

MOLECULAR PHYLOGENY OF VIETNAMESE
Paphiopedilum helenae Aver. POPULATIONS

Tran Minh Tuan¹, Chu Ngoc Quan¹, Bui Thuy Lien², Nguyen Minh Sang³,
Cao Phi Bang⁴, Nguyen Sinh Khang⁵, Le Chi Toan^{2*}

¹Ba Vi National Park, ²Hanoi Pedagogical University 2, ³Kim Xuyen High School

⁴Hung Vuong University, ⁵Institute of Ecology and Biological Resources

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<i>Paphiopedilum helenae</i>, a member of the genus <i>Paphiopedilum</i>, Orchidaceae, is an endangered species. This study used molecular data with 29 newly sequenced samples of <i>P. helenae</i> in Vietnam to investigate its phylogeny. The results of molecular data analysis strongly support that <i>Paphiopedilum</i> is a monophyletic group. Four subgenera were recorded within <i>Paphiopedilum</i>, namely <i>Parvisepalum</i>, <i>Brachypetalum</i>, <i>Megastaminodium</i> and KEYWORDS Phylogeny Molecular <i>Paphiopedilum helenae</i> Population Vietnam	<i>Paphiopedilum</i>. Compared with previous studies, the results of this study suggest that the population of <i>P. helenae</i> was recorded as monophyletic in the section <i>Paphiopedilum</i>. The individuals of the species are concentrated in a group, especially the individuals of <i>P. helenae</i> in Vietnam are not placed together but are mixed with other individuals of China. These results show that the genetics of <i>Paphiopedilum helenae</i> populations in Vietnam and China are highly conservative, and there are genetic variations in this population; however, these current genetic variations are not significant for taxonomic arrangement and phylogeny.

NGHIÊN CỨU PHÁT SINH LOÀI PHÂN TỬ CỦA QUẦN THỂ
Paphiopedilum helenae Aver. Ở VIỆT NAM

Trần Minh Tuấn¹, Chu Ngọc Quân¹, Bùi Thùy Liên², Nguyễn Minh Sáng³,
Cao Phi Bằng⁴, Nguyễn Sinh Khang⁵, Lê Chí Toàn^{2*}

¹Vườn Quốc gia Ba Vì, ²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ³Trường THPT Kim Xuyên

⁴Trường Đại học Hùng Vương, ⁵Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
TỪ KHÓA Phát sinh loài Phân tử <i>Paphiopedilum helenae</i> Quần thể Việt Nam	<i>Paphiopedilum helenae</i> Aver. là một thành viên thuộc chi Lan Hải, họ Phong Lan, là loài đang đối diện nguy cơ tuyệt chủng. Nghiên cứu này sử dụng dữ liệu phân tử với 29 trình tự được giải mới thành công của <i>Paphiopedilum helenae</i> ở Việt Nam nhằm nghiên cứu phát sinh chủng loài của <i>P. helenae</i>. Kết quả phân tích dữ liệu phân tử của nghiên cứu ủng hộ mạnh mẽ rằng <i>Paphiopedilum</i> là nhóm đơn phát sinh. Bốn phân chi (subgenus) được ghi nhận bên trong <i>Paphiopedilum</i> lần lượt là <i>Parvisepalum</i>, <i>Brachypetalum</i>, <i>Megastaminodium</i> và <i>Paphiopedilum</i>. So với các nghiên cứu trước đây, kết quả của nghiên cứu này gợi ý rằng, quần thể <i>P. helenae</i> được ghi nhận là đơn phát sinh nằm trong nhóm <i>Paphiopedilum</i>. Các cá thể của loài này nằm tập trung thành một nhánh, đặc biệt các cá thể Lan Hải <i>P. helenae</i> của Việt Nam không nằm tập trung mà nằm lẫn cùng các cá thể khác của Trung Quốc. Kết quả này cho thấy, thông tin di truyền của các quần thể <i>Paphiopedilum helenae</i> tại nhiều khu vực ở Việt Nam và Trung Quốc có tính bảo thủ cao và xuất hiện các biến đổi trong di truyền của quần thể này. Tuy vậy, hiện các biến dị di truyền này chưa có ý nghĩa đối với sắp xếp phân loại và phát sinh loài.

