

NHẬN DIỆN PHÂN TỬ MỘT SỐ LOÀI LAN HẢI (*Paphiopedilum*) ĐẶC HỮU TẠI VIỆT NAM

Vũ Thị Huyền Trang¹, Vũ Quốc Luận², Lê Thị Ngọc Diệp¹,

Nguyễn Thanh Diễm¹, Nguyễn Thành Công¹, Lưu Phương Nam¹,

Nguyễn Hữu Thuận Anh¹, Trần Duy Dương³, Trần Hợp⁴, Trần Hoàng Dũng¹

TÓM TẮT

Lan Hải *Paphiopedilum* đặc hữu Việt Nam là nhóm lan quý hiếm, có nguy cơ tuyệt chủng cao nên cần có biện pháp bảo tồn. Trong khi đa số các cây lan Hải được mua bán thương mại thường là cây con, cây chưa trưởng thành, cây không có hoa vì thế cần phải có phương pháp nhận diện nhanh và chính xác. Hiện nay phương pháp mã vạch DNA là một phương pháp hiệu quả, được ứng dụng ngày càng phổ biến. Trong nghiên cứu này để nhận diện các loài lan Hải đã khảo sát 6 vùng gene là ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* trên 23 mẫu thuộc 8 loài lan Hải đặc hữu Việt Nam. Việc khuếch đại các vùng trình tự ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1* đều thành công với hiệu suất tuyệt đối 100%. Các trình tự lan Hải đặc hữu Việt Nam trong nghiên cứu được đăng kí mã số trình tự, đồng thời góp phần vào thư viện trình tự Gen thế giới. Kết quả của nghiên cứu đã đề xuất trình tự kết hợp ITS và *matK* cho tiềm năng cao nhất trong việc nhận diện 6 loài lan Hải đặc hữu trong nghiên cứu, gồm *P. delenatii*, *P. hangianum*, *P. helenae*, *P. x dalatense*, *P. gratixianum*, *P. vietnamense*. Trình tự mã vạch này có thể áp dụng để nhận diện quần thể lan Hải Việt Nam phục vụ cho việc quản lý và bảo tồn các loài lan Hải có giá trị.

Từ khóa: *Paphiopedilum*, loài đặc hữu, nhận diện phân tử, ITS, *matK*, *trnL*.

1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là nước có môi trường sinh thái đa dạng thích hợp với nhiều loại cây, trong đó có lan Hải. Lan Hải đặc hữu là lan chỉ tồn tại và phân bố ở một khu vực nhất định vì vậy được ưa chuộng vì tính quý hiếm. Điều này dẫn đến việc buôn bán trái phép làm cho lan Hải ngày càng gần với nguy cơ tuyệt chủng. Để bảo tồn cần có phương pháp nhận diện nhanh và chính xác cây ngay cả trong giai đoạn chưa có hoa.

Phương pháp mã vạch DNA sử dụng một đoạn DNA ngắn trong bộ gen nhân, lập hoạt ty thể như là một chỉ thị để nhận diện một nhóm cá thể đặc trưng với độ chính xác ở mức nucleotide. Ngay sau khi khái niệm mã vạch DNA ra đời, nhiều công trình trên thế giới đã tập trung vào việc thiết lập bộ dữ liệu DNA cho sinh vật bản địa. Nhiều công trình được ứng dụng trên lan *Dendrobium* dựa vào các vùng trình tự *psbA-trnH* (Yao *et al.*, 2009), *matK* và *rbcl* (Asahina *et al.*, 2010). Trên nhóm địa lan *Cymbidium*, vùng ITS và ITS2 nổi lên như DNA chỉ

thị giúp chỉ ra quan hệ chủng loài của *Cymbidium* châu Á, đặc biệt vùng ITS2 có thể được sử dụng như một mã vạch DNA ở mức độ cao cho các loài lan (Sharma *et al.*, 2012).

Trong đối tượng *Paphiopedilum*, một nghiên cứu phát sinh chủng loài ở mức độ phân tử đã được thực hiện dựa trên việc thu thập các dữ liệu trình tự DNA từ các vị trí trong nhân (vùng ITS) và trong plastid (một phần gen *matK*, *ycf1*, các vùng non-coding *psaA-ycf6x3* và *trnF-ndhJ*) (Chochaj *et al.*, 2012). Trong nước, Khuất Hữu Trung và các cộng sự cũng đã sử dụng trình tự vùng ITS để phân biệt 16 loài và 2 thứ dưới loài của chi *Paphiopedilum* Việt Nam (Khuất Hữu Trung *et al.*, 2008). 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.

Như vậy có nhiều vùng trình tự được sử dụng trên các đối tượng khác nhau của hoa lan. Trong nghiên cứu này, đã sử dụng 6 vùng trình tự ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* để phân tích đặc điểm trình tự và nhận diện loài lan Hải đặc hữu Việt Nam cũng như một số các loài lan Hải Việt Nam lân cận khác.

¹ Trường Đại học Nguyễn Tài Thành

² Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

³ Viện Di truyền Nông nghiệp

⁴ Trường Đại học Sư phạm TP. HCM

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Hai mươi mẫu lá từ cây trưởng thành đã có hoa, thuộc 8 loài lan Hải đặc hữu Việt Nam gồm *P. delatanii*, *P. hangianum*, *P. helenae*, *P. tranlienianum*, *P. x dalatense*, *P. gratixianum*, *P. vietnamense*, *P. x hermannii* được thu thập từ Viện Sinh học Tây Nguyên và Viện Di truyền Nông nghiệp. Trừ *P. hermannii* và *P. vietnamense* là 2 loài hiếm, gần như tuyệt chủng ngoài thiên nhiên nên chỉ thu được 1 mẫu, các loài còn lại đều thu từ 3 mẫu trở lên để so sánh.

2.2. Tách DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự các vùng trình tự chỉ thị nhận diện

DNA tổng số được tách bằng Kit ISOLATE II Genomic DNA Kit, Công ty BIOLINE. Hai mươi mẫu nghiên cứu được sử dụng để khuếch đại 6 vùng trình tự khảo sát là ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*. Các mối khuếch đại trình tự được nêu ở bảng 1. Nhiệt độ Tm để khuếch đại các vùng ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* lần lượt là 58°C, 55°C, 63°C, 53°C, 53°C, 53°C.

Bảng 1. Các mối sử dụng trong nghiên cứu

Tên vùng trình tự	Tên mối	Trình tự mối	Chiều dài sản phẩm khuếch đại	Trích dẫn
ITS	IT1-F	AGTCGTAACAAGGTTTC	900	(Tsai, 2011)
	IT2-R	GTAAGTTTCTTCTCCTCC		
<i>matK</i>	F56-mo	CCTATCCATCTGGAATCTTAG	1100	Thiết kế mới (Đặng Văn Khải <i>et al.</i> , 2017)
	R1326-mo	GTTCTAGCACAAAGAGTCG		
<i>trnL</i>	<i>trnL</i> -F	GGTAGAGCTACGACTTGATT	600	(Group 2009)
	<i>trnL</i> -R	CGGTATTGACATGTA AAAATGGACT		
<i>rpoB</i>	2F	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	600	(Group 2009)
	4R	GATCCCAGCATCACAATCC		
<i>rpoC1</i>	1.1F	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	600	(Group 2009)
	1.3R	TGAGAAAACATAAGTAAGGGC		
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA</i> 3'f	CGCGCATGGTGGTTCCACAATCC	900	

2.3. Phân tích dữ liệu trình tự

Phần mềm Finch TV (Geospiza, 2004), được sử dụng để kiểm tra độ tin cậy các peak tín hiệu. Dữ liệu trình tự thô được kiểm tra độ tin cậy và hiệu chỉnh bằng cách đối chiếu trình tự chiếu xuôi với chiếu ngược và kiểm tra peak tín hiệu tại các vị trí da hình nucleotide trên phần mềm Seaview 4.0 (Gouy *et al.*, 2009) và so sánh với trình tự từ cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST.

