

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI ARTOCARPUS

Trần Nhân Dũng¹, Lương Thị Thu Thảo và Đỗ Tấn Khang¹

ABSTRACT

Six samples belonging to the *Artocarpus* genus were collected from some regions including Tien Giang, Can Tho and Ho Chi Minh. Firstly, the ploidy level of the samples was determined by Flow cytometry method. After extraction, DNA samples were used as the templates for PCR reactions which aimed at the ITS region and the *matK* gene using primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990) and primers *matK-VF/matK-VR* (Tina, 2005). These isolated fragments were sequenced, and then analysed by PAUP 4.0 program with parsimony method to generate the relative phylogeny of the samples. In addition, the leaf protein was also extracted to study the genetic difference using the SDS-PAGE method. The results showed that there were three ploidy level consisting of 2n, 3n and 4n. The results obtained from ploidy analysis and ITS region depicted that H.TG, H.SG and H.CT were *Artocarpus camansi* while K.CT1 and K.CT2 were *Artocarpus altilis*, and K.TG was the hybrid between *Artocarpus altilis* and *Artocarpus mariannensis*. However, the *matK* region and protein profile could not distinguish species including *A. altilis*, *A. mariannensis* and the hybrid between *A. altilis* and *A. mariannensis*.

Keywords: Flow cytometry, ITS, *matK*, phylogeny, SDS-PAGE

Title: Study the genetic characteristics of several *Artocarpus* spp.

TÓM TẮT

Sáu mẫu cây thuộc chi *Artocarpus* trong thí nghiệm được thu thập từ một số địa điểm khác nhau thuộc các tỉnh Tiền Giang, Cần Thơ, và TP.HCM. Trước hết, mức độ đa bội thể của các mẫu được xác định thông qua phương pháp dòng chảy tế bào (Flow cytometry). Các mẫu DNA sau khi ly trích được dùng để thực hiện phản ứng PCR với các cặp mồi ITS1/ITS4 (White et al. 1990) và *matK-VF/matK-VR* (Tina, 2005) để khuếch đại vùng gene ITS và *matK*. Trình tự của hai gene này sau đó được phân tích bằng phần mềm PAUP 4.0 theo phương pháp parsimony, để dựng giản đồ phả hệ thể hiện mối tương quan của các cây được nghiên cứu. Protein lá của các mẫu cây cũng được nghiên cứu bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE. Kết quả thu được cho thấy các cây có mức độ đa bội thể khác nhau (2n, 3n, 4n). Khảo sát mức độ đa bội thể và trình tự gene ITS cho kết quả: có thể các cây H.TG, H.SG và H.CT là *Artocarpus camansi*, K.CT1 và K.CT2 là *Artocarpus altilis*, K.TG là cây lai *Artocarpus altilis* x *Artocarpus mariannensis*. Tuy nhiên, trình tự đoạn *matK* và phổ điện di SDS-PAGE protein chưa thể dùng phân biệt các loài *A. altilis*, *A. mariannensis* và cây lai *A. altilis* x *A. mariannensis* trong thí nghiệm này.

Từ khóa: Dòng chảy tế bào, giản đồ phả hệ, ITS, *matK*, SDS-PAGE

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây xa-kê, hay còn gọi là cây bánh mì, breadfruit [*Artocarpus altilis* (Park.) Fosb.] là một loài thuộc chi *Artocarpus*, họ Dâu tằm (Moraceae). Xa-kê là một loài cây thường xanh tán lớn, thân lá đẹp, cho nhiều trái với hàm lượng carbohydrate, vitamin và khoáng chất cao. Do đó, hầu hết các bộ phận của cây xa-kê bao gồm: thân, nhựa, hoa, lá đều có giá trị riêng (Ragone, 2006).