Mở đầu

Chi Lan Hải – *Paphiopedilum* Pfitzer thuộc phân họ Cypripedioideae trong họ Phong Lan – Orchidaceae, hiện có khoảng 109 loài đã được ghi nhận, phân bố rộng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới Châu Á; từ Ấn Độ ngang qua Nam Trung Quốc, trải dài xuống phía Nam qua Đông - Nam Á, đến tận New Guinea và quần đảo Solomon [1], [2]. *Paphiopedilum* là một nhóm thực vật có hoa với cấu trúc rất đặc trưng là cánh hoa giữa (môi hoặc cánh môi) hình túi sâu trông giống như chiếc hài. Chúng có thân dạng thảo, mọc thành cụm hoặc rải rác trên đất, đá hoặc phụ sinh; thân rễ thường không rõ ràng hoặc rất ngắn; rễ ít hoặc nhiều, to mập có lông hoặc không. Lá thường khoảng 3-7 chiếc, xếp gần thành 2 hàng, thường gấp dọc ở gốc tạo hình chữ V; phiến lá hình dải, gần hình thuôn đến e líp (bầu dục) hẹp hoặc e líp rộng; chóp lá nhọn, tù, gần tròn hoặc hơi lõm; mép lá nguyên, đôi khi hơi gợn sóng; gân chính lõm mặt trên và hơi lồi hoặc lồi rõ mặt dưới, các gân thứ cấp thường mờ ở mặt trên và gần như không thấy ở mặt dưới; mặt trên lá đồng nhất có màu xanh lá cây hoặc khảm bởi các mảng màu xanh lá cây sẫm hay nhạt, mặt dưới đồng nhất xanh lục nhạt hoặc thưa thớt hay dày đặc các đốm tím. Hoa đơn hoặc có vài bông trên cuống ngắn hoặc dài ở đỉnh cây; cuống hoa gần đứng hoặc hơi cong hình cánh cung, thường có lông tơ dày và ngắn, có lá bắc mịn [1], [3]. Các loài thuộc *Paphiopedilum* có giá trị cao về dược liệu và làm cảnh. Tuy vậy, nhiều loài *Paphiopedilum*, trong đó có *Paphiopedilum helenae* Aver. (Hình 1) có mức độ bị đe dọa tuyệt chủng ngày càng gia tăng nhanh chóng do môi trường sống của chúng bị phá hủy hoặc suy giảm trầm trọng cùng với nạn thu mua và buôn bán với số lượng lớn [4], [5].



Hình 1. Hình thái *Paphiopedilum helenae* được thu ở tự nhiên và bảo tồn tại Trạm đa dạng sinh học Mê Linh

Nhiều nghiên cứu trên các đối tượng của họ Phong Lan cũng như Lan Hải – *Paphiopedilum* đã được tiến hành theo nhiều hướng khác nhau nhằm đánh giá mức độ đa dạng, đặc điểm và mối quan hệ di truyền. Họ Phong Lan (Orchidaceae) là họ thực vật đa dạng và bao gồm nhiều loài trên thế giới. Trình tự gen ITS (Internal Transcribed Spacer) đã được sử dụng nghiên cứu trên 190 giống Phong Lan, bao gồm tất cả các loài và phân lớn được nghiên cứu trên nhiều thành viên

của họ Phong Lan (Orchidaceae). Gần đây, những nhà nghiên cứu thực vật đã tập trung vào các điều tra về sự phát sinh loài ở nhiều bậc phân loại, và các loài thuộc họ Phong Lan (Orchidaceae) cũng như chi *Paphiopedilum* đã được quan tâm nghiên cứu [6].

Chochai và cộng sự [7] tiến hành nghiên cứu điều tra mối quan hệ phát sinh loài của chi *Paphiopedilum* dựa trên dữ liệu phân tử từ trình tự ITS và các gen lục lạp. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng *Paphiopedilum* là nhóm đơn phát sinh với 3 phân chi *Parvisepalum*, *Brachypetalum* và *Paphiopedilum*. Một bản đồ về kích thước bộ gen và số lượng nhiễm sắc thể được cung cấp, trong đó thể hiện rằng, số lượng nhiễm sắc thể của các loài là không có sự biến đổi với $2n = 26$. Górnaiak và cộng sự [8] đã tiến hành nghiên cứu vị trí phân loại của *Paphiopedilum canhii* (Cypripedioideae; Orchidaceae) dựa trên dữ liệu về tế bào và phân tử học. Kết quả của nghiên cứu chỉ ra rằng, *P. canhii* là một loài được mô tả từ năm 2010 nhưng đã gây ra nhiều tranh cãi giữa các nhà thực vật học do sự khác biệt hình thái không rõ ràng của nó so với các loài khác, tuy nhiên kết quả phát sinh loài chỉ ra rằng loài này là một nhánh phát sinh độc lập trong *Paphiopedilum* và việc mô tả loài này là loài mới năm 2010 là chính xác. Hơn nữa, dựa vào kết quả này đã đề xuất việc phục hồi phân chi *Megastaminodium* với một loài duy nhất là *P. canhii* [8]. Tuy vậy, vị trí phát sinh của phân chi này trong một số dữ liệu trình tự gene đơn là chưa chắc chắn. Lee và cộng sự [9] nghiên cứu sắp xếp và vị trí phát sinh của loài Lan Hải *Paphiopedilum rungsuriyanum* dựa trên dữ liệu từ hình thái, tế bào và phân tử. Nghiên cứu chỉ ra rằng *P. rungsuriyanum* có số lượng nhiễm sắc thể là $2n = 26$. Kết quả nghiên cứu phát sinh loài thể hiện rằng *P. rungsuriyanum* là thành viên của phân chi *Paphiopedilum* và là một chi em của nhóm (section) *Paphiopedilum*. Tsai và cộng sự [10] tiến hành một nghiên cứu phát sinh loài và lịch sử tiến hóa của chi *Paphiopedilum* dựa trên dữ liệu gen nhân và gen lục lạp. Nghiên cứu sử dụng dữ liệu phân tử của 78 loài với 04 chỉ thị bao gồm ITS, *trnL* intron, *trnL-trnF* spacer, *atpB-rbcL* spacer. Kết quả của nghiên cứu thể hiện rằng *Paphiopedilum* là chi đơn phát sinh và bao gồm 3 phân chi *Parvisepalum*, *Brachypetalum* và *Paphiopedilum*. Phân tích lịch sử tiến hóa chỉ ra rằng, *Paphiopedilum* có nguồn gốc từ nam Trung Quốc và Đông Nam Á và sau đó phát tán đến các quần đảo trong khu vực Đông Nam Á. Vũ Huyền Trang và cộng sự [11] tiến hành nghiên cứu đa dạng và định danh một số loài *Paphiopedilum* sử dụng 08 gen. Kết quả của nghiên cứu đã xác định được vị trí phát sinh của 17 loài *Paphiopedilum* Việt Nam, tuy nhiên một số loài khác chưa có vị trí phát sinh rõ ràng. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng ITS là trình tự có ý nghĩa rất lớn trong việc xác định phát sinh của *Paphiopedilum*. Nguyễn Thị Hải Yến và cộng sự [12] nghiên cứu khả năng định danh loài Lan Hải *Paphiopedilum helenae* bằng chỉ thị phân tử và một số đặc điểm hình thái. Kết quả của nghiên cứu chỉ ra rằng, các trình tự *trnH-psbA* và ITS có tiềm năng trong định danh các loài Lan Hải, các trình tự nói trên cung cấp nhiều thông tin và hữu ích cho nghiên cứu phát sinh chủng loại của Lan Hải.

