

GIÁM ĐỊNH MỘT SỐ LOÀI NƯA TẠI THANH HÓA BẰNG CÁC DẪN LIỆU HÌNH THÁI VÀ PHÂN TỬ

Bùi Văn Thắng¹, Nguyễn Thị Hải Hà², Vũ Quang Nam³,
Nguyễn Thế Đại⁴, Phan Văn Quỳnh⁵, Nguyễn Ngọc Ánh⁶

^{1,2,3,6}Trường Đại học Lâm nghiệp

^{4,5}Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng KHCN Lâm nghiệp Thanh Hóa

TÓM TẮT

Nưa là những cây có củ thuộc chi Nưa (*Amorphophallus* Blume ex Decne.) thuộc họ Ráy (Araceae), có phân bố rộng khắp và được trồng nhiều ở khu vực Đông Nam Á và châu Phi với mục đích kinh tế, được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm, y học và công nghiệp hóa học bởi củ Nưa chứa glucomannan có nhiều công năng trong y học. Sử dụng phương pháp hình thái để giám định 60 mẫu cây Nưa được thu tại 5 huyện của tỉnh Thanh Hóa, kết hợp với phân tích trình tự vùng gen *matK* và *trnL* của 16 mẫu đại diện từ 60 mẫu Nưa cho thấy các mẫu Nưa được thu từ Thanh Hóa thuộc về 2 loài là Nưa chuông (*Amorphophallus paeoniifolius*) và Nưa krausei (*Amorphophallus krausei*). Loài Nưa krausei có phân bố hẹp, chỉ thấy xuất hiện ở xã Trí Nang của huyện Lang Chánh; trong khi đó loài Nưa chuông được tìm thấy phổ biến ở các huyện còn lại của Tỉnh. Các đặc điểm hình thái của 2 loài Nưa trên được mô tả cùng các thông tin về đặc điểm sinh học và phân bố. Kết quả cũng cho thấy việc sử dụng mã vạch ADN của 2 đoạn gen *matK* và *trnL* trong việc giám định các mẫu Nưa ở Thanh Hóa là hiệu quả và là cơ sở khoa học phục vụ cho việc bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Nưa có giá trị cho Tỉnh.

Từ khóa: Giám định, hình thái, mã vạch ADN, Nưa, Thanh Hóa.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nưa là những cây có củ thuộc chi Nưa (*Amorphophallus*) thuộc họ Ráy (Araceae) đã được sử dụng làm thức ăn truyền thống từ lâu đời ở Việt Nam và trên thế giới. Các loài trong chi Nưa có phân bố rộng khắp và được trồng nhiều khu vực Đông Nam Á và châu Phi. Nưa là cây trồng kinh tế, được sử dụng rộng rãi trong thực phẩm, y học và công nghiệp hóa học. Cây Nưa chứa hợp chất hóa học được gọi là glucomannan - một polysaccharide bao gồm glucose và mannose với tỷ lệ mol 2:3, được nối với nhau bởi liên kết β -1,4. Nghiên cứu lâm sàng cho thấy glucomannan có khả năng làm giảm lipid (Arvill and Bodin, 1995; Sood et al., 2008), giảm huyết áp tâm thu (Arvill and Bodin, 1995) và giảm đường huyết (Sood et al., 2008). Hiện nay, ở Trung Quốc có 5 loài đang được trồng làm nguyên liệu bột Nưa konjac đó là *A. albus* Liu & Wei, *A. corrugatus* N. E. Br., *A. konjac* K. Koch, *A. krausei* Engl. và *A. yunnanensis* Engl. Cả 5 loài Nưa này gọi

dưới một tên chung là Nưa konjac (Nguyễn Văn Dư và cs, 2011). Ở Việt Nam, chi Nưa có khoảng 25 loài, trong đó có 2 trong 3 loài được trồng phổ biến ở Trung Quốc để sản xuất nguyên liệu glucomannan (Nguyễn Văn Dư, 2004).

Để định danh các loài, hiện nay bên cạnh việc sử dụng các đặc điểm về hình thái, phương pháp giám định loài sử dụng các đoạn mã vạch ADN (DNA barcode) cũng đang được các nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên cứu. Mã vạch ADN là những đoạn ADN ngắn, nằm trong hệ gen (nhân, lục lạp và ty thể) đặc trưng cho mỗi loài sinh vật. Xác định loài bằng mã vạch ADN có độ chính xác cao, đặc biệt hữu dụng và khắc phục được hạn chế của phân loại về hình thái đối với các loài gần gũi mà những quan sát hình thái, sinh trưởng, phát triển chưa đủ cơ sở để phân biệt. Trong nghiên cứu này 2 đoạn trình tự mã vạch ADN đặc trưng ở hệ gen lục lạp là *matK*, *trnL* đã được sử dụng để tiến hành phân lập, xác định và

phân tích trình tự ADN làm cơ sở dữ liệu phân tử phục vụ cho việc giám định loài Nura được thu từ 5 huyện của tỉnh Thanh Hóa.

II. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: Các loài Nura được thu từ 5 huyện của tỉnh Thanh Hóa.

Địa điểm thu mẫu: Tổng số 60 mẫu tiêu bản được thu từ 5 huyện của Thanh Hóa, gồm: huyện Lang Chánh (ở các xã: Quang Hiến, Giao Thiện, Lâm Phú, Trí Nang, Tam Vãn); huyện Thạch Thành (ở các xã: Thành Long, Ngọc Trạo, Thành Tâm, Thành Công, Thạch Đồng); huyện Quan Hóa (ở các xã: Hồi Xuân, Xuân Phú, Nam Động, Phú Xuân, Nam

Xuân); huyện Thường Xuân (ở các xã: Ngọc Phụng, Lương Sơn, Yên Nhân, Xuân Cẩm, Xuân Chinh); huyện Như Xuân (ở các xã: Hải Vân, Thanh Phong, Xuân Thái, Xuân Phúc, Thanh Lâm). Cách thu và xử lý mẫu vật được thực hiện theo Nguyễn Nghĩa Thìn (2007).

Vật liệu nghiên cứu phân tử: 16 mẫu lá bánh tẻ của cây Nura đại diện từ 60 mẫu được lấy tại 5 huyện của tỉnh Thanh Hóa. Sau khi thu, mẫu được bảo quản trong túi nylon có chứa silica gel hút ẩm, sau đó được bảo quản ở -20°C để tách chiết ADN. Ký hiệu các mẫu Nura được lấy theo chữ viết tắt của tên họ khoa học của loài.

Bảng 1. Danh sách các mẫu nghiên cứu

Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu
A1	Xã Quang Hiến, huyện Lang Chánh	A9	Xã Lương Sơn, huyện Thường Xuân
A2	Xã Giao Thiện, huyện Lang Chánh	A10	Xã Yên Nhân, huyện Thường Xuân
A3	Xã Thành Long, huyện Thạch Thành	A11	Xã Hải Vân, huyện Như Xuân
A4	Xã Thành Tâm, huyện Thạch Thành	A12	Xã Thanh Phong, huyện Như Xuân
A5	Xã Hồi Xuân, huyện Quan Hóa	A13	Xã Xuân Thái, huyện Như Xuân
A6	Xã Xuân Phú, huyện Quan Hóa	A14	Xã Trí Nang, huyện Lang Chánh
A7	Xã Nam Động, huyện Quan Hóa	A15	Xã Trí Nang, huyện Lang Chánh
A8	Xã Ngọc Phụng, huyện Thường Xuân	A16	Xã Trí Nang, huyện Lang Chánh

Các cặp mồi được sử dụng để nhân các đoạn gen *matK* và *trnL* được thiết kế dựa trên

các tài liệu đã được công bố.

Bảng 2. Trình tự các cặp mồi và kích thước vùng gen đích theo lý thuyết

Gen	Tên mồi	Trình tự 5'-3'	Nhiệt độ bắt mồi	Kích thước băng lý thuyết
<i>matK</i>	P9F	ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	50°C	950 bp
	P9R	CTTCTCTGTAAAGAATTC		
<i>trnL</i>	P11F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	54°C	700 bp
	P11R	GGGGATAGAGGGACTTGAAC		

Hóa chất: hóa chất sử dụng để tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá cây Nưa: Kit tách chiết ADN tổng số (Plant DNA isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của hãng iNtRon Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR purification Kit) của hãng Norgen, Canada; Hóa chất cho điện di trên gel Agarose, DNA marker, Redsafe của hãng Norgen, sigma.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu lá của cây Nưa theo hướng dẫn của Kit (Plant DNA Isolation Kit). Xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch ADN tổng số bằng phương pháp quang phổ kế trên máy nanodrop2000. Nhân bản đoạn gen bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ), mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng phản ứng 25 μ l, bao gồm: H₂O deion (8,5 μ l), 2x PCR Master mix Solution (12,5 μ l), 10 pmol/ μ l mỗi xuôi (1,0 μ l), 10 pmol/ μ l mỗi ngược (1,0 μ l), ADN tổng số (2 μ l tương ứng 50 ng). Chu trình nhiệt PCR: biến tính 94°C 5 phút, tiếp theo 35 chu kỳ [95°C - 30 giây, 54°C - 50 giây, 72°C - 50 giây], 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%, nhuộm gel bằng redsafe, soi dưới đèn UV và chụp ảnh bằng hệ thống Dolphin - Doc Image system của hãng Wealtec (Mỹ). Sản phẩm PCR được tinh sạch theo quy trình của Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR purification Kit). Sau đó được giải trình tự hai chiều bởi công ty Macrogen, Hàn Quốc. Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Dữ liệu trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. Tìm kiếm và so sánh giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng trên ngân hàng Genbank (NCBI) bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mô tả hình thái 02 loài Nưa

