

NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ GẦN GŨI CÓ THỂ CỦA MỘT SỐ CHI THUỘC HỌ CAM (RUTACEAE) Ở VIỆT NAM

BÙI THU HÀ, NGUYỄN THỊ HỒNG LIÊN
 Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

TRẦN THẾ BÁCH
 Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
 Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Để xây dựng được một hệ thống phát sinh chủng loại có sức thuyết phục cao, phải có nhiều dẫn liệu dựa trên các kết quả nghiên cứu bằng các phương pháp khác nhau như: phương pháp hình thái so sánh, phương pháp cổ sinh học, phương pháp địa lý học,... đặc biệt là phương pháp phân loại bằng đặc điểm phân tử ADN và ứng dụng các chương trình máy tính.

Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng các chương trình máy tính với dữ liệu là các đặc điểm hình thái và các thông tin phân tử đã được công bố để nghiên cứu mối quan hệ gần gũi có thể của một số chi thuộc họ Cam (Rutaceae) ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Chọn 1 đại diện làm nhóm ngoài (OutGroup) trong xây dựng cây phát sinh chủng loại.
- Thông tin về trình tự ADN các loài của các chi họ Cam có ở Việt Nam được lấy trên ngân hàng gen.
- Đối chiếu trình tự ADN bằng chương trình máy tính ClustalX 1.83.
- Ứng dụng chương trình máy tính Paup 4.0 (hoạt động trên máy Mac-G5), MrBayes, TreeView và Mega để xây dựng sơ đồ mối quan hệ gần gũi có thể của một số chi của họ Cam (Rutaceae) ở Việt Nam, với dữ liệu là các đặc điểm hình thái và thông tin trình tự ADN đã được công bố.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Xác định nhóm Outgroup

Để xây dựng xây dựng cây phát sinh chủng loại, cần xác định một nhóm ngoài "Outgroup", thường là nhóm nguyên thủy hơn nhưng có quan hệ gần gũi với nhóm nghiên cứu. Qua quá trình tham khảo các tài liệu chuyên sâu về họ Rutaceae trên thế giới và ở Việt Nam, chúng tôi đã lựa chọn họ Simaroubaceae là nhóm outgroup.

2. Xây dựng xây dựng cây phát sinh chủng loại của một số chi thuộc họ Cam (Rutaceae Juss.) ở Việt Nam

Bảng 1

Các loài họ Cam và mã số trên ngân hàng trình tự ADN

Tên khoa học	Mã số trên ngân hàng gen	Tên khoa học	Mã số trên ngân hàng gen
<i>Acronychia pedunculata</i>	DQ225890	<i>Clausena lansium</i>	DQ225873
<i>Aegle marmelos</i>	AY115615	<i>Micromelum minutum</i>	AF025520
<i>Atalantia buxifolia</i>	AF434801	<i>Murraya paniculata</i>	AY115632

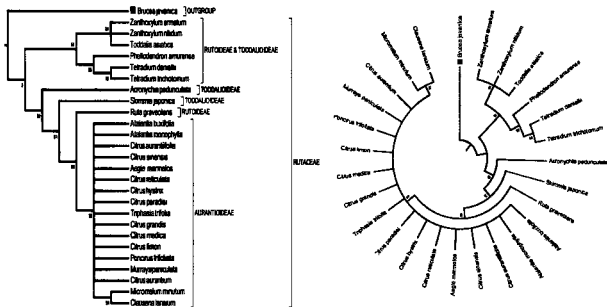
<i>Atalantia monophylla</i>	AY115616
<i>Brucera javanica</i>	GU593011
<i>Citrus aurantiifolia</i>	AY115617
<i>Citrus aurantium</i>	AY321661
<i>Citrus hystrix</i>	AY115622
<i>Citrus limon</i>	AY115627
<i>Citrus maxima</i>	AY115619
<i>Citrus medica</i>	EU178120
<i>Citrus paradise</i>	AY115633
<i>Citrus reticulata</i>	AY115634
<i>Citrus sinensis</i>	AF434810

<i>Phellodendron amurense</i>	AY321681
<i>Poncirus trifoliata</i>	AY115636
<i>Ruta graveolens</i>	AF025524
<i>Skimmia japonica</i>	DQ225882
<i>Tetradium daniellii</i>	DQ225904
<i>Tetradium trichotomum</i>	DQ225901
<i>Toddalia asiatica</i>	DQ225923
<i>Triphasia trifolia</i>	AY059643
<i>Zanthoxylum armatum</i>	DQ225920
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	DQ225915

Vị trí các nhóm taxon dựa theo hệ thống của Takhtajan (1997). Sử dụng chương trình máy tính Paup, Bayes (trình bày kết quả bằng chương trình TreeView và Mega 5) và thông tin trình tự ADN thuộc gen trnL-trnF. Nhóm ngoài "OutGroup" được chọn là Sầu đâu (*Brucera javanica*), thuộc họ Thanh thất (Simaroubaceae).

2.1. Phương pháp Parsimony

Kết quả sử dụng thông tin trình tự trnL-trnF khi và phương pháp Parsimony để xây dựng xây dựng cây phát sinh chủng loại của các chi trong họ Cam được thể hiện ở các hình 1:



Hình 1: Mối quan hệ gần gũi của một số loài thuộc họ Cam (Rutaceae) dựa trên trình tự thông tin trnL-trnF và phương pháp Parsimony

- Nhóm nguyên thủy: chi Xuyên tiêu (*Zanthoxylum*) nằm trong phân họ Cửu ly hương (Rutoideae).

- Chi Xuyên tiêu (*Zanthoxylum*) và chi Xit xa (*Toddalia*) làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, được thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở hai chi: cây thường trườn, có gai, lá mọc cách.

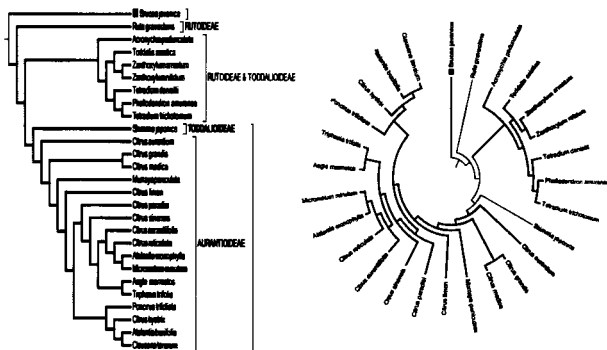
- Chi Hoàng bá (*Phellodendron*) và chi Dầu dầu (*Tetradium*) làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở cả hai chi: thường là cây gỗ, lá kép, mọc đối.

- Hình 1 cũng chỉ ra 2 phân họ được công nhận trong các hệ thống hiện nay là phân họ Cửu lý hương (*Rutoideae*) và phân họ Xit xa (*Toddalioideae*) có mối quan hệ gần gũi với nhau, nhưng không tách biệt rõ thành 2 nhóm tương ứng với 2 phân họ. Đây là gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo để xem xét giới hạn và vị trí của 2 phân họ này trong họ Rutaceae.

- Giới hạn các chi của phân họ Cam (*Aurantioideae*) cho thấy sự giống nhau trong các hệ thống nghiên cứu về họ Cam (Rutaceae) của Engler (1896), W. T. Swingle & P. C. Reece (1967), Heywood (1993), Takhtajan (1997, 2009): các chi *Atalantia*, *Citrus*, *Aegle*, *Triphasia*, *Poncirus*, *Murraya*, *Micromelum*, *Clausena* có mối quan hệ gần gũi với nhau và nằm trong phân họ *Aurantioideae*. Tuy nhiên việc phân chia *Aurantioideae* thành các tông và phân tông ở đây không thể hiện rõ ràng.

2.2. Phương pháp khoảng cách (NJ)

Kết quả sử dụng trình tự thông tin trnL-trnF khi ứng dụng phương pháp khoảng cách để xây dựng cây phát sinh chủng loại của các chi trong họ Cam (Rutaceae) có phân bố ở Việt Nam được thể hiện qua hình 2:



Hình 2: Mối quan hệ gần gũi giữa một số loài họ Cam (Rutaceae) dựa trên trình tự thông tin trnL-trnF và phương pháp khoảng cách

- Nhóm nguyên thủy: chi Cửu lý hương (*Ruta*) nằm trong phân họ *Rutoideae*.

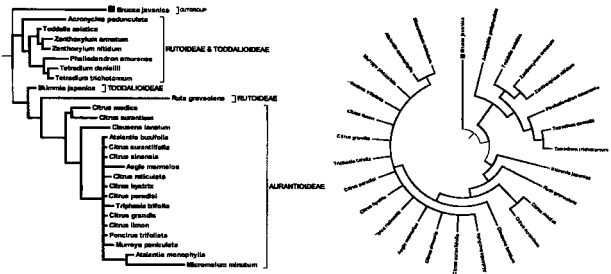
- Chi Xuyên tiêu (*Zanthoxylum*) và chi Xit xa (*Toddalia*) làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở hai chi: cây thường trườn, có gai, lá mọc cách.

- Chi Hoàng bá (*Phellodendron*) và chi Dầu dầu (*Tetradium*) làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở cả hai chi: thường là cây gỗ, lá kép, mọc đối.

- 2 phân họ được công nhận trong các hệ thống phân loại hiện nay là *Rutoideae* và *Toddalioideae* có mối quan hệ gần gũi với nhau, nhưng không tách biệt bằng sự ngắt quãng rõ thành 2 nhóm tương ứng với 2 phân họ. Kết quả này cũng giống với kết quả khi ứng dụng phương pháp Parsimony đã trình bày ở trên. Giới hạn các chi của phân họ *Aurantioideae* là giống với các hệ thống phân loại họ Cam của Engler (1896), W. T. Swingle & P. C. Reece (1967), Heywood (1993), Takhtajan (1997, 2009)... Các chi *Atalantia*, *Citrus*, *Aegle*, *Triphasia*, *Poncirus*, *Murraya*, *Micromelum*, *Clausena* có mối quan hệ gần gũi với nhau và nằm trong phân họ *Aurantioideae*. Trong đó có thể thấy chi *Atalantia* có thể có mối quan hệ gần gũi với *Clausena* hoặc *Micromelum* (đây là 2 chi được xếp trong tông *Clauseneae*), điều này lại phù hợp với hệ thống Takhtajan (2009), tác giả chuyển chi *Atalantia* vào tông *Clauseneae*.

2.3. Phương pháp sử dụng chương trình máy tính MrBayes

Kết quả sử dụng trình tự thông tin trnL-trnF khi ứng dụng chương trình MrBayes để xác định mối quan hệ gần gũi có thể của các chi trong họ Cam ở Việt Nam được thể hiện ở hình 3:



Hình 3: Mối quan hệ gần gũi giữa một số loài họ Cam (Rutaceae) dựa trên trình tự thông tin trnL-trnF và chương trình MrBayes

- Nhóm nguyên thủy nằm trong phân họ *Toddalioideae*.
- Chi Xuyên tiêu (*Zanthoxylum*) và chi Xit xa (*Toddalia*) làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở hai chi: cây thường trườn, có gai, lá mọc cách.
- Chi Hoàng bá (*Phellodendron*) và chi Dầu dầu (*Tetradium*) làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở cả hai chi: thường là cây gỗ, lá kép, mọc đối.
- Hình 3 cũng chỉ ra: 2 phân họ được công nhận trong các hệ thống hiện nay là *Rutoideae* và *Toddalioideae* có mối quan hệ gần gũi với nhau, nhưng không tách biệt rõ bằng sự ngắt quãng thành 2 nhóm tương ứng với 2 phân họ. Kết quả này đều giống nhau khi sử dụng các phương pháp nghiên cứu khác nhau. Vì vậy, rất cần thêm các nghiên cứu tiếp theo để xem xét giới hạn và vị trí của 2 phân họ này trong họ Rutaceae.
- Giới hạn các chi của phân họ *Aurantioideae* là giống các hệ thống Rutaceae của Engler (1896), W. T. Swingle & P. C. Reece (1967), Heywood (1993), Takhtajan (1997, 2009): các chi *Atalantia*, *Citrus*, *Aegle*, *Triphasia*, *Poncirus*, *Murraya*, *Micromelum*, *Clausena* có mối quan hệ

gắn gũi với nhau và nằm trong phân họ *Aurantioideae*. Trong đó chi *Atalantia* có thể có mối quan hệ gần gũi với *Micromelum* (là chi nằm trong tông *Clauseneae*), điều này lại phù hợp với hệ thống của Takhtajan (2009) là tác giả chuyển chi *Atalantia* vào tông *Clauseneae*.

3. Xây dựng sơ đồ (cây) mối quan hệ gần gũi có thể giữa các chi của họ Cam (*Rutaceae* Juss.) ở Việt Nam trên cơ sở ứng dụng chương trình Paup (trình bày kết quả bằng chương trình TreeView và Mega 5) và sử dụng đặc điểm hình thái.

Đặc điểm và mã hóa:

1. Cây thân gỗ: 0; cây thân thảo: 1.
2. Cây đứng: 0; cây leo: 1.
3. Lá "đơn": 0; lá kép 3: 1; lá kép lông chim 2.
4. Lá mọc cách: 0; lá mọc đối: 1
5. Một vòng nhị: 0; hai vòng nhị: 1; nhị nhiều, dính thành bó: 2.
6. Các lá noãn rời: 0; các lá noãn dính nhau hoàn toàn: 1.
7. Noãn 1-2: 0; noãn 3-nhiều: 1.
8. Quả nang: 0; quả hạch: 1; quả mọng: 2.
9. Quả khác kiểu quả cam: 0; kiểu quả cam không có vỏ hóa gỗ: 1; kiểu quả cam có vỏ hóa gỗ: 2.
10. Vỏ quả trong không có lông có lông hình túi mọng nước: 0; vỏ quả trong có lông có lông hình túi mọng nước: 1.

Xây dựng ma trận

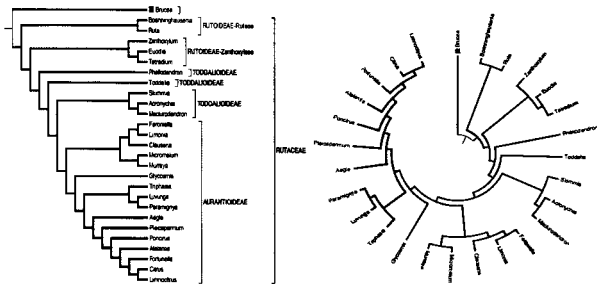
<i>Acronychia</i>	0001110100	<i>Micromelum</i>	0020110200
<i>Aegle</i>	0010211202	<i>Murraya</i>	0020110200
<i>Atalantia</i>	1000111211	<i>Paramignya</i>	0100110201
<i>Boenninghausenia</i>	1120?01000	<i>Phellodendron</i>	0021010100
<i>Citrus</i>	0000211211	<i>Pleiospermum</i>	0010110211
<i>Clausena</i>	002011?200	<i>Poncirus</i>	0010111211
<i>Euodia</i>	0011000000	<i>Ruta</i>	1020101000
<i>Feroniella</i>	0020?11200	<i>Skimmia</i>	0000010100
<i>Fortunella</i>	0000011211	<i>Tetradium</i>	0021000000
<i>Glycosmis</i>	0010110200	<i>Toddalia</i>	0110010100
<i>Limnocitrus</i>	0000?1?211	<i>Triphasia</i>	0010110201
<i>Limonia</i>	0120?11200	<i>Zanthoxylum</i>	0020000000
<i>Luvunga</i>	0110110201	<i>Brucea</i>	1020000100
<i>Maclurodendron</i>	000111?100		

Kết quả ứng dụng chương trình máy tính Paup với phương pháp khoảng cách để xác định mối quan hệ gần gũi giữa một số loài thuộc họ Cam (*Rutaceae*) có ở Việt Nam dựa trên đặc điểm hình thái thể hiện qua hình 4:

- *Rutoideae* là nhóm nguyên thủy của họ Cam, sau đó đến *Toddalioideae* và nhóm tiến hóa nhất là *Aurantioideae*.

- *Boenninghausenia* gần gũi với *Ruta*, đây là 2 chi được xếp trong tông *Ruteae*.

- 3 chi *Euodia*, *Tetradium*, *Zanthoxylum* có mối quan hệ gần gũi với nhau, cả 3 chi này được xếp trong tông *Zanthoxyleae*.
- 3 chi *Acronychia*, *Macclurodendron*, *Skimmia* có mối quan hệ gần gũi với nhau, đây là 3 chi được xếp trong phân họ *Toddalioideae*.
- Chi *Micromelum* gần gũi với chi *Murraya*; cả 2 chi này đều thuộc tông *Clauseneae*.
- 3 chi *Triphasia*, *Luvunga*, *Paramignya* có mối quan hệ gần gũi với nhau, nên được xếp trong tông *Citreae*.
- *Citrus* gần gũi với *Limnocitrus*; nhóm 2 chi này gần gũi với *Fortunella*, *Atalantia*, *Poncirus*, *Pleiospermum* và *Aegle*. Các chi này đều thuộc tông *Citreae*.



Hình 4: Mối quan hệ gần gũi giữa một số loài họ Cam (Rutaceae) dựa trên đặc điểm hình thái và ứng dụng phương pháp khoảng cách

Như vậy hầu hết các chi trong sơ đồ thể hiện ở hình 4 có vị trí phù hợp với hệ thống Takhtajan (1997).

4. Kết hợp dữ liệu hình thái và trình tự gen để tìm hiểu mối quan hệ gần gũi có thể giữa các chi của họ Cam (Rutaceae Juss.) ở Việt Nam

4.1. Chương trình máy tính MrBayes

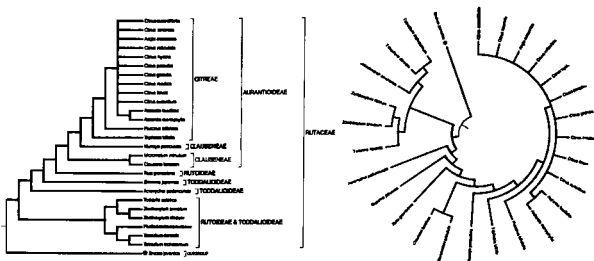
Kết quả ứng dụng chương trình MrBayes và chương trình Paup với phương pháp Parsimony khi kết hợp dữ liệu hình thái và trình tự gen để tìm hiểu mối quan hệ gần gũi có thể giữa các chi của họ Cam (Rutaceae) ở Việt Nam thể hiện qua các hình 5, 6, 7.

- *Zanthoxylum* và *Toddalia* làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở hai chi: cây trườn, có gai, lá mọc cách.

- *Phellodendron* và *Tetradium* làm thành một nhóm có quan hệ gần gũi, thể hiện qua các đặc điểm hình thái đều có ở cả hai chi: cây gỗ, lá kép, mọc đối.

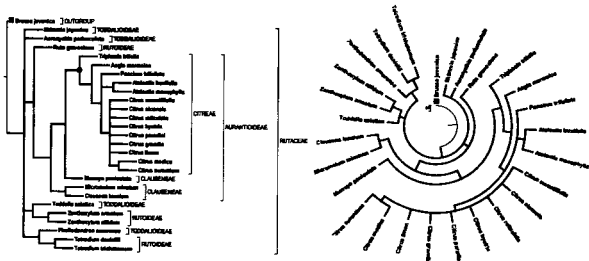
Các hình 5, 6, 7 cũng đưa ra kết quả rất giống nhau khi sử dụng nhiều chương trình máy tính với các phương pháp khác nhau, đó là: 2 phân họ được công nhận trong các hệ thống hiện nay là *Rutoideae* và *Toddalioideae* có mối quan hệ gần gũi với nhau, nhưng không tách biệt rõ bằng sự

ngắt quãng thành 2 nhóm tương ứng với 2 phân họ. Đây là gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo để xem xét giới hạn và vị trí của 2 phân họ này trong họ Rutaceae.



Hình 5: Mối quan hệ gần gũi có thể giữa một số loài họ Cam (Rutaceae) dựa trên kết hợp đặc điểm hình thái và trình tự ADN, ứng dụng chương trình máy tính

4.2. Phương pháp Parsimony



Hình 6: Mối quan hệ gần gũi có thể giữa một số loài họ Cam (Rutaceae) dựa trên kết hợp đặc điểm hình thái và trình tự gen

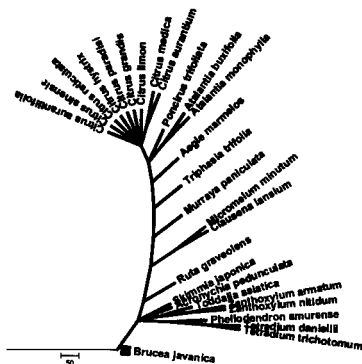
- Giới hạn các chi của phân họ *Aurantioideae* là giống các hệ thống Rutaceae của Engler (1896), W. T. Swingle & P. C. Reece (1967), Heywood (1993), Takhtajan (1993), Takhtajan (1997, 2009). Các chi *Atalantia*, *Citrus*, *Aegle*, *Triphasia*, *Poncirus*, *Murraya*, *Micromelum*, *Clausena* có mối quan hệ gần gũi với nhau và nằm trong phân họ *Aurantioideae*.

+ Chi *Clausena* gần gũi với *Micromelum*, 2 chi này có mối quan hệ gần gũi với *Murraya* và cả 3 chi đều thuộc tông *Clauseneae*.

+ Chi *Atalantia*, *Citrus*, *Aegle*, *Triphasia*, *Poncirus* có mối quan hệ gần gũi với nhau và thuộc tông *Citreae*.

Giới hạn 2 tông *Clauseneae* và *Citreae* này gần giống như hệ thống của Takhtajan (1997).

- Nhóm *Rutoideae* và *Toddalioideae* là nhóm nguyên thủy; tiến hóa nhất là phân họ *Aurantioideae* mà đại diện là chi *Citrus*.



Hình 7: Mối quan hệ gần gũi có thể giữa một số loài họ Cam (Rutaceae) dựa trên kết hợp đặc điểm hình thái và trình tự gen, ứng dụng phương pháp Parsimony

III. KẾT LUẬN

- Các cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng một số phương pháp đã chỉ ra các nhóm có quan hệ gần gũi với nhau, đặc biệt là các chi trong phân họ *Aurantioideae* luôn thuộc về phân họ này trong các cây phát sinh chủng loại cũng như trong các hệ thống phân loại của Engler (1896), W. T. Swingle & P. C. Reece (1967), Heywood (1993), Takhtajan (1997, 2009). Các chi trong 2 phân họ *Rutoideae* và *Toddalioideae* có mối quan hệ gần gũi với nhau và thường không tách biệt rõ thành 2 nhóm tương ứng với 2 phân họ. Kết quả này cũng phù hợp với bài báo gần đây của Wing S. P., Pang C. S., Mark P. S., and Paul P. H. B. (2007). Đây là gợi ý để thay đổi giới hạn và vị trí phân loại của 2 phân họ này.

- Việc phân tích dữ liệu kết hợp cả đặc điểm hình thái và trình tự ADN là phương pháp phù hợp để xây dựng mối quan hệ gần gũi và phát sinh chủng loại cho họ Cam. Nhóm (*Rutoideae* và *Toddalioideae*) là nhóm nguyên thủy, tiến hóa nhất là phân họ *Aurantioideae*. Sơ đồ quan hệ gần gũi có thể (hình 5, 6, 7) hầu như phù hợp với hệ thống của Takhtajan (1997).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bentham, G., J. D. Hooker**, 1876. Genera Plantarum, London.
2. **De Candolle, A. P.**, 1824. Prodrum 6, pp. 709-732
3. **Engler, A.**, 1896. Rutaceae. Die Naturlichen Pflanzenfamilien 3, p. 96-201.
4. **Heywood, V. H.**, 1993. Flowering Plants of the world, Oxford University Press.

5. **Hutchinson, J.**, 1969. The families of flowering plants 1-2, Oxford.
6. **Jeanmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins, T. J. Gibson**, 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem Sci, 23, 403-5.
7. **Nguyễn Tiến Bản**, 1997. Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín ở Việt Nam, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
8. **Swingle, W. T., P. C. Reece**, 1967. "The botany of Citrus and its wild relatives". The Citrus Industry (Reuther, W., Webber, H. J. and Batchelor, L. D., eds) 1: 190-422. University of California Press, Berkeley.
9. **Swofford, D. L.**, 1998: PAUP*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4, Sinauer. Associates, Sunderland, Massachusetts. (PAUP* version 4.0 b10 computer program).
10. **Takhtajan A.**, 1997. Diversity and classification of flowering plants, New York.
11. **Takhtajan A.**, 2009. Flowering Plants, Springer.
12. **Tamura, K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar**, 2011. MEGA5, Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution
13. **Wing, S. P., C. S. Pang, P. S. Mark, P. H. B. Paul**, 2007. Congruence of Molecular, Morphological, and Biochemical Profiles in Rutaceae: a Cladistic Analysis of the Subfamilies *Rutoideae* and *Toddalioideae*. Systematic Botany, 32(4):837-846.

STUDY ON RELATIONSHIPS AMONG SOME GENERA OF THE FAMILY RUTACEAE IN VIETNAM

BUI THU HA, NGUYEN THI HONG LIEN, TRAN THE BACH

SUMMARY

We used computer programs (such as Paup, MrBayes, TreeView, Mega 5 and ClustalX 1.83...), morphological characteristics and the Genbank data to make trees for relationship of Rutaceae's genera in Vietnam. Two genera, *Rutoideae* and *Toddalioideae* are in close relationships and almost arranged into 2 groups.