

PHYLOGENETIC ANALYSIS BASED ON *psbZ-rps14* AND *rbcL-accD* SEQUENCES TO SUPPORT SPECIES IDENTIFICATION OF (*Hoya verticillata* var *verticillata*)**Hoang Viet Cuong, Pham Thi Thu Hien, Tu Quang Tan, Chu Hoang Mau***

TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 26/8/2024 Revised: 17/10/2024 Published: 18/10/2024	<i>Hoya verticillata</i> var. <i>verticillata</i> is a valuable ornamental and medicinal plant containing many biologically active substances. In traditional medicine, <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> has been used as a galactagogue to treat wounds and broken bones. <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> has a similar morphology to some species of the <i>Hoya</i> genus, so it is difficult to identify. When the roots, stems, and leaves have changed shape or are in powder form due to mechanical impact, it is even more difficult to distinguish. This study aims to identify DNA markers to support the identification of <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> species. Using molecular evolutionary analysis methods, based on the sequence of the space region of the chloroplast genome with high nucleotide diversity, the phylogenetic tree showing the genetic relationship between <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> and species of the <i>Hoya</i> genus was established. Analysis based on the <i>psbZ-rps14</i> sequence showed that <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> was distributed in the same group as <i>Hoya carnosa</i> (NC_045868.1) and <i>Hoya meliflua</i> (NC_069571.1), but the bootstrap coefficients were low (76% and 51%, respectively). For the <i>rbcL-accD</i> sequence, <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> was very closely related to <i>Hoya carnosa</i> (NC_045868.1) and <i>Hoya ovalifolia</i> (NC_069563.1) with bootstrap coefficients of 96% and 94%, respectively. The <i>rbcL-accD</i> marker in the chloroplast genome is a potential DNA barcode candidate to aid in distinguishing <i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i> from other species in the <i>Hoya</i> genus.
KEYWORDS	
Chloroplast genome <i>Hoya verticillata</i> Molecular evolution <i>psbZ-rps14</i> <i>rbcL-accD</i>	

PHÂN TÍCH SỰ PHÁT SINH CHỦNG LOẠI DỰA TRÊN TRÌNH TỰ *psbZ-rps14* VÀ *rbcL-accD* NHẪM HỖ TRỢ ĐỊNH DANH LOÀI LAN TAI CÁO (*Hoya verticillata* var *verticillata*)**Hoàng Việt Cường, Phạm Thị Thu Hiền, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu***

Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 26/8/2024 Ngày hoàn thiện: 17/10/2024 Ngày đăng: 18/10/2024	Lan tai cáo (<i>Hoya verticillata</i> var. <i>verticillata</i>) là cây hoa cảnh và cây dược liệu quý, chứa nhiều dược chất có hoạt tính sinh học. Trong y học truyền thống, Lan tai cáo được sử dụng làm thuốc lợi sữa, chữa trị vết thương, gãy xương. Lan tai cáo có hình thái tương tự một số loài thuộc chi <i>Hoya</i> , nên khó nhận diện. Khi rễ, thân, lá thay đổi hình dạng hoặc ở dạng bột do tác động cơ học lại càng khó phân biệt. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định chỉ thị DNA để hỗ trợ định danh loài Lan tai cáo. Sử dụng phương pháp phân tích tiến hoá phân tử, dựa trên trình tự vùng đệm của hệ gene lục lạp có giá trị đa dạng nucleotide cao, cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ di truyền giữa Lan tai cáo với các loài thuộc chi <i>Hoya</i> đã được thiết lập. Phân tích dựa trên trình tự <i>psbZ-rps14</i> cho thấy Lan tai cáo phân bố cùng nhóm với <i>Hoya carnosa</i> (NC_045868.1) và <i>Hoya meliflua</i> (NC_069571.1), nhưng hệ số bootstrap thấp (76% và 51%). Đối với trình tự <i>rbcL-accD</i> , Lan tai cáo có quan hệ rất gần với <i>Hoya carnosa</i> (NC_045868.1) và <i>Hoya ovalifolia</i> (NC_069563.1) với hệ số bootstrap lần lượt là 96% và 94%. Chỉ thị <i>rbcL-accD</i> trong hệ gene lục lạp là ứng cử viên mã vạch DNA tiềm năng hỗ trợ phân biệt loài Lan tai cáo (<i>H. verticillata</i> var <i>verticillata</i>) với các loài khác trong chi <i>Hoya</i> .
TỪ KHÓA	
Hệ gene lục lạp <i>Hoya verticillata</i> Tiến hoá phân tử <i>psbZ-rps14</i> <i>rbcL-accD</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10996>