3.1.1. Loài Nưa krausei (*Amorphophallus krausei* Engl. & Gehrm.)

Hình thái: Cây thân củ, cao tới gần 1 m. Củ hình thuôn dài 20 - 25 cm, đường kính 4 - 5 cm. Lá có phiến rộng khoảng 60 - 70 cm, xẻ 3 thùy, các thùy xẻ lông chim 1 - 2 lần thành nhiều thùy nhỏ, thùy nhỏ hình ở dạng chung hình bầu dục, dài 7 - 15 cm, đỉnh có mũi nhọn đột ngột, gốc lá 1 bên tù đến tròn, cụt, bên kia men theo cuống tạo thành cánh hẹp đến khá rộng, màu xanh lục vừa phải; cuống lá dài 60 - 70 cm, đường kính 2 - 3,5 cm ở gốc, màu vàng - xanh xỉn, có các vân xanh đậm theo chiều ngang. Cuống bông mo dài 11 cm, đường kính 5 - 7 mm, có lông tơ ngắn; mo hình trứng thuôn, dài 16,5 cm, rộng 5 cm ở gốc, màu xanh nhạt, đỉnh nhọn, gốc tròn, mặt trong nâu nhạt và có nhiều mụn cơm nhỏ. Bông nạc không cuống, dài 14 cm; phần cái hình trụ, kích thước 2,2 x 0,7 cm, bầu dày đặc; phần hoa bất thụ hình trụ, kích thước 7 x 5 mm; phần đực hình nón ngược, dài 6,4 cm, đường kính 8 mm ở gốc, 12 mm ở đỉnh; phần phụ hình nón dài 5 cm, màu kem, đỉnh nhọn đột ngột, gốc hơi hẹp lại, có vài hoa bất thụ. Bầu hình cầu, rộng 1 mm; vòi nhụy rõ, ngắn, khoảng 5 mm; núm nhụy hình tròn, rộng 0,5 mm. Hoa trung tính hình thoi, kích thước 3 x 0,7 mm. Nhị nhóm 2, rời nhau, hình nón, kích thước 1 x 1 mm ở gốc, đỉnh hẹp hơn, chỉ nhị dài 1 mm; bao phấn hình bầu dục, kích thước 0,8 x 0,3 mm, lưng dính toàn bộ vào chỉ nhị, vỏ ngoài gấp nếp, mở bằng lỗ ở đỉnh; trung đới rộng, gần bằng 2 lần chiều rộng bao phấn.

Sinh học và sinh thái: Cây mọc dưới tán rừng, ở độ cao tới 1500 m; thường thấy ở các nương rẫy cũ.

Phân bố: Miền Trung Việt Nam, từ Nghệ An trở vào, còn có ở Nam Trung Quốc, Mianma, Lào và Thái Lan.

Kết quả phân tích hình thái cho thấy các mẫu Nưa thu được tại xã Trí Nang của huyện Lang Chánh đều thuộc loài Nưa krausei (*A. krausei* Engl. & Gehrm.).



Hình 1. Hình thái thân, lá và củ *Nura krausei* ở huyện Lang Chánh (xã Trí Nang), tỉnh Thanh Hóa



Hình 2. Hình thái thân, lá và củ *Nura chuông* bắt gặp hầu hết ở các huyện còn lại của tỉnh Thanh Hóa

3.1.2. Loài *Nura chuông* (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson)

Hình thái: Cây thảo cao tới 2 m. Thân củ hình cầu, dẹp, cỡ 20 x 30 cm, nâu đậm, seọ rỗ rỗ, có chồi mầm dạng thân rễ dài tới 10 cm. Lá mọc từ củ thường đơn độc, hiếm khi 2; phiến lá rộng tới 3 m, xẻ 3 thùy, thùy xẻ lông chim 2 - 3 lần; phiến nhỏ hình trứng, trứng ngược tới mác, cỡ 3 - 35 x 2 - 12 cm, mặt trên xanh lục, nhạt hơn ở mặt dưới; cuống lá mập, dài tới 150 cm, rộng tới 10 cm ở gốc, xanh nhạt tới đậm, đốm hay chấm xanh xanh đậm, bề mặt sần sùi với nhiều mụn cơm dạng gai mềm, thường chầy, nhót khi bị tác động. Bông mo lớn, cuống dài 3 - 20 cm, rộng 1 - 8 cm, xanh nhạt tới hơi nâu, thường nhẵn hơn cuống lá. Mo hình chuông, mở ra rộng, cỡ 40 - 60 x 30 - 60 cm; phần ống ngắn, xanh nhạt, đốm sáng ở

