

DẪN LIỆU PHÂN TỬ VÀ QUAN HỆ PHÁT SINH GIỮA MỘT SỐ LOÀI CHÂN KÉP HỌ Paradoxosomatidae Ở VIỆT NAM (Diplopoda: Polydesmida)

Nguyễn Đức Anh*, Nguyễn Giang Sơn

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam,
*ducanh410@yahoo.com

TÓM TẮT: Bài báo cung cấp dẫn liệu phân tử của 10 loài chân kép họ Paradoxosomatidae ở Việt Nam. Một đoạn trình tự 680 bp của gen ty thể COI (Cytochrome c Oxidase Subunit I) đã được giải mã và lưu trữ trên ngân hàng gen (GenBank). Tập hợp dữ liệu sau khi sắp xếp và căn chỉnh của đoạn gen COI có kích thước 571 bp từ 14 mẫu thuộc 11 loài; trong đó loài ngoài nhóm được sử dụng là *Polydesmus denticulatus* (C.L. Koch, 1847), thuộc họ Polydesmidae. Phân tích ma trận tương đồng và khoảng cách di truyền cho thấy sự phân tách rõ ràng giữa loài ngoài nhóm (họ Polydesmidae) và các loài thuộc họ Paradoxosomatidae. Khoảng cách di truyền giữa các loài chân kép họ Paradoxosomatidae dao động từ 0,063 đến 0,236. Hầu hết giá trị khoảng cách di truyền của loài *Polydesmus denticulatus* với các loài trong họ Paradoxosomatidae đều lớn hơn hai. Đối với mẫu cùng loài, giá trị khoảng cách di truyền cũng thay đổi từ 0,047 (loài *Sellanucheza grandis*), 0,063 (loài *Tonkinosoma flexipes*) và 0,102 (loài *Tonkinosoma jeekeli*). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa theo hai phương pháp: Maximum Likelihood (ML) và Bayesian Inference (BI). Cả hai cây ML và BI đều cho thấy các loài thuộc tộc Chamberlinini luôn tạo thành một nhóm và tách riêng với các loài khác. Quan hệ giữa loài và tộc khác (Tonkinosomatini, Sulciferini và Orthomorphiini) chưa rõ ràng do sự hạn chế về dữ liệu nghiên cứu (dẫn liệu phân tử và số lượng loài nghiên cứu). Ngoài ra, vị trí phân loại của loài *Tonkinosomatini jeekeli* cũng cần được xem lại dựa trên kết quả phân tích.

Từ khóa: Paradoxosomatidae, Polydesmida, chân kép, dẫn liệu phân tử, quan hệ phát sinh, Việt Nam.

MỞ ĐẦU

Họ chân kép Paradoxosomatidae Daday, 1889 có số lượng khoảng 1.000 loài thuộc hơn 200 giống và được phân chia trong 22 tộc, 3 phân họ [14]. Ở Việt Nam, đã ghi nhận được 78 loài thuộc họ này, tuy nhiên ước tính mới chỉ phát hiện được 30-40% số lượng loài có trong tự nhiên ở Việt Nam.

Các loài cuốn chiếu mai họ Paradoxosomatidae ở Việt Nam thuộc 25 giống, 8 tộc và 2 phân họ [13]. Các nghiên cứu trước đây về hệ thống học của họ chân kép này chủ yếu dựa trên các đặc điểm hình thái. Vì vậy, có rất nhiều vấn đề đang được thảo luận về hệ thống học của họ này, ví dụ vị trí phân loại của các giống, các đặc điểm hình thái phân chia các tộc [15].

Bên cạnh đó, dẫn liệu phân tử về các đối tượng thuộc họ chân kép này còn rất hạn chế. Vì vậy, bài báo này có mục đích cung cấp thêm các dẫn liệu phân tử (trình tự gene ty thể COI) và

xây dựng cây quan hệ phát sinh của một số loài chân kép họ Paradoxosomatidae ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu vật được thu trong các đợt khảo sát từ năm 2005-2014 ở Việt Nam, được bảo quản trong cồn 75% tại Phòng Sinh thái môi trường đất, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Các mẫu vật được định loại theo Attems (1938, 1953), Jeekel (1953), Golovatch (1984), Nguyen (2010, 2013), Nguyen & Korsós (2012) [2, 3, 11, 12, 13, 14].