Nhằm từng bước tiến tới bảo tồn đa dạng các loài Lan Hải tự nhiên ở Việt Nam nói chung và đặc biệt các loài Hải có giá trị thương mại cao ở miền Bắc như *Paphiopedilum helenae* thì việc thu thập các thông tin về dữ liệu di truyền, xác định vị trí và mối quan hệ phát sinh của *P. helenae* là rất cần thiết. Do đó, nghiên cứu này tập trung vào (1) thu thập dữ liệu phân tử của một số gene và phát sinh loài của *Paphiopedilum helenae* với những loài gần gũi bằng dữ liệu phân tử; (2) xác định mối quan hệ phát sinh loài của *Paphiopedilum helenae* ở Việt Nam.

1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

1.1. Vật liệu, tách chiết DNA, PCR, giải trình tự gen

Nghiên cứu này sử dụng 99 mẫu nghiên cứu bao gồm 80 loài của *Paphiopedilum*, trong đó có 12 cá thể của *P. helenae* được thu tại Việt Nam trong nghiên cứu này. 04 loài thuộc *Phragmipedium* được sử dụng làm đối chứng. 08 gene bao gồm 06 gen lục lạp *atpB-rbcL* spacer, *matK*, *psaA-ycf3ex3*, *trnF-ndhJ*, *trnL* intron, và *trnL-F* spacer) và 02 trình tự nhân (ITS và *ycf1*) được sử dụng để xây dựng khối dữ liệu phân tử trong nghiên cứu này.

Tổng cộng có 549 trình tự được sử dụng, thông tin chi tiết các trình tự được trình bày chi tiết tại Bảng S1 (xem tại địa chỉ:

https://docs.google.com/document/d/1wBBuConwYYHFAa7hDz6XJCQ_nUjOfTJa/edit?usp=sharing&ouid=100007090073393019065&rtpof=true&sd=true).

DNA tổng số của các cá thể *P. helenae* được sử dụng trong nghiên cứu này được tách chiết từ các mẫu lá khô được bảo quản bằng silica gel sử dụng bộ kit tách chiết DNA tổng số Plant Genomic DNA Kit (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc). Phản ứng khuếch đại PCR cho 08 trình tự DNA được tiến hành theo điều kiện và sử dụng mồi theo nghiên cứu của Tsai và cộng sự [10].

Phản ứng khuếch đại PCR sử dụng MasterMix của công ty MCLAB (South San Francisco, California, USA). Chương trình chạy PCR được cài đặt như sau: 95 °C trong 5 phút, 35 chu kỳ cho 95 °C trong 30 giây, 50 °C trong 40 giây, 72 °C trong 1 phút 30 giây, và cuối cùng kéo dài trong thời gian 10 phút ở 72 °C, sau đó bảo quản lưu ở 5 °C.

Các sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,0%. Các sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ phục hồi tinh sạch đoạn DNA đa chức năng BioMed và sau đó tiến hành giải trình tự sử dụng các đoạn mồi trong phản ứng PCR cho từng gene tương ứng. Giải trình tự hai chiều được hoàn thành bằng máy giải trình tự DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, California, Hoa Kỳ). Việc ước tính chất lượng và lắp ráp cho các trình tự mới tạo được thực hiện bằng Geneious 8.0.5 [13]. Các trình tự cuối cùng được căn chỉnh sử dụng MUSCLE 3.8.31 và sau đó được điều chỉnh trong Geneious [13].

1.2. Phân tích phát sinh chủng loài

Nghiên cứu này sử dụng hai phương pháp maximum likelihood (ML) và Bayesian inference (BI) để thực hiện các phân tích phát sinh loài của *Paphiopedilum*. Phương pháp ML được tiến hành sử dụng phần mềm RAxML 8.2.12 [14] bằng cách sử dụng mô hình chạy GTR+I+G được đề xuất bởi jModeltest 2.1.6 [15] cho mỗi vùng DNA đơn lẻ và khối dữ liệu kết hợp áp dụng 1.000 thế hệ bootstrap. Phân tích BI được tiến hành bằng cách sử dụng phần mềm MrBayes 3.2.6 [16] và chạy trên CIPRES [17] bằng cách sử dụng mô hình chạy tương tự với phương pháp ML và cũng được đề xuất bởi jModeltest 2.1.6. Thuật toán MCMC của BI được chạy trong 10 triệu thế hệ với bốn chuỗi Markov chain Monte Carlo (MCMC) và các cây phát sinh được lấy mẫu sau mỗi 1000 thế hệ. Để kiểm tra kích thước mẫu hiệu quả (ESS) của tất cả các tham số có liên quan (>200), chúng tôi đã sử dụng Tracer v.1.6 [18]. Với 25% thế hệ lấy mẫu đầu tiên (2500 cây) bị loại bỏ, một cây phát sinh tối ưu nhất và chỉ số ủng hộ (PP) sẽ được thu trong nhóm 75% các cây còn lại, và kết quả của phân tích được đọc bằng Figtree v1.4.0.

2. Kết quả và thảo luận

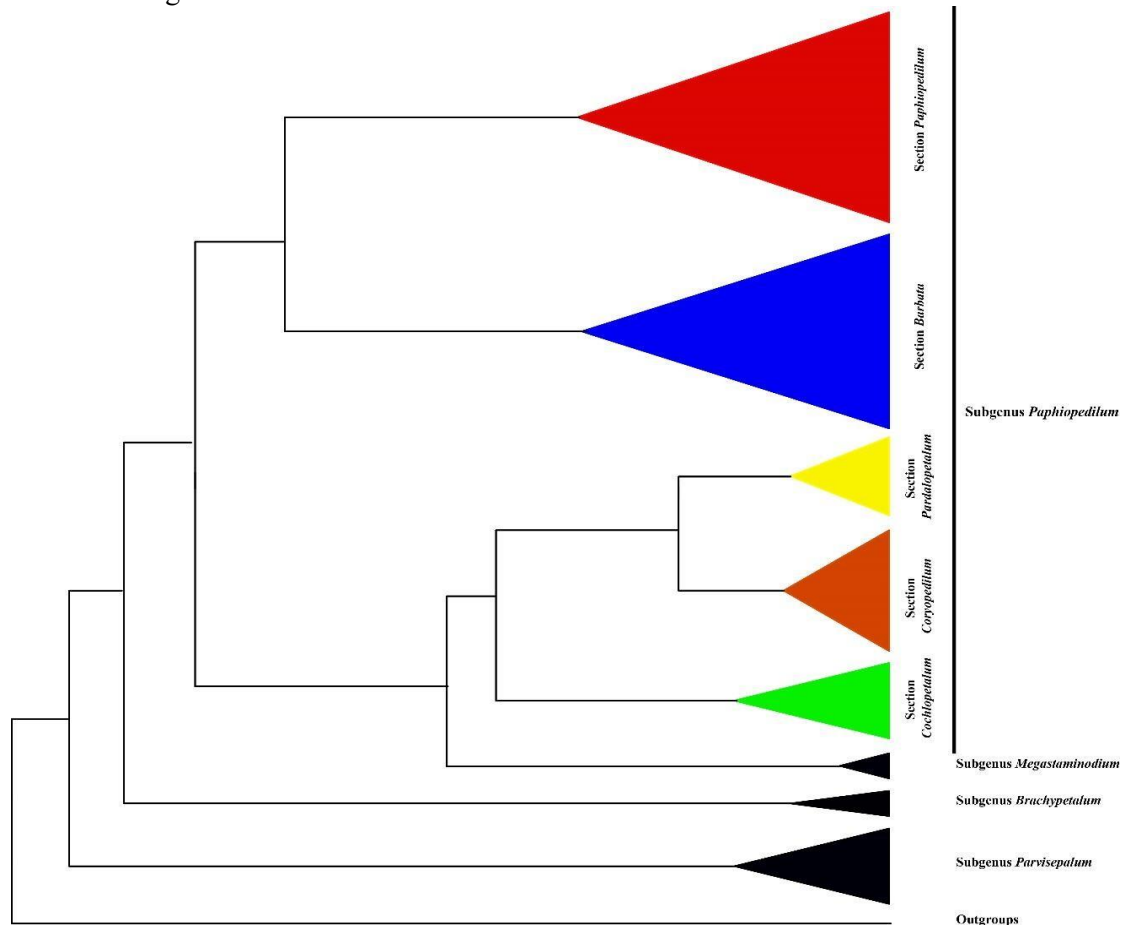
2.1. Kết quả phân tích dữ liệu phân tử

Nghiên cứu này đã giải thành công 29 trình tự mới của các cá thể *Paphiopedilum helenae* ở Việt Nam, tất cả các trình tự mới đều được kiểm tra thông qua công cụ BLAST và được sử dụng trong phân tích về phát sinh loài. Các trình tự mới đều được công bố trên NCBI với mã số được trình bày tại Bảng S1.

Chiều dài các khối dữ liệu đơn lẻ *atpB-rbcL* spacer, *matK*, *psaA-ycf3ex3*, *trnF-ndhJ*, *trnL* intron, và *trnL-F* spacer, ITS và *ycf1* lần lượt là 609, 1167, 842, 734, 627, 431, 823, 1646 pbs. Khối dữ liệu kết hợp bao gồm 6879 pbs cho tất cả các mẫu nghiên cứu và đối chứng. Khối dữ liệu kết hợp chỉ bao gồm 643 vị trí nucleotide có thể thay đổi chiếm khoảng 9,34%. Manzanilla và cộng sự [19] và Lê Chí Toàn [20] cho rằng tỷ lệ các vị trí có thể biến đổi là tỷ lệ nghịch với mối quan hệ phân tử. Do đó với tỷ lệ khoảng 9,34% của các nucleotide có thể thay đổi trong khối dữ liệu kết hợp cho phân tích phát sinh thể hiện quan hệ chặt chẽ giữa các loài của *Paphiopedilum*.

2.2. Kết quả phân tích mối quan hệ phát sinh chủng loại

Kết quả phân tích mối quan hệ phát sinh loài của *Paphiopedilum* dựa trên dữ liệu kết hợp của phương pháp ML và BI là tương đồng nhau, một số vị trí có sự phát sinh khác biệt, tuy vậy chỉ số ủng hộ cho các vị trí này là rất thấp và không tin cậy. Do đó, quan hệ phát sinh loài của *Paphiopedilum* được kết hợp và trình bày trên cây phát sinh loài của phương pháp ML với chỉ số ủng hộ từ cả hai phương pháp ở trên các nhánh phát sinh và được thể hiện tóm tắt trong Hình 2 và chi tiết trong Hình 3.



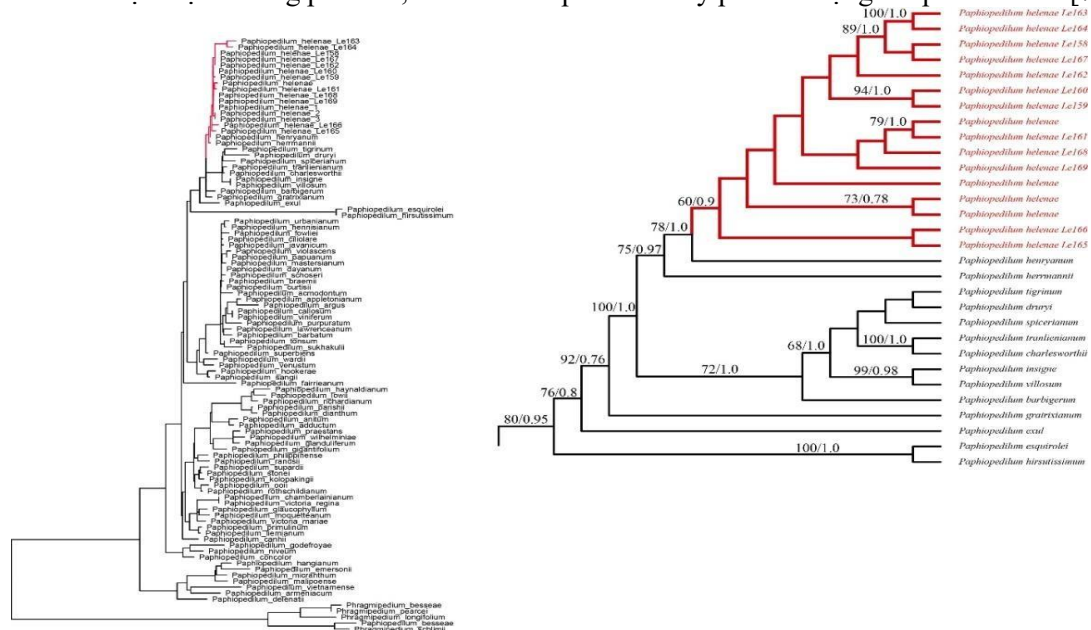
Hình 2. Sơ đồ khái quát phát sinh loài của chi *Paphiopedilum* dựa trên cây ML từ khối dữ liệu kết hợp của 8 vùng DNA

Kết quả phân tích dữ liệu phân tử của chúng tôi hỗ trợ mạnh mẽ rằng *Paphiopedilum* là nhóm đơn phát sinh (Hình 2 và Hình 3). Bốn phân chi (subgenus) được ghi nhận bên trong *Paphiopedilum* lần lượt là *Parvisepalum*, *Brachypetalum*, *Megastaminodium* và *Paphiopedilum*, trong đó phân chi *Megastaminodium* được phục hồi bởi nghiên cứu của Górnjak và cộng sự [8] và chỉ được trình bày khái quát bởi nghiên cứu của Vũ Huyền Trang và cộng sự [11] và nghiên cứu này.

Phân chi *Parvisepalum* được ghi nhận là nhóm được hình thành sớm nhất, kết quả này là tương đồng với các nghiên cứu trước đây như Chochai và cộng sự [7], Górnjak và cộng sự [8], Vũ Huyền Trang và cộng sự [11]. Phân chi *Parvisepalum* bao gồm các thành viên tập trung phân bố ở phía nam Trung Quốc và Việt Nam, các loài của phân chi này được ước tính hình thành vào khoảng 4,3 triệu năm trước tại khu vực này [10].

Phân chi *Brachypetalum* là nhóm có vị trí phát sinh ngay sau phân chi *Parvisepalum*. Các loài thuộc *Brachypetalum* được đặc trưng bởi số hoa từ 1-3 trên một cụm hoa, các bông hoa có màu trắng hoặc vàng. Phân chi này là một nhóm đơn phát sinh với sự hỗ trợ mạnh mẽ của dữ liệu

phân tử (Hình 2). *Brachypetalum* có một số điểm tương đồng với *Parvisepalum* về đặc hình thái và số lượng nhiễm sắc thể (đều có 26 nhiễm sắc thể), tuy nhiên chúng có sự khác biệt về cấu trúc của hoa và đặc biệt là vùng phân bố, các loài của phân chi này phân bố rộng khắp Indochina [7].



Hình 3. Cây phát sinh loài của chi *Paphiopedilum* theo phân tích maximum likelihood từ bộ dữ liệu kết hợp của 08 gen (*atpB-rbcL* spacer, *matK*, *psaA-ycf3ex3*, *trnF-ndhJ*, *trnL* intron, và *trnL-F* spacer, ITS và *ycf1*). Chỉ số ủng hộ ML và PP của phân tích BI được trình bày trên các nhánh. Những điểm trống thể hiện chỉ số ủng hộ thấp hơn 50%.

Phân chi *Megastaminodium* được thành lập bởi Braem và Gruss [21], được phục hồi và khẳng định bởi Górniak và cộng sự [8]. Phân chi này bao gồm một loài duy nhất đặc hữu ở Việt Nam là *Paphiopedilum canhii*. Tuy nhiên, việc công nhận phân chi này và xác định vị trí phát sinh của nó vẫn còn có những vấn đề chưa được giải quyết rõ ràng do sự không thống nhất giữa các hệ thống sắp xếp phân loại và sự giới hạn về dữ liệu nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng *Paphiopedilum canhii* có vị trí phát sinh độc lập nằm trong phân chi *Paphiopedilum* cùng với nhánh phát sinh của các nhóm *Cochlopetalum*, *Coryopedilum*, *Pardalopetalum*. Tuy nhiên, vị trí phát sinh này của *Paphiopedilum canhii* là không chắc chắn với sự ủng hộ yếu của dữ liệu phân tử. Kết quả này cũng được tìm thấy trong nghiên cứu của Górniak và cộng sự [8] và Vũ Huyền Trang và cộng sự [11]. Từ kết quả này cho thấy rằng, cần có nhiều nghiên cứu tiếp theo với sự bổ sung ý nghĩa về dữ liệu phân tử để có thể xác định được chính xác vị trí phát sinh của *Paphiopedilum canhii*, từ đó trả lời các vấn đề còn tồn tại trong sắp xếp phân chi *Megastaminodium*.

Kết quả của chúng tôi chỉ ra rằng phân chi *Paphiopedilum* là nhóm đơn phát sinh bao gồm năm nhóm và hai nhánh phát sinh chính độc lập với nhau. Nhánh phát sinh thứ nhất bao gồm ba nhóm *Cochlopetalum*, *Coryopedilum*, *Pardalopetalum* cộng với *Paphiopedilum canhii*. Nhánh phát sinh còn lại bao gồm hai nhóm là *Barbata* và *Paphiopedilum* (Hình 2). Kết quả của chúng tôi là tương đồng với các nghiên cứu trước đây [7], [8], [10], [11].

Quần thể loài *Paphiopedilum helenae* được ghi nhận là một nhánh đơn phát sinh nằm trong nhóm *Paphiopedilum* bởi dữ liệu phân tử. Các cá thể của loài này nằm tập trung thành một nhánh, đặc biệt 12 cá thể Lan Hải *P. helenae* của Việt Nam được lấy mẫu trong nghiên cứu này không nằm tập trung mà nằm lẫn cùng các cá thể khác của Việt Nam và Trung Quốc. *Paphiopedilum helenae*, *P. henryanum*, *P. barbigerrum* và *P. herrmannii* dường như có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhau, tuy nhiên mối quan hệ này được hỗ trợ chủ yếu từ dữ liệu phân tử, kết quả tương tự được tìm thấy trong nghiên cứu của Vũ Huyền Trang và cộng sự [11]. Về đặc

điểm hình thái, *Paphiopedilum helenae* có đặc điểm tương đồng với *P. barbigerrum*, *P. henryanum* và *P. insigne* về hình dạng cây và lá nhưng khác biệt dễ nhận thấy là cấu trúc và màu sắc của hoa. *P. helenae* dễ dàng phân biệt với *P. insigne* và *P. henryanum* bởi lá dài lưng hình trứng ngược đến gần tròn, kích thước 1,8-3,5 x 1,5-3 cm, chóp tù hoặc hơi lõm, màu vàng tươi sáng với mép trắng hoặc vàng nhạt, không có chấm màu tím hoặc nâu - tím xen lẫn, cánh hoa thẳng hoặc hơi cong, hình thuôn hẹp hoặc hơi có dạng thìa hẹp, mép nguyên; trong khi đó lá dài lưng của *P. insigne* có hình trứng hoặc trứng - gần tròn, kích thước 5-6 x 4-4,5 cm, chóp tù, màu vàng hơi xanh ở giữa, xen chi chít các chấm nhỏ màu nâu - tím và của loài *P. henryanum* là hình bầu dục gần tròn đến hình trứng rộng, kích thước 3-3,6 x 2,9-3,5 cm, chóp tù hoặc có mũi nhọn ngắn, màu vàng tươi đến xanh vàng nhạt với nhiều đốm nâu - tím xen lẫn, cánh hoa của cả 2 loài này có mép gợn sóng [1], [4].

Kết quả này cho thấy, thông tin di truyền của các quần thể *Paphiopedilum helenae* tại nhiều khu vực ở Việt Nam và Trung Quốc có tính bảo thủ cao, và các biến đổi trong di truyền của các quần thể này chưa tạo thành các biến dị có ý nghĩa đối với sắp xếp phân loại và phát sinh loài.

Nguyễn Thị Hải Yến và cộng sự [12] chỉ ra rằng các loài *Paphiopedilum helenae* là những cá thể có kích thước nhỏ và khó định loại bằng hình thái đặc biệt khi chúng chưa ra hoa. Các tác giả cũng gợi ý rằng, hai chỉ thị phân tử *trnH-psbA* và ITS là những gen tiềm năng cho định loại Lan Hải Helen. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng dữ liệu phân tử được xây dựng từ 8 gen (*atpB-rbcL* spacer, *matK*, *psaA-ycf3ex3*, *trnF-ndhJ*, *trnL* intron, và *trnL-F* spacer, ITS và *ycf1*) đồng ý với các tác giả rằng dữ liệu phân tử hiện tại là có ý nghĩa đối với nghiên cứu phát sinh và định loại Lan Hải Helen, tuy nhiên chúng tôi cũng đề xuất rằng việc áp dụng dữ liệu genome để làm rõ một số vấn đề còn tồn tại trong nghiên cứu về hệ thống và tiến hóa của *Paphiopedilum* là rất cần thiết.

3. Kết luận

Nghiên cứu đã giải thành công 29 trình tự mới của 12 mẫu Lan Hải Helen *Paphiopedilum helenae* đại diện cho các quần thể tại nhiều khu vực khác nhau của Việt Nam. Kết quả phân tích dữ liệu phân tử của nghiên cứu ủng hộ mạnh mẽ rằng *Paphiopedilum* là nhóm đơn phát sinh. Bốn phân chi (subgenus) được ghi nhận bên trong *Paphiopedilum* lần lượt là *Parvisepalum*, *Brachypetalum*, *Megastaminodium* và *Paphiopedilum*. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng *Paphiopedilum canhii* có vị trí phát sinh độc lập nằm trong phân chi *Paphiopedilum* cùng với nhánh phát sinh của các nhóm *Cochlopetalum*, *Coryopedilum*, *Pardalopetalum*. Tuy nhiên, vị trí phát sinh này của *Paphiopedilum canhii* là không chắc chắn với sự ủng hộ yếu của dữ liệu phân tử. Phân chi *Paphiopedilum* là nhóm đơn phát sinh bao gồm năm nhóm và hai nhánh phát sinh chính độc lập với nhau. Nhánh phát sinh thứ nhất bao gồm ba nhóm *Cochlopetalum*, *Coryopedilum*, *Pardalopetalum* cộng với *Paphiopedilum canhii*. Nhánh phát sinh còn lại bao gồm hai nhóm là *Barbata* và *Paphiopedilum*. Quần thể loài *Paphiopedilum helenae* được ghi nhận là một nhánh đơn phát sinh nằm trong nhóm *Paphiopedilum* bởi dữ liệu phân tử. Các cá thể của loài này nằm tập trung thành một nhánh, đặc biệt 12 cá thể Lan Hải *P. helenae* của Việt Nam được lấy mẫu trong nghiên cứu này không nằm tập trung mà nằm lẫn cùng các cá thể khác của Việt Nam và Trung Quốc. Kết quả này cho thấy, thông tin di truyền của các quần thể *Paphiopedilum helenae* tại nhiều khu vực ở Việt Nam và Trung Quốc có tính bảo thủ cao, và các biến đổi trong di truyền của các quần thể này chưa tạo thành các biến dị có ý nghĩa đối với sắp xếp phân loại và phát sinh loài.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam qua nhiệm vụ khoa học và công nghệ quỹ gen cấp quốc gia mã số NVQG-2021/ĐT.25.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Z. J. Liu, X. Q. Chen, and P. J. Cribb, "Paphiopedilum," in *Flora of China*, vol. 25, Z.Y. Wu, and P. H. Raven, Eds, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis and Science Press, Beijing, 2009, pp. 33-44.
 - [2] R. Govaerts, *World checklist of selected plant families (Paphiopedilum)*, the Royal Botanic Gardens, Kew, 2022.
 - [3] L. V. Averyanov, P. J. Cribb, P. K. Loc, and N. T. Hiep, "Slipper Orchids of Vietnam; with an Introduction to the Flora of Vietnam", Compass Press Limited, Royal Botanic Gardens, Kew, London, 2003.
 - [4] L. V. Averyanov, P. J. Cribb, P. K. Loc, and N. T. Hiep, *Slipper Orchids of Vietnam; with an Introduction to the Flora of Vietnam*, Transport Publishing House, (in Vietnamese), Ha Noi, 2004.
 - [5] IUCN, "The IUCN Red List of Threatened Species," 2022. [Online]. Available: <https://www.iucnredlist.org/>. [Accessed on 27 March 2024]
 - [6] A. V. Cox, A. M. Pridgeon, V. A. Albert, and M. W. Chase, "Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae; Orchidaceae); Nuclear rDNA sequences," *Plant Systematics and Evolution*, vol. 208, pp. 197–223, 1997.
 - [7] A. Chochai, I. J. Leitch, M. J. Ingrouille, and M. F. Fay, "Molecular phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid sequences," *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 70, no. 2, pp. 176–196, 2012.
 - [8] M. Górniak, D. L. Szlachetko, A. K. Kowalkowska, J. Bohdanowicz, and C. X. Canh, "Taxonomic placement of *Paphiopedilum canhii* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on cytological, molecular and micromorphological evidence," *Molecular Phylogenetics & Evolution*, vol. 70, pp. 429–441, 2014.
 - [9] Y. I. Lee, M. C. Chung, K. Sydara *et al.*, "Taxonomic placement of *Paphiopedilum rungsuriyanum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on morphological, cytological and molecular analyses," *Bot. Stud.*, vol. 58, p. 16, 2017.
 - [10] C. C. Tsai, P. C. Liao, Y. Z. Ko, C. H. Chen, and Y. C. Chiang, "Phylogeny and phylogeny and historical biogeography of *Paphiopedilum* Pfitzer (Orchidaceae) based on nuclear and plastid DNA," *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, pp. 1-14, 2020.
 - [11] 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, pp. 1-18, 2020.
 - [12] T. H. Y. Nguyen, D. T. Nguyen, X. Q. Ngo, T. P. Do, and H. M. Chu, "A study on the correlation between DNA markers and morphology characteristics for identification of *Paphiopedilum helenae* Aver. of Vietnam," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 05, pp. 178-185, 2022.
 - [13] M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies, and A. Drummond, "Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data," *Bioinformatics*, vol. 28, pp. 1647-1649, 2012.
 - [14] A. Stamatakis, "RAxML-VI-HPC, maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models," *Bioinformatics*, vol. 22, pp. 2688-2690, 2006.
 - [15] D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada, "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing," *Nature Methods*, vol. 9, p. 772, 2012.
 - [16] F. Ronquist and J. P. Huelsenbeck, "MrBayes 3, Bayesian phylogenetic inference under mixed models," *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 1572-1574, 2003.
 - [17] M. A. Miller, W. Pfeiffer, and T. Schwartz, "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees," *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, USA: Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 2010, pp. 1-8.
 - [18] A. Rambaut and A. J. Drummond, "Tracer," 2007. [Online]. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>. [Accessed Jan 05, 2021].
 - [19] V. Manzanilla, A. Kool, N. L. Nguyen, V. H. Nong, T. T. H. Le, and H. De Boer, "Phylogenomics and barcoding of *Panax*: Toward the identification of ginseng species," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 18, pp. 1-14, 2018.
 - [20] C. T. Le, "Molecular phylogeny of *Macrosolen* (Blume) Rchb. (Loranthaceae) from Vietnam based on molecular data," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 5, pp. 261-267, 2022.
 - [21] R. M. Bateman, "Evolution and classification of European orchids: insights from molecular and morphological characters," *Journal Europäischer Orchideen*, vol. 33, pp. 33-119, 2001.
-