

Xác định vị trí phân loại mẫu *Alocasia* sp. thu thập ở Xuân Sơn (Phú Thọ) trên cơ sở phân tích 3 vùng gen *matK*, *petD* và *trnY-trnE*

Bùi Hồng Quang¹, Nguyễn Văn Dư^{1*}, Lê Thị Mai Linh¹, Lê Xuân Đắc², Hà Minh Tâm³

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Ngày nhận bài 18/1/2019; ngày chuyển phản biện 25/1/2019; ngày nhận phản biện 28/2/2019; ngày chấp nhận đăng 4/3/2019

Tóm tắt:

Bài báo phân tích sự khác biệt giữa mẫu *Alocasia* sp. 87 mới thu được ở Phú Thọ với các loài trong chi *Alocasia* và các chi liên quan dựa trên phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*, *petD*, *trnY-trnE*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trình tự các axit nucleotide của mẫu nghiên cứu tương đồng với chi *Alocasia* 98%, chi *Cocolasia* 93%. Kết quả phân tích vùng gen *matK* ghi nhận, mẫu *Alocasia* sp. 87 tách biệt ra khỏi nhóm của các loài đã biết thuộc chi *Alocasia*. Đối với vùng gen *petD* ghi nhận mẫu *Alocasia* sp. 87 thuộc cùng nhóm với chi *Alocasia* và *Leucocasia*, tuy nhiên mẫu này đã có sự tách biệt tạo thành một nhánh riêng. Nhóm tác giả nghi ngờ mẫu *Alocasia* sp. 87 có thể thuộc về một loài mới.

Từ khóa: *Alocasia* sp., *matK*, *petD*, Phú Thọ, *TrnY-TrnE*, Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, nhất là trong lĩnh vực công nghệ sinh học, các nghiên cứu sâu hơn về các yếu tố di truyền đặc biệt được quan tâm trong công tác phân loại thực vật. Các nghiên cứu này đã giúp cho các kết quả phân loại thực vật trở nên rõ ràng hơn, nhất là ở các taxon có nhiều đặc điểm hình thái học không biến động nhiều theo các điều kiện sống, giai đoạn phát triển của từng cá thể. Các kết quả nghiên cứu về các yếu tố di truyền (như giải trình và so sánh trình tự nucleotide ở các loài hay các taxon khác nhau) đã hỗ trợ rất nhiều trong phân tích mối quan hệ giữa các taxon thực vật. Ở họ Ráy (*Araceae*), đã có rất nhiều nghiên cứu về mối quan hệ giữa các taxon trong họ này dựa trên các kết quả nghiên cứu về sinh học phân tử, giải trình gen, so sánh vị trí của các vùng gen *MatK*... Ví dụ, kết quả giải trình gen lục lạp loài *A. macrorrhizos* của Bin Wang và Limin Han [1], hay dùng phương pháp PCR để định loại loài *Alocasia odora* của Hagino và cs [2]. Năm 2012, Nauheimer và cs đã xây dựng sơ đồ phát sinh chủng loại của các chi *Alocasia*, *Colocasia*, *Remusatia* và *Steudnera* ở khu vực Malaysia dựa trên các kết quả phân tích trình tự gen của các loài trong các chi nghiên cứu [3]. Chi Ráy - *Alocasia* ở Việt Nam bao gồm 7 loài và được phân bố rộng rãi từ Bắc vào Nam

[4]. Các nghiên cứu về mặt hình thái học của các loài đã chỉ ra những đặc điểm phân biệt ở hầu hết số loài trong chi là tương đối rõ ràng. Mới đây, một số mẫu tiêu bản và mẫu ADN đã được thu thập tại Vườn quốc gia Xuân Sơn (Phú Thọ). Về đặc điểm hình thái, chúng tôi đã xác định được 2 chi *Vietnamocasia* (mẫu *Vietnamocasia* NVD1 và *Vietnamocasia* NVD2) và chi *Alocasia* (mẫu *Alocasia* sp. 87, 88.1 và 88.2), trong đó 1 mẫu thuộc loài *A. odora* K. Koch. Tuy nhiên, xem xét kỹ các đặc điểm về bông mo của cây, mẫu *Alocasia* 87 khá tương đồng với loài *A. odora* K. Koch. Để xác định chính xác hơn cả 5 mẫu thu thập được ở Vườn quốc gia Xuân Sơn, chúng tôi đã tiến hành giải mã 3 vùng gen *matK*, *petD* và *trnY-trnE* và xác định vị trí của chúng trong họ Ráy.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

5 mẫu thu thập tại tỉnh Phú Thọ đã được sử dụng cho nghiên cứu này (bảng 1). Các mẫu đều gồm 2 phần mẫu tiêu bản (xác định loài bằng đặc điểm hình thái) và mẫu mô tế bào - mẫu lá (phân tích ADN). Mẫu ADN được bảo quản trong túi cùng với silica gel ở thực địa và sau đó được lưu giữ ở tủ âm 30°C trong phòng thí nghiệm cho đến khi mẫu được sử dụng cho phân tích ADN. Các mẫu *Alocasia odora*

*Tác giả liên hệ: email: vandul78@gmail.com

Determination of taxonomic location of the *Alocasia* sp. sample collected in Xuan Son (Phu Tho province) based on analysis results of genes *matK*, *petD* and *trnY-trnE*

Hong Quang Bui¹, Van Du Nguyen^{1*}, Thi Mai Linh Le¹, Xuan Duc Le², Minh Tam Ha³

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

²Vietnam - Russia Tropical Center

³Hanoi Pedagogical University 2

Received 18 January 2019; accepted 4 March 2019

Abstract:

The paper analysed the difference between the sample of *Alocasia* sp. 87 recently collected from Phu Tho province of Vietnam and the samples of *Alocasia* species and related genera based on nucleotide sequence analysis of *matK*, *petD*, and *trnY-trnE* gene regions. The results showed that the studied sample was similar 98% to *Alocasia* genus, and 93% to *Coccolasia* genus. The results of *matK* genomic region analysis also recorded that the sample of *Alocasia* sp. 87 was separated from the known species of *Alocasia* genus. For the *petD* gene region, the sample of *Alocasia* sp. 87 was similar to the group of the genera *Alocasia* and *Leucocasia*; however, it seems to separate into a different branch. The authors suspect that *Alocasia* sp. 87 could be a new species.

Keywords: *Alocasia* sp., *matK*, *petD*, Phu Tho, *trnY-trnE*, Vietnam.

Classification number: 1.6

Bảng 1. Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Tên khoa học	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ thu mẫu
1	<i>Alocasia</i> sp.	<i>Alocasia</i> sp. 87	Tỉnh Phú Thọ	"N21 11.014 E105 05.832" "53 m"
2	<i>Alocasia odora</i>	<i>Alocasia odora</i> 88.1	Tỉnh Phú Thọ	"N21 11.014 E105 05.832" "53 m"
3	<i>Alocasia odora</i>	<i>Alocasia odora</i> 88.2	Tỉnh Phú Thọ	"N21 11.014 E105 05.833" "57 m"
5	<i>Vietnamocasia dauae</i>	<i>Vietnamocasia dauae</i> . NVD1		
6	<i>Vietnamocasia dauae</i>	<i>Vietnamocasia dauae</i> . NVD2		

88.1, *Alocasia odora* 88.2, *Vietnamocasia dauae* NVD1 và *Vietnamocasia dauae* NVD2 đã được xác định loài trên cơ sở các đặc điểm hình thái. Tuy nhiên, mẫu *Alocasia* sp. 87 cũng chỉ xác định được đến chi *Alocasia*.

Phương pháp nghiên cứu

Mẫu lá được nghiền trong nitrogen lỏng thành dạng bột mịn. Tách chiết ADN tổng số bằng kit Dneasy plant mini kit - hãng Qiagen với quy trình được thực hiện theo nhà sản xuất. Nhân bản PCR (Polymerase Chain Reaction) các vùng gen *matK*, *petD*, *trnY-trnE* bằng GeneAmp PCR System 9700 system. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 50 ml, gồm 25 ml PCR Mastermix, 1 ml mỗi xuôi F (10 pM), 1 ml mỗi ngược R (10 pM), 2 ml ADN tổng số, 21 ml nước cất để ion. Chu trình chạy PCR được tiến hành theo chu kỳ nhiệt: 3 phút ở 95°C, 30 chu kỳ (50 giây 95°C, 1 phút 52°C, 1 phút 72°C) và sau đó là 1 chu kỳ ở 72°C trong 8 phút.

Cặp mồi giải mã trình tự nucleotide vùng gen *matK* [5] như sau: *matK* 390: 5'-CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTC - 3' và *matK* 1326: 5'- TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T - 3'. Cặp mồi giải mã trình tự vùng gen *petD* [6] như sau: *petDR*: 5'- AAT TAT GTC CCA TCC CTT TAG C - 3' và *PetDF*: 5'- GGG AGT TAA CAAAGAAAC CTG ACT - 3'. Cặp mồi giải mã trình tự vùng gen *trnY-trnE* [7] như sau: *F*: 5'- CAA AGC CAG CGG ATT TAC AA - 3' và *R*: 5'- CCC CAT CGT CTA GTG GCC TA - 3'.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng Qiaquick gel extranction kit (Qiagen, Đức). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch sẽ được gửi đi đọc trình tự các vùng gen tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phân tích so sánh các vùng gen giữa các loài bằng phần mềm Bioedit, Chromas Pro. Phần mềm MEGA 6.0 [8] để phân tích khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp Minimum Likelihood (ML) [9].

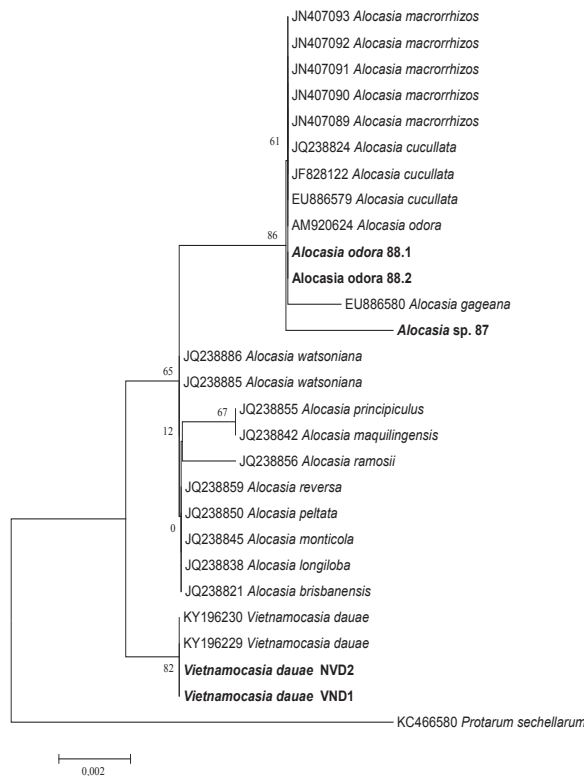
Kết quả và thảo luận

Phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*

Trong nghiên cứu này, trình tự vùng gen *matK* của 5 mẫu nghiên cứu đã được xác định với kích thước khoảng 700 bp. Trên cơ sở trình tự nucleotide vùng gen *matK* của 5 mẫu nghiên cứu, cùng với trình tự gen các mẫu thuộc các loài khác đã được công bố trên GenBank, cây phát sinh phả hệ đã được xây dựng (hình 1). Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra sự tách biệt rõ ràng giữa 2 chi *Alocasia* và *Vietnamocasia*, trong đó các loài cùng một chi kết hợp với nhau và hình thành 1 nhánh tiến hóa, giá trị bootstrap khá cao, 65% đối với chi *Alocasia* và 85% đối với *Vietnamocasia*. Tuy nhiên, mẫu *Alocasia* sp. 87 tách biệt ra khỏi nhóm của các loài

thuộc chi *Alocasia* nên đây có thể là một loài mới thuộc chi *Alocasia*.

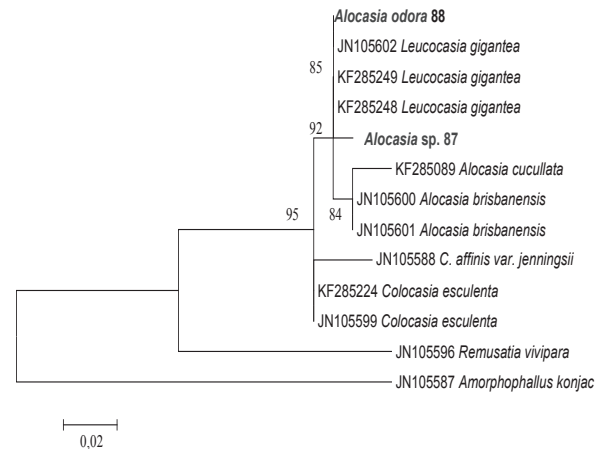
Ở nhóm 2, gồm 2 mẫu *Vietnamocasia dauea* NVD1 và *Vietnamocasia dauea* NVD2 thuộc loài *Vietnamocasia dauea*, loài này được phát hiện tại Việt Nam năm 2017 [10]. Chi *Vietnamocasia* có đặc điểm hình thái tương đồng với 2 chi *Alocasia* và *Colocasia*.



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *matK* giữa các mẫu nghiên cứu và trong GenBank theo phương pháp Maximum Likelihood.

Phân tích trình tự nucleotide vùng gen *petD* giữa các mẫu nghiên cứu

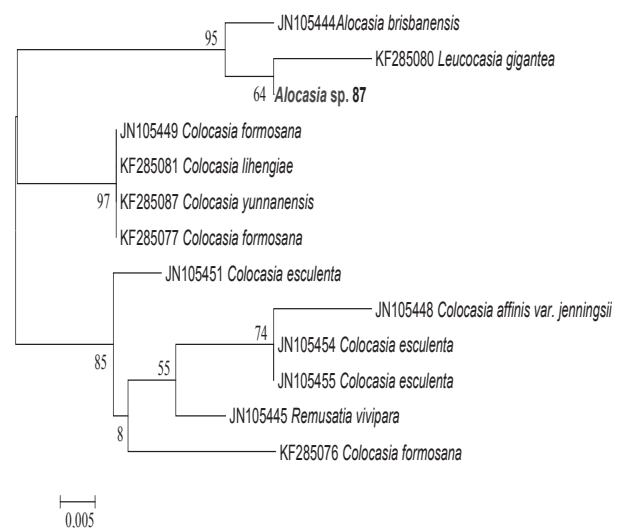
Trong nghiên cứu này, trình tự nucleotide vùng gen *petD* của 2 mẫu *Alocasia* sp. 87 và *Alocasia odora* 88 đã được xác định với chiều dài khoảng 300 bp. Kết quả nghiên cứu mối quan hệ di truyền giữa các 2 mẫu nghiên cứu và các loài thuộc chi *Alocasia* trên cơ sở phân tích trình tự vùng gen *petD* được trình bày ở hình 2. Dữ liệu phân tích đã chỉ ra 2 mẫu thu thập *Alocasia* sp. 87 và *Alocasia odora* 88 nằm cùng nhánh tiến hóa với chi *Alocasia*. Hai chi *Alocasia* và *Leucocasia* khá tương đồng về di truyền và chúng kết hợp với nhau hình thành một nhánh tiến hóa riêng, với giá trị bootstrap cao (92%). Kết quả cũng chỉ ra mẫu *Alocasia* sp. 87 tách biệt với các loài thuộc chi *Alocasia*, phù hợp với phân tích là một loài mới (hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *petD* giữa mẫu nghiên cứu *Alocasia* sp. 87 với các loài khác trên GenBank theo phương pháp Maximum Likelihood

Phân tích trình tự nucleotide vùng gen *trnY-trnE*

Mẫu *Alocasia* sp. 87 được giải mã trình tự nucleotide vùng gen *trnY-trnE* cho kết quả chiều dài 300 bp. So sánh với các trình tự khác trên Genbank cho thấy, mẫu nghiên cứu tương đồng với chi *Alocasia* 98%, chi *Cocolasia* 93%. Kết quả nghiên cứu mối quan hệ di truyền của mẫu *Alocasia* sp. 87 trên cơ sở phân tích trình tự vùng gen *trnY-trnE* được xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood như sau: cây phát sinh được chia ra làm các nhánh khác nhau, trong đó mẫu *Alocasia* sp. 87 tạo thành 1 nhánh tách biệt với các loài thuộc chi *Alocasia* và chi *Leucocasia* (hình 3), tuy nhiên các dữ liệu vùng gen này chưa có nhiều nên cần nghiên cứu thêm các vùng gen khác.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *trnY-trnE* giữa mẫu nghiên cứu *Alocasia* sp. 87 với các loài khác trên GenBank theo phương pháp Maximum Likelihood

Về mặt hình thái học, đặc điểm khác biệt lớn nhất của mẫu *Alocasia* sp. 87 là có hình thái phiến lá rất khác biệt so với hầu hết các loài trong chi: phiến hình tam giác rộng, gốc lõm hình tim, có nhiều nếp nhăn ở phần thịt lá; cuống lá dài... Tuy nhiên, các đặc điểm của bông mo thì khá gần gũi với loài *A. odora*. Chính vì lý do này, đề tài đã tiến hành nghiên cứu giải trình tự gen và so sánh trình tự các nucleotide trong vùng gen *MatK* của mẫu *Alocasia* sp. 87 và mẫu loài *A. odora* 88 với loài *Vietnamocasia dauae*.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide vùng gen *matK*, *petD*, *trnE-trnY* giữa các mẫu nghiên cứu có sự tách biệt giữa 2 chi *Alocasia* và *Vietnamocasia*, điều này phù hợp với kết quả của Sam và cs [10]. Tuy nhiên, mẫu *Alocasia* sp. 87 có sự tách biệt ra khỏi nhóm của các loài thuộc chi *Alocasia*, rất có thể đây là một loài mới.

Kết luận

Các nghiên cứu so sánh trình tự nucleotide vùng gen *matK*, *petD*, *trnY-trnE* cho thấy mẫu *Alocasia* sp. 87 thuộc chi *Alocasia* nhưng tách biệt với các loài khác trong chi, nó gần gũi nhất với loài *Alocasia brisbanensis*. Tuy nhiên, để có thể kết luận mẫu *Alocasia* sp. 87 là một loài mới hay không, cần có sự kết hợp phân tích và theo dõi thêm các đặc điểm hình thái, mô tả và công bố theo đúng luật danh pháp thực vật.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED), thông qua đề tài mã số 106-NN.03-2015.53.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bin Wang, Limin Han (2015), "The complete chloroplast genome sequence of *A. macrorrhizos*", *Mitochondrial DNA*, **27(5)**, pp.1-2.
- [2] K. Hagino, et al. (2017), "Identification of *A. odora* (Kuwazuimo in Japanese) Using PCR Method", *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **58(1)**, pp.32-35.
- [3] L. Nauheimer, P.C. Boyce, S.S. Renner (2012), "Giant taro and its relatives: a phylogeny of the large genus *Alocasia* (Araceae) sheds light on Miocene floristic exchange in the Malesian region", *Annals of Botany*, **1**, pp.69-85.
- [4] Nguyễn Văn Dư (2017), *Họ Ráy - Araceae Juss, Thực vật chí Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
- [5] P. Cuénoud, et al. (2002), "Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences", *American Journal of Botany*, **89(1)**, pp.132-144.
- [6] W. Dong, J. Liu, J. Yu, L. Wang, S. Zhou (2012), "Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding", *PLOS ONE*, **7(4)**, p.e35071.
- [7] H.T. Kim, K.J. Kim (2014), "Chloroplast genome differences between Asian and American *Equisetum arvense* (Equisetaceae) and the origin of the hypervariable *trnY-trnE* intergenic spacer", *PLOS ONE*, **9(8)**, p.e103898.
- [8] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30(12)**, pp.2725-2729.
- [9] M. Nei, S. Kumar (2000), *Molecular evolution and phylogenetics*, Oxford University Press.
- [10] L.N. Sam, W.S. Yeng, T. Haeveermans, N.V. Du, P.C. Boyce (2017), "Vietnamocasia, a new genus from Central Vietnam belonging to the *Alocasia* and *Colocasia* clade (Araceae)", *Phytotaxa*, **303(3)**, pp.253-263.