DNA tổng số được chiết xuất từ các mẫu chân và cơ bụng của các cá thể chân kép. Cặp mồi chung LCO1498 (5'-GGTCAACAAATCA TAAAGATATTGG-3') và HCO2190 (5'-TAA ACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') được sử dụng để nhân bản một đoạn trình tự gen ty thể COI (Cytochrome c Oxidase Subunit I) [6]. Chu trình nhiệt cho phản ứng khuếch đại gen (PCR) để nhân bản đoạn gen COI như sau: 94°C: 2

phút, 36 chu kỳ phản ứng bao gồm 94°C: 30 giây, 50°C: 30 giây và 72°C: 2 phút, cuối cùng 72°C: 5 phút. Sau đó, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng việc chạy điện di với agarose gel và dung dịch đệm TBE (Tris Borate EDTA) 1X. Các sản phẩm PCR nhân bản thành công gen COI được tinh sạch và gửi đi giải trình tự ở Công ty Macrogen (Hàn Quốc).

Các trình tự DNA được kiểm tra và tinh chỉnh bằng phần mềm BioEdit [9] và được xác nhận với công cụ BLAST [1]. Các trình tự gen COI được sắp xếp (alignment) bằng phần mềm MUSCLE [4]. Tất cả trình tự được lưu trữ trên ngân hàng dữ liệu với các mã số truy cập (bảng 1). Mức độ tương đồng của trình tự nucleotid, axit amin và khoảng cách di truyền (p-distance) giữa các loài được tính toán thống kê bằng MEGA 6.0 [15].

Việc xác định mô hình thay thế nucleotid phù hợp nhất được tính toán bằng Modeltest trong Mega 6.0. Mô hình có giá trị theo BIC (Bayesian Information Criterion) sẽ được lựa chọn để xây dựng cây quan hệ phát sinh giữa các loài. Các vị trí codon bao gồm 1st+2nd+3rd. Mô hình tối ưu được lựa chọn là GTR+G+I với các thông số: BIC: 7039,891; InL= -3362,683; Gamma=0,49; Invariable=0,42; R=3,86; Freq A=0,205; Freq C=0,130; Freq T=0,431; Freq G=0,234.

Cây quan hệ phát sinh được xây dựng trên

hai phương pháp Maximum Likelihood (ML) và Bayesian Inference (BI). Cây phát sinh ML được xây dựng theo mô hình GTR+G+I, phân tích bootstrap với 1000 lần lấy lại mẫu (resampling), bằng phần mềm MEGA 6.0 [15]. Cây phát sinh BI được chạy gộp các vị trí codon (combined Bayesian) và xây dựng bằng phần mềm MrBayes 3.1.2, với các tham số sau: nst=6, rates = invgamma, ngen = 10.000.000, heating parameter = 0,06, samplefreq = 1.000.

Loài chân kếp *Polydesmus denticulatus* thuộc họ Polydesmidae được sử dụng làm loài ngoài nhóm (outgroup) trong xây dựng cây quan hệ phát sinh. Trình tự gen ty thể COI của loài này được lấy từ ngân hàng GenBank (bảng 1).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đoạn gen ty thể COI dài 680bp của 13 mẫu thuộc 10 loài chân kếp thuộc họ Paradoxosomatidae ở Việt Nam được giải trình tự. Tập hợp dữ liệu (dataset) của 14 mẫu chân kếp (10 loài ở Việt Nam và 1 loài trên GenBank) sau khi cắt và căn chỉnh trình tự để đảm bảo tính chính xác trong so sánh tương đồng vị trí giữa trình tự các mẫu nghiên cứu và trình tự tham khảo chứa 571 bp, với tần suất A, T, G, C tương ứng là 20,4%, 43%, 23,5% và 13,1%. Vùng chứa thông tin PI (Parsimony Informative) và vùng chứa thông tin thay đổi (Variable Informative) chiếm 170 bp và 235 bp, tương ứng.

