

XÁC ĐỊNH MÃ VẠCH DNA CHO HAI LOÀI THUỘC CHI *HOMALOMENA* (HỌ ARACEAE) Ở VIỆT NAM

VĂN HỒNG THIÊN¹, LƯU HỒNG TRƯỜNG², NGUYỄN PHI NGÀ³, TRỊNH NGỌC NAM¹

¹Trường đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh

²Viện Sinh thái học Miền Nam, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh

trinhngocnam@iuh.edu.vn

Tóm tắt: Homalomena là chi thực vật thuộc họ Araceae với nhiều loài có giá trị dược liệu và được sử dụng trong y học cổ truyền ở Việt Nam. Trong một số nghiên cứu đã công bố, một vài loài trong chi này có sự không thống nhất về danh pháp khoa học cũng như vị trí phân bố. Nghiên cứu hiện tại được thực hiện nhằm mô tả chi tiết hình thái và xác định chính xác danh pháp hai đối tượng nghiên cứu là loài Homalomena occulta và Homalomena pierreana thuộc chi Homalomena. Kết quả giải trình tự gen đã lần đầu cung cấp dữ liệu phân tử của vùng trình tự trnL intron và trnL-trnF IGS cho 2 loài H. occulta và H. pierreana. Bằng việc so sánh trình tự trnL intron và trnL-trnF IGS giữa 2 loài nghiên cứu với các loài hiện có trên GenBank, đặc biệt là loài H. aromatica, một loài có đặc điểm hình thái tương tự với loài H. occulta. Nghiên cứu này đã xác định H. occulta và H. aromatica là 2 loài riêng biệt. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp dữ liệu khoa học để khẳng định chính xác vị trí phân loại của một số loài thuộc chi Homalomena.

Từ Khóa: Homalomena, DNA barcode, phylogeny, Vườn quốc gia Phú Quốc.

IDENTIFICATION OF DNA BARCODE SEQUENCE FOR TWO *HOMALOMENA* SPECIES (ARACEAE) IN VIETNAM

Abstract: Homalomena is genus of flowering plants of the Araceae family which consists of many medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. However, the scientific names and classification of some species of this genus in are still controversial. Therefore, this study was performed to describe the morphological characteristics and determine the correct scientific names of two species Homalomena occulta and Homalomena pierreana. Our data, for the first time, provided the molecular data (trnL intron and trnL-trnF IGS sequences) of H. occulta and H. pierreana. The comparison of trnL intron and trnL-trnF IGS regions of two studied species and others in GenBank, especially H. aromatica, the closely relative to H. occulta, proved that H. occulta and H. aromatica were two distinct species, which supported to the correct classification of these species in previous studies.

Keywords: Homalomena, DNA barcode, phylogeny, Phu Quoc National Park.

1 GIỚI THIỆU

Thiên niên kiện (Homalomena) là một chi thuộc họ Araceae với nhiều loài có giá trị kinh tế, được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền [1-2]. Trên thế giới, chi *Homalomena* có khoảng 250 loài phân bố chủ yếu ở các khu vực nhiệt đới của Châu Á [3]. Ở Việt Nam, chi Thiên niên kiện hiện có 5 loài gồm: *H. conchinchinensis*, *H. occulta*, *H. pendula*, *H. pierreana* và *H. vietnamensis* [4-5].

Hiện nay, việc nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học ở thực vật đang ngày một trở nên phổ biến. Tuy nhiên việc định danh một cách chính xác đối với đối tượng nghiên cứu hiện đang bị xem nhẹ, điều này có thể sẽ dẫn đến việc xác định nhầm đối tượng, đặc biệt trong bối cảnh nhiều loài trong cùng một chi ở thực vật thường có các đặc điểm hình thái tương tự nhau hoặc nhiều loài đang còn gặp nhiều ý kiến khác nhau bởi các nhà phân loại học về tên khoa học chính xác của nó. Trong chi *Homalomena*, Nguyễn Văn Dư (2017) [4] cho rằng loài *H. aromatica* và *H. occulta* là cùng 1 loài. Tuy nhiên, phần lớn các tác

giả khác lại cho rằng đây là 2 loài riêng biệt và loài *H. occulta* có ở Việt Nam trong khi loài *H. aromatica* chỉ phân bố ở Nam Mỹ, Trung Quốc, Thái Lan, Ấn Độ và Bangladesh [2-3, 6-8]. Tương tự, loài *H. pierreana* là một loài hiếm và được mô tả lần đầu bởi Engler and Krause (1912) [9] với mẫu vật được ghi nhận có ở khu vực Đông Dương. Các nghiên cứu tổng thể ở họ Araceae về sau ở Việt Nam đều không phát hiện lại loài này, các tác giả chỉ nghi nhận lại theo các tài liệu lịch sử và rất mơ hồ về vị trí phân bố. Theo đó, Phạm Hoàng Hộ (2000) [2] và Nguyễn Văn Dư (2017) [4] cho rằng, loài *H. pierreana* có khu vực phân bố ở phía Nam Việt Nam nhưng chưa biết rõ vị trí. Gần đây, Van *et al.* (2018) [6] cũng là tác giả đầu tiên trong bài báo này đã phát hiện lại loài *H. pierreana* ở Vườn quốc gia (VQG) Phú Quốc, qua đó, tác giả đã ghi nhận lại chính xác vị trí phân bố và khẳng định rằng, hiện tại loài *H. pierreana* ở Việt Nam chỉ mới phát hiện có ở VQG Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang.

Với những dữ liệu về 2 loài *H. pierreana* và *H. occulta* nói trên, có thể thấy rằng, loài *H. pierreana* mới chỉ phát hiện có ở VQG Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang trong khi loài còn lại vẫn còn nhiều ý kiến trái chiều. Ngoài ra, một số công bố trước đây về hoạt tính sinh học lại có những kết luận trái ngược với các nhà phân loại học chuyên khảo về họ Araceae nói riêng cũng như ở thực vật nói chung. Chẳng hạn, Tran *et al.* (1992) [10] đã công bố thành phần hóa học có trong cao chiết ethanol của thân rễ loài *H. aromatica*, một loài mà cho đến nay vẫn còn nhiều ý kiến khác nhau trong việc có hay không sự phân bố ở Việt Nam. Ninh *et al.* (2015) [11] đã phân tích được 6 hợp chất từ cao chiết methanol của thân rễ loài *H. pierreana* thu được ở Vườn quốc gia Bạch Mã (tỉnh Thừa Thiên Huế), một vị trí mà nhiều tài liệu chuyên khảo về thực vật nói chung cũng như họ Araceae nói riêng đều không nhắc đến.

Nghiên cứu hiện tại sử dụng phương pháp giải trình tự gen vùng *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS (thuộc hệ thống mã vạch DNA) cho 2 loài *H. aromatica* và *H. pierreana*, từ đó so sánh với các loài trong chi *Homalomena* trong các công bố trước đây. Kết quả của nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ vị trí phân loại của các loài này trong chi *Homalomena*.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mẫu vật của loài *H. occulta* được thu tại VQG Côn Đảo, huyện Côn Đảo, tỉnh Bà Rịa-Vũng Tàu. Loài *H. pierreana* thu tại VQG Phú Quốc, huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang.

Ngoài ra, vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS của các taxa thuộc họ Araceae ở GenBank (NCBI) cũng được sử dụng trong nghiên cứu này (Bảng 2).

Bảng 2: Trình tự của các taxa từ dữ liệu NCBI được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên loài	Mã số GenBank (<i>trnL</i> / <i>trnL-trnF</i>)	STT	Tên loài	Mã số GenBank
1	<i>Aglaodorum griffithii</i>	AM932318/ AM933314	7	<i>Homalomena humilis</i>	KU727592/ KU727659
2	<i>Acorus calamus</i>	EU814693/ EU814694	8	<i>Homalomena aromatica</i>	KU727624/ KU727669
3	<i>Arisaema speciosum</i>	EU193411/ AY275609	9	<i>Homalomena rubescens</i>	KU727520/ KU727547
4	<i>Alocasia odora</i>	JQ238679/ JQ238764	10	<i>Rhodospatha oblongata</i>	AM932307/ AM933303
5	<i>Colocasia esculenta</i>	JQ238718/ JQ238804	11	<i>Scindapsus heredaceus</i>	AM932309/ AM933305
6	<i>Homalomena tenuispadix</i>	KU727598/ KU727653	12	<i>Typhonium trilobatum</i>	AY249016/ AY248978

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu phân loại

Phương pháp nghiên cứu phân loại được dùng là phương pháp hình thái so sánh. Dựa trên các đặc điểm hình thái của các cơ quan sinh sản và sinh dưỡng của cây để chỉ ra những đặc điểm khác biệt và gần

gũi của các loài. Từ đó, so sánh với các công bố trước đây để xác định chính xác tên khoa học của loài nghiên cứu [2-6].

2.2.2 Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Được thực hiện theo phương pháp CTAB 2X cải tiến [13] theo quy trình như sau: (1) Khử mẫu lá với cồn 70%; (2) Nghiền 100mg mẫu lá trong 1000 µl dung dịch đệm tách chiết (NaCl 1.5M, Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM, EDTA (pH 8,0) 20 mM, CTAB 4%), vortex mạnh và ủ 60°C trong 15 phút (3 phút đảo đều); (3) Bổ sung 800 µl chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1), đảo đều; (4) Ly tâm 13000 vòng trong 10 phút ở 4°C, thu dịch nổi trên cùng sang 1 eppendorf khác; (5) Thêm 800 µl isopropanol, đảo nhẹ, để ủ ở tủ -20°C trong 30 phút; (6) Ly tâm 13000 vòng trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ dịch nổi và thu tủa; (7) Thêm 800 µl ethanol 70%, ly tâm 13000 vòng trong 10 phút ở 4°C thu tủa; (8) Để khô tủa 15-25 phút, thêm 50 µl dung dịch TE và bảo quản ở -20°C.

2.2.3 Phương pháp PCR khuếch đại vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS

Vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS được khuếch đại bằng cặp mồi thể hiện ở Bảng 1. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Mastercycler (Eppendorf, Đức) với các thành phần bao gồm: 12,5 µl GoTaq Green Master Mix (Promega, Mỹ), 1,25µl mỗi mồi xuôi và ngược có nồng độ 10 µM, 9,5 µl nước khử ion và 0,5 µl DNA mẫu. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR gồm: 5 phút ở 95°C; 35 chu kỳ gồm: biến tính (1 phút ở 94°C), bắt cặp mồi (1 phút 30 giây ở 55°C) và tổng hợp mạch mới (1 phút 30 giây ở 72°C); hoàn thiện phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Kết quả điện di sản phẩm PCR trình bày trong nghiên cứu là đại diện của ba lần lặp lại.

Mồi (primer) cho các phản ứng nhân bản vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS của loài nghiên cứu được tham khảo từ nghiên cứu của Taberlet *et al.* (1991) [12] (Bảng 1).

Bảng 1: Hai cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')
<i>trnL</i> intron (F)	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trnL</i> intron (R)	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
<i>trnL-trnF</i> IGS (F)	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trnL-trnF</i> IGS (R)	ATTTGAACTGGTGACACGAG

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tại Công ty TNHH Công nghệ Sinh học Nam Khoa (Quận 7, Tp. Hồ Chí Minh).

2.2.4 Phương pháp hiệu chỉnh trình tự và xây dựng cây phát sinh loài

Kết quả giải trình tự 2 chiều được kiểm tra độ chính xác với sự hỗ trợ của phần mềm FinchTV và Seaview. Các trình tự được sắp giống bằng phần mềm ClustalX2.1 [14], xây dựng cây phát sinh loài của mẫu nghiên cứu và các trình tự từ Genbank (Bảng 02) bằng phần mềm MEGA5 theo phương pháp Neighbor-joining với nhóm ngoại là loài *Acorus calamus* [15]. Bảng tính khoảng cách di truyền giữa các loài thuộc chi *Homalomena* được xây dựng dựa trên phương pháp Pairwise distance bằng phần mềm MEGA5 [16]. Ngoài ra, việc so sánh cặp giữa các mẫu nghiên cứu được thực hiện bằng phần mềm Biodeit theo phương pháp sắp giống toàn cục (Global Alignment) [17].

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả định loại loài

3.1.1 *Homalomena pierreana* Engl. & K. Krause, 1912. *Pflanzenr. Arac.* 75 (IV. 23Da): 34, fig. 13.

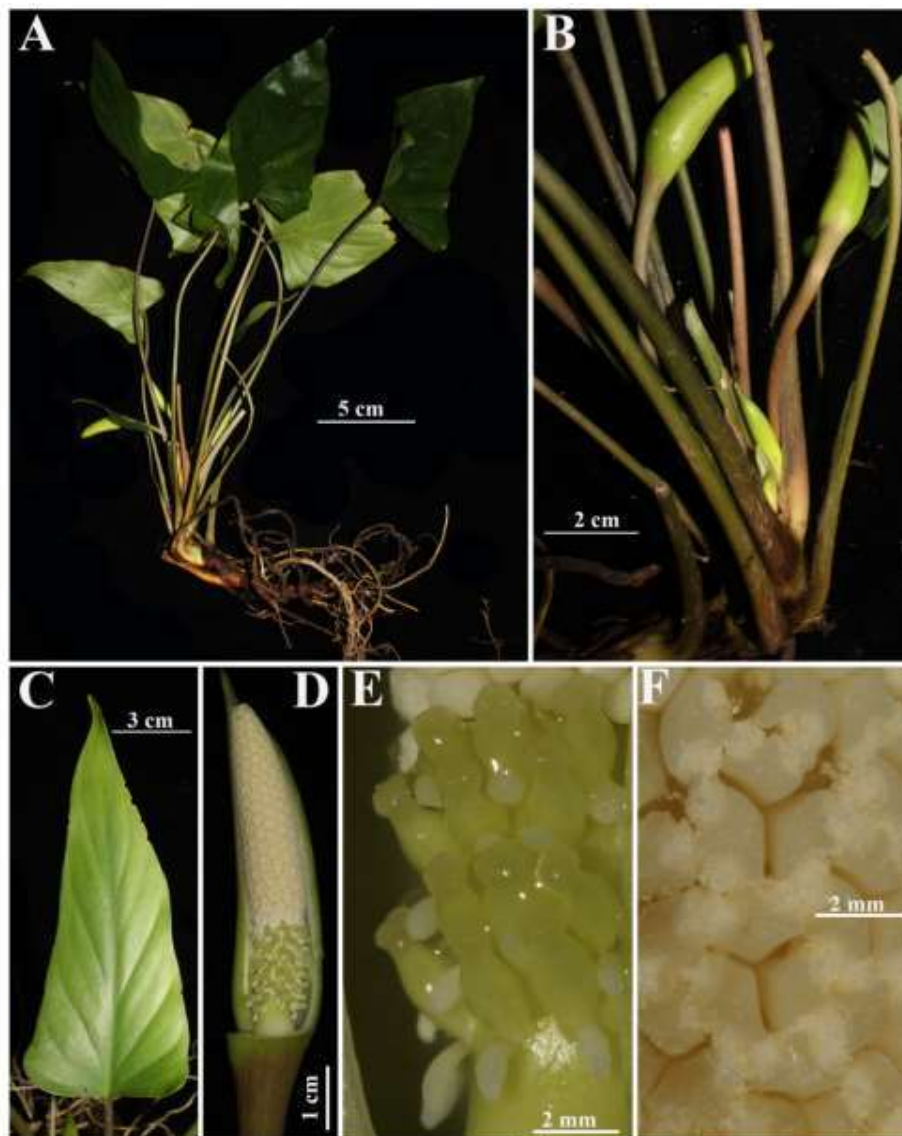
Cây có kích thước trung bình, thường xanh, cao khoảng 10 cm. Thân củ dài 8-14 cm, đường kính 1,5-2 cm. Lá 6-8; cuống lá dài 10-15 cm, đường kính khoảng 4 mm, màu xám xanh. Phiến lá dài 8-10 cm, rộng 3-5 cm, hình tam giác hay hình tim, đỉnh nhọn, màu xanh lục đậm ở mặt trên, nhạt hơn ở mặt dưới, gân giữa lõm ở mặt trên, lồi ở mặt dưới, các gân bên xuất phát từ gân giữa và hướng ra mép lá. Phát hoa 2-5; cuống hoa dài hơn cuống lá, dài 4-5 cm, đường kính khoảng 5 mm, màu xám đến nâu. Mo dài hơn bông nạc, dài 3-4 cm, rộng khoảng 1 cm màu xanh lúc non, vàng nhạt lúc hoa nở, hình ê lip, đỉnh nhọn.

Bông nạc dài 2,5-3 cm, hình nón, màu trắng xanh; phần cái dài 8 mm, hình trụ; bầu hình chai, 3 ô, màu xanh lục nhạt, cao khoảng 2 mm, đường kính khoảng 1 mm, noãn đính trụ. Phần đực dài 2-2,5 cm long, hình nón, đỉnh nhọn, bao phần mở bằng các rãnh ở đỉnh.

Mẫu chuẩn: Pierre sine num (P, isotype), Cochinchina.

Phân bố: mới chỉ phát hiện có ở VQG Phú Quốc, Kiên Giang, Việt Nam.

Mẫu nghiên cứu: Văn Hồng Thiện và Hà Văn Long H.T.Van 202 (SGN), Vườn quốc gia Phú Quốc, Kiên Giang, ngày 22 tháng 10 năm 2018, tọa độ 10°21'01"N; 103°06'52"E độ cao khoảng 83 m so với mặt nước biển; H.T. Van 108 (SGN!), Vườn quốc gia Phú Quốc, Kiên Giang, ngày 14 tháng 8 năm 2015; Pierre sine num. (P, đã xem hình quét), Đông Dương.



Hình 1: Loài *Homalomena pierreana*. A. Cây ngoài thực địa, B. Phát hoa, C. Phiến lá, D. Bông nạc, E. Bầu và núm nhụy, F. Bao phần.

3.1.2. *Homalomena occulta* Schott, 1832. Melet. Bot. 1: 20.

– *Calla occulta* Lour. 1790. Fl. Cochich. 532.

– *Zantedeschia occulta* (Lour.) Spreng. 1826. Syst. Veg. 3: 765.

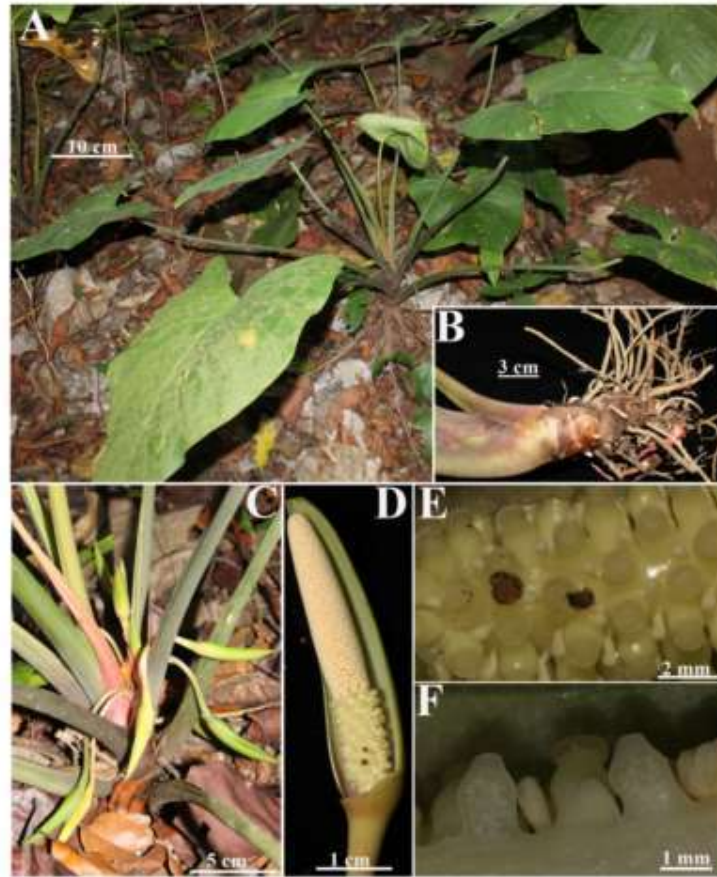
– *Spirospatha occulta* (Lour.) Raf. 1838. Fl. Tellur. 4: 8.

Cây có kích thước trung bình, thân thảo thường xanh. Thân củ dài 12–16 cm, rộng 4–5 cm. Lá 8–10 lá. Cuống lá dài 40–50 cm, đường kính 1,5 cm ở gốc, 3–5 mm ở phần ngọn, màu xanh xám. Phiến lá dài 28–32 cm, rộng 24–26 cm, hình tim, đỉnh nhọn, dài khoảng 0.5 cm, màu xanh lục nhạt ở mặt dưới, đậm hơn ở mặt trên, gân lá lõm ở mặt trên và lồi ở mặt dưới, các gân bên sơ cấp xuất phát từ gân giữa và hướng ra mép lá. Bông mo 4–6, xuất hiện ở nách lá. Hoa đơn tính. Cuống bông mo ngắn hơn nhiều so với cuống lá, dài 8–10 cm, rộng khoảng 3 mm, màu xanh lục nhạt. Mo dài hơn bông nạc, thường khép kín, dài 4–5 cm, rộng 5–8 mm, màu xanh lục, không phân biệt giữa phiến và ống, hình ê líp, hình lưới liềm hay hình thuyền. Bông nạc dài gần bằng mo, dài 3–5 cm, gần như không cuống; phần cái dài khoảng 1.5 cm, đường kính khoảng 5–8 mm, hình trụ, hoa xếp thưa; bầu hình chai ngắn, màu vàng nhạt, cao khoảng 1,5 mm, đường kính khoảng 1 mm, 3 ô, noãn nhiều, kích thước nhỏ, đính trụ; núm nhụy dạng đĩa, lồi, đường kính khoảng 1 mm, màu vàng nhạt; hoa bất thụ xen hình chùy, màu trắng xen vào giữa các bầu; vòi nhụy gần như không. Phần đực dài 2,8–3,2 cm, đường kính khoảng 4 mm, hình trụ, đỉnh tròn, màu trắng đục, hoa sắp xếp dày, bao phần mở ra bởi các khe bên gần đỉnh. Ra hoa: tháng 6–7.

Mẫu chuẩn: Lodd. Bot. Cap. No. 12 (P), Cochinchine.

Phân bố: VQG Côn Đảo, Bà Rịa–Vũng Tàu; Cúc Phương, Ninh Bình.

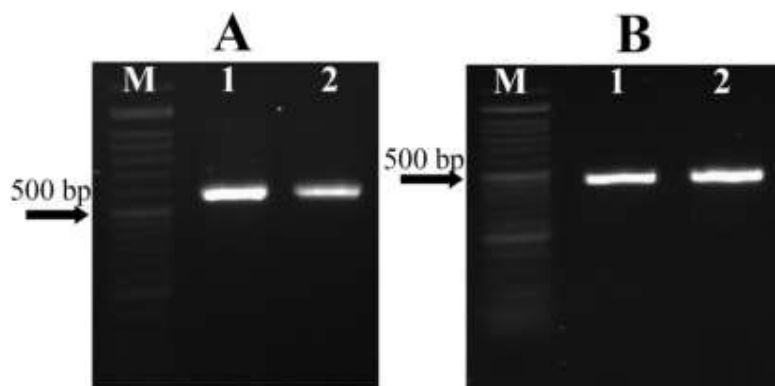
Mẫu nghiên cứu: Văn Hồng Thiện H.T.Van 86 (SGN!), VQG Côn Đảo, Bà Rịa–Vũng Tàu, ngày 09 tháng 06 năm 2015, tọa độ 8°42'53"N; 106°37'14"E, độ cao khoảng 307 m so với mặt nước biển; Du 179 (HN!); Bonkon 7592 (VNM!), ngày 20 tháng 06 năm 1940; Soejarto DDS 13761 (P, đã xem hình quét), Việt Nam, ngày 28 tháng 06 năm 2005.



Hình 2. Loài *Homalomena occulta*. A. Cây ngoài thực địa, B. thân củ, C. Phát hoa, D. Bông nạc, E. Bầu và núm nhụy, F. Bầu cắt dọc.

3.2. Kết quả khuếch đại vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS

Kết quả điện di thể hiện ở Hình 3 cho thấy, sản phẩm vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS của mẫu nghiên cứu đều sáng rõ, kích thước khoảng 550 bp đối với vùng *trnL* intron và khoảng 400 bp đối với vùng *trnL-trnF* IGS. Kết quả này phù hợp với kích thước lý thuyết của cặp mồi do Taberlet *et al.* (1991) [12] thiết kế sử dụng cho nghiên cứu này.

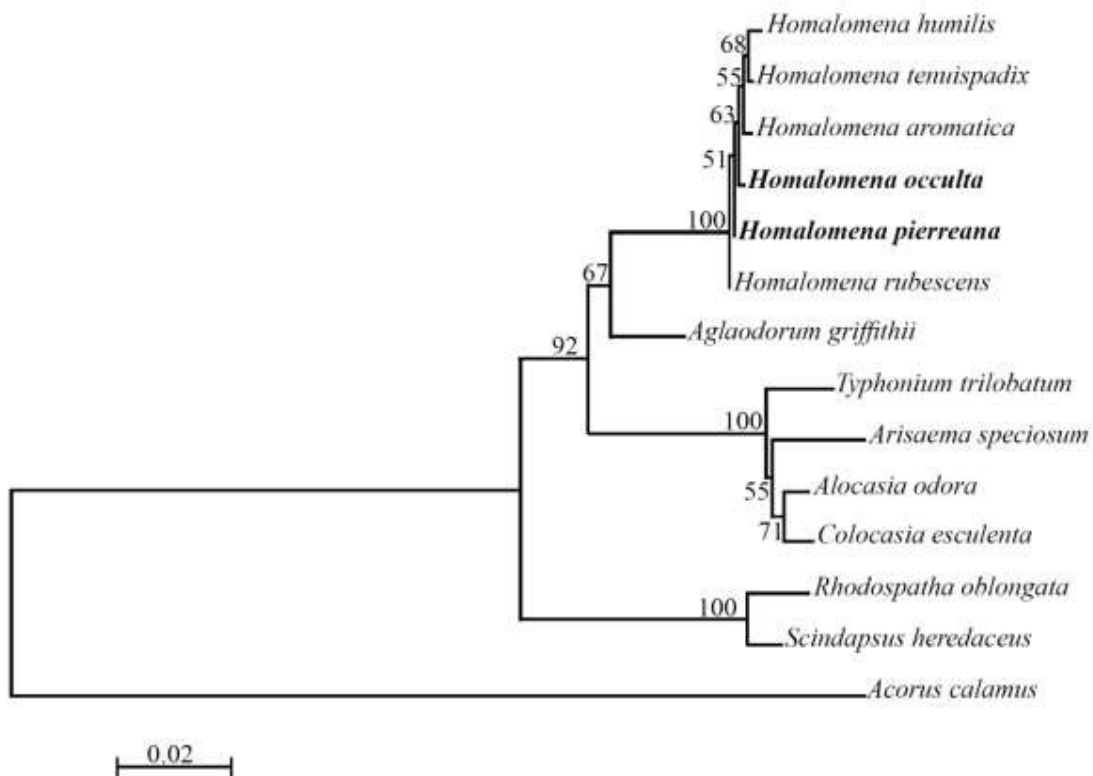


Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR 2 vùng trình tự *trnL* intron (A) và *trnL-trnF* IGS (B) của loài *H. occulta* và *H. pierreana*.

Từ kết quả khuếch đại vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS, sản phẩm PCR của 2 vùng trình tự này được tinh sạch và giải trình tự.

3.3. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài

Cây phát sinh loài (Hình 4) được xây dựng dựa trên sự kết hợp giữa 2 vùng gen (*trnL* intron và *trnL-trnF* IGS) của 2 loài nghiên cứu và các loài thuộc họ Araceae hiện có trên cơ sở dữ liệu của Trung tâm dữ liệu công nghệ sinh học quốc gia (National Center Biotechnology Information- ICBI, Hoa Kỳ). Kết quả cho thấy, tất cả cả loài thuộc chi Thiên Niên Kiện (*Homalomena*) đều xếp chung một nhánh với giá trị bootstrap tuyệt đối (100%). Trong nhóm này, loài *H. occulta* xếp ngoài cùng so với nhóm các loài *H. aromatica*, *H. tenuispadix* và *H. humilis*. Kết quả này cho thấy rằng, loài *H. occulta* đã có 1 khoảng cách di truyền nhất định với loài *H. aromatica*. Khoảng cách di truyền giữa loài *H. occulta* so với loài *H. aromatica* là 0.003 cao hơn khoảng cách giữa loài *H. occulta* so với loài *H. pierreana* (0.001) (Bảng 3) trong khi loài *H. occulta* và *H. pierreana* là 2 loài riêng biệt đã được chấp thuận bởi các nhà phân loại học [1-2, 5, 7, 9].

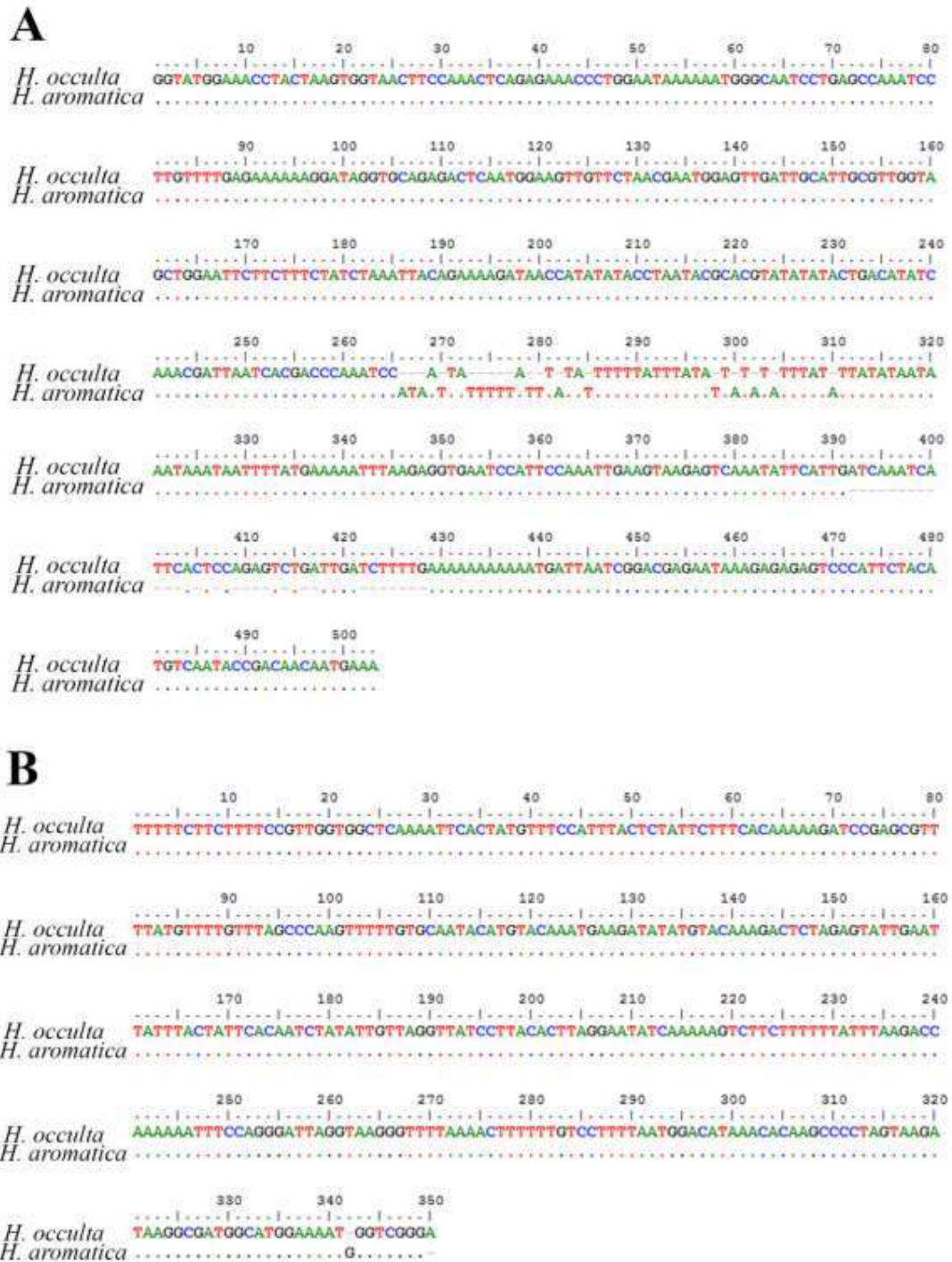


Hình 4. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên sự kết hợp 2 vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS bằng phần mềm MEGA5 dựa trên phương pháp Neighbor-joining [16].

Bảng 3: Khoảng cách di truyền giữa các loài thuộc chi *Homalomena*

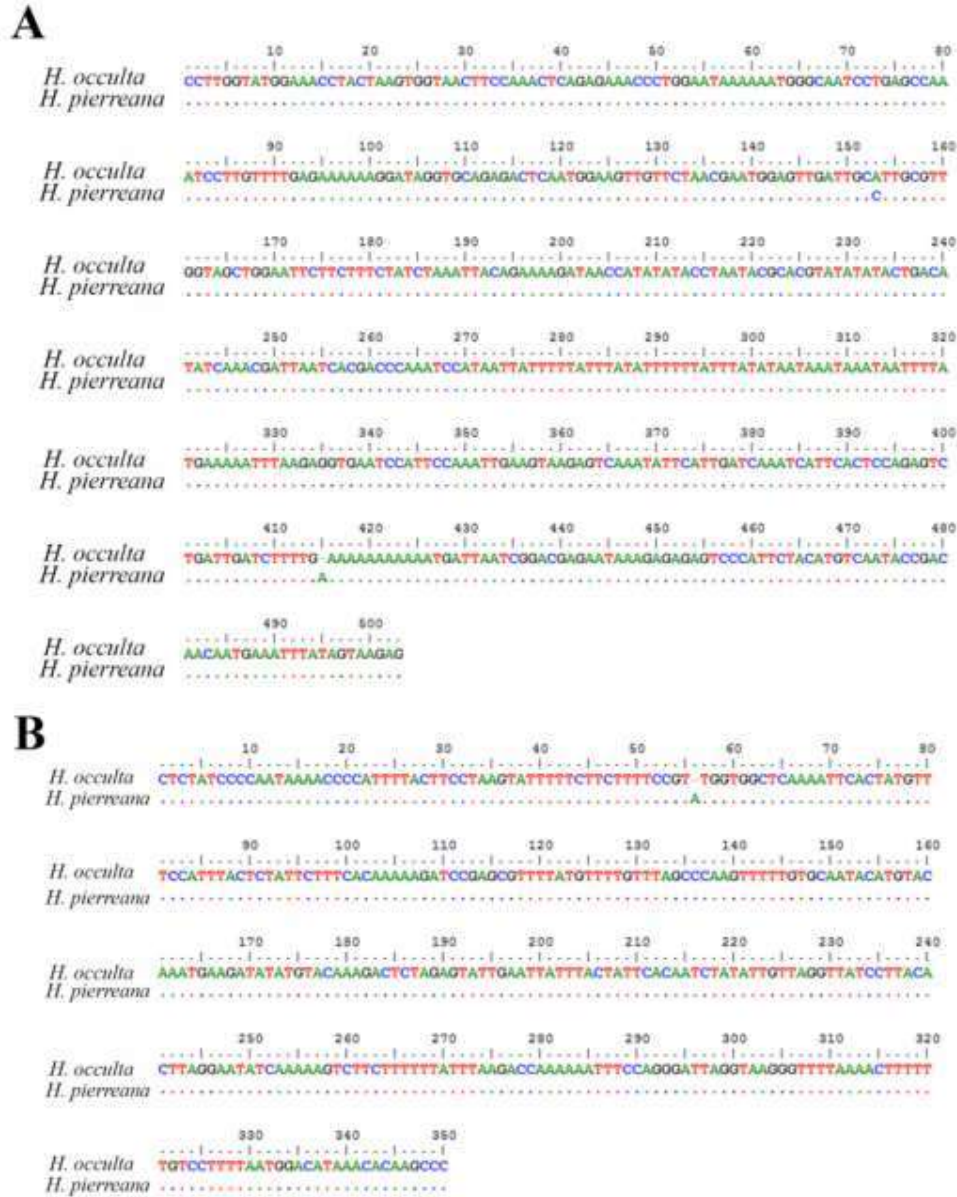
	<i>H. pierreana</i>	<i>H. aromatica</i>	<i>H. occulta</i>	<i>H. humilis</i>	<i>H. rubescens</i>	<i>H. tenuispadix</i>
<i>H. pierreana</i>	-					
<i>H. aromatica</i>	0.004	-				
<i>H. occulta</i>	0.001	0.003	-			
<i>H. humilis</i>	0.005	0.007	0.004	-		
<i>H. rubescens</i>	0.001	0.003	0.000	0.004	-	
<i>H. tenuispadix</i>	0.007	0.008	0.005	0.007	0.005	-

Để làm sáng tỏ thêm cho nhận định trên, chúng tôi tiến hành so sánh chi tiết trình tự vùng *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS giữa loài *H. occulta* so với loài *H. aromatica* cũng như giữa loài *H. occulta* so với loài *H. pierreana*.



Hình 5: Kết quả sắp giống trình tự vùng trnL intron (hình A) và vùng trnL-trnF IGS (hình B) của 2 loài *H. occulta* và *H. aromatica* bằng phần mềm Biodeit. Chú thích: dấu (.) thể hiện sự tương đồng (match) giữa 2 trình tự, dấu (-) thể hiện vị trí gap.

Kết quả so sánh trình tự ở Hình 5A và 5B cho thấy, đã có sự khác biệt khá lớn giữa trong trình tự DNA giữa 2 loài *H. occulta* và *H. aromatica*. Theo đó, vùng trình tự *trnL* intron của loài *H. aromatica* so với loài *H. occulta* có đến 46 vị trí đột biến (gap) trong tổng chiều dài 503 bp của đoạn gen, trong đó có 18 đột biến là dạng thêm đoạn (vị trí 266-268, 270, 273-277, 279-280, 282, 285, 298, 300, 302, 305, 310) và 28 đột biến là dạng mất đoạn gồm các vị trí 392-403, 405, 407, 409-412, 414, 416-417, 422-428 (hình 5A). Trong khi ở vùng *trnL-trnF* IGS, loài *H. aromatica* so với loài *H. occulta* chỉ có 1 đột biến mất điểm ở vị trí 342 (Hình 5B).



Hình 6. Kết quả sắp giống trình tự vùng *trnL* intron (hình A) và vùng *trnL-trnF* IGS (hình B) của 2 loài *H. occulta* và *H. pierreana* bằng phần mềm Biodeit. Chú thích: dấu (.) thể hiện sự tương đồng (match) giữa 2 trình tự, dấu (-) thể hiện vị trí gap.

Kết quả so sánh trình tự ở Hình 6 cho thấy, vùng trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS của loài *H. occulta* và *H. pierreana* có sự tương đồng cao. Theo đó vùng *trnL* intron giữa hai loài này chỉ có 2 vị trí sai khác trong tổng chiều dài đoạn so sánh là 503 bp, cụ thể (1) ở vị trí 153, loài *H. occulta* là mã bộ ba adenine trong khi ở *H. pierreana* là cytosine; (2) vị trí 415 là một đột biến mất điểm của loài *H. occulta* so với *H. pierreana* (Hình 6A). Tương tự, ở vùng *trnL-trnF* IGS, cũng chỉ có 1 đột biến mất điểm của loài *H. occulta* so với *H. pierreana* ở vị trí 56 (Hình 6B).

Như vậy, qua sự so sánh chi tiết vùng trình tự DNA giữa các loài nghiên cứu cho thấy, sự khác biệt trong hai vùng *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS giữa loài *H. occulta* và *H. aromatica* lớn hơn so với loài *H. occulta* và *H. pierreana*. Kết quả này giúp khẳng định loài *H. occulta* và *H. aromatica* là hai loài riêng biệt. Từ kết quả này, một lần nữa đã cho thấy vai trò quan trọng trong việc ứng dụng mã vạch DNA trong việc xác định chính xác danh pháp của các loài thực vật bên cạnh hình thức phân loại cổ điển là phương pháp hình thái so sánh. Nhiều công bố gần đây đã ứng dụng phương pháp này trong việc phân biệt các loài thực vật có hình thái tương tự, chẳng hạn Ton et al. (2019) [18] đã sử dụng vùng ITS và *matK* (DNA barcode) trong việc phân biệt hai loài có hình thái tương tự trong chi *Rothmannia* là *R. wittii* và *R. daweshanensis*. Tương tự, loài Trà hoa vàng Tam Đảo (*Camellia tamdaoensis*) có đặc điểm hình thái tương tự là loài Trà vàng (*Camellia petelotii*), từ đó, Hà Văn Huân và Nguyễn Văn Phong (2015) [19] đã sử dụng một vùng gen nằm trong DNA barcode là *matK* để phân biệt 2 loài này.

4 KẾT LUẬN

Bằng phương pháp hình thái so sánh, nghiên cứu này đã mô tả chi tiết hình thái và xác định cụ thể danh pháp khoa học hai đối tượng nghiên cứu là loài *H. occulta* và *H. pierreana*. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng lần đầu cung cấp dữ liệu phân tử cho hai loài nghiên cứu. Thông qua 2 vùng trình tự trình tự *trnL* intron và *trnL-trnF* IGS, nghiên cứu đã xác định *H. occulta* và *H. aromatica* là hai loài riêng biệt, từ đó góp phần làm sáng tỏ những ý kiến trái chiều giữa hai loài này ở nhiều nghiên cứu trước đây.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn Trường đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này bởi chương trình nghiên cứu cấp cơ sở với Đề tài có mã số 184.TP12. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn kỹ sư Hà Văn Long, cán bộ của Vườn Quốc gia Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang đã hỗ trợ chúng tôi trong công tác thu mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi., Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Y học, 2006.
- [2] Phạm Hoàng Hộ., Cây cỏ Việt Nam. Nxb. Trẻ, 2000.
- [3] P.C. Boyce., D. Sookchaloem., W.L.A. Hettterscheid., G. Gusman., N. Jacobsen., T. Idei., V.D. Nguyen., Araceae. The Flora of Thailand, 11: 101-321, 2012.
- [4] Nguyễn Văn Dur., Thực vật chí Việt Nam, họ Ráy-Araceae, Nxb. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, pp. 114-125, 2017.
- [5] Văn Hồng Thiện., Xây dựng cây phả hệ cho họ Ráy ở khu vực phía Nam Việt Nam dựa trên hình thái và marker phân tử. Luận án tiến sĩ Sinh thái học, Viện Hàn lâm khoa học Công nghệ Việt Nam, 2017.
- [6] H.T. Van., P.N. Nguyen., H.T. Luu., New distributions of three Aroids in southern vietnam. Journal of Science, Ho Chi Minh City University of Education, 3: 129-138, 2018.
- [7] F. Gagnepain., Aracées. In: Lecomte H. (ed) Flore générale de l'Indo-Chine, 6: 1075-1196, 1942.
- [8] M. Kehie., P. Kehie., N.L. Pfoze., Phytochemical and ethnopharmacological overview of endangered Homalomena aromatic Schott: An aromatic medicinal herb of Northeast India. Indian Journal of Natural Products and Resources, 8: 18-31, 2017.
- [9] A. Engler., K. Krause., Araceae-Philodendroideae-Philodendreae, Allgemeiner Teil, Homalomeninae und Schismatoglottidinae, pp. 1-134 in Pflanzenreich, vol. 55 (IV.23Da), ed. A. Engler. Leipzig: Engelmann, 1912.

- [10] V.S. Tran., B. Steffan., W. Steglich., G. Klebe., G. Adam., Sesquiterpenoids from the roots of *Homalomena aromatica*. *Phytochemistry*, 31: 3515-3520, 1992.
- [11] K.B. Ninh., T.N. Ninh, H.G. Vu., M.L. Tran., Q.L. Le., T.H.H. Tran., X.C. Nguyen., H.N. Nguyen., R. Jacinto., V.K. Huynh., T.A. Tran., V.K. Phan., V.M. Chau., Sesquiterpenoids from *Homalomena pierreana* *Engl. Journal of Science and Technology*, 53: 305-310, 2015.
- [12] P. Taberlet, L. Gielly, G. Patou, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109, 1991.
- [13] Huỳnh Nữ Băng Thùy., Nguyễn Anh Dũng., Võ Tấn Dũng., Văn Hồng Thiện., Xác định vị trí phân loại họ Limncharitaceae dựa trên dữ liệu phân tử từ quy trình tách chiết DNA nhanh. *Chuyên san Khoa học và Công nghệ, Thành Đoàn Tp. Hồ Chí Minh*, 4: 78-82, 2018.
- [14] D.J. Thompson., D.G. Higgins., T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680, 1994.
- [15] N. Cusimano., J. Bogner., S.J. Mayo., P.C. Boyce., Relationships within the Araceae: comparison of morphological patterns with molecular phylogenies. *American Journal of Botany*, 98: 1-15, 2011.
- [16] M. Kimura., A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 11-120, 1980.
- [17] T.A. Hall., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98, 1999.
- [18] T.H.T. Ton., T.T. Nguyen., T.K.T. Dinh., V.S. Le., G.B. Tran., H.T. Van., new distribution records of *Rothmannia wittii* (Rubiaceae) in vietnam and identification of DNA barcode sequence for *R. wittii*. *Journal of Science, Ho Chi Minh City University of Education*, 16: 190-199, 2019.
- [19] Hà Văn Huân., Nguyễn Văn Phong., Xác định đoạn mã vạch DNA cho trà hoa vàng tam đảo (*Camellia tamdaoensis*): loài cây đặc hữu của Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 5: 123-130, 2015.

Ngày nhận bài: 23/04/2019

Ngày chấp nhận đăng: 10/06/2019