Phần mềm MEGA (Kumar *et al.*, 2008) được sử dụng cho việc tính toán các thông số đột biến thay thế nucleotide gồm Variation, Pasimony, Singleton theo mô hình Kimura 2, thuật toán Maximum Likelihood với chỉ số bootstrap lặp lại 1000 lần. Các thông số Monoindel, Insertion, Deletion được ghi nhận thủ công.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu mẫu các loài lan Hải đặc hữu Việt Nam

Nghiên cứu đã thu thập được 23 mẫu lan Hải, thuộc 8 loài đặc hữu gồm 6 loài nguyên thủy *P. delatanii*, *P. gratixianum*, *P. hangianum*, *P. helenae*, *P. tranlienianum*, *P. vietnamense* và 2 loài lai *P. dalatense* và *P. x hermannii*.

3.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự các vùng trình tự chỉ thị nhận diện

DNA tổng số của 23 mẫu lan được sử dụng để khuếch đại 6 vùng trình tự của lan Hải là ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*. Trong đó 5 vùng trình tự ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1* cho kết quả khuếch đại PCR thành công trên tất cả các mẫu nghiên cứu đồng thời hiệu suất giải trình tự cũng đạt 100%. Cấp mỗi *matK* 2.1F/5R để xuất bởi CBOL (2009) hơi khó khuếch đại hơn các vùng trình tự khác (Chase *et al.*, 2007, Hollingsworth *et al.*, 2009). Tuy nhiên cặp mối 56F-mo/1326R-mo do nhóm nghiên cứu thiết kế (Đặng Văn Khải *et al.*, 2017) thì hiệu quả khuếch đại cao hơn và ít phải lặp lại phản ứng PCR. Cấp mối IT1/IT2 được dùng trong các nghiên cứu trước đây (Tsai *et al.*, 2003, Gigot *et al.*, 2007) cũng cho hiệu

quả khuếch đại cao vùng ITS trên đối tượng lan Hải *Paphiopedilum*. Ba vùng trình tự *trnL*, *rpoB* và *rpoC1* dễ dàng được khuếch đại thành công nhất ngay phần ứng đầu tiên.

Riêng vùng *trnH-psbA*, có 4/23 mẫu khuếch đại không thành công. Hiệu suất khuếch đại chỉ đạt 82,61%, đây cũng là hiệu suất đạt được sau rất nhiều lần lặp lại phản ứng PCR. Ngoài ra khoảng cách vách sản phẩm chỉ dài khoảng 600 bp thay vì 900 bp như dự kiến. Kết quả giải trình tự vùng *trnH-psbA* đều cho kết quả tin hiệu trình tự bị nhiễu, đồng thời chiều F chỉ nhận được chiều dài trình tự khoảng 200 bp thay vì 600-900 bp như dự kiến. Vùng *trnH-psbA* được đề xuất làm trình tự mã vạch trên lan *Dendrobium* (Yao *et al.*, 2009) nhưng không thích hợp cho đối tượng lan Hải *Paphiopedilum*. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với một số công bố trước đây (Gigot *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2015). Vì thế, vùng *trnH-psbA* đã được loại bỏ khỏi các phân tích tiếp theo.

Trình tự của từng mẫu được so với ngân hàng dữ liệu gen GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả cho thấy 23/23 mẫu đều thuộc nhóm lan Hải *Paphiopedilum* và đúng với các vùng trình tự khuếch đại, với độ tương đồng đạt 95 - 100%. Trình tự các mẫu sau khi kiểm tra tính chính xác đã được đăng kí mã số trên ngân hàng GenBank.

3.3. Đặc điểm trình tự của các vùng gen nghiên cứu

Khi phân tích biến dị di truyền các mẫu lan Hải trong nghiên cứu, vùng ITS có tỉ lệ Parsimon, Singleton, Insertion và Deletion cao nhất, kế đến là *matK* (Bảng 2). Tỉ lệ thấp nhất là 2 vùng *rpoB* và *rpoC1*. Tình đa hình di truyền cao của hai vùng ITS và *matK* cũng đã được báo cáo trước đây (Chattopadhyay (Chattopadhyay *et al.*, 2017; Parveen *et al.*, 2017). Ngược lại các trình tự *trnL*, *rpoB* và *rpoC1* khá bảo tồn.

Bảng 2. Đa dạng di truyền các vùng trình tự của 8 loài lan Hải đặc hữu Việt Nam

Locus	Chiều dài trình tự	Chiều dài phân tích (L)	Biến dị thay thế Variable site		Biến dị thêm/mất Indel				Tổng số loài phân định được	Tỷ lệ loài phân định (%)
			Số lượng vị trí Parsimony (P)	Số lượng vị trí Singleton (S)	Số lượng đoạn chèn (Insertion)	Số lượng đoạn mất (Deletion)	Số lượng chèn/mất 1 nu (Monoindel)	Tổng Indel		
ITS	661-703	725	64	108	4	1	11	16	3	37,5
matK	1089-1131	1132	37	46	0	0	0	0	5	62,5
trnL	415-428	466	17	9	0	0	0	0	4	50
rpoB	485	3213	7	14	0	0	0	0	3	37,5
rpoC1	462	1345	5	13	0	0	0	0	3	37,5

Bảng 3. Khoảng cách di truyền trong cùng loài (intra-specific distance) và khoảng cách di truyền giữa các loài (inter-specific distance) của mẫu lan Hải

Vùng trình tự	Khoảng cách di truyền cùng loài (intra-specific distance)	Khoảng cách di truyền khác loài (inter-specific distance)
ITS	0	0,020 0,000 - 0,076
matK	0	0,008 0,000 - 0,029
trnL	0	0,009 0,000 - 0,031
rpoB	0	0,006 0,000 - 0,022
rpoC1	0	0,003 0,000 - 0,011

3.4. Nhận diện loài dựa vào cây phát sinh (tree-based method)

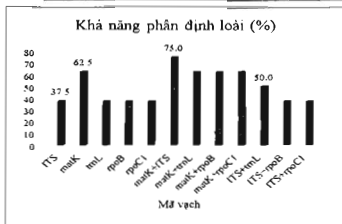
Mục đích của nghiên cứu này là nhận diện các loài lan Hải Việt Nam nên việc phân tích chi tiết khả năng phân định loài của từng trình tự mã vạch được thực hiện trên các trình tự Việt Nam. Các mã vạch được khảo sát bằng từng vùng trình tự riêng lẻ và vùng ghép 2 trình tự. Loài được xem là phân định được khi các trình tự của cùng loài được xếp với nhau vào cùng một nhánh đơn ngành trên cây phát sinh và tách biệt với các nhánh loài còn lại.

Đối với 5 vùng trình tự riêng lẻ, *matK* cho khả năng phân định tốt nhất (5/8 loài) đạt 62,5% (Hình 4), các trình tự còn lại ITS, *trnL*, *rpoB* và *rpoC1* đều đạt 3/8. Việc ghép 2 trình tự cho phép nhận diện