Bảng 1. Các loài chân kếp đã được giải trình tự đoạn gen COI

STT	Loài	Địa điểm thu	Mã số mẫu	Mã số GenBank
	Họ Paradoxosomatidae			
1	<i>Tonkinosoma flexipes</i> Jeekel, 1953	VQG Xuân Sơn, Phú Thọ	IEBR-Myr 50	KR818292
2	<i>Tonkinosoma flexipes</i> Jeekel, 1953	VQG Cát Bà, Hải Phòng	IEBR-Myr 207	KR818300
3	<i>Tonkinosoma jeekeli</i> Nguyen, 2010	VQG Cúc Phương, Ninh Bình	IEBR-Myr 128	KR818294
4	<i>Tonkinosoma jeekeli</i> Nguyen, 2010	VQG Cát Bà, Hải Phòng	IEBR-Myr 203	KR818299
5	<i>Sellanucheza grandis</i> (Golovatch, 1984)	Hương Sơn, Hà Tĩnh	IEBR-Myr 59	KR818293
6	<i>Sellanucheza grandis</i> (Golovatch, 1984)	VQG Pù Mát, Nghệ An	IEBR-Myr 177	KR818296
7	<i>Sellanucheza hoffmani</i> Nguyen, 2010	VQG Phong Nha - Kẻ Bàng, Quảng Bình	IEBR-Myr 182	KR818298

8	<i>Chamberlinius hualienensis</i>	Quần đảo Ruykyus, Nhật Bản	IEBR-Myr 499	KR818301
9	<i>Riukiupeltis jamashina</i>	Quần đảo Ruykyus, Nhật Bản	IEBR-Myr 502	KR818302
10	<i>Orthomorphoides setosa</i> (Attems, 1937)	VQG Bi Doup-Núi Bà, Lâm Đồng	IEBR-Myr 467	KU234719
11	<i>Orthomorpha</i> sp.	VQG Cát Tiên, Đồng Nai	IEBR-Myr 436	KU234720
12	<i>Simplogonomorpha falcata</i> (Attems, 1937)	VQG Bi Doup - Núi Bà, Lâm Đồng	IEBR-Myr 167	KR818295
13	<i>Paradoxosomatidae</i> sp.	Na Hang, Tuyên Quang	IEBR-Myr 179	KR818297
Họ Polydesmidae				
14	<i>Polydesmus denticulatus</i> (C.L. Koch, 1847)	GenBank	GB	HQ966182

Mức độ tương đồng trình tự nucleotid, trình tự axit amin và số điểm khác biệt trình tự được thể hiện ở Bảng 2. So sánh giữa các loài trong họ Paradoxomatidae cho thấy vùng trình tự khảo sát mang nhiều thông tin khác biệt giữa các loài, mức độ tương đồng trình tự nucleotid dao động trong khoảng 0,803-0,901, và tương đồng trình tự axit amin trong khoảng 0,894-0,994. Sự khác biệt lớn về trình tự nucleotid bộc lộ ngay cả ở những loài cùng giống như mức tương đồng trình tự thấp giữa *T. flexipes* và *T. jeekeli* (0,852-0,866), hay giữa *S. grandis* và *S. hoffmani* (0,880-0,896). Tuy nhiên, thống kê điểm khác biệt trình tự cho thấy phần lớn các thay thế nucleotid là đồng nghĩa. So sánh trình tự nucleotid giữa loài *T. flexipes* và *T. jeekeli* ghi nhận 76-84 đột biến, nhưng chỉ 2-4 là đột biến dẫn tới thay thế axit amin. Giữa loài *S. grandis* và *S. hoffmani* cũng chỉ quan sát được 0-5 thay thế khác nghĩa trong 27-68 đột biến trình tự nucleotid. Xét trong cả họ Paradoxomatidae, số đột biến trình tự nucleotid ghi nhận dao động trong khoảng 56-112, với chỉ 0-20 đột biến dẫn tới khác biệt trình tự axit amin. Trong khi đó, đối chiếu trình tự các loài trong họ Paradoxomatidae với loài khác họ là *Polydesmus denticulatus* ghi nhận 111-141 đột biến trình tự nucleotid với 32-35 khác biệt trình tự axit amin. Những thông tin này phản ánh vùng trình tự khảo sát có tốc độ tiến hóa nhanh và sớm bão hòa bởi các thay thế nucleotid đồng nghĩa. Như vậy, các phân tích dựa trên mô hình thay thế nucleotid sử dụng vùng gen này thích hợp cho việc tái hiện quan hệ phát sinh ở bậc