Tuy nhiên, trên thực tế có một loài xa-kê là *Artocarpus altilis* và một loài khác thường bị nhầm lẫn với xa-kê là *Artocarpus camansi* Blanco (có nơi gọi là mít nài), có họ hàng gần với xa-kê. Về công dụng làm thuốc, loài này chưa được báo cáo cụ thể, chỉ suy đoán rằng nó có công dụng tương tự *Artocarpus altilis* (Ragone, 2006). Chính vì thế, việc tìm hiểu về đặc điểm di truyền của *Artocarpus altilis* và *Artocarpus camansi* Blanco là cần thiết. Ngày nay, phân loại học bằng sinh học phân tử đã và đang trở thành khoa học mũi nhọn trong phân loại học, bổ sung cho phân loại học truyền thống dựa theo đặc điểm hình thái giải phẫu. Phân loại học phân tử là phương pháp phân loại sinh vật bằng các dữ liệu so sánh hóa sinh các phân tử lớn như DNA, RNA và protein. ITS là trình tự được sử dụng trong nhiều nghiên cứu ở mức độ di truyền của hệ thống phân loại thực vật (Baldwin *et al.*, 1995). Ngoài ra, *matK* là một trong những gene ít bảo tồn nhất của lục lạp, trở thành một nguồn thông tin có giá trị trong việc thiết lập hệ thống phân loại ở cấp độ loài (Steele và Vilgalys, 1994).

Mục tiêu:

Khảo sát số lượng đa bội thể trong tế bào và phân tích trình tự vùng gene ITS và *matK* của một số loài thuộc chi *Artocarpus*. Từ đó, xây dựng sơ đồ phả hệ thể hiện mối tương quan giữa các loài nghiên cứu.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

Mẫu lá xa-kê (không quá già, cũng không quá non) sử dụng trong nghiên cứu này được thu thập từ 6 địa điểm khác nhau. Thu mẫu dựa trên các đặc điểm hình thái của *Artocarpus altilis* được mô tả bởi Phạm Hoàng Hộ (2000) và Ragone (2006). Mục tiêu chính là so sánh sự khác biệt về di truyền của 2 nhóm cây, do đó các địa điểm thu mẫu khác nhau chỉ mang ý nghĩa của các lần lặp lại (3 lần). Mỗi cây thu 3-4 lá.

Bảng 1: Thời gian và địa điểm thu mẫu

STT	Kí hiệu cây	Tên loài	Địa điểm	Ghi chú
1.	K.TG		Cai Lậy-Tiền Giang	
2.	K.CT1	<i>Artocarpus altilis</i>	Xóm Chài-TP. Cần Thơ	Nhóm 1
3.	K.CT2		Ninh Kiều-TP.Cần Thơ	
4.	H.TG		Cai Lậy-Tiền Giang	
5.	H.SG	<i>Artocarpus camansi</i>	Bình Tân-TP.HCM	Nhóm 2
6.	H.CT		Ninh Kiều-TPCT	

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định mức đa bội thể

Trích và nhuộm nội dung DNA nhân từ lá cây: Lau sạch mẫu lá bằng cồn 70%, lấy khoảng 0,5 cm² mẫu lá cho vào đĩa petri, cho 0,5 ml dung dịch nhuộm CyStain UV

ploidy (chứa chất có tác dụng ly trích nội dung DNA nhân tế bào và chất nhuộm DAPI (4' 6-diamidino-2-phenylindole) phát quang dưới đèn UV). Dùng dao lam cắt nhỏ mẫu lá thành sợi mảnh. Cho thêm 1,5 ml dung dịch nhuộm Cystain UV ploidy, ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 3 phút. Sau đó lọc dung dịch mẫu qua màng lọc Partec 30 µm CellTrics (Đức) và tiến hành đo mức đa bội thể trên máy Partec Ploidy Analyser PA-I với các thông số như sau: Par Gain: 560.0; Speed: 1.00 (µl/s); L-L (Lower-level): 80 và U-L (Upper-level): 800.

Tiến hành đo và hiệu chỉnh các thông số của máy cho đến khi biểu đồ thu được có dạng một đỉnh cao và nhọn, đồng thời cho giá trị trung bình hàm lượng DNA (mean DNA nuclei content) ổn định sau nhiều lần đo (khoảng 10 lần).

Dựa vào biểu đồ phân tích, mức độ đa bội thể của mẫu thí nghiệm được tính theo công thức:

$$(C/ C_0) \times N_0$$

Với: - C: Giá trị trung bình hàm lượng DNA nhân cây cần khảo sát

- C₀: Giá trị trung bình hàm lượng DNA nhân cây A đã biết độ đa bội

- N₀: Mức đa bội của mẫu cây A.

2.2.2 Phân tích trình tự ITS và matK

Ly trích DNA

Ly trích DNA xa-kê theo qui trình CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (Rogers và Bendich, 1988).

Thực hiện phản ứng PCR

Khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990) theo chu kỳ nhiệt như sau: 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ của 3 bước gồm 95°C (50 giây), 57°C (70 giây) và 72°C (90 giây), cuối cùng là 72°C trong 7 phút.

Khuếch đại gene *matK* với cặp mồi *matK*-VF: 5'-AACCCTTCGTTACTGGATAAAAAGA-3' và *matK*-VR: 5'-CCGCTGTAATAATGAGAAAGA-3' (Tina, 2005) theo chu kỳ nhiệt như sau: 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ của 3 bước gồm 95°C (90 giây), 57°C (120 giây) và 72°C (180 giây), cuối cùng là 72°C trong 10 phút.

Giải trình tự sản phẩm PCR vùng gene ITS và matK bằng hệ thống giải trình tự tự động ABI3130.

Phân tích dữ liệu

Phân tích dữ liệu và xây dựng sơ đồ phả hệ dựa trên trình tự DNA bằng phương pháp “maximum parsimony” (Farris, 1970) với phần mềm PAUP 4.0 (Swofford, 2002) theo mô hình tiến hóa mặc định của phần mềm. Trình tự của hai loài thuộc họ Moraceae được sử dụng làm outgroup.

2.2.3 Điện di SDS-PAGE để khảo sát sự khác biệt về hệ protein lá.

Thực hiện ly trích protein mẫu lá bằng phương pháp SDS có bổ sung TCA/Acetone.

Chuẩn bị mẫu: Mẫu có nồng độ protein 1mg/ml, pha theo tỷ lệ 1:1. Cho vào ống eppendorf 20 µl mẫu protein và 20 µl dung dịch đệm pha mẫu (Glycine sample buffer). Lắc đều và đun cách thủy ở 95⁰C, 5 phút. Để nguội.

Chuẩn gel điện di: Sử dụng gel phân tích polyacrylamide 10 %.

Đổ đầy dung dịch chạy điện di vào phía bên dưới và bên trên bộ điện di.

Đưa mẫu protein vào các giếng trên gel. Sau khi hoàn tất việc đưa mẫu vào, đặt nắp hộp điện di lại và cho dòng điện đi qua. Dòng điện chạy điện di là 25mA/40V.

Nhuộm gel: Gel được lấy ra khỏi hộp gel cẩn thận và cho vào dung dịch nhuộm đã pha. Để làm nhanh quá trình nhuộm màu, hệ thống sẽ được đặt trên máy lắc. Thời gian nhuộm trong vòng 1 giờ.

Tẩy màu: Tẩy gel bằng dung dịch tẩy. Ngâm gel trong dung dịch tẩy và đặt trên máy lắc từ 2-3 giờ. Kết thúc quá trình tẩy gel khi nhận thấy gel đã sạch lớp màu nền và các băng protein hiện rõ trên gel.

Scan phổ điện di và phân tích.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định mức đa bội thể

Kết quả cho biết giá trị trung bình hàm lượng DNA nhân của các mẫu cây H.TG, H.SG và H.CT tương đương nhau (xấp xỉ 42). Ba cây này đều có đặc điểm chung là có hạt (cùng thuộc nhóm 2). Vì vậy, ta sử dụng giá trị trung bình hàm lượng DNA nhân của ba mẫu cây này (42.3) như giá trị trung bình hàm lượng DNA nhân mẫu đối chứng lưỡng bội (C₀), sau đó tính toán để có được mức đa bội thể của các mẫu như bảng sau:

Bảng 2: Mức đa bội thể của các mẫu khảo sát

Mẫu	K.TG	K.CT1	K.CT2	H.TG	H.SG	H.CT
C	61,19	76,19	85,79	42,28	42,36	42,27
Mức đa bội thể (C/C ₀)*2	2,89	3,60	4,06	2,00	2,00	2,00

Kết quả phân tích mức đa bội thể của các mẫu khảo sát:

- Cây H.TG, H.SG và H.CT: cây lưỡng bội, cho trái có nhiều hạt.
- Cây K.TG: cây tam bội, cho trái không hạt.
- Cây K.CT1 và K.CT2: cây tứ bội, cho trái không hạt.

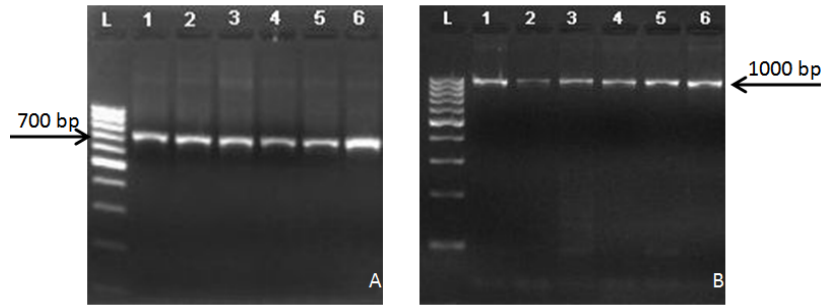
Cây K.TG là cây tự tam bội có thể có nguồn gốc từ *A. camansi* lưỡng bội, do thụ tinh giữa giao tử đơn bội và lưỡng bội, hoặc là kết quả của sự thụ tinh giữa giao tử đơn bội và lưỡng bội của các loài khác nhau (Zerega *et al.*, 2004). Cây tam bội không sinh giao tử bình thường do rối loạn trong quá trình giảm phân, nên là cây không hạt.

Cây K.CT1 và K.CT2 không hạt có thể là cây tự tứ bội, cũng có nguồn gốc từ *A. camansi* lưỡng bội.

Thể tự đa bội phát sinh do sự nhân đôi các nhiễm sắc thể của chính chúng. Trong quá trình giảm phân, sự hiện diện của hơn hai nhiễm sắc thể đồng dạng dẫn đến việc sắp hàng không chính xác của các nhiễm sắc thể tương đồng ở kỳ đầu I, và sự phân ly không chính xác của các nhiễm sắc thể tương đồng ở kỳ sau I. Kết quả là các giao tử có sự phân bố không bình thường của các NST, thường là không cân bằng, và nói chung là không hoạt động chức năng trong các hợp tử chứa chúng.

3.2 Khảo sát trình tự gene ITS và matK

Sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose 1,5 % với điện trường 2V/cm cho kết quả như hình 1.



Hình 1: Các phân đoạn ITS (A) và matK (B) của 6 mẫu trên gel agarose

L: Ladder (thang chuẩn 100 bp); 1: K.TG; 2: K.CT1; 3: K.CT2; 4: H.TG; 5: H.SG; 6: H.CT

Chiều dài các đoạn được khuếch đại khoảng 700bp đối với vùng ITS và 1000bp đối với vùng gen *matK*. Chiều dài này phù hợp với chiều dài đoạn ITS và *matK* của các cây hạt kín.

Kết quả giải trình tự

Đoạn gene matK

Các trình tự của băng đoạn *matK* được giải có chiều dài 772-788 bp.

Kết quả BLAST trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene NCBI cho thấy các trình tự *matK* trong thí nghiệm này đều tương đồng cao với các trình tự *matK* của *Artocarpus altilis* (Bảng 3).

Bảng 3: Kết quả BLAST đoạn gene *matK* các mẫu trong thí nghiệm trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene NCBI

STT	Ký hiệu mẫu	Loài tương đồng	Mã số	Tỉ lệ xác nhận (%)
1	K.TG	<i>Artocarpus altilis</i>	HM446658.1	99
2	K.CT1	<i>Artocarpus altilis</i>	HM446658.1	99
3	K.CT2	<i>Artocarpus altilis</i>	HM446658.1	99
4	H.TG	<i>Artocarpus altilis</i>	HM446658.1	100
5	H.SG	<i>Artocarpus altilis</i>	HM446658.1	100
6	H.CT	<i>Artocarpus altilis</i>	HM446658.1	99

MatK là đoạn gene nằm trong lục lạp, di truyền theo dòng mẹ, và nhận xét ở phần khảo sát mức độ đa bội thể rằng ba cây K.TG, K.CT1 và K.CT2 đều có nguồn gốc

từ *Artocarpus camansi*, do hiện tượng tự đa bội. Trình tự *matK* của 6 cây trong thí nghiệm này đều tương đồng cao với cùng một loài *Artocarpus altilis*.

Kết quả này cho thấy cây H.TG, H.SG và H.CT là *Artocarpus camansi*, các cây K.TG, K.CT1 và K.CT2 là *Artocarpus altilis*, có nguồn gốc là *A. camansi* tự đa bội. Cây K.TG cũng có thể là cây lai giữa *A. altilis* (cây mẹ) và một loài khác.

Đoạn gene ITS

Các trình tự của băng đoạn ITS được giải có chiều dài 660-670 bp.

Kết quả BLAST trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene NCBI cho thấy các trình tự ITS trong thí nghiệm này tương đồng cao với các trình tự ITS của các loài thuộc chi *Artocarpus* (Bảng 4).

Bảng 4: Kết quả BLAST đoạn gene ITS các mẫu trong thí nghiệm trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene NCBI

STT	Ký hiệu mẫu	Loài tương đồng	Mã số	Tỉ lệ xác nhận (%)
1	K.TG	<i>Artocarpus mariannensis</i>	FJ917022.1	98
2	K.CT1	<i>Artocarpus altilis</i>	FJ917023.1	97
3	K.CT2	<i>Artocarpus altilis</i>	FJ917023.1	98
4	H.TG	<i>Artocarpus camansi</i>	FJ917024.1	99
5	H.SG	<i>Artocarpus camansi</i>	FJ917024.1	99
6	H.CT	<i>Artocarpus camansi</i>	FJ917024.1	86

Kết quả ở bảng trên cũng cho nhận xét cây H.TG, H.SG và H.CT là *Artocarpus camansi*, cây K.CT1, K.CT2 là *Artocarpus altilis* của các thí nghiệm trên.

Tuy nhiên, trình tự gene ITS của cây K.TG lại tương đồng cao với trình tự ITS của *A. mariannensis* chứ không là *A. altilis*. Vì cây K.TG phải là cây chứa bộ nhiễm sắc thể (NST) của *A. altilis* (để có trình tự *matK* tương đồng với trình tự *matK* của *A. altilis*) và bộ NST của *A. mariannensis* (để có trình tự ITS tương đồng với trình tự ITS của *A. mariannensis*) nên cây 1 có thể là cây lai giữa *A. mariannensis* và *A. altilis* và *A. altilis* là cây mẹ.

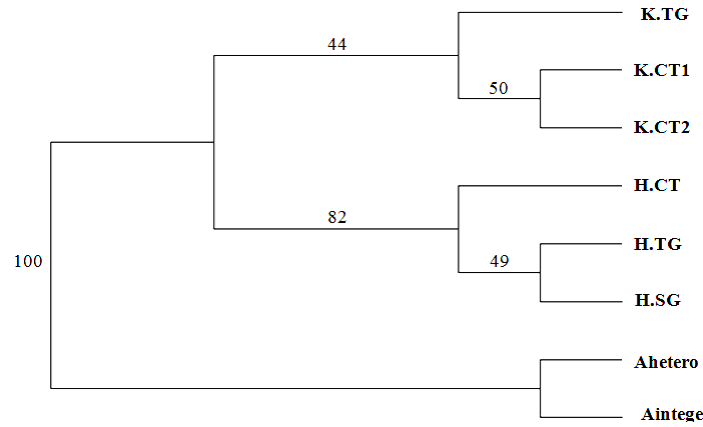
Cây mẹ *A. altilis* là cây lưỡng bội (vì cây tam bội không có khả năng sinh giao tử bình thường) và cây bố *A. mariannensis* là cây lưỡng bội. Cây con (cây K.TG) là cây tam bội (kết quả khảo sát đa bội thể). Do đó, có sự giảm phân không bình thường ở một trong hai cây bố mẹ để tạo ra giao tử 2n.

Phân tích trình tự ITS và *matK* dựa vào giản đồ phả hệ

Thứ tự phân nhánh của giản đồ phả hệ cho thấy các cây có thể được chia làm 2 nhóm lớn khác biệt rõ rệt với các chỉ số bootstrap khác nhau (Hình 2).

Nhóm 1: Gồm ba cây K.TG, K.CT1 và K.CT2 với chỉ số bootstrap là 44%.

Nhóm 2: Gồm ba cây H.CT, H.TG và H.SG với chỉ số bootstrap là 82%.



Hình 2: Phân tích Maximum parsimony của các băng đoạn *matK* dài 791 bp sau khi kết hợp với các trình tự từ ngân hàng gene

*Các số ở các nhánh cây thể hiện chỉ số bootstrap được phân tích từ 100 lần lặp lại.

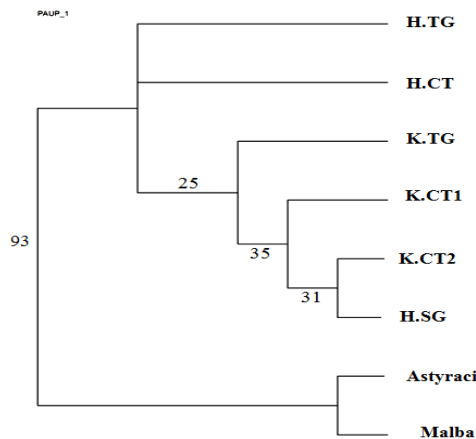
Sáu cây trong thí nghiệm phân thành hai nhóm như trên là hợp lý, phù hợp với kết quả quan sát về hình thái. Trình tự đoạn ITS có thể dùng phân biệt các loài *A. altilis*, *A. mariannensis* và cây lai *A. altilis* x *A. mariannensis*.

Cây K.CT1 và K.CT2 thể hiện trên sơ đồ mối quan hệ gần nhau hơn so với cây K.TG. Kết quả này phù hợp với kết luận ở trên rằng cây K.CT1 và K.CT2 là *A. altilis*, cây K.TG là cây lai *A. altilis* x *A. mariannensis*.

Đoạn gene *matK*

Thứ tự phân nhánh của cây phả hệ (topology) cho thấy các loài có thể được chia làm 2 nhóm lớn khác biệt rõ rệt với các chỉ số bootstrap khác nhau (Hình 3).

- Nhóm 1: Gồm 2 cây H.TG và H.CT với chỉ số bootstrap là 93%.
- Nhóm 2: Gồm 4 cây K.TG, K.CT1, K.CT2 và H.SG với chỉ số bootstrap là 25%.



Hình 3: Phân tích Maximum parsimony của các băng đoạn *matK* dài 791 bp sau khi kết hợp với các trình tự từ ngân hàng gene

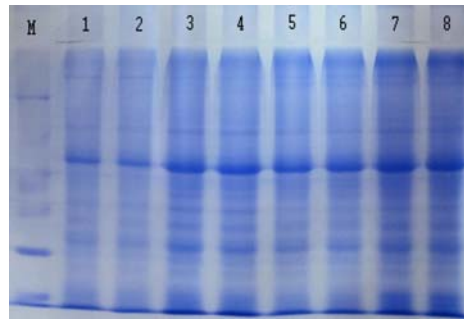
*Các số ở các nhánh cây thể hiện chỉ số bootstrap được phân tích từ 100 lần lặp lại.

Sáu cây trong thí nghiệm không phân thành hai nhóm như ở trường hợp đoạn gene ITS. Tuy nhiên, theo sơ đồ phả hệ, chỉ số bootstrap của các mẫu K.TG, K.CT1, K.CT2 và H.SG rất thấp. Điều này có thể là do gene *matK* là một trong những gene ít bảo tồn nhất của lục lạp. Nó có mức độ biến dị di truyền nhanh gấp 3 lần so với gene *rbcL* ở Saxifragaceae (Johnson và Soltis, 1994), gấp 2 lần so với gene *rbcL* ở Polemoniaceae (Steel và Vilgalys, 1994). Do những đặc tính này, *matK* trở thành một nguồn thông tin có giá trị trong việc thiết lập hệ thống phân loại ở cấp độ loài (Steele và Vilgalys, 1994).

Do đó, trình tự đoạn *matK* chưa thể dùng phân biệt các loài *A. altilis*, *A. mariannensis* và cây lai *A. altilis* x *A. mariannensis* trong thí nghiệm này.

3.3 Điện di SDS-PAGE

Hai trong số ba cây ở mỗi nhóm được sử dụng để phân tích sự khác biệt về hệ protein của lá. Kết quả phổ điện di protein SDS-PAGE trên lá (K.CT1, K.CT2, H.TG và H.CT) được thể hiện ở hình 4.



Hình 4: Phổ điện di protein 4 cây K.CT1, K.CT2, H.TG và H.CT

M: Thang protein chuẩn;

1-2: K.CT1; 3-4: K.CT2; 5-6: H.TG; 7-8: H.CT

Các băng protein đều biểu hiện giống nhau. Kết quả này chứng minh rằng hệ protein ở lá của các cây trong thí nghiệm này không có sự khác biệt.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Các cây trong thí nghiệm được xác định là có mức đa bội thể khác nhau. Những cây có hạt là những cây lưỡng bội (2n), những cây không hạt là những cây đa bội (3n, 4n).

Khảo sát mức đa bội thể và trình tự gene ITS và *matK* cho kết quả: có thể các cây H.TG, H.SG và H.CT là *Artocarpus camansi*, K.CT1 và K.CT2 là *Artocarpus altilis*, K.TG là cây lai *Artocarpus altilis* x *Artocarpus mariannensis*.

Kết quả phổ điện di protein của 4 cây trong thí nghiệm (K.CT1, K.CT2, H.TG và H.CT) đều biểu hiện giống nhau.

4.2 Đề nghị

Tăng cường thu mẫu với số lượng lớn và mở rộng phạm vi thu mẫu.

Khảo sát tính khả dụng của một số dấu phân tử tiềm năng khác nhằm hỗ trợ cho việc phân loại học *Artocarpus altilis* và những loài gần gũi, dựa trên cơ sở hình thái học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA-A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 247–277.
- Farris, J.S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* 19: 83–92.
- Johnson, L.A. and D.E. Soltis. 1994. matK DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae. *Systematic Botany* 19:143–156.
- Phạm Hoàng Hộ. 2000. Cây cỏ Việt Nam, quyển 2. Nhà xuất bản Trẻ.
- Ragone, D. 2006. Traditional Trees of Pacific Islands: Their culture environment and use. Edited by C.R. Elevitch. Permanent Agriculture Resources.
- Rogers, S.O., and A.J.B. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers. A6: 1-10.
- Steele, K.P. and R. Vilgalys. 1994. Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene matK. *Syst. Bot.* 19:126-142.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates.
- Tina, K. 2005. Molecular genetic analysis of the genere *Carica* L. and *Vasconcellea* Saint Hilaire (Caricaceae). Thesis submitted in fulfilment of the requirement for the degree of Doctor (Ph.D.) in Applied Biological Sciences.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc.
- Zerega, N.J.C., D. Ragone and T.J. Motley. 2004. Complex origins of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): Implications for human migrations in Oceania. *American Journal of Botany* 91(5):760-766.