được 6/8 loài dựa vào vùng mã vạch *matK*+ITS (Bảng 4). Kết quả này cũng phù hợp với đề xuất của Chochai và cộng sự (2012) về việc kết hợp một vùng trình tự từ nhân (ITS) và một vùng trình tự từ plastid để tăng hiệu quả nhận diện (Chochai *et al.*, 2012). Kết quả đánh giá cao ITS và *matK* về khả năng phân định loài đã được nhắc đến trong nhiều nghiên cứu trước đây và kể cả những nghiên cứu mới đây nhất (Chattopadhyay *et al.*, 2017, Ghorbani *et al.*, 2017, Parveen *et al.*, 2017). Việc *matK* kết hợp với các trình tự khác (*matK*+*trnL*, *matK*+*rpoB*, *matK*+*rpoC1*) cho khả năng phân định loài (5/8) cao hơn so với khi ITS kết hợp với các trình tự (ITS+*trnL*, ITS+*rpoB*, ITS+*rpoC1*) (Bảng 4). Việc ghép thứ 3 trình tự trở lên đều không làm tăng thêm khả năng phân định loài.

Bảng 4. Khả năng phân định loài của các vùng trình tự mã vạch

STT	Tên khoa học	ITS	matK	trnL	rpoB	rpoC1	matK+ITS	matK+trnL	matK+rpoB	matK+rpoC1	ITS+trnL	ITS+rpoB	ITS+rpoC1
1	<i>Paphiopedilum delenatii</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	<i>Paphiopedilum x dlatense</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	<i>Paphiopedilum gratixianum</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	<i>Paphiopedilum hangianum</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5	<i>Paphiopedilum helenae</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6	<i>Paphiopedilum x hermannii</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
7	<i>Paphiopedilum tranlienianum</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
8	<i>Paphiopedilum vietnamense</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Số lượng loài phân định được		3/8	5/8	3/8	3/8	3/8	6/8	5/8	5/8	5/8	4/8	3/8	3/8
Tỉ lệ loài phân định được (%)		37,5	62,5	37,5	37,5	37,5	75,0	62,5	62,5	62,5	50,0	37,5	37,5

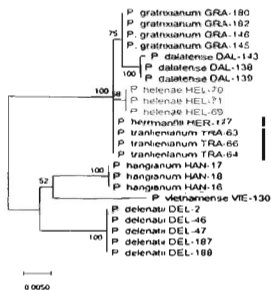


Hình 4. Biểu đồ khả năng phân định loài của các vùng trình tự mã vạch

Ba loài *P. delenatii*, *P. hangianum* và *P. vietnamense* đều được phân tách nhánh rõ ràng ở tất cả các cây phát sinh ghép và riêng lẻ. Đây là 3 loài cùng thuộc dưới chi *Parvisepalum* khá đặc trưng trong hệ thống phân loại hình thái của chi *Paphiopedilum*. Trong khi đó các loài *P. helenae*, *P. tranlienianum*, *P. gratixianum* đều được xếp cùng tổ (section) *Paphiopedilum* của dưới chi *Paphiopedilum*

nên có quan hệ rất gần nhau về hình thái lẫn di truyền. *P. dlatense* và *P. hermannii* là hai loài lai tự nhiên được khảo sát trong nghiên cứu. *P. hermannii* là loài lai từ bố mẹ là *P. hirsutissimum* và *P. helenae* cũng thuộc cùng tổ nên việc phân nhánh các loài này nằm cùng nhau là hoàn toàn có cơ sở. *P. hermannii* và *P. tranlienianum* vẫn chưa phân định được trong nghiên cứu. Đây đều là loài đặc hữu của vùng núi phía Bắc Việt Nam. Việc nhận diện 2 loài này cần có thêm thông tin phân tử hoặc có thể phối hợp với thông tin hình thái. Do *P. hermannii* hiện nay hầu như đã tuyệt chủng ngoài thiên nhiên, nên chỉ thu được 1 mẫu, do đó chưa có phân tích so sánh di truyền cả thể cùng loài. Còn loài lai *P. dlatense* thì thể hiện sự đa dạng di truyền rõ trong cùng loài khi các cá thể trong loài thường tách nhánh riêng so với 2 mẫu chị em của nó (Hình 5). Trong khi đặc điểm vùng ITS của 3 mẫu này giống nhau, việc ghép *matK* với ITS cho khả năng tách 3 mẫu loài *P. dlatense* thành một nhánh độc lập giúp nhận diện được loài này trong 8 loài nghiên cứu. Các trình tự của loài *P. dlatense* được đăng kí trên ngân hàng GenBank

cũng là những trình tự đầu tiên và duy nhất cho đến nay của loài này, khẳng định sự đặc hữu loài của Việt Nam.



Hình 5. Cây phát sinh loài ITS+matK

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu đã xác định đặc điểm của 5 vùng trình tự phân định loài ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*. Thông tin trình tự các loài lan Hải Việt Nam đã được đăng kí mã số trình tự trên ngân hàng GenBank, góp phần vào bộ sưu tập thông tin phân tử thế giới, đồng thời đăng kí đặc trưng trình tự của loài Việt Nam. Các vùng *trnH-psbA*, *rpoB*, *rpoC1* không phù hợp để làm trình tự mã vạch. Việc kết hợp 2 vùng trình tự *matK* và ITS đã nhận diện thành công 6/8 loài lan Hải đặc hữu Việt Nam. Kết quả này là cơ sở để mở rộng việc nhận diện trên quần thể lan Hải Việt Nam. Kết quả nghiên cứu nên được áp dụng vào công tác quản lí và bảo tồn nguồn gen thực vật có giá trị của Việt Nam, đồng thời góp phần khẳng định bản quyền đặc hữu Việt Nam của các loài quý hiếm ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asahina H, Shinozaki J, Masuda K, Morimitsu Y and Satake M (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences. *Journal of Natural Medicines* 64(2): 133-138.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson T A J, Conrad F, Salazar G A, Richardson J E, Hollingsworth M L, Barraclough T G, Kelly L and Wilkinson M (2007). A proposal for a

standardised protocol to barcode all land plants. *TAXON* 56(2): 295-299.

- Chattoopadhyay P, Banerjee G and Banerjee S (2017). Distinguishing Orchid Species by DNA Barcoding: Increasing the Resolution of Population Studies in Plant Biology. *Omic* 21(12): 711-720.

- Chochai A, Leitch I J, Ingrouille M J and Fay M F (2012). Molecular phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170(2): 176-196.

- Đặng Văn Khải, Nguyễn Thị Nhà và Vũ Thị Huyền Trang (2017). Screening, designing, pilot evaluation and application of some potential primers for molecular discrimination of *Paphiopedilum* species in Vietnam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*: 113-118.

- Dong W, Xu C, Li C, Jiahui S, Zuo Y, Shi S, Cheng T, Guo J and Zhou S (2015). *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific reports* 5: 8348.

- Geospiza I (2004). FinchTV version 1.4.0: DNA sequence chromatogram trace viewer.

- Ghorbani A, Gravendeel B, Selliah S, Zarre S and de Boer H (2017). DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep. *Molecular Ecology Resources* 17(2): 342-352.

- Gigot G, Van Alphen-Stahl J, Bogarin D, Warner J, Chase MW and Savolainen V (2007). Finding a suitable DNA barcode for Mesoamerican orchids. *Lankesteriana International Journal on Orchidology* 7(1-2): 200-203.

- Gouy M, Guindon S and Gascuel O (2009). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221-224.

- Group CPW (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 12794-12797.

- Hollingsworth P M, Forrest L L, Spouge J L, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Chase M W, Cowan R S, Erickson D L, Fazekas A J, Graham S W, James K E, Kim K-J, Kuehn M W, Schneider H, van AlphenStahl J, Barrett S C L, van den Berg C, Bogarin D, Burgess KS, Cameron N, et al.