dưới họ. Ranh giới phân tách từ bậc họ trở lên cần xét tới các khác biệt khác nghĩa dựa trên trình tự axit amin hoặc tập trung vào các thay thế nucleotid ở vị trí codon thứ 2. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ mới thử nghiệm xây dựng mối quan hệ giữa các loài trong họ Paradoxosomatidae dựa trên mô hình thay thế nucleotid.

Khoảng cách di truyền p giữa các loài chân kép được trình bày ở bảng 3. Trong đó, giá trị p dao động từ 0,063 đến 0,236. Khoảng cách di truyền giữa các loài trong họ Paradoxosomatidae với loài *Polydesmus denticulatus* (họ Polydesmidae) đều có giá trị lớn hơn 0,20, ngoại trừ giá trị p giữa loài *Orthomorphoides setosa* và *Polydesmus denticulatus*. Theo mô hình phân tích trình tự nucleotid, mức khác biệt giữa *O. setosa* và *P. denticulatus* có khoảng cách di truyền không lớn, nhưng phân tích chi tiết cho thấy trình tự hai loài này bộc lộ nhiều thay thế khác nghĩa (32). Đây là một thông tin phản ánh sự hạn chế khi chỉ phân tích dựa trên mô hình thay thế nucleotid giữa các nhóm phân loại có thể đã phân nào bão hòa bởi các đột biến trung tính.

Giá trị p cũng thay đổi khá lớn giữa các giống khác nhau, đều lớn hơn 0,133. Giữa các loài cùng giống, giá trị p dao động từ 0,133-0,147 đối với giống *Tonkinosoma*, 0,103-0,119 đối với giống *Sellanucheza*. Giá trị p giữa các mẫu cùng loài dao động từ 0,047 (đối với loài *S. grandis*) và 0,063 (đối với loài *T. flexipes*). Đặc biệt, giữa hai mẫu thuộc loài *T. jeekeli* ở

Cúc Phương và Cát Bà có giá trị p khá lớn (0,102), nhưng đây chỉ là những khác biệt về trình tự nucleotid trung tính và không dẫn tới sự thay thế axit amin (bảng 2).

Bảng 2. Ma trận mức độ tương đồng và số điểm khác biệt trình tự nucleotid và axit amin một phần vùng gen COI giữa các loài chân khớp