ngoài, đỏ nâu ở trong; phần phiến mở hết khi hoa thụ phấn, nâu đỏ. Bông nạc dài tới 70 cm, phần cái hình trụ, cỡ 15 - 17 x 6 - 7 cm, phần đực hình nón ngược, dài 8 - 12 x 4 cm ở gốc, 7 - 8 cm ở đỉnh; phần phụ hình nón, cao 20 - 22 cm, lồi lõm kì quái, màu nâu đậm. Bầu hình cầu dẹp, rộng tới 4 mm; núm nhụy 3 thùy, rộng bằng hoặc hơn bầu, vàng nhạt; vòi nhụy dài 1 - 2 mm, màu hồng. Quả mọng, chín màu đỏ.

Sinh học và sinh thái: Thường mọc trong rừng thứ sinh, nơi có nhiều ánh sáng hoặc dưới tán rừng, nơi bìa rừng, bản ở độ cao từ 700 - 900 m trở xuống.

Phân bố: Tuyên Quang, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Hải Phòng, Hoà Bình, Ninh Bình, Thanh Hóa. Thế giới: Trồng và mọc hoang ở Nam Trung Quốc, qua Đông Nam Á tới phía Bắc Australia và từ Madagasca tới Ấn Độ và

Philippin, Nhật Bản.

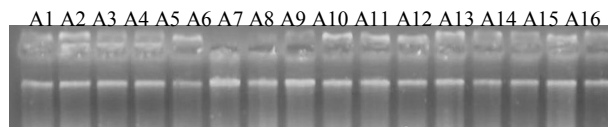
Kết quả phân tích hình thái cho thấy các mẫu Nưa thu được tại 4 huyện: Thạch Thành, Quan Hóa, Thường Xuân và Như Xuân thuộc loài Nưa chuông (*A. paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson).

3.2. Phân tích mã vạch ADN

3.2.1. Tách chiết ADN tổng số từ lá cây Nưa

Từ kết quả giám định bằng phương pháp hình thái, 16 mẫu Nưa đã được lựa chọn để phân tích ADN mã vạch (mẫu ký hiệu từ A1

đến A13 về giám định hình thái thuộc loài Nưa chuông, mẫu từ A14 đến A16 thuộc loài Nưa krausei). ADN tổng số của 16 mẫu lá Nưa đã được tách chiết thành công với chất lượng ADN cao. Kết quả điện di kiểm tra ADN trên gel agarose 1% cho thấy các băng ADN tổng số thu được sắc nét, ADN không bị gãy (hình 3). Kết quả đo OD cho chỉ số OD₂₆₀/OD₂₈₀ của các mẫu luôn nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0. ADN đạt tiêu chuẩn để sử dụng cho các kỹ thuật tiếp theo.

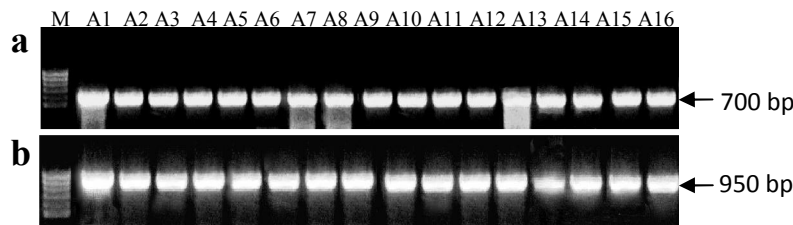


Hình 3. Ảnh điện di ADN tổng số tách từ 16 mẫu Nưa trên gel agarose 1%

3.2.2. Nhân bản các đoạn mã vạch ADN bằng kỹ thuật PCR

ADN tổng số được pha loãng với nồng độ 25ng/μl và sử dụng cho phản ứng PCR với 2

cặp mồi nhân đoạn gen *matK* và *trnL*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR được thể hiện trên hình 4a,b.



Hình 4. a - Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *trnL*; b - Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *matK* từ 16 mẫu Nưa trên gel agarose 1,2%. M – thang AND chuẩn 100 bp

Điện di sản phẩm PCR của tất cả các mẫu thí nghiệm cho thấy, ở các mẫu đều thu được một băng ADN sáng rõ nét, có kích thước khoảng 700 bp (đối với mồi gen *trnL*) và 950 bp (đối với mồi gen *matK*) phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen *trnL* và *matK* dự kiến nhân bản. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần đều cho kết quả trùng nhau 100%. Kết quả điện di cũng cho thấy, không có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen *matK*, *trnL* rất đặc hiệu, có thể sử dụng

trực tiếp các sản phẩm này để tinh sạch và xác định trình tự nucleotide.

3.2.3. Xác định và phân tích trình tự nucleotide của đoạn mã vạch ADN

Trình tự nucleotide đoạn gen *matK* và *trnL* ở sản phẩm PCR của 16 mẫu nưa đã được xác định. Kết quả cho thấy: các mẫu từ A1 đến A13 đều có chiều dài trình tự đoạn gen *matK* là 905 nucleotide, đoạn gen *trnL* là 522 nucleotide giống nhau 100%; mẫu A14, A15, A16 có chiều dài trình tự đoạn gen *matK* là

951 nucleotide, đoạn gen *trnL* là 444 nucleotide giống nhau 100%. So sánh trình tự nucleotide gen *matK* của các mẫu từ A1 đến A13 với các mẫu A14, A15, A16 có mức độ tương đồng 98,8%; trình tự nucleotide gen *trnL* của các mẫu từ A1 đến A13 với các mẫu A14, A15, A16 có mức độ tương đồng 95,3%.

Sử dụng phần mềm so sánh trình tự nucleotide BLAST của các mẫu từ A1 đến A13 với các loài Nưa trên Genbank cho thấy các mẫu từ A1 đến A13 thu được tại Thanh Hóa giống với trình tự nucleotide của gen *matK*

của loài Nưa chuông (*A. paeoniifolius*) với mã số trên Genbank là AF387410 tới 100%. Tương tự, so sánh trình tự nucleotide đoạn gen *trnL* ở các mẫu từ A1 đến A13 với các trình tự gen trong Genbank, cho kết quả giống với trình tự gen *trnL* ở loài Nưa chuông (*A. paeoniifolius*) với mã số trên Genbank là AF387464 là 99%; có một nucleotide sai khác ở vị trí 415 (các mẫu từ A1 đến A13 có thêm một A, còn trình tự nucleotide gen *trnL* mã số AF387464 không có).

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* ở các mẫu từ A1 đến A13 với loài Nưa chuông (*A. paeoniifolius*) mã số AF387410 trong Genbank

A1-A13 (matK-TH)	1	AAATTCACAAATGCCGATACAGATGTTCCCTCTTACATTTATTACGATTCTTTTTTCATGAATATCATAAATGGAAT
AF387410	1
A1-A13 (matK-TH)	81	AATCTCATTACCCCAAAGAAATCTAACTATTATGGTTTTTCAAAAGAGAATCCAAGACTATTTTTCTTCTATATAATTC
AF387410	81
A1-A13 (matK-TH)	161	TTATGTAGTTGAATGTGAATCCATATTCGTTTTTCTCCGTAAACAATCCTCTTATTTACGATCAACATCTTCTGGAACCT
AF387410	161
A1-A13 (matK-TH)	241	TTCTTGAGCGAGCACATTTCTATGAAAAATAGAACAAACATCTCGTAGTACTTTGTTGTAATGATTTTCAGAAAACCCTA
AF387410	241
A1-A13 (matK-TH)	321	TGGTTGTTCAAGGATCCTTTTCATGCATATGTTAGATATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCAAAAGGGACTCATCTTTT
AF387410	321
A1-A13 (matK-TH)	401	GATGAAGAAATGGAATCTTACTTTGTCAAATTTTTGGCAATGTCATTTTTCACTTTTGGTCTCAACCCCTGAGGATCCACA
AF387410	401
A1-A13 (matK-TH)	481	TAAACCAATTCTCAAATTTCTTTCTATTTCTGGGTTATCTTTCAAGTGTACCAATAAATCCTTCAGCGGTAAAGAGT
AF387410	481
A1-A13 (matK-TH)	561	CAAACTGCTAGAGAATTTTTTTTACTAGATACTGTTACTAAAAAATCGAAACTATAGTTCCAATATTTCCATGATTGG
AF387410	561
A1-A13 (matK-TH)	641	AGCAATTCTAAAAGCGAAATTTTCTAACCTATCGGGGAATCCTATTAGTAAAGCCAGTTTGGGCCGATTTGTCTGATTCG
AF387410	641
A1-A13 (matK-TH)	721	ATATTTATGATCGATTTGGTCCGACATCTAGAAATCTTTCTCATTTACACTGGGTCTTCAAAAAACAAGTTTGAT
AF387410	721
A1-A13 (matK-TH)	801	CGAATAAAGTATATACTTCGACTTTCTATGCTAGAACTTTGCCCGTAAACATAAAAGTACAGTACGCCCTTTTTCGA
AF387410	801
A1-A13 (matK-TH)	881	AAGATTAGGTTCAAGATTTTACAA
AF387410	881

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen trnL ở các mẫu từ A1 đến A13 với loài Nưa chuông (*A. paeoniifolius*) mã số AF237464 trong Genbank

A1-A13 (trnL-TH) AF387464	110.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80	1	GACTTGATTGCATTGACCCCTGGTATGGA AACCTACTAAGTGGTAACTTCCA AACTCAGAGAAACCCCTGGAATAAAAAT
A1-A13 (trnL-TH) AF387464	8190.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160	81	GGCCAATCCTGAGCCAAATCCTTGTTT GAGAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGA
A1-A13 (trnL-TH) AF387464	161170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240	161	GTTGATTGCATTGGCTCGGTAGCTGGAATCCTCTTCTATCTAAATTACAGAAAGATAATCCTATATACCTAATACAC
A1-A13 (trnL-TH) AF387464	241250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320	241	ACGTATATATACTGACATATCAAACGATTAATCAGACCCAAATCCATAAATAATTTATATAAATATAAAAAATCAA
A1-A13 (trnL-TH) AF387464	321330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	321	AATTTTATGAAAAATTAAGAGTATTCCGAAATCCATTTCTAAATTAAGTAAGAGTGAATATTCAGTGATCAATCATT
A1-A13 (trnL-TH) AF387464	401410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480	401	TGAAAAAATAAATGATTAAGCCGACGAGATAAAGAGAGAGTCCCATTTCTACATGTCAAATCCGACAAACAATGAAAT
A1-A13 (trnL-TH) AF387464	481490.....500.....510.....520	481	TTATAGTAAGAGGAAAAATCCCTCGACTTAAAAATCCTGAGG

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của mẫu A14, A15, A16 với các loài Nưa trên Genbank cho thấy mẫu 3 thu được tại Thanh Hóa giống với trình tự nucleotide của gen *matK* của loài Nưa krausei (*A. krausei*) với mã số trên ngân hàng gen là AF387399 tới 100%. Tương tự, trình tự nucleotide đoạn gen *trnL* cho kết quả

giống với trình tự gen này ở loài Nưa krausei (*A. krausei*) với mã số trên Genbank là AF387453 tới 99%, có một nucleotide sai khác ở vị trí 318 (các mẫu từ A14, A15 và A16 có thêm một A, còn trình tự nucleotide gen *trnL* mã số AF387453 không có).

Bảng 5. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen matK ở mẫu A14, A15, A16 với loài Nưa Krausei (*A. krausei*) mã số AF387399 trong Genbank

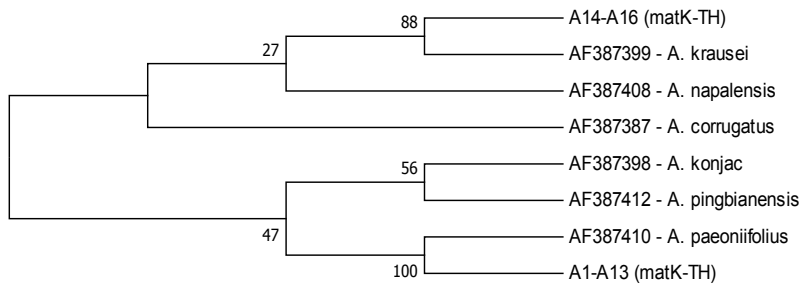
A14-A16 (matK-TH) AF387399	110.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80	1	ATTCAATATTTCCATTTTTGAGGCAAAATTAACACATTTAAAGTCGCTATCAGATATACTAAACCCCTACCCCGTACAT
A14-A16 (matK-TH) AF387399	8190.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160	81	CTAGAAATCCTGCTTCAAATCTACAATACTGGATACAAGATGTTCCCTCTTACATTTATTACGATCTTTTTTCATGA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	161170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240	161	ATATCATAAATTCGAATAACTCATTACTCCAAAGAAATCTAACTATTATGCTTTTTCAAAAGAGAATCCAGGCATTTTT
A14-A16 (matK-TH) AF387399	241250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320	241	TGTTCCATATAAATCTTATCTAGCTTGAATCGAAATCCATATTAGTTTTTCTCCCTAAACAATCCTCTTATTTACGATCA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	321330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	321	ACATCTTCTGGAACCTTTCTTGAGCGAGCACATTTCTATGAAAAATAGAACAACTCTGCTAGTACTTTGTTGTAATGA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	401410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480	401	TTTTCAAAAAACCCATGCTTCTCAAGGATCCTTTCATGCATATGTTAGATACAAGGAAAAATCAATTTCTGGCTCAA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	481490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560	481	AAGGACTCATCTCTGATGAAGAAATGAAAACTTACTTTCTCAATTTTTGCCAATGTAATTTTCACTTTTGGTCTCAA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	561570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640	561	CCCTGTAGGATCCACATAAAACCAATTTCTCAAAATTTTTCTTTCTATTTTTCTGGGTATCTTTCAAGTCTACCAATAAATCC
A14-A16 (matK-TH) AF387399	641650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720	641	TTCAAGCGGTAAAGAGTCAAATGCTAGAGAAATCTTTTTTCTAGTAGACTGTACTAAAAAATCGAAACTATAGTCCAA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	721730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800	721	TTATTCCTATGATTGGACCAATGTCAAAAGCGAAATTTTGTAACTATCGGGGAATCCTATTAGTAAGCCAGTTTGGCC
A14-A16 (matK-TH) AF387399	801810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880	801	GATTTGCTGATTCTCATATTAATGATCGATTTGCTCGGACATGAGAAATCTTCTCATTATACAGCCGGTCTTCAAA
A14-A16 (matK-TH) AF387399	881890.....900.....910.....920.....930.....940.....950	881	AAAACAAAGTTTCTATCGAATAAAGTATATACTCCGACTTTCATGCTGCTAGAACCTTTCGCCCTTAAACATA

Bảng 6. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen trnL ở mẫu A14, A15, A16 với loài *Nura krausei* (A. krausei) mã số AF387453 trong Genbank

A14-A16 (trnL-TH) AF387453	1	GAGAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTCTAACAAATGGAGTTGATTGCATTGGGGTGGTAGCTGGAA	80
A14-A16 (trnL-TH) AF387453	81	TTCTTCTTTCTATCTAAATTACAGAAAAGGTAACCCATATACCTAATACGCACGTATATATACCGACATATCAAAACGAT	160
A14-A16 (trnL-TH) AF387453	161	TAAACACGACCCAAATCCATATAAATTATTTATATAATTATAATAAATTTATAATAAATTCAAAAATTTATGAAAAATTA	240
A14-A16 (trnL-TH) AF387453	241	AAGAGTTATTGCGAATCCATTCTAAATTGAAGTAAGAGTCGAATATTCAGTGATCAAATCATTTGAAAAAAAAAAAAATG	320
A14-A16 (trnL-TH) AF387453	321	ATTAATCGGACCGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTTCTACATGTCAAATCCGACAAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAA	400
A14-A16 (trnL-TH) AF387453	401	TCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAGTCCCTCTATCCC	400

Xây dựng cây phát sinh thể hiện mối quan hệ của 2 nhóm mẫu *Nura* nghiên cứu (A1 đến A13 và A14 đến A16) và 6 loài thuộc chi *Amorphophallus* trên ngân hàng gen (*Nura* chuông *A. paeoniifolius* mã số AF387410, *Nura*

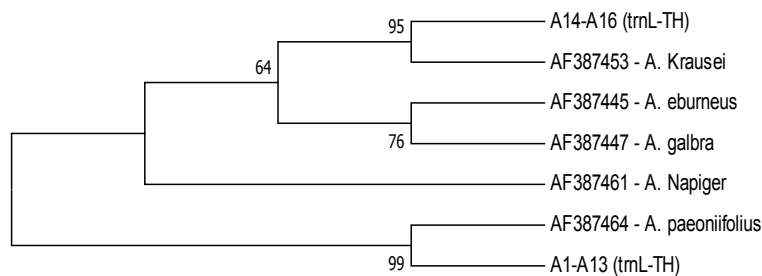
krausei *A. krausei* mã số AF387399, *A. napalensis* mã số AF387408, *A. corrugatus* mã số AF387387, *A. konjac* mã số AF387398, *A. pingbianensis* mã số AF387412) dựa trên kết quả phân tích đoạn gene *matK* (hình 5).



Hình 5. Cây phân phát sinh dựa trên trình tự nucleotide gen matK của một số loài *Nura* xây dựng bằng phần mềm MEGA (phương pháp Neighbor-joining)

Tương tự, cây phát sinh thể hiện mối quan hệ của 2 nhóm mẫu nghiên cứu (A1 đến A13 và A14 đến A16) và 5 loài chi *Amorphophallus* trên ngân hàng gen (*Nura* chuông *A. paeoniifolius* mã số AF387464, *Nura krausei* *A.*

krausei mã số AF387453, *A. eburneus* mã số AF387445, *A. galbra* mã số AF387447 và *A. napiger* mã số AF387461) dựa trên kết quả phân tích đoạn gene *trnL* (hình 6).



Hình 6. Cây phân phát sinh dựa trên trình tự nucleotide gen trnL của một số loài *Nura* xây dựng bằng phần mềm MEGA (phương pháp Neighbor-joining)

Kết quả xây dựng cây phát sinh giữa các mẫu Nưa nghiên cứu với các loài Nưa công bố trong ngân hàng gen dựa trên trình tự nucleotide gen *matK* và *trnL* (hình 5, hình 6) cho thấy, các mẫu Nưa (A1 – A13) giống với loài Nưa Chuông (*A. paeoniifolius*); mẫu A14, A15, A16 giống với loài Nưa krausei (*A. krausei*) cùng trong một nhánh.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả giám định loài về mặt hình thái học và vật hậu cho thấy các mẫu Nưa thu tại 05 huyện của tỉnh Thanh Hóa thuộc hai loài là Nưa chuông (*A. paeoniifolius*) và Nưa krausei (*A. krausei*). Nưa krausei có phân bố hẹp, chỉ thấy xuất hiện ở xã Trí Nang của huyện Lang Chánh; trong khi đó loài còn lại được tìm thấy phổ biến ở các huyện còn lại của tỉnh.

Xác định, so sánh và phân tích trình tự vùng gen *matK* và *trnL* từ 16 mẫu Nưa thu tại Thanh Hóa đã định danh được các mẫu Nưa từ A1 đến A13 là loài Nưa chuông (*A. paeoniifolius*), mẫu A14, A15, A16 là loài Nưa krausei (*A. krausei*) phù hợp với định danh về hình thái. Việc sử dụng mã vạch DNA của đoạn gen

matK và *trnL* trong việc giám định các mẫu Nưa ở Thanh Hóa là hiệu quả và là cơ sở khoa học quan trọng cho bảo tồn và phát triển nguồn gen Nưa quý ở tỉnh Thanh Hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arvill A, Bodin L (1995). Effect of short-term ingestion of Konjac glucomannan on serum cholesterol in healthy men. *Am J Clin Nutr* 61:585 - 589.
2. Nguyễn Nghĩa Thìn (2007). *Các phương pháp nghiên cứu thực vật*. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) (2005). *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Nguyễn Văn Dư và N.K. Khôi (2004). Bổ sung ba loài thuộc chi Nưa *Amorphophallus* Blume ex Decne (họ Ráy-Araceae ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, 26 (4A): 57 - 60.
5. Nguyễn Văn Dư, Hà Tuấn Anh, Bùi Văn Thanh, Trương Anh Thư (2011). Loài Nưa (*Amorphophallus*) – Họ Ráy (Araceae) có triển vọng trong công nghệ thực phẩm. Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4, trang 1095 - 1098.
6. Sood N, Baker W.L, Coleman C.I. (2008). Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight, and blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 88:1167 - 1175.

IDENTIFICATION OF *Amorphophallus* spp. FROM THANH HOA PROVINCE BY EVIDENCES ON MORPHOLOGY AND MOLECULE

Bui Van Thang¹, Nguyen Thi Hai Ha², Vu Quang Nam³,
Nguyen The Dai⁴, Phan Van Quynh⁵, Nguyen Ngoc Anh⁶

^{1,2,3,6}Vietnam National University of Forestry

^{4,5}Center for research and application of forestry science and technology Thanh Hoa

SUMMARY

Amorphophallus Blume ex Decne is one of genuses of the Araceae family, distributed widely and cultivated in Southeast Asia and Africa for the purpose of economy, widely used in food, medicine and chemical industries by its tubers containing a polysaccharide - glucomannan - features in medicine. The results of using morphological methods for identification of 60 samples collected from 5 districts of Thanh Hoa province, combined with the genetic sequence analysis of *trnL* and *matK* from 16 samples showed the samples of *Amorphophallus* collected from Thanh Hoa, belonging to 2 species: *Amorphophallus paeoniifolius* and *Amorphophallus krausei*. The characteristics on morphology and distribution of these species are also given. *Amorphophallus krausei* have limited distribution, only observed in Tri Nang commune of Lang Chanh district; while *Amorphophallus paeoniifolius* is found in the rest districts of the province. Results also showed that the use of DNA barcode of *trnL*, *matK* genes and in the assessment of the samples in Thanh Hoa, Nua is effective and an important scientific proof for conservation and development of *Amorphophallus* genetic resources in Thanh Hoa province.

Keywords: *Amorphophallus*, DNA barcode, identification, morphology, Thanh Hoa province.

Ngày nhận bài : 19/12/2016

Ngày phản biện : 25/12/2016

Ngày quyết định đăng : 20/01/2017