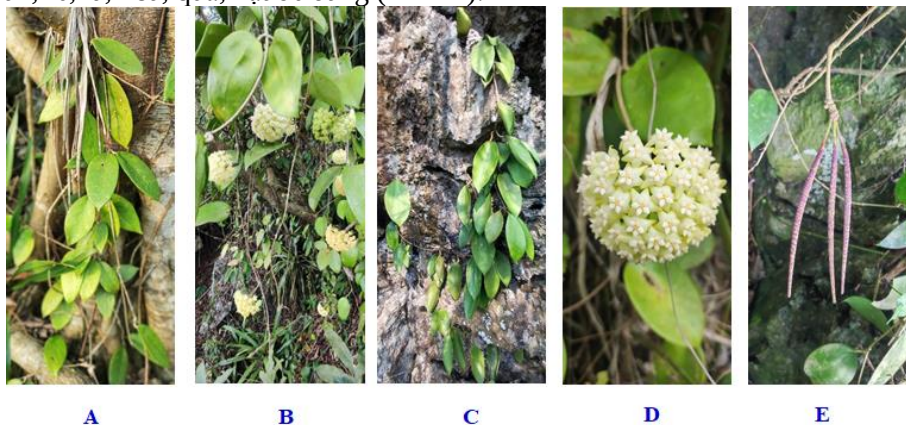
* Corresponding author. Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Nghiên cứu phát sinh chủng loại dựa trên phân tích hệ gene nhân cung cấp các mối quan hệ được giải quyết tốt giữa các họ và bộ thực vật hạt kín, cung cấp những hiểu biết sâu sắc về quá trình tiến hóa và đa dạng hóa của chúng [1]. Các gene nhân tiến hóa nhanh hơn các gene lục lạp, và gene ty thể [2]. Tuy nhiên, hệ gene nhân chứa một lượng lớn các vùng không mã hóa, các trình tự lặp đi lặp lại và các intron, khiến nó phức tạp hơn các hệ gene ty thể và hệ gene lục lạp. Kích thước của hệ gene nhân rất khác nhau giữa các loài, trong đó một số hệ gene thực vật và động vật đặc biệt lớn. Các sinh vật lưỡng bội có hai bộ nhiễm sắc thể, dẫn đến dị hợp tử, trong đó hai alen khác nhau tồn tại ở một locus. Điều này tạo thêm một lớp phức tạp khác cho việc lắp ráp và phân tích bộ gene. Các sinh vật đa bội (có nhiều hơn hai bộ nhiễm sắc thể) còn đặt ra những thách thức lớn hơn do có nhiều bản sao của mỗi gene. Vì vậy, việc tích hợp cả phương pháp tiếp cận dựa trên lục lạp và DNA nhân có thể mang lại sự hiểu biết toàn diện hơn về phân loại thực vật và lịch sử tiến hóa [3].

Nghiên cứu hệ gene lục lạp cho thấy, trình tự DNA lục lạp (chloroplast DNA-cpDNA) là công cụ có giá trị để nghiên cứu phát sinh loài thực vật và xác định loài. Các vùng không mã hóa của DNA lục lạp, chẳng hạn như intron và các vùng đệm giữa các thể hệ, tiến hóa nhanh hơn các vùng mã hóa như *rbcL*, khiến chúng phù hợp hơn để giải quyết mối quan hệ giữa các đơn vị phân loại có liên quan chặt chẽ [4]. Gene *matK* đã cho thấy tiềm năng phân tích phát sinh loài trên cấp độ họ, với vùng 3' của nó đặc biệt mang lại nhiều thông tin [5]. Các chỉ thị DNA lục lạp có độ biến thiên cao, bao gồm *ycf1^a*, *trnK*, *rpl32-trnL* và *trnH-psbA*, đã được xác định là ứng cử viên tiềm năng cho các nghiên cứu phân loại cấp độ thấp và mã vạch DNA [6]. Những tiến bộ gần đây trong kỹ thuật giải trình tự DNA đã cho phép so sánh toàn bộ hệ gene, góp phần to lớn vào sự hiểu biết về mối quan hệ tiến hóa thực vật [7]. Những phương pháp tiếp cận phân tử này bổ sung cho các phương pháp hình thái và hóa thạch truyền thống, mang lại cái nhìn chính xác và toàn diện hơn về phát sinh chủng loại thực vật.

Cây Lan tai cáo (*Hoya verticillata* var. *verticillata*) là một loại cây biểu sinh, vừa là cây hoa cảnh vừa là cây thuốc quý. Trong tự nhiên, loài này phân bố ở vùng núi đá, sống bò trên đá hoặc leo trên thân cây gỗ [8]. Tại tỉnh Thái Nguyên, loài này được tìm thấy ở vùng núi đá của các huyện miền núi trong tỉnh, chủ yếu ở các huyện Võ Nhai, Đồng Hỷ, Phú Lương, Định Hóa. Tại khu vực Hang Trai, huyện Đồng Hỷ, loài thực vật này phát triển rất tốt, có thể thu thập được các mẫu về thân, rễ, lá, hoa, quả, hạt dễ dàng (Hình 1).