Carne M, Chacón J, Clark A, Clarkson J J, Conrad F, Devey D S, Ford C S, Hedderson T A J, Hollingsworth M L, Husband B C, Kelly L J, Kesanakurti P R, Kim J S, Kim Y-D, Lahaye R, Lee H-L, Long D G, Madriñán S, Maurin O, Meusnier I, Newmaster S G, Park C-W, Percy D M, Petersen G, Richardson J E, Salazar G A, Savolainen V, Seberg O, Wilkinson M J, Yi D-K and Little DP (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31): 12794-12797.

13. Khuất Hữu Trung, Trần Đăng Khánh, Lê Huy Hàm, Trần Duy Dương và Nguyễn Trọng Khoa (2008). Evaluation of genetic diversity *Paphiopedilum* groups in morphology; analysis of specific characteristic of indigenous gene resource of *Paphiopedilum* in Vietnam. Hanoi, Vietnam, Ministry of Science and Technology.

14. Kumar S, Nei M, Dudley J and Tamura K (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9(4): 299-306.

15. Parveen I, Singh H K, Malik S, Raghuvanshi S and Babbar S B (2017). Evaluating five different

loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK*, and *ITS*) for DNA barcoding of Indian orchids. *Genome* 60(8): 665-671.

16. Sharma S K, Kumaria S, Tandon P and Satyawada R R (2012). Comparative karyomorphological study of some Indian *Cymbidium* Swartz, 1799 (Cymbidieae, Orchidaceae). *Comparative cytogenetics* 6(4): 453-465.

17. Tsai C C (2011). Molecular Phylogeny and Biogeography of Phalaenopsis Species. *Orchid Biotechnology* 1: 1-24.

18. Tsai C C, Huang S C, Huang P L and Chou C H (2003). Phylogeny of the genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae) with emphasis on the subgenus *Phalaenopsis* based on the sequences of the internal transcribed spacers 1 and 2 of rDNA.

19. Yao H, Song J Y, Ma X Y, Liu C, Li Y, Xu H X, Han J P, Duan L S and Chen S L (2009). Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region. *Planta Medica* 75(6): 667-669.

IDENTIFICATION OF ENDEMIC *Paphiopedilum* SPECIES IN VIETNAM

Vu Thị Huyền Trang¹, Vu Quốc Luan², Lê Thị Ngọc Diệp¹,
Nguyễn Thanh Diem¹, Nguyễn Thanh Công¹, Lưu Phương Nam¹,
Nguyễn Hữu Thuận Anh¹, Trần Duy Dương³, Trần Hốp⁴, Trần Hoàng Dũng¹

¹Nguyễn Tat Thanh University

²Tay Nguyen Scientific Research Institute Central

³Vietnam Agricultural Genetics Institute

⁴Education University - HCMC

Summary

Paphiopedilum is a rare and endangered orchid group. Vietnam possesses diverse species of this genus and some of them are valuable endemic taxa. Therefore, conservation measures are needed. Most illegal trading are applied on immature, flowerless plants. Hence a fast and accurate identification method is needed for effective conservation. DNA barcoding is a new method, which is increasingly popular today. In this study, to identify *Paphiopedilum* species, we investigated 6 sequence regions ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH*- on 23 samples of 8 *Paphiopedilum* species. The amplification of 5 regions ITS, *matK*, *trnL*, *rpoB*, *rpoC1* were 100% successful. The sequences in this study were submitted and contributed to GenBank. The results of this study proposed the combination of ITS and *matK* sequences as the highest potential for identifying 6 *Paphiopedilum* species, including *Paphiopedilum delenatii*, *P. hangianum*, *P. helena*, *P. x dalaense*, *P. gratrxianum*, *P. vietnamense*. This barcode sequence can be applied to identify Vietnam *Paphiopedilum* population serving for management and conservation of this valuable orchid group.
Keywords: *Paphiopedilum*, endemic species, molecular identification, ITS, *matK*, *trnL*.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Kim Lý

Ngày nhận bài: 11/11/2019

Ngày thông qua phản biện: 11/12/2019

Ngày duyệt đăng: 18/12/2019