S T T	Loài		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	<i>Tonkinosoma flexipes</i> (50)	nu	ID	36	84	83	88	94	99	92	89	93	102	93	94	135
		aa		2	4	4	10	10	13	3	3	6	20	12	10	35
2	<i>Tonkinosoma flexipes</i> (207)	nu	0,936	ID	83	76	84	84	87	87	85	88	100	97	80	134
		aa	0,989		2	2	8	8	11	1	1	4	18	10	8	33
3	<i>Tonkinosoma jeekeli</i> (128)	nu	0,852	0,854	ID	58	88	85	93	89	83	88	96	94	86	121
		aa	0,978	0,989		0	10	10	11	3	3	4	17	12	10	33
4	<i>Tonkinosoma jeekeli</i> (203)	nu	0,854	0,866	0,898	ID	90	88	90	88	91	92	104	93	100	134
		aa	0,978	0,989	1		10	10	11	3	3	4	17	12	10	33
5	<i>Sellanucheza grandis</i> (59)	nu	0,845	0,852	0,845	0,842	ID	27	59	94	85	102	91	80	60	119
		aa	0,947	0,957	0,947	0,947		0	5	7	7	8	12	2	0	32
6	<i>Sellanucheza grandis</i> (177)	nu	0,835	0,852	0,851	0,845	0,952	ID	68	93	84	90	91	76	56	118
		aa	0,947	0,957	0,947	0,947	1		5	7	7	8	12	2	0	32
7	<i>Sellanucheza hoffmani</i> (182)	nu	0,826	0,847	0,837	0,842	0,896	0,88	ID	95	93	96	98	77	66	120
		aa	0,931	0,942	0,942	0,942	0,973	0,973		10	10	9	13	7	5	33
8	<i>Chamberlinius hualienensis</i> (499)	nu	0,838	0,847	0,844	0,845	0,835	0,837	0,833	ID	71	92	108	92	94	131
		aa	0,984	0,994	0,984	0,984	0,963	0,963	0,947		0	3	17	9	7	34
9	<i>Riukiupeltis jamashinai</i> (502)	nu	0,844	0,851	0,854	0,84	0,851	0,852	0,837	0,875	ID	92	111	87	89	128
		aa	0,984	0,994	0,984	0,984	0,963	0,963	0,947	1		3	17	9	7	34
10	<i>Simplogonomorpha falcata</i> (167)	nu	0,837	0,845	0,845	0,838	0,821	0,842	0,831	0,838	0,838	ID	112	90	90	127
		aa	0,968	0,978	0,978	0,978	0,957	0,957	0,952	0,984	0,984		16	10	8	32
11	<i>Orthomorpha</i> sp., (436)	nu	0,821	0,824	0,831	0,817	0,84	0,84	0,828	0,81	0,805	0,803	ID	89	93	141
		aa	0,894	0,905	0,91	0,91	0,936	0,936	0,931	0,91	0,91	0,915		13	12	35
12	<i>Orthomorphaoides setosa</i> (467)	nu	0,837	0,83	0,835	0,837	0,859	0,866	0,865	0,838	0,847	0,842	0,844	ID	84	111
		aa	0,936	0,947	0,936	0,936	0,989	0,989	0,963	0,952	0,952	0,947	0,931		2	32
13	<i>Paradosoxosomatidae</i> sp., (179)	nu	0,835	0,859	0,849	0,824	0,894	0,901	0,884	0,835	0,844	0,842	0,837	0,852	ID	122
		aa	0,947	0,957	0,947	0,947	1	1	0,973	0,963	0,963	0,957	0,936	0,989		32
14	<i>Polydesmus denticulatus</i> (GB)	nu	0,763	0,765	0,788	0,765	0,791	0,793	0,789	0,77	0,775	0,777	0,753	0,805	0,786	ID
		aa	0,815	0,826	0,826	0,826	0,831	0,831	0,826	0,821	0,821	0,831	0,815	0,831	0,831	

Số trong ngoặc đơn chỉ ký hiệu mẫu, ví dụ: (50) = IEBR-Myr 50.

Cây quan hệ phát sinh xây dựng theo phân tích Maximum Likelihood được thể hiện ở hình 1. Chi số ở gốc các nhánh là giá trị bootstrap với 1.000 lần lấy lại mẫu (%). Mức độ tin cậy