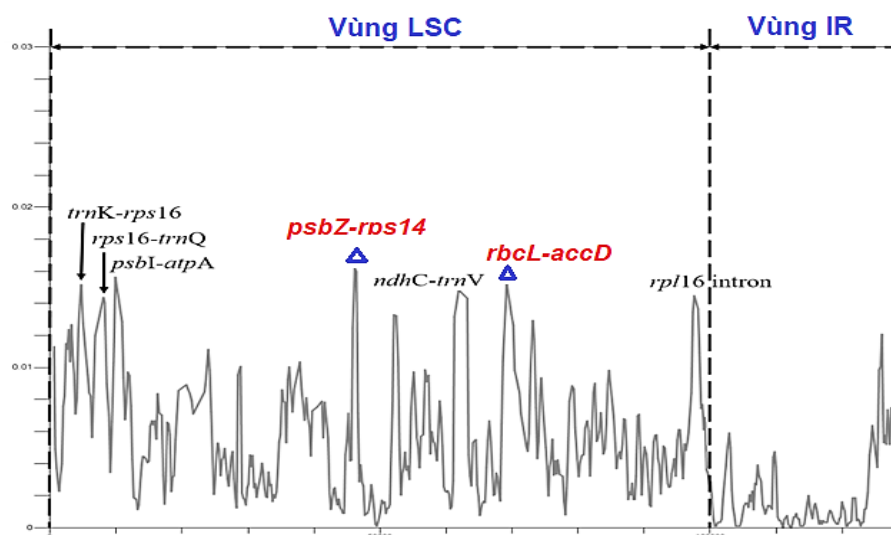


Hình 1. Cây *Hoya verticillata* var. *verticillata* mọc trong môi trường tự nhiên tại khu vực Hang Trai, xã Tân Long, huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam. A, B: Cây *H. verticillata* var. *verticillata* leo trên cây gỗ; C: Cây *H. verticillata* var. *verticillata* trên vách đá; D: Hoa *H. verticillata* var. *verticillata*; E: Quả *H. verticillata* var. *verticillata* (Ảnh chụp của nhóm tác giả)

Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) có hình thái tương tự các loài khác thuộc chi *Hoya* và họ Apocynaceae, nên rất khó để phân biệt với các loài khác trong chi *Hoya*, trong họ

Apocynaceae nếu chỉ dựa trên cơ sở là hình thái, giải phẫu. Ngoài ra, nếu Lan tai cáo bị biến dạng hoặc ở dạng bột thì việc xác định sẽ không khả thi.

Các nghiên cứu gần đây đã khám phá việc sử dụng trình tự hệ gene lục lạp để phân biệt các loài trong chi *Hoya*. Hai chỉ thị *rbcL* và *matK* được sử dụng trong phân tích sự phát sinh loài cho thấy *matK* cung cấp độ phân giải tốt hơn *rbcL* [9]. Trong hệ gene lục lạp hoàn chỉnh của *Hoya* có vùng sao chép đơn nhỏ (SSC) giảm, còn các đoạn đảo ngược (IR) lại mở rộng [10], [11] và một số mã vạch DNA tiềm năng đã được xác định như *trnT-trnL-trnF*, *psbA-trnH* và *ycf1* [10]. Những vùng DNA có giá trị đa dạng nucleotide cao tồn tại ở vùng sao chép lớn (LSC), SSC và IR được sử dụng trong phân tích tiến hoá phân tử. Các nghiên cứu về sự phát sinh loài sử dụng các vùng DNA lục lạp này không những làm rõ mối quan hệ tiến hoá giữa các loài trong chi *Hoya* mà còn đề xuất ứng viên mã vạch tiềm năng hỗ trợ định danh loài [11]-[13]. Trong nghiên cứu trước, bốn vùng đệm liên gene (*trnK-rps16*, *rps16-trnQ*, *psbI-atpA*, *ndhC-trnV*) đã được sử dụng làm dữ liệu để phân tích sự phát sinh chủng loại, kết quả cho thấy Lan tai cáo có quan hệ họ hàng rất gần và phân bố trong cùng nhóm với *Hoya carnosa* với hệ số Bootstrap là 99-100% [13]. Trong nghiên cứu này, hai vùng đệm *psbZ-rps14* và *rbcL-accD* nằm trong vùng LSC có giá trị đa dạng nucleotide cao (Hình 2) được sử dụng trong phân tích tiến hoá phân tử nhằm tìm kiếm ứng viên mã vạch DNA tiềm năng hỗ trợ phân biệt loài Lan tai cáo với các loài khác nhau trong chi *Hoya*.



Hình 2. Trình tự vùng đệm *psbZ-rps14* và *rbcL-accD* của hệ gene lục lạp Lan tai cáo có giá trị đa dạng nucleotide cao sử dụng trong phân tích tiến hoá phân tử

2. Phương pháp nghiên cứu

Dữ liệu hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var *verticillata*) lưu giữ trên GenBank mang mã số OR475244 [14]. Trình tự nucleotide của hai vùng đệm *psbZ-rps14* và *rbcL-accD* của phân tử cpDNA được nhận diện và tải từ dữ liệu hệ gene lục lạp của Lan tai cáo trên GenBank.

Sử dụng BLAST để phân tích sự tương đồng đối với mỗi trình tự vùng đệm của *H. verticillata* var *verticillata* với các loài khác trên GenBank. Chọn các trình tự có tổng điểm và độ che phủ cao làm dữ liệu cho phân tích phát sinh chủng loại.

Phân tích sự phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng đệm *psbZ-rps14* và *rbcL-accD* bằng MEGA11 [15], theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) và mô hình Tamura-Nei [16], với hệ số bootstrap được suy ra từ 1000 lần lặp lại [17].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Trình tự vùng đệm *psbZ-rps14* và *rbcL-accD*

Trong hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var *verticillata*), gene *psbZ* thuộc nhóm gene mã hóa tiểu đơn vị protein thuộc photosystem II, còn *rps14* là gene mã hóa protein tiểu đơn vị nhỏ và trình tự giữa hai gene này được gọi là vùng đệm *psbZ-rps14*. Gene *rbcL* mã hóa tiểu đơn vị protein rubisco liên quan đến quang hợp, gene *accD* mã hóa tiểu đơn vị enzyme Acetyl-CoA-carboxylase, tham gia tổng hợp acid béo và *rbcL-accD* là vùng đệm giữa hai gene này. Trình tự nucleotide của hai vùng đệm được tải từ trình tự cpDNA trên GenBank (mã số OR475244), trong đó *psbZ-rps14* có kích thước 885 bp, còn *rbcL-accD* là 907 bp (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự nucleotide của vùng đệm *psbZ-rps14* và *rbcL-accD* trong phân tử cpDNA lục lạp của *H. verticillata* var *verticillata* tải từ GenBank

Đặc điểm	Vùng đệm <i>psbZ-rps14</i>	Vùng đệm <i>rbcL-accD</i>
Số lượng nucleotide	885 bp	907 bp
Trình tự nucleotide	ACCTATCGTCCCAGATCCAAAACCGAAAG GACCCCCGAATTTTCTCGGTTGTAAGA CACATTAGAATTTAATATAAGTCCCCCAA AGAGAATAGAAAATGCAAATAAGAAAAC AAAAAATTTGAGGGGGGTCAAACCTCTTC CAAACCTATTAAAAAATACAATTAATAT TTATAATATTTAATAAAAAATAAAATAATT GGAATCGAGTCGAGGAGAGTCTTTGGTCT GGGACTGCACAAAAATGATCGAGGTGTAT ATTTATATATGAGGTATAGAGGTTTATAT TTATATATAAATTTTATATATAAATAAAT ATATTAATATTGTGTGGACATATTATGTA TCAAGAACGAAAAAAGCGGATATGGTTG AATGGTAAAAATTTCTCTTTGCCAAGGAGA AGATGTGGGTTCGATTCCCGCTATCCGCC CACGATAAAATTTATTATTAAATATAAAA AAATATTAAATAAAATTAGGTTAGGTTTT ATTAAATATAATTTGGTATAGTTGTCTGT GATCGTGTAGTCATTCTATCCCCCTCTT TTTCCCTTTCTATAGCCTCCCCCAAAGT GGTAATTAATTACTAGTTAACTTAACAAA GTAAAATCTAAAATTTTGTGACAAACAAG ATGTTGCGGAGACGGGATTTGAACCCGTG ACCTCAAGGTTATGAGCCTTGCGAGCTAC CAAACCTGCTCTACTCCGCGATGAAGAGAA GAACCTGAAAACTAATAGATAACCAGGGGT TGAGTTTCGCCCTCTACCATATCTGTACA AATAGGATAGCCCATTTATACAGAATGGT AAAGGGTTATACAGAATGGCAAGGGGGAC CTCTACGATCACCGACCTAGAATAGAAA TCTAGAGTTAATCC	TTACTTTTTGTTATCTTAGTTGAATTGTAA TTAAACTCGGCCCAATCTTTTCTAAAAGG ATTGAGCCGAATACAAAGATTCTTTTTTTT TTTTTATTTAATTATTTTTTAAAGTATTTAA TATTAATACATACTTATATAGATATAAGAT TTGAAATAAAAAAATCAAAAAAATCTA AGGCTCAAATCTTTCTATTGTTGTCTTGGA CCTACAATTAATCTACGGATCCTTGGGATT GGGCTATTCTTTTATATCCTGCAGTTTTCC TGAATCAAGCCAAGTATCACAATCTTTCT ATCCATCCCGTATATTGTCTTTTCTTTCC ATATTGGTGAAATAGAACCTGAAATTTTAA CGTTCTTGGGCGAAATTTTACGAAAAAAG GATTTATAAAATATTTTTTTTCGATGCGAA TTTGATACGACATAAGAAAAGGCGCTCTTT ATCATTGTATTTATAATGACAAGAGATTCC CTGATATCATATTAATATATTGACAATATT CAAAAAAATGTATAAAAAAATGACAAG GGATTCTCTGATATCATATTAATATATTGA CATTATTCAAAAAATAATGTATAATGTATA AAAACAATGACAAGAGATTCCCTGATATGA TATATATATATAGTGTATAGTCATATATAT CGTATAGTGAAGTATTACTCCGGATTTTCA AAAAAAGAGCATTTTTTTTCAATAATCACAC CTAATACCTTCTTATTGTTTCTTATTGGTT AACTTATTAGTTAATAAAAAATGCTAGCGA TTGGTTTAGTCTAATAGGAAAGAAGATATT CAAATAAATAATTTTTTGATCGAATGACTAT TCATCTATTGTTTTTATATTTTCTTACAAA ACAAAAAACAAAAAAGGGGGACAAAAT AACTCT

3.2. Thiết lập cây phát sinh chủng loại dựa trên vùng đệm *psbZ-rps14*

Trình tự vùng đệm *psbZ-rps14* trong hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var *verticillata*) được sử dụng trong phân tích BLAST trực tuyến trên NCBI đã thu được 100 trình tự, trong đó có 33 trình tự được lựa chọn để phân tích sự phát sinh chủng loại với tổng số điểm từ 1282 - 1663 (đối với nhóm *Hoya*) và từ 1062 - 1304 (nhóm ngoài *Hoya*), độ che phủ là 100%. Độ tương đồng 93,72 - 100% (Nhóm *Hoya*) và 89,48 - 94% (nhóm ngoài *Hoya*) (Bảng 2).

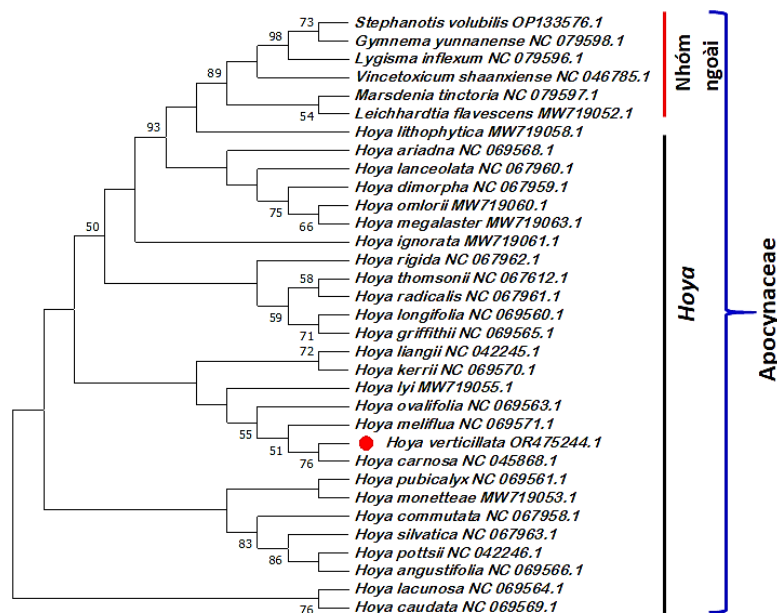
Bảng 2. Danh sách trình tự *psbZ-rps14* từ GenBank được sử dụng trong phân tích sự phát sinh chủng loại

TT	Tên loài	Mã trên GeneBank	Tổng điểm	Độ che phủ (%)	Hệ số tương đồng (%)
1	<i>Hoya verticillata</i>	NC_085236.1	1663	100	100
2	<i>Hoya carnosa</i>	NC_045868.1	1633	100	100
3	<i>Hoya lyi</i>	MW719055.1	1493	100	97,51
4	<i>Hoya kerrii</i>	NC_069570.1	1482	100	97,08
5	<i>Hoya ariadna</i>	NC_069568.1	1472	100	96,96
6	<i>Hoya monetteae</i>	MW719053.1	1452	100	96,83
7	<i>Hoya thomsonii</i>	NC_067612.1	1454	100	96,72
8	<i>Hoya ovalifolia</i>	NC_069563.1	1452	100	96,83
9	<i>Hoya meliflua</i>	NC_069571.1	1447	100	96,82
10	<i>Hoya silvatica</i>	NC_067963.1	1441	100	96,61
11	<i>Hoya pottsii</i>	NC_042246.1	1441	100	96,61
12	<i>Hoya angustifolia</i>	NC_069566.1	1441	100	96,61
13	<i>Hoya megalaster</i>	MW719063.1	1432	100	96,27
14	<i>Hoya lacunosa</i>	NC_069564.1	1430	100	96,38
15	<i>Hoya dimorpha</i>	NC_067959.1	1428	100	95,97
16	<i>Hoya lithophytica</i>	MW719058.1	1426	100	96,27
17	<i>Hoya commutata</i>	NC_067958.1	1423	100	96,27
18	<i>Hoya caudata</i>	NC_069569.1	1421	100	96,05
19	<i>Hoya radicalis</i>	NC_067961.1	1417	100	95,86
20	<i>Hoya omlorii</i>	MW719060.1	1413	100	96,04
21	<i>Hoya rigida</i>	NC_067962.1	1393	100	95,33
22	<i>Hoya liangii</i>	NC_042245.1	1391	100	95,70
23	<i>Hoya pubicalyx</i>	NC_069561.1	1371	100	95,36
24	<i>Hoya longifolia</i>	NC_069560.1	1365	100	95,25
25	<i>Hoya griffithii</i>	NC_069565.1	1365	100	95,25
26	<i>Hoya ignorata</i>	MW719061	1360	100	95,14
27	<i>Hoya lanceolata</i>	NC_067960.1	1282	98	93,72
28	<i>Leichhardtia flavescens</i>	MW719052.1	1304	100	94,00
29	<i>Marsdenia tinctoria</i>	NC_079597.1	1286	100	92,86
30	<i>Gymnema yunnanense</i>	NC_079598.1	1184	100	91,86
31	<i>Stephanotis volubilis</i>	OP133576.1	1147	100	90,95
32	<i>Lygisma inflexum</i>	NC_079596.1	1118	100	90,61
33	<i>Vincetoxicum shaanxiense</i>	NC_046785.1	1062	100	89,48

Cây phát sinh chủng loại được thiết lập dựa trên 33 trình tự vùng đệm *psbZ-rps14* cho thấy 27 loài thuộc chi *Hoya* có quan hệ rất gần với 6 loài thuộc các chi khác (nhóm ngoài) như *Leichhardtia*, *Marsdenia*, *Vincetoxicum*, *Lygisma*, *Gymnema*, *Stephanotis*, hệ số bootstrap là 93%. Trong nhóm *Hoya*, loài Lan tai cáo phân bố cùng nhóm với loài *Hoya carnosa* (mã số NC_045868.1), hệ số bootstrap là 76%, với loài *Hoya meliflua* (NC_069571.1), hệ số bootstrap là 51% (Hình 3).

3.3. Thiết lập cây phát sinh chủng loại dựa trên vùng đệm *rbcL-accD*

Sử dụng BLAST phân tích tương đồng giữa vùng đệm *rbcL-accD* trong hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var *verticillata*) với các trình tự trên GenBank kết quả đã thu được 100 trình tự, trong đó có 34 trình tự được lựa chọn để phân tích sự phát sinh chủng loại với tổng điểm là 1274 - 1818 (nhóm *Hoya*) và 716 - 1092 (nhóm ngoài *Hoya*), độ che phủ là 98 - 100% (nhóm *Hoya*) và 77 - 82% (Bảng 3). Cây phát sinh chủng loại được thiết lập dựa trên 34 trình tự vùng đệm *psbZ-rps14* cho thấy 26 loài thuộc chi *Hoya* có quan hệ gần với 8 loài thuộc các chi khác (nhóm ngoài) như *Leichhardtia*, *Marsdenia*, *Vincetoxicum*, *Lygisma*, *Gymnema*, *Stephanotis*, *Dregea*, *Synanchum* với hệ số bootstrap là 77%. Trong nhóm *Hoya*, loài Lan tai cáo có quan hệ rất gần với loài *Hoya carnosa* (mã số NC_045868.1), hệ số bootstrap là 96%, với loài *Hoya ovalifolia* (NC_069563.1), hệ số bootstrap là 94% (Hình 4).



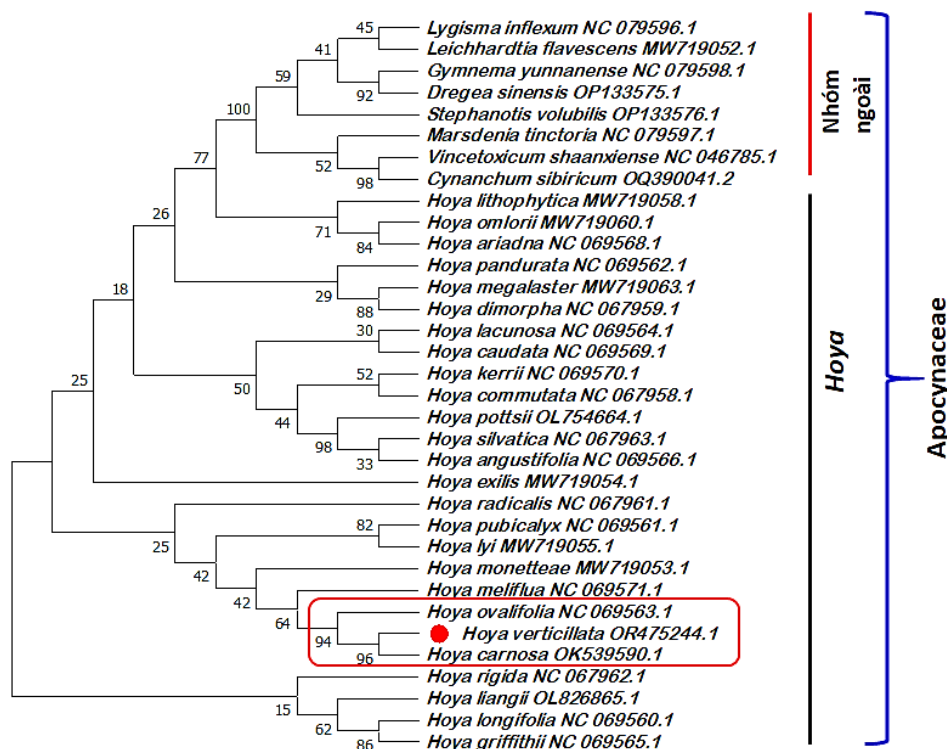
Hình 2. Sơ đồ cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng đệm psbZ-rps14. Từng nhánh của sơ đồ cây thể hiện tên loài và mã số của trình tự vùng đệm psbZ-rps14 trên GenBank.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) [18]. Các số cạnh các nhánh trong sơ đồ cây là hệ số bootstrap với 1000 lần lặp lại

Bảng 3. Danh sách trình tự rbcL-accD từ GenBank được sử dụng trong phân tích sự phát sinh chủng loại

TT	Tên loài	Mã trên GeneBank	Tổng điểm	Độ che phủ (%)	Hệ số tương đồng (%)
1.	<i>Hoya verticillata</i>	NC_085236.1	1671	100	100
2.	<i>Hoya monetteae</i>	MW719053.1	1658	100	97,28
3.	<i>Hoya lyi</i>	MW719055.1	1643	100	96,96
4.	<i>Hoya carnosa</i>	OK_539590.1	1640	100	99,23
5.	<i>Hoya omlorii</i>	MW719060.1	1586	100	92,63
6.	<i>Hoya ovalifolia</i>	NC_069563.1	1583	100	98,04
7.	<i>Hoya radicalis</i>	NC_067961.1	1573	100	96,13
8.	<i>Hoya rigida</i>	NC_067962.1	1573	100	96,10
9.	<i>Hoya pubicalyx</i>	NC_069561.1	1555	100	95,53
10.	<i>Hoya griffithii</i>	NC_069565.1	1551	100	95,71
11.	<i>Hoya longifolia</i>	NC_069560.1	1551	100	95,71
12.	<i>Hoya liangii</i>	OL_826865.1	1522	100	95,01
13.	<i>Hoya kerrii</i>	NC_069570.1	1518	100	95,19
14.	<i>Hoya dimorpha</i>	NC_067959.1	1514	100	93,85
15.	<i>Hoya meliflua</i>	NC_069571.1	1513	100	96,65
16.	<i>Hoya angustifolia</i>	NC_069566.1	1501	100	95,16
17.	<i>Hoya silvatica</i>	NC_067963.1	1501	100	95,16
18.	<i>Hoya pottsii</i>	OL_754664.1	1501	100	95,16
19.	<i>Hoya lithophytica</i>	MW719058.1	1496	100	92,25
20.	<i>Hoya caudata</i>	NC_069569.1	1472	100	95,86
21.	<i>Hoya lacunosa</i>	NC_069564.1	1344	100	92,86
22.	<i>Hoya exilis</i>	MW719054.1	1274	100	90,09
23.	<i>Hoya pandurata</i>	NC_069562.1	1453	99	97,74
24.	<i>Hoya commutata</i>	NC_067958.1	1353	99	94,36
25.	<i>Hoya ariadna</i>	NC_069568.1	1343	98	93,60
26.	<i>Hoya megalaster</i>	MW719063.1	1818	98	92,75
27.	<i>Leichhardtia flavesces</i>	MW719052.1	1091	85	91,83
28.	<i>Lygisma inflexum</i>	NC_079596.1	1036	82	94,04

TT	Tên loài	Mã trên GeneBank	Tổng điểm	Độ che phủ (%)	Hệ số tương đồng (%)
29.	<i>Stephanotis volubilis</i>	OP133576.1	995	82	92,94
30.	<i>Dregea sinensis</i> var. <i>corrugata</i>	OP133575.1	979	82	91,94
31.	<i>Marsdenia tinctoria</i>	NC_079597.1	907	78	90,24
32.	<i>Vincetoxicum shaanxiense</i>	NC_046785.1	891	82	90,36
33.	<i>Gymnema yunnanense</i>	NC_079598.1	879	78	90,15
34.	<i>Cynanchum sibiricum</i>	OQ390041.2	716	77	87,38



Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng đệm rbcL-accD. Từng nhánh của sơ đồ cây thể hiện tên loài và mã số của trình tự vùng đệm rbcL-accD trên GenBank.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) [18]. Các số cạnh các nhánh trong sơ đồ cây là hệ số bootstrap với 1000 lần lặp lại

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, hai vùng đệm psbZ-rps14 và rbcL-accD có giá trị đa dạng nucleotide cao từ hệ gene lục lạp của loài Lan tai cáo mang mã số OR475244 trên GenBank được sử dụng phân tích tiến hoá phân tử và thiết lập cây phát sinh chủng loại. Sơ đồ cây thiết lập dựa trên trình tự vùng đệm psbZ-rps14 cho thấy Lan tai cáo phân bố cùng nhóm với *Hoya carnososa* (NC_045868.1), hệ số bootstrap là 76%, với loài *Hoya meliflua* (NC_069571.1), hệ số bootstrap là 51%. Trên sơ đồ cây thiết lập dựa trên trình tự vùng đệm rbcL-accD, Lan tai cáo có quan hệ rất gần với *Hoya carnososa* (NC_045868.1), hệ số bootstrap là 96%, với loài *Hoya ovalifolia* (NC_069563.1), hệ số bootstrap là 94%. Vùng đệm rbcL-accD trên LSC của hệ gene lục lạp là ứng cử viên mã vạch DNA tiềm năng hỗ trợ phân biệt loài Lan tai cáo (*H. verticillata* var. *verticillata*) với các loài khác trong chi *Hoya*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. Zhang and H. Ma, "Nuclear phylogenomics of angiosperms and insights into their relationships and evolution," *Journal of Integrative Plant Biology*, vol. 66, pp. 546-578, 2024.

- [2] G. Drouin, H. Daoud, and J. Xia, "Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants," *Molecular phylogenetics and evolution*, vol. 49, pp. 827-831, 2008.
- [3] E. P. Witharana, M. H. San, N. U. Jayawardana, N. K. M. Yamamoto, and Y. Nagano, "Cost-Effective Approaches to Elucidate Intergeneric Relationships of Plants: Utilizing Multiple Conserved Nuclear Genes and Whole Chloroplast Genomes," *bioRxiv*, 2024, doi: 10.1101/2024.01.15.575800.
- [4] L. Gielly and P. Taberlet "The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcl* sequences," *Molecular biology and evolution*, vol. 11, pp. 769-777, 1994.
- [5] K.W. Hilu and G. Liang, "The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics," *American Journal of botany*, vol. 84, pp. 830-839, 1997.
- [6] W. Dong, J. Liu, J. Yu, L. Wang, and S. Zhou, "Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding," *PLoS One*, vol. 7, 2012, Art. no. e35071.
- [7] A. O. Uncu, A. T. Uncu, I. Celik, S. Doganlar, and A. Frary, "A Primer to Molecular Phylogenetic Analysis in Plants," *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 34, pp. 454-468, 2015.
- [8] K. K. Sarkar, T. Mitra, M. A. Rahman, I. M. Raja, M. Aktaruzzaman, M. A. Abid, M. N. H. Zilani, and D. N. Roy, "In Vivo bioactivities of *Hoya parasitica* (Wall.) and in silico study against cyclooxygenase enzymes," *BioMed Res. Int.*, vol. 28, 2022, Art. no. 1331758.
- [9] V. C. Hoang, T. H. A. Mai, Q. T. Tu, and H. M. Chu, "Analysis of the chloroplast gene region, *rbcl*, isolated from *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight plant," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, pp. 474-481, 2023.
- [10] W. O. Odago, E. N. Waswa, C. Nanjala, E. S. Mutinda, V. O. Wanga, E. M. Mkala, M. A. Oulo, Y. Wang, C.-F. Zhang, G.-W. Hu, and Q.-F. Wang, "Analysis of the Complete Plastomes of 31 Species of *Hoya* Group: Insights Into Their Comparative Genomics and Phylogenetic Relationships," *Front. Plant Sci.*, vol. 12, 2022, Art. no. 814833.
- [11] M. Rodda and M. A. Niissalo, "Plastome evolution and organisation in the *Hoya* group (Apocynaceae)," *Sci Rep.*, vol. 11, 2021, Art. no. 14520.
- [12] S. S. Renner, L. Wanntorp, A. Kocyan, and R. van Donkelaar, "Towards a Monophyletic *Hoya* (Marsdenieae, Apocynaceae): Inferences from the Chloroplast *trnL* Region and the *rbcl*-*atpB* Spacer," *Systematic Botany*, vol. 31, pp. 586-596, 2006.
- [13] C. V. Hoang, T. Q. Tu, T. T. M. Lo, and M. H. Chu, "Dataset on intergenic spacer regions of chloroplast genome and potential DNA barcode of *Hoya verticillata* var *verticillata* in Vietnam," *Data Brief.*, vol. 54, 2024, Art. no. 110471.
- [14] S. Jo, C. H. Mau, T. Q. Tan, H. V. Cuong, C. Lee, N. H. Quan, S. D. Thuong, and N. T. N. Lan, "Hoya verticillata chloroplast, complete genome," *GenBank*: OR475244.1. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR475244.1>. [Accessed August 22, 2024].
- [15] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11," *Mol Biol Evol.*, vol. 38, pp. 3022-3027, 2021.
- [16] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Mol Biol Evol.*, vol. 10, pp. 512-526, 1993.
- [17] J. Felsenstein, "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap," *Evolution*, vol. 39, pp. 783-791, 1985.
- [18] National Center for Biotechnology Information, "GenBank". [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>. [Accessed Jan. 15, 2024].