee* 4(07): 48-54.

Parveen I, Singh HK, Malik S, Raghuvanshi S, Babbar SB (2012) DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Mol Ecol Resour* 12: 82–90.

Siripiyasing P (2012) DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand. *Afr J Agric Res* 7: 393–404.

Singer RB, Sazima M (2001) Flower Morphology and pollination mechanism in three sympatric goodyerinae orchids from Southeastern Brazil. *Ann Bot* 88(6): 989-997.

Tsiftsis S (2016) Morphological variability of *Himantoglossum* s.s. (Orchidaceae) in Greece. *Phytotaxa* 245: 17-30.

UCN. The IUCN (2019) Red List of Threatened Species; Version 2019-2; IUCN: Gland, Switzerland.

Zhang FP, Huang JL, Zhang SB (2016). Trait evolution in the slipper orchid *Paphiopedilum* (Orchidaceae) in China. *Plant Signal Behav* 11(3), doi: 10.1080/15592324.2016.1149668.

USING THE MOPHOLOGY CHARACTERISTICS AND DNA BARCODE TO IDENTIFYING *Paphiopedilum hangianum* OF VIET NAM

Nguyen Thi Hai Yen¹, Ngo Xuan Quang², Do Tien Phat^{3,4*}

¹ TNU-University of Science

² VAST-Institute of Tropical Biology

³ VAST-Institut of biotechnology

⁴ VAST- Graduate University of Sciences and Technolog

SUMMARY

Orchid genus *Paphiopedilum* is one of the special genus of the orchid family having beautiful flowers, vibrant colors and a unique structure. This kind of orchid species are nowadays seriously threatened due to overexploitation and many of them are endangered. Many different species in this genus are similar in leaf characteristics, which is easy to confuse with the morphological way. Therefore, developing methods to identify these species of this orchid genus are essential. In this study, we analyzed and characterized the detail of stem and leaf as well as flower morphological structure of *P. hangianum* collected from Tuyen Quang, Vietnam. In addition, the sequence of *rbcL* gene was also used as a potential barcode DNA to identify *P. hangianum* species. Our result showed that the *rbcL* gene fragment isolated from samples was 708 bp. Based on the nucleotide sequence of the *rbcL* gene segment and the BLAST software in the NCBI, we found that this sample belonged to *Paphiopedilum* genus, respectively. The similarity of the nucleotide sequence of this samples and other *rbcL* gene sequence of some species in genus *Paphiopedilum* on the GenBank ranges from 99.13% to 99.85% (GenBank: MK161066.1, AB176547.1, JQ182212.1, JQ182211.1, JN181467.1, JN181466.1, JN181465.1, JN181468.1, JQ182209.1). According to the dendrogram tree of a the *rbcL* gene sequences, *P. hangianum* species was closely related to *P. vietnamense* species and *P. delenatii* species.

Keywords: DNA barcode, *P. hangianum*; botanical morphology, locus gen *rbcL*.

* Corresponding author: Tel: +84-981220379; Email: dtphat@ibt.ac.vn