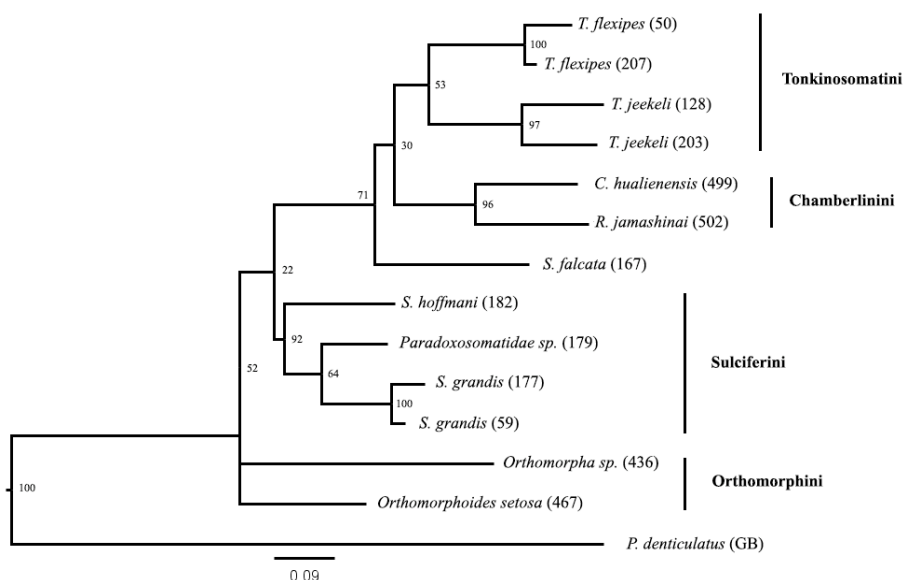
được đánh giá theo giá trị ML bootstrap như sau: mức độ tin cậy cao: >85%; mức độ tin cậy trung bình: 65-85%; mức độ tin cậy thấp: <65%.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền theo mô hình thay thế nucleotid (p-distance) của đoạn gen ty thể COI giữa các loài chân kép

Loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>T. flexipes</i> (50)														
2 <i>T. flexipes</i> (207)	0,063													
3 <i>T. jeekeli</i> (128)	0,147	0,145												
4 <i>T. jeekeli</i> (203)	0,145	0,133	0,102											
5 <i>S. grandis</i> (59)	0,154	0,147	0,154	0,158										
6 <i>S. grandis</i> (177)	0,165	0,147	0,149	0,154	0,047									
7 <i>S. hoffmani</i> (182)	0,173	0,152	0,163	0,158	0,103	0,119								
8 <i>C. hualienensis</i> (499)	0,161	0,152	0,156	0,154	0,165	0,163	0,166							
9 <i>R. jamashinai</i> (502)	0,156	0,149	0,145	0,159	0,149	0,147	0,163	0,124						
10 <i>S. falcata</i> (167)	0,163	0,154	0,154	0,161	0,179	0,158	0,168	0,161	0,161					
<i>Orthomorpha</i> sp. (436)	0,179	0,175	0,168	0,182	0,159	0,159	0,172	0,189	0,194	0,196				
<i>Orthomorphoides setosa</i> (467)	0,163	0,170	0,165	0,163	0,140	0,133	0,135	0,161	0,152	0,158	0,156			
<i>Paradoxomatidae</i> sp. (179)	0,165	0,140	0,151	0,175	0,105	0,098	0,116	0,165	0,156	0,158	0,163	0,147		
14 <i>P. denticulatus</i> (GB)	0,236	0,235	0,212	0,235	0,208	0,207	0,210	0,229	0,224	0,222	0,247	0,194	0,214	

Kết quả cho thấy, các nhóm đơn phát sinh được hình thành bao gồm: tộc Chamberlinini gồm hai loài *C. hualienensis* và *R. jamashinai*; tộc Sulciferini gồm các loài *S. hoffmani*, *S. grandis* và loài *Paradoxosomatidae* sp.; tộc Tonkinosomati gồm *T. jeekeli* và *T. flexipes*; tộc Orthomorphini gồm hai loài *Orthomorpha* sp. và *Orthomorphoides setosa*. Hai tộc Chamberlinini và Tonkinosomatini có quan hệ gần nhau, tạo thành một nhóm đơn phát sinh (monophyly) trên

cây quan hệ phát sinh. Tương tự, tộc Sulciferini được xem là nhóm chị em với hai tộc Tonkinosomatini và Chamberlinini. Hai loài thuộc tộc Orthomorphini tạo thành hai nhánh riêng biệt và không có quan hệ chung. Chỉ số bootstrap ở các nhánh đều thể hiện mức độ tin cậy trung bình và thấp (<85%), ngoại trừ ở một số nhánh của loài *T. flexipes*, *T. jeekeli*, *S. grandis* và giữa hai loài thuộc tộc Chamberlinini (100%, 97%, 100% và 96%, tương ứng).

