VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology

Journal homepage: https://js.vnu.edu.vn/NST

Original Article

Using DNA Barcode *matK* and *ITS* in Molecular Identification of the *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 Plant Collected in Luang Namtha, Laos

Pham Thi Thanh Nhan*

University of Education, Thai Nguyen University, Thai Nguyen, Vietnam

Received 30th March 2024
Revised 26th April 2025; Accepted 28th April 2025

Abstract: The *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 species has been over-exploited and is listed in the Red Data Book of Vietnam. In this article, we present the identification results of the species collected from Luang Namtha province, Laos, using DNA barcodes (*matK* and *ITS*). The *matK* gene fragment and the *ITS* region isolated on the agarose gel had lengths consistent with theoretical calculations, approximately 900 bp and 500 bp, respectively. The BLAST analysis of the *matK* gene and *ITS* region obtained in this study has the highest similarity - 100% and 98.39%, respectively - to *Anoectochilus roxburghii* and *Anoectochilus burmannicus* species in the GenBank. Each sequence exhibits 15 nucleotide position variations compared to the reference sequences. The results of molecular phylogenetic analysis demonstrated that the *matK* and *ITS* barcodes identified the geneus *Anoectochilus*, in which, *ITS* region can be used for differentiation of the *Anoectochilus roxburghii* species.

Keywords: Anoectochilus roxburghii (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840, DNA barcode, Laos, *matK*, *ITS* region.

* Corresponding author.
E-mail address: ptnhanbio@tnue.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5731

Sử dụng DNA barcode *matK* và *ITS* trong định loại phân tử loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840) thu thập tại Luang Namtha, Lào

Phạm Thị Thanh Nhàn*

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên, Thái Nguyên, Việt Nam

Nhận ngày 30 tháng 5 năm 2024
Chỉnh sửa ngày 26 tháng 4 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 4 năm 2025

Tóm tắt: Lan Kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840) đang bị khai thác quá mức và được ghi vào Sách Đỏ ở Việt Nam. Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày kết quả định loại loài Lan kim tuyến được thu thập ở tỉnh Luang Namtha, Lào bằng mã vạch DNA (*matK* và *ITS*). Đoạn gene *matK* và vùng *ITS* phân lập được trên bản gel agarose có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết tương ứng lần lượt là 900 bp và 500 bp. Các trình tự phân lập được có độ tương đồng cao nhất với các loài khác trong chi *Anoectochilus*, lần lượt là 98,39% và 100% với các loài *Anoectochilus roxburghii* và *Anoectochilus burmannicus* trên GenBank. Mỗi đoạn gene có 15 vị trí thay đổi nucleotide so với các trình tự tham chiếu. Kết quả cây phát sinh chủng loại cho thấy, mã vạch *matK, ITS* phát hiện được chi *Anoectochilus*, trong đó *ITS* có ý nghĩa nhận diện loài *Anoectochilus roxburghii.*

Từ khóa: Lan Kim tuyến, DNA barcode, Lào, *matK*, vùng *ITS*.

1. Mở đầu

Lan Kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 thuộc chi *Anoectochilus*, họ Orchidaceae và bộ Orchidales, còn có tên đồng nghĩa là *Chrysobaphus roxburghii* Wall. 1826, *Anoectochilus setaceus Blume*. Đây là cây dược liệu quý hiếm có giá trị kinh tế rất cao. Theo đông y, cây có vị ngọt, tính mát, bổ âm, có tác dụng bồi bổ sức khỏe, chữa suy nhược thần kinh, thanh nhiệt, giải độc, cao huyết áp, viêm gan, long đờm, sốt cao,… [1, 2]. Loài này có khu phân bố rộng, số lượng cá thể ít, tái sinh chậm, điều kiện sống khắc nghiệt, có nguy cơ tuyệt chủng trong tự nhiên, thường được tìm thấy ở Ấn Độ, Nepal, Bhutan, Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan, Lào, Campuchia, Malaysia, Indonesia và Việt Nam. Chi *Anoectochilus* có khoảng 12 loài. Ở Việt Nam, chúng được xếp vào nhóm IA theo Nghị định 32/2006/NĐ-CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại và được liệt kê trong Sách Đỏ là nhóm thực vật có nguy cơ tuyệt chủng EN A1a,c,d [3].

Việc định loại thực vật nói chung và cây thuốc nói riêng có thể dựa vào nhiều phương pháp khác nhau. Các phương pháp truyền thống như phân tích và so sánh các đặc điểm giải phẫu, hình thái, sinh hóa hoặc sinh lý,… đã được báo cáo thành công ở nhiều loài thực vật, chẳng hạn như *Hibiscus mutabilis* L. và *Hibiscus schizopetalus* Hook.f. [4], *Brachiaria mutica* [5], *Pluchea indica* (L.) LESS. và *Pluchea pteropoda* HELMS [6],… Tuy nhiên, việc xác định loài không phải lúc nào cũng hiệu quả, đặc biệt đối với các loài thuộc cùng một phân chi hoặc các bộ phận cơ thể của chúng không còn nguyên vẹn.

Hiện nay, mã vạch DNA (DNA barcode) được sử dụng thường xuyên và rộng rãi để cung cấp bằng chứng bổ sung cho các nghiên cứu phân loại ở cấp độ phân tử. Do đó, xu hướng

* Tác giả liên hệ.
Địa chỉ email: ptnhanbio@tnue.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5731

kết hợp các barcode và đặc điểm hình thái trong xác định loài trở nên rất có ý nghĩa đối với các nghiên cứu phân loại học. Một số locus mã vạch gồm *rpoC1, matK, ITS, rbcL, trnH-psbA,*… đã được ứng dụng hiệu quả trong việc nhận dạng thực vật, trong đó có loài họ Orchidaceae. Đặc biệt, gene *matK* trong lục lạp đã được ứng dụng thành công ở nhiều loài thực vật [7], [8]. Mặt khác, có nhiều nghiên cứu khác chứng minh vai trò của vùng *ITS*. Vùng này nằm trong nhân tế bào, gồm trình tự *ITS1-5.8S-ITS2*, dùng để phân loại các loài động vật, thực vật với tỷ lệ chính xác cao. Các nghiên cứu trước đây đã xác định mối quan hệ của các loài thực vật dựa trên trình tự nucleotide *ITS* ở cây *P. fruticosa, P. scutellaria, P. serrata Balf, P. filicifolia, P. balfouriana* [9], *Scrophularia* và nhiều loài khác là bằng chứng của việc sử dụng vùng *ITS* có hiệu quả trong nhận dạng thực vật [8, 10]. Hương và cộng sự đã sử dụng tổ hợp 3 đoạn gene lục lạp *rbcL, matK, trnH-psbA* để giám định loài Áo cộc (*Liriodendron chinense* [11]. Mạnh và cộng sự [12] đã so sánh các đoạn gene *rbcL* và *trnH-psbA* của phân loài *Abies delavayi. fansipanensis* (Q.P. Xiang) Rurhforth với loài Trung Quốc và cho thấy rằng có một vị trí khác ở nucleotide thứ 455.

Nghiên cứu này trình bày các đặc điểm của mã vạch DNA *matK* và *ITS* phân lập từ cây *Anoectochilus setaceus Blume* được thu thập ở Luong Namtha, Lào để hiểu rõ sự khác biệt về cấp độ phân tử giữa các loài, và ý nghĩa của việc sử dụng kết hợp hai barcode này trong phân loại phân tử, góp phần cung cấp thông tin về mã vạch DNA cho loài thực vật này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu cây lan Kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840) thu thập tại tỉnh Luang Namtha của Lào đã được sử dụng để phát hiện các đặc điểm của trình tự *matK* và *ITS*. Mẫu cây được phân loại dựa vào đặc điểm hình thái tại phòng Thực vật học (mã số LKT0001), được bảo tồn bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật và trồng tại vườn thực nghiệm thuộc khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này là của Invitrogene (ThermoFisher Scientific, Mỹ) và Merck (Darmstadt, Đức) như chloroform, isoamyl, CTAB, PCR Master mix,...

2.2. Phương pháp tách chiết DNA, PCR và giải trình tự

DNA tổng số từ lá tươi non được tách chiết và tinh sạch theo quy trình của Shaghai-Maroof MA và cộng sự [13]. Trình tự vùng *ITS* và đoạn gene *matK* được khuếch đại bằng phương pháp PCR với các cặp mồi được trình bày trong Bảng 1. Trình tự mồi được tham khảo từ nghiên cứu của Nhàn và cộng sự [14].

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi để khuếch đại đoạn gene *matK* và *ITS* của Lan kim tuyến bằng phản ứng PCR

Mồi	Kí hiệu	Trình tự 5'->3'	Kích thước dự kiến (bp)
ITS	ITS-F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	500
	ITS-R	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
matK	matK-F	CGATCTATTCATTCAATATTTC	900
	matK-R	TCTAGCACACGAAGTCGAAGT	

Mỗi phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 25 µL bao gồm 1,5 µL mồi xuôi F (10 pmol. μL^{-1}), 1,5 µL mồi ngược R (10 pmol. μL^{-1}), 1,0 µL DNA tổng số (500 ng/mL), 12,5 µL Master mix 2X và 8,5 µL nước deion. Chu trình nhiệt của PCR bao gồm biến tính trong 4 phút ở 94 °C, 28 chu kỳ (biến tính trong 1 phút ở 94 °C, tiếp hợp mồi trong 1 phút ở 54 °C, tổng

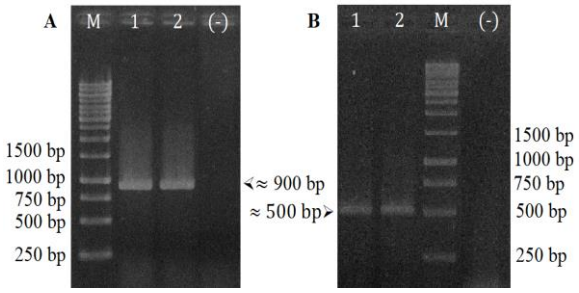
hợp trong 1 phút 30 giây ở 72 °C), và tổng hợp trong 10 phút ở 72 °C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%. Sản phẩm PCR của đoạn gene *ITS* và *matK* được giải trình tự tự động bằng máy ABI PRISM® 3100 Avant với bộ Kit BigDye® Terminator v3.1. Dữ liệu trình tự nucleotide được phân tích và xây dựng cây phát sinh về mối quan hệ di truyền bằng các công cụ Tin sinh học Bioedit, BLAST và MEGA X [15-17].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khuếch đại vùng ITS và đoạn gene matK bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số từ mẫu lá *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 được đánh giá thông qua điện di trên gel agarose và đo quang phổ. Kết quả cho thấy có một băng đặc hiệu và sạch. Tỷ lệ OD_{260}/OD_{280} dao động từ 1,8 đến 2,0 chứng tỏ DNA đảm bảo cho các phản ứng tiếp theo (kết quả không trình bày).

Vùng *ITS* và đoạn gene *matK* được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi matK-F/matK-R và ITS-F/ITS-R. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy băng DNA của đoạn gene *matK* và vùng *ITS* có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết tương ứng lần lượt là 900 bp và 500 bp (Hình 1 A và B). Kết quả này có sự tương đồng với công bố của Nhàn và cộng sự trên cây *Stephania brachyandra* Diels khi sử dụng cùng trình tự mồi [14]. Sản phẩm PCR vùng *ITS* và đoạn gene *matK* của loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 được tinh sạch và giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động ABI PRISM® 3100. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, trình tự phân lập được đọc xuôi và ngược. Sau khi chỉnh sửa bằng Bioedit, các trình tự này được phân tích bằng BLAST trên website NCBI để so sánh mức độ tương đồng, mức độ nhận dạng và xác định tên chi, loài dựa trên các trình tự nucleotide phân lập.



Hình 1. Hình ảnh điện đi sản phẩm PCR đoạn gene *matK* (A) và vùng *ITS* (B). (1-2): sản phẩm PCR đoạn *matK/ITS*; (-): Đối chứng âm (không chứa DNA); M: Marker 1kb.

3.2. Đặc điểm trình tự barcode matK và ITS của loài Anoectochilus roxburghii (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840

Đặc điểm barcode *matK* của loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840.

Với trình tự thu được, kết quả phân tích BLAST cho thấy trình tự *matK* phân lập được thuộc chi *Anoectochilus*, tương đồng cao nhất với *A. burmannicus* (tổng điểm 1164, Query cover 100% và Per. Identity 100%), trong khi có sự sai khác với trình tự *matK* của *A.roxburghii* EU817409.1 (tổng điểm 1134, Query cover 100% và Per. Identity 99,21%). Trong 16 trình tự *matK* của các loài thuộc chi *Anoectochilus* và các chi lan có quan hệ gần với loài nghiên cứu trên ngân hàng gene, tổng số điểm BLAST từ 523 đến 1164, Query cover (%) từ 46- 100%, và Per. identity (%) từ 94,93 đến 100%. Sự khác biệt các giá trị này do sự khác nhau về vị trí một số nucleotide và kích thước trình tự *matK* phân lập được (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả BLAST trình tự đoạn gene *matK* các loài thuộc chi *Anoectochilus*

STT	Tên loài	Mã số	Tổng điểm	Query cover (%)	Per. identity (%)
1	Anoectochilus _MatK				
2	*Anoectochilus burmannicus*	NC_066958.1	1164	100	100

3	*Anoectochilus pingbianensis*	MK451793.1	1158	100	99,84
4	*Ludisia discolor (Lan Gấm)*	NC_030540.1	1158	99	100
5	*Anoectochilus chapaensis*	MW589500.1	1158	100	99,84
6	*Anoectochilus elatus*	KU687098.1	1153	97	100
7	*Anoectochilus hainanensis*	MK451792.1	1136	100	99,21
8	*Anoectochilus emeiensis*	NC_033895.1	1136	100	99,21
9	*Anoectochilus formosanus*	NC_061756.1	1136	100	99,21
10	*Anoectochilus zhejiangenesis*	NC_054353.1	1136	100	99,21
11	*Anoectochilus roxburghii*	EU817409.1	1134	100	99,21
12	*Anoectochilus koshunensis*	EU797512.1	1129	100	99,05
13	*Anoectochilus sikkimensis*	MW020694.1	1026	100	94,93
14	*Anoectochilus baotingenesis*	MW020665.1	523	46	98,64
15	*Odontochilus tortus*	MW589530.1	1038	96	96,15
16	*Macodes petola*	MW589527.1	1038	96	96,15
17	*Goodyera malipoensis*	MW589514.1	1024	96	95,83

Ghi chú: Anoectochilus -MatK là trình tự đoạn gene *matK* của mẫu nghiên cứu.

Mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Anoectochilus* được xác định dựa trên trình tự vùng *matK* bằng phần mềm MEGAX. Ma trận khoảng cách theo cặp về trình tự vùng *matK* của *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và 12 loài Anoectochilus (Bảng 3) cùng cây phát sinh loài của chúng đã được xây dựng bằng cách sử dụng MEGA X và phương pháp Neighbor-Joining (Hình 2). Kết quả đã xác nhận rằng hệ số chênh lệch giữa các vùng *ITS* của *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và 17 loài *Anoectochilus* khác dao động từ 0,00 đến 1,812. Kết quả chỉ ra rằng trình tự *ITS* của *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 nằm cùng nhánh với *Anoectochilus burmannicus*.

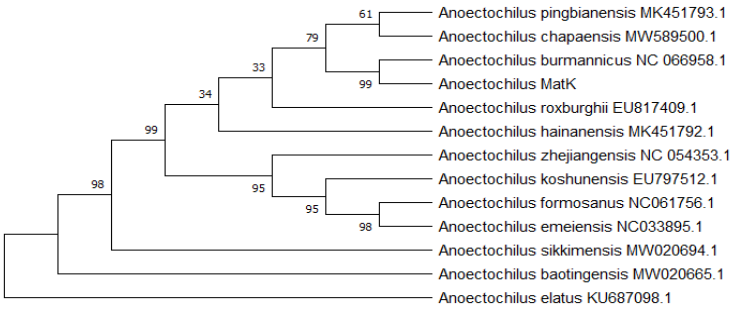
Bảng 3. Bảng ma trận khoảng cách di truyền dựa trên các trình tự đoạn gene *matK*

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
(1)		0,004	8,272	0,003	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000	0,002	0,000	34,700
(2)	0,009		8,264	0,004	0,003	0,000	0,003	0,000	0,000	0,004	0,003	0,004	34,694
(3)	0,542	0,557		8,276	8,272	8,282	8,258	8,264	8,264	8,383	8,272	8,272	34,837
(4)	0,007	0,009	0,549		0,003	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	34,700
(5)	0,002	0,007	0,546	0,005		0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,000	0,002	34,700
(6)	0,009	0,000	0,556	0,009	0,007		0,003	0,000	0,000	0,004	0,003	0,004	34,694

(7)	0,009	0,007	0,559	0,005	0,007	0,007		0,003	0,003	0,004	0,003	0,004	34,694
(8)	0,009	0,000	0,557	0,009	0,007	0,000	0,007		0,000	0,004	0,003	0,004	34,694
(9)	0,009	0,000	0,557	0,009	0,007	0,000	0,007	0,000		0,004	0,003	0,004	34,694
(10)	0,000	0,009	0,550	0,007	0,002	0,009	0,009	0,009	0,009		0,002	0,000	33,863
(11)	0,002	0,007	0,546	0,005	0,000	0,007	0,007	0,007	0,007	0,002		0,002	34,700
(12)	0,000	0,009	0,542	0,007	0,002	0,009	0,009	0,009	0,009	0,000	0,002		34,700
(13)	1,321	1,812	1,184	1,321	1,321	1,812	1,611	1,812	1,812	0,943	1,321	1,321	

Chú thích số viết tắt: (1) Anoectochilus_MatK, (2) *Anoectochilus zhejiangenesis,* (3) *Anoectochilus sikkimensis,* (4) *Anoectochilus roxburghii,* (5) *Anoectochilus pingbianensis,* (6) *Anoectochilus koshunensis,* (7) *Anoectochilus hainanensis,* (8) *Anoectochilus formo*sanus, (9) *Anoectochilus emeiensis,* (10) *Anoectochilus elatus,* (11) *Anoectochilus chapaensis,* (12) *Anoectochilus burmannicus,* (13) *Anoectochilus baotingenesis.*

Gần đây, phương pháp khả năng tối đa (Maximum Likelihood) đã được áp dụng để phân tích trình tự DNA [14, 17-20]. Kết quả BLAST trình tự đoạn gene *matK* của Đức và cộng sự [19] có mức độ tương đồng cao hơn so với trình tự *rbcL*, thậm chí xuất hiện một số loài hoàn toàn không liên quan đến loài lan, số khác thuộc về chi khác trong họ Orchidaceae như *Platythelys querceticola hoặc Cephalanthera falcata forma, Nothoalsomitra suberosa và Cucumis sativus* [20]. Kết quả phân tích phát sinh loài gene *matK* đối với *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 cho thấy cây được vẽ theo tỷ lệ, với chiều dài nhánh được đo bằng số lượng thay thế trên mỗi vị trí. Phân tích này bao gồm 12 trình tự *matK* trong GenBank và mẫu *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840. Tất cả các vị trí có khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đều bị loại bỏ. Trong Hình 2, 13 loài thuộc chi *Anoectochilus* được nhóm lại thành hai nhánh, nhánh chính thứ hai được chia thành nhiều phân nhóm với hệ số boostrap từ 33-99%, trong đó *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và *A. burmannicus*.



Hình 2. Phân tích phát sinh chủng loại phân tử xây dựng dựa trên trình tự đoạn gene *matK*. Thu được 13 trình tự *matK* trong đó có mẫu *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và 12 trình tự *matK* thuộc chi *Anoectochilus* trên GenBank. Cây được vẽ theo tỷ lệ, với chiều dài nhánh được đo bằng số lượng thay thế trên mỗi vị trí. Các vị trí codon được bao gồm là thứ 1 + thứ 2 + thứ 3 + Không mã hóa. Tất cả các vị trí có khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đều bị loại bỏ (tùy chọn xóa hoàn toàn). Giá trị bootstrap nằm phía trên các nút của nhánh. Các chữ in hoa và số trong ngoặc là mã số Accession của loài *Anoectochilus* được công bố trên GenBank.

Đặc điểm barcode *ITS* của loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840.

Kết quả so sánh trình tự *ITS* phân lập được (*Anoectochilus ITS*) bằng BLAST cho thấy mẫu nghiên cứu thuộc chi *Anoectochilus,* tổng điểm dao động từ 604 đến 660, Query cover từ 92 đến 98% và Per. Identity từ 92,05 đến 98,39%, sự tương đồng cao nhất với loài *A. roxburghii* với mã số MK451732.1 trên GenBank (Bảng 4). Kết quả này khác với *matK* là do, trình tự *Anoectochilus _ITS* phân lập được có kích thước chênh lệch không lớn so với các loài đã công bố trên GenBank.

Bảng 4. Kết quả BLAST trình tự vùng *ITS* các loài thuộc chi *Anoectochilus*

STT	Tên loài	Mã số	Tổng điểm	Query cover (%)	Per. identity (%)
1	Anoectochilus _ITS				
2	*Anoectochilus roxburghii*	MK451732.1	660	98	98,39
3	*Anoectochilus hainanensis*	OP787946.1	651	98	97,61
4	*Anoectochilus burmannicus*	MW721051.1	651	98	98,37
5	*Anoectochilus pingbianensis*	MK451731.1	649	98	97,85
6	*Anoectochilus chapaensis*	MW721056.1	645	98	98,09
7	*Anoectochilus formosanus*	GQ328777.1	645	98	97,84
8	*Anoectochilus sikkimensis*	MW721078.1	640	98	97,82
9	*Anoectochilus medogenesis*	MW721065.1	640	98	97,82
10	*Anoectochilus calcareus*	MW721055.1	640	98	97,82
11	*Anoectochilus baotingenesis*	MW721046.1	640	98	97,82
12	*Anoectochilus setaceus*	MT872105.1	636	98	97,81
13	*Anoectochilus nandanensis*	MW721069.1	634	98	97,55
14	*Anoectochilus malipoensis*	MW721063.1	634	98	97,55
15	*Anoectochilus elatus*	MW721057.1	634	98	97,55
16	*Anoectochilus zhejiangenesis*	MT872106.1	630	98	97,53
17	*Anoectochilus albolineatus*	MW721044.1	623	98	98,03
18	*Anoectochilus koshunensis*	KT334331.1	604	97	96,68
19	*Goodyera schlechtendaliana*	MG730133.1	640	92	92,05

Mối quan hệ di truyền giữa các loài thuộc chi *Anoectochilus* được xác định dựa trên trình tự vùng *ITS* bằng phần mềm MEGAX. Ma trận khoảng cách theo cặp về trình tự vùng ITS của *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và 17 loài Anoectochilus cùng cây phát sinh loài của chúng đã được xây dựng bằng cách sử dụng MEGA X và phương pháp Neighbor-Joining (như trong Hình 3). Kết quả đã xác nhận rằng hệ số chênh lệch giữa các vùng *ITS* của *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và 17 loài *Anoectochilus* khác dao động từ 0,00 đến 0,466 (Bảng 5). Kết quả chỉ ra rằng vùng *ITS* của *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 nằm cùng nhánh với *Anoectochilus roxburghii* (MK451732.1).

Bảng 5. Bảng ma trận khoảng cách di truyền dựa trên các trình tự vùng *ITS*

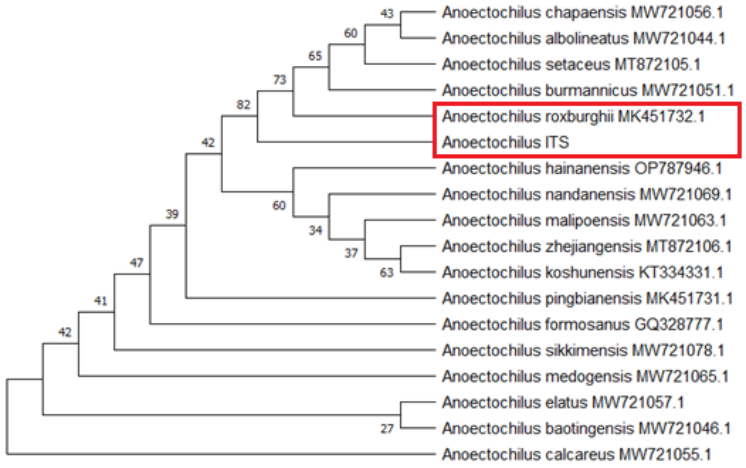
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	16	18
1		0,007	0,006	0,006	0,003	0,006	0,007	0,006	0,007	0,007	0,005	0,006	0,007	0,004	0,006	0,003	0,006	5,025
2	0,011		0,003	0,007	0,006	0,003	0,000	0,003	0,000	0,003	0,000	0,003	0,004	0,007	0,003	0,006	0,003	5,019
3	0,008	0,003		0,007	0,004	0,000	0,003	0,000	0,003	0,004	0,003	0,000	0,003	0,006	0,000	0,004	0,000	5,019
4	0,008	0,014	0,011		0,004	0,007	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,007	0,007	0,003	0,007	0,004	0,007	5,020
5	0,003	0,008	0,006	0,006		0,004	0,006	0,004	0,006	0,006	0,006	0,004	0,006	0,003	0,004	0,000	0,004	5,021
6	0,008	0,003	0,000	0,011	0,005		0,003	0,000	0,003	0,004	0,003	0,000	0,003	0,006	0,000	0,004	0,000	5,019
7	0,011	0,000	0,003	0,014	0,008	0,003		0,003	0,000	0,003	0,000	0,003	0,004	0,007	0,003	0,006	0,003	5,019
8	0,008	0,003	0,000	0,011	0,006	0,000	0,003		0,003	0,004	0,003	0,000	0,003	0,006	0,000	0,004	0,000	5,019
9	0,011	0,000	0,003	0,014	0,008	0,003	0,000	0,003		0,003	0,000	0,003	0,004	0,007	0,003	0,006	0,003	5,019
10	0,014	0,003	0,006	0,017	0,011	0,006	0,003	0,006	0,003		0,003	0,004	0,005	0,007	0,004	0,006	0,004	5,035
11	0,008	0,000	0,003	0,014	0,008	0,003	0,000	0,003	0,000	0,003		0,003	0,004	0,007	0,003	0,006	0,003	5,649
12	0,008	0,003	0,000	0,011	0,005	0,000	0,003	0,000	0,003	0,006	0,003		0,003	0,006	0,000	0,004	0,000	5,019
13	0,011	0,005	0,003	0,014	0,008	0,003	0,005	0,003	0,005	0,008	0,006	0,003		0,006	0,003	0,006	0,003	5,024
14	0,005	0,011	0,008	0,003	0,003	0,008	0,011	0,008	0,011	0,014	0,011	0,008	0,011		0,006	0,003	0,006	5,019
15	0,008	0,003	0,000	0,011	0,006	0,000	0,003	0,000	0,003	0,006	0,003	0,000	0,003	0,008		0,004	0,000	5,019
16	0,003	0,008	0,006	0,006	0,000	0,006	0,008	0,006	0,008	0,011	0,008	0,006	0,008	0,003	0,006		0,004	5,021
17	0,008	0,003	0,000	0,011	0,006	0,000	0,003	0,000	0,003	0,006	0,003	0,000	0,003	0,008	0,000	0,006		5,019
18	0,438	0,451	0,451	0,432	0,432	0,451	0,451	0,451	0,451	0,466	0,463	0,451	0,457	0,423	0,451	0,432	0,451	

Chú thích số viết tắt: 1- Anoectochilus-ITS; 2- *Anoectochilus zhejiangenesis*; 3- *Anoectochilus sikkimensis*; 4- *Anoectochilus setaceus*; 5- *Anoectochilus roxburghii*; 6- *Anoectochilus pingbianensis*; 7- *Anoectochilus nandanensis*; 8- *Anoectochilus medogenesis*; 9- *Anoectochilus malipoensis*; 10- *Anoectochilus koshunensis*; 11-*Anoectochilus hainanensis*; 12- *Anoectochilus formosanus*; 13- *Anoectochilus elatus*; 14- *Anoectochilus chapaensis*; 15-*Anoectochilus calcareus*; 16- *Anoectochilus burmannicus*; 17- *Anoectochilus baotingenesis*; 18- *Anoectochilus albolineatus*.

Ngược lại với trình tự *matK*, bộ dữ liệu vùng *ITS* có giá trị bootstrap thấp hơn (Hình 3). Chi *Anoectochilus* được tách thành hai nhánh chính. Nhánh chính thứ hai tiếp tục chia thành hai nhánh thứ cấp và nhánh thứ cấp thứ hai chia thành nhiều nhánh và phân nhánh. Trong đó, trình tự *ITS* phân lập được cùng nhóm với *A. roxburghii* với mã số MK451732.1 trên GenBank, giống với kết quả BLAST. Vì vậy, trong trường hợp mã vạch giữa các loài thuộc chi *Anoectochilus* và để xác định loài *A. roxburghii*, trình tự *ITS* là ứng cử viên mã vạch tốt hơn *matK*.

Đức và cộng sự [19] đã phân tích kích thước hiệu chỉnh của vùng gene *ITS1, ITS2* (393 bp và 477 bp) bằng MEGA 6.0. Kết quả cho thấy vùng bảo tồn của trình tự *ITS1* là 365/393, *ITS* 2 là 438/477 vị trí. Vùng biến đổi của *ITS1* có 1 vị trí nucleotide khác biệt của 1 loài so với các loài khác và 25 vị trí khác biệt từ 2 loài trở lên so với các loài còn lại. Vùng biến đổi của *ITS2* có 6 vị trí khác biệt của 1 loài so

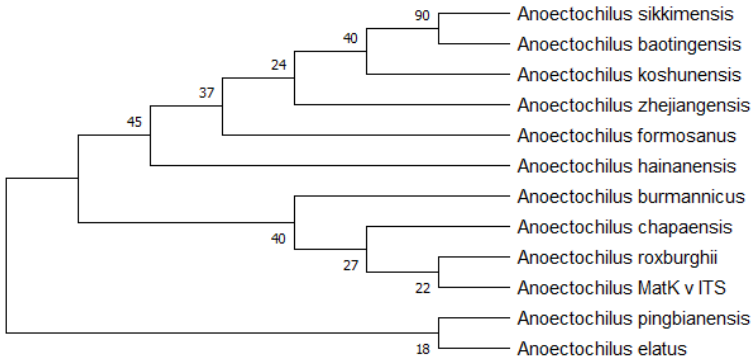
với các loài khác và 29 vị trí có sự khác biệt từ 2 loài trở lên so với các loài còn lại. Nhóm tác giả đề xuất dùng vùng gene *ITS1* và *ITS2* để đánh giá mối quan hệ di truyền và xác định hai loài *Anoectochilus roxburhii*, *Anoectochilus formosanus* [19].



Hình 3. Phân tích phát sinh loài phân tử của vùng *ITS*. 18 trình tự *ITS* đã thu được bao gồm mẫu *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 và 17 trình tự *ITS* trên GenBank. Cây được vẽ theo tỷ lệ, với chiều dài nhánh được đo bằng số lượng thay thế trên mỗi vị trí. Các vị trí codon được bao gồm là thứ 1 + thứ 2 + thứ 3 + Không mã hóa. Tất cả các vị trí có khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đều bị loại bỏ (tùy chọn xóa hoàn toàn). Giá trị bootstrap nằm phía trên các nút của nhánh. Các chữ in hoa và số trong ngoặc là mã số Accession của loài Anoectochilus được công bố trên GenBank.

3.3. Sử dụng kết hợp matK và ITS định loại Anoectochilus roxburghii (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840

Trong số các loài thuộc chi *Anoectochilus*, một số loài có cả trình tự gene *matK* và vùng *ITS* được tìm thấy trên GenBank. Trong đó, 11 loài có trình tự của cả 2 barcode này đảm bảo tính tương đồng cho phân tích. Cây phát sinh gene được thiết lập dựa trên sự kết hợp trình tự *matK* và *ITS* (*matK/ITS*). Mẫu *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840 được phân bố trong một nhánh với *Anoectochilus roxburghii* với giá trị bootstrap là 22% (Hình 4).



Hình 4. Cây phát sinh loài lan Kim tuyến được xây dựng trên sự kết hợp trình tự đoạn gene *matK* với vùng *ITS* (*matK/ITS*). Giá trị Bootstrap nằm phía trên các nút của nhánh.

Cùng với cách tiếp cận này, Thu và cộng sự đã sử dụng trình tự vùng *ITS* và đoạn gene *rpoC1* để định danh loài *Anoectochilus* thu thập ở Thuận Châu, Sơn La. Chiều dài lần lượt là 666 bp và 628 bp. Kết quả BLAST xác định mẫu Anoectochilus LKT-SL là loài *Anoectochilus setaceus*. Khoảng cách di truyền giữa mẫu này và các loài trên GenBank dựa trên trình tự *ITS* và *rpoC1* là thấp, ở mức 0,2% [18]. Trong nghiên cứu của Đức và cộng sự [19], chín mã vạch *DNA matK, rbcL, rpoB1, rpoB2, rpoC1, rpoC2, ITS, ITS1* và *ITS2* đã được sử dụng để phân tích di truyền. Dựa trên trình tự *ITS1* và *ITS2*, cây phát sinh được xây dựng để thể hiện mối quan hệ và sự phân biệt giữa các loài thuộc chi *Anoectochilus* và *Lusidia*. Trong khi đó, Thế và cộng sự [20] đã chứng minh rằng *rbcL* và *matK* có hiệu quả khác nhau trong định loại lan Kim tuyến. Mã vạch *rbcL* đáng tin cậy hơn mã vạch *matK* hoặc sự kết hợp của cả hai gene này có ý nghĩa phân loại phân tử.

4. Kết luận

Với những dữ liệu thu được, barcode *matK* và *ITS* được sử dụng để nhận diện chi *Anoectochilus*. Barcode *ITS* có thể được xem là ứng cử viên trong định loại loài *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Wall. ex Lindl. 1840. Hai barcode này là công cụ hữu hiệu hỗ trợ phương pháp hình thái giải phẫu học so sánh trong việc xác định loài và sắp xếp lại hệ thống phân loại.

Tài liệu tham khảo

[1] N. T. Ban, List of Vietnamese Plant Species, Agricultural Publishing House, Hanoi, 2005.

[2] D. T. Loi, Medicinal Plants and Drugs from Vietnam, Medical Publising House, Hanoi, 2006, pp. 780-781.

[3] Vietnam Ministry of Science and Technology, Red Data Book of Vietnam, Publishing House of Natural Sciences and Technology, 2007, pp. 780-781.

[4] T. T. N Hai, Comparison of Morphological and Anatomical Characteristics of Hibiscus mutabilis L. and Hibiscus schizopetalus Hook.f., which belong to the Geneus Hibiscus-Cotton Family (Malvaceae), Journal of Science and Technology, No. 18, 2028, pp. 44-57.

[5] P. T. Hang, N. K. Nghia, H. T. Tham, Investigating the Growth and Anatomical Characteristics of Brachiaria mutica grown in the Nethouses, Journal of Science - Can Tho University, Vol. 57, No. 5B, 2021, pp. 205-215.

[6] P. T. Hang, N. N. P. Thao, N. N. Tran, P. T. Dat, N. P. Dam, D. T. Khang, N. D. Do, N. T. H. Phuc, Observation of Morphological Characteristics and Anatomical Structures as well as Evaluation of Antibacterial Activity of Pluchea indica (L.) LESS. and Pluchea pteropoda HELMS, Plants, Journal of Science - Can Tho University, Vol. 58, No. 2, 2022, pp. 132-139.

[7] S. Letsiou, P. Madesis, E. Vasdekis, C. Montemurro, M. E. Grigoriou, G. Skavdis, V. Moussis, A. E. Koutelidakis, A. G. Tzakos, DNA Barcoding as a Plant Identification Method, *Appl. Sci.*, Vol. 14, No. 4, 2024, pp. 1415, https://doi.org/10.3390/app14041415.

[8] H. Li, W. Xiao, T. Tong, Y. Li, M. Zhang, X. Lin, X. Zou, Q. Wu, X. Guo, The Specific DNA Barcodes Based on Chloroplast Genes for Species Identification of Orchidaceae Plants, Scientific Reports, Vol. 11, 2021, pp. 1424.

[9] H. T. T. Hue, N. T. B. Ngoc, D. Q. Ha, L. T. T. Hien, N. X. Canh, Analysis of DNA Barcode Region ITS and matK in some Polyscias plants of Vietnam, TNU Journal of Science and Technology, Vol. 227, No. 5, 2022, pp. 318-325.

[10] T. Yang, T. L. Zhang, Y. H. Guo, X. Liu, Identification of Hybrids in *Potamogeton*: Incongruence between Plastid and *ITS* Regions Solved by a Novel Barcoding Marker PHYB, PLOS ONE, Vol. 11, No. 11, 2016, pp. e0166177.

[11] B. T. M. Huong, N. V. Phong. Study on Identification of DNA Barcode Sequence of Liriodendron Chinense to Identify Plant Species, Journal of Forestry Science and Technology, Vol. 5, 2020, pp. 012-021.

[12] N. H. Manh, L. T. T. Hang, N. T. H. Mai, N. T. P. Trang, N. V. Sinh, Molecular Characteristic of rbcL and trnH-psbA of *Abies delavayi subsp. fansipanensis* (Xiang Q.P.) Rurhforth in Vietnam, Vietnam Journal of Science and Technology, Vol. 63, No. 3, 2021, pp. 28-32.

[13] M. A. S. Maroof, K. M. Soliman, R. A. Jorgenesen, R. W. Allard, Ribosomal DNA Sepacer-length Polymorphism in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America, Vol. 81, No. 24, 1984, pp. 8014-8018, http://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014.

[14] P. T. T Nhan, L. P Dung, P. T. N. Khanh, T. Xaykham, C. H. Mau, DNA Barcode of MatK Combined with ITS Effectively Distinguishes the Medicinal Plant *Stephania brachyandra* Diels Collected in Laocai, Vietnam, Journal of Applied Biology and Biotechnology, Vol. 9, No. 6, 2021, pp. 63-70.

[15] K. Tamura, 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, 1993, pp. 512-526.

[16] J. Felsenstein, Confidence Limits on Phylogeneies: An Approach using the Bootstrap, Evolution, Vol. 39, 1985, pp. 783-791.

[17] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms, Molecular Biology and Evolution, Vol. 35, 2018, pp. 1547-1549.

[18] L. T. M. Thu, T. T. Thuy, C. H. Mau, The Species Identification with DNA Barcode and the Sequence Analysis of ITS and rpoC1 of *Anoectochilus Sample Collected at Thuan Chau, Son La, Vietnam*, Journal of Science and Technology - Thai Nguyen University, Vol. 9, 2019, pp. 107-114.

[19] H. H. Duc, N. T. Giang, D. H. Xo, H. T. Loan, P. D. Yen, T. T. Tuan, D. D. Giap, Research on using some DNA Barcodes in Genetic Analysis and Identification of some Anoectochilus spp. Plants, Journal of Science - Can Tho University, Vol. 55, No. 1, 2019, pp. 14-23.

[20] H. V. The, T. T. K Phuong, V. T. T. Tram, S. Widiarsih, Comparison of *matK* and *rbcL* DNA Barcodes for Genetic Classification of Jewel Orchid Accessions in Vietnam, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, Vol. 19, No. 1, 2021, pp. 93, http://doi.org/10.1186/s43141-021-00188-1.