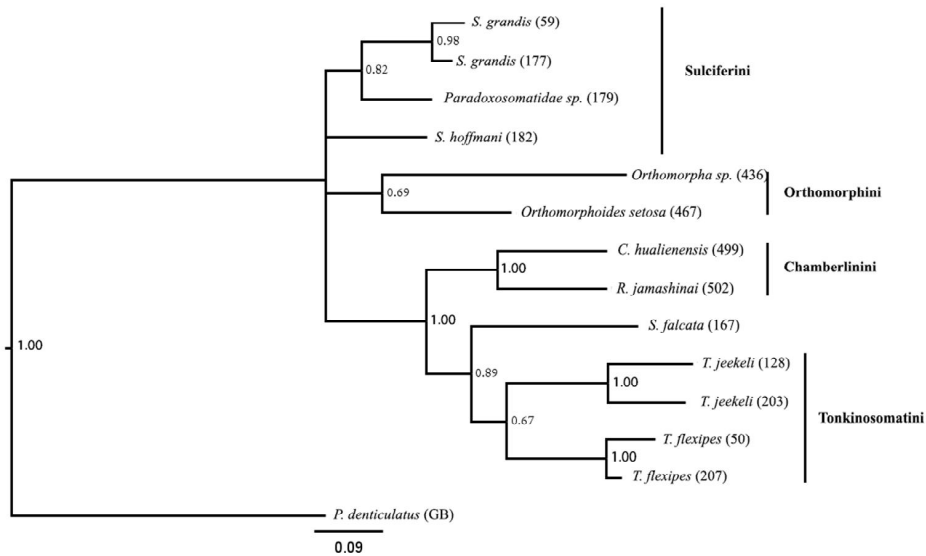


Hình 1. Cây quan hệ phát sinh theo phương pháp ML của đoạn 571 bp gen COI

Cây quan hệ phát sinh xây dựng theo phân tích Bayesian Inference (BI) được thể hiện ở hình 2. Chỉ số ở gốc các nhánh là giá trị xác suất hậu nghiệm (Bayesian posterior probability = BPP). Mức độ tin cậy được đánh giá như sau: mức độ tin cậy cao: BPP >0,85; mức độ tin cậy trung bình: BPP =0,65-0,86; mức độ tin cậy thấp: BPP <0,65.

Kết quả cho thấy các nhóm đơn phát sinh được hình thành bao gồm: tộc Chamberlinini gồm hai loài *C. hualienensis* và *R. jamashinai*;

tộc Tonkinosomati gồm *T. jeekeli* và *T. flexipes*; tộc Orthomorphiini gồm hai loài *Orthomorpha* sp. và *Orthomorphoides setosa*. Tộc Sulciferini gồm các loài *S. hoffmani*, *S. grandis* và loài thuộc họ Paradoxosomatidae, nhưng không tạo thành một nhóm riêng biệt. Quan hệ phát sinh giữa các loài thuộc tộc Sulciferini và Orthomorphiini cũng chưa được thể hiện rõ. Tuy nhiên, tộc Chamberlinini được tách riêng với tộc Tonkinosomatini và loài *Simplogonomorpha falcata* với mức độ tin cậy cao (BPP=1,00).



Hình 2. Cây quan hệ phát sinh theo phương pháp BI của đoạn 571 bp gen COI

Hai phương pháp phân tích ML và BI đều cho thấy, hai loài *Riukiupeltis jamashinai* và *Chamberlinius hualienensis* luôn tạo thành một nhóm riêng biệt. Điều này cũng phù hợp với phân loại hình thái khi xếp hai loài này thuộc tộc Chamberlinini. Quan hệ phát sinh giữa hai loài *T. jeekeli* và *T. flexipes* có giá trị ML bootstrap và BPP khá thấp (53% và 0,67, tương ứng). Thêm vào đó, khoảng cách di truyền giữa hai loài *T. jeekeli* và *T. flexipes* khá lớn ($p=0,133-0,147$) và có khác biệt 2-4 axit amin trong vùng phân tích. Điều này thể hiện loài *T. jeekeli* có khả năng nằm ở đơn vị phân loại khác như Golovatch (2014) [8] đã nhận xét.

Gen ty thể tiến hóa nhanh hơn so với các gen nhân. Vì vậy, gen ty thể thường được sử dụng để phân tích mối quan hệ phát sinh chủng

loại đối với các đơn vị phân loại bậc thấp (họ, tộc, giống, loài). Trong đó, gen COI tiến hóa nhanh và được sử dụng để phân tích mối quan hệ giữa các loài trong cùng giống, hoặc ở đơn vị dưới loài [13]. Ngoài ra, việc xây dựng cây phát sinh chủng loại có độ tin cậy cao không chỉ phụ thuộc vào tốc độ tiến hóa của gen mà còn phụ thuộc vào số lượng dữ liệu được đưa vào phân tích cũng như mức độ quan hệ giữa các loài được đưa vào phân tích. Vì vậy, trong nghiên cứu này với số lượng mẫu phân tích còn ít, kết quả phân tích về quan hệ phát sinh giữa các đơn vị phân loại trong họ Paradoxosomatidae còn hạn chế, chưa rõ ràng. Quan hệ phát sinh chủng loại giữa các đơn vị phân loại trong họ Paradoxosomatidae có thể rõ ràng hơn nếu được bổ sung thêm dữ liệu phân tử của các gen nhân, gen ty thể của nhiều loài thuộc họ này.

KẾT LUẬN

Một đoạn 680bp gen ty thể COI của 13 mẫu thuộc 10 loài chân khớp họ Paradoxosomatidae đã được giải trình tự và lưu trữ trên Ngân hàng GenBank với các mã số. Phân tích khoảng cách di truyền giữa các loài cho thấy sự phân tách rất rõ giữa các loài chân khớp thuộc họ Paradoxosomatidae và họ Polydesmidae.

Cây quan hệ phát sinh giữa 10 loài chân khớp thuộc họ Paradoxosomatidae cho thấy, các loài thuộc tộc Chamberlini luôn thành tạo một nhóm riêng, phù hợp với hệ thống phân loại hình thái. Tuy nhiên, đoạn gen 680 bp COI cũng chưa phản ánh được mối quan hệ tiến hóa giữa các đơn vị phân loại khác trong họ Paradoxosomatidae. Phân tích quan hệ tiến hóa trong họ Paradoxosomatidae cần bổ sung thêm các dẫn liệu phân tử khác (gen nhân và gen ty thể) của nhiều loài hơn.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong khuôn khổ đề tài No. 106-NN.05-2015.22.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402
2. Attems C., 1938. Die von Dr. C. Dawydoff in Französisch Indochina gesammelten Myriopoden. *Mém. Mus. natn. Hist. nat., N.S.*, 6(2): 187-321.
3. Attems C., 1953. Myriopoden von Indochina. Expedition von C. Dawidoff (1938-1939). *Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, 5(3): 133-230.
4. Edgar R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792- 1797.
5. Enghoff H., Golovatch S. I., Nguyen D. A., 2004. A review of the millipede fauna of Vietnam (Diplopoda). *Arthropoda Selecta*, 13(1/2): 29-43
6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
7. Golovatch S. I., 1984. Contribution to the millipede fauna of Vietnam (Diplopoda) II. *Acta zoologica Hungarica*, 30: 53-77.
8. Golovatch S. I., 2014. On several new or poorly-known Oriental Paradoxosomatidae (Diplopoda: Polydesmida, XVI. *Arthropoda Selecta*, 23(3): 227-251.
9. Hall T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
10. Hwang U. W., Kim W., 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4): 215-228.
11. Jeekel C. A. W., 1953. Two new Strongylosomidae from Indochina. *Beaufortia*, 2(29): 1-8.
12. Nguyen D. A., 2010. A review of the millipede tribe Tonkinosomatini (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae) from Vietnam. *Zootaxa*, 3036: 58-68
13. Nguyen D. A., Korsós Z., 2011. A revision of the millipede genus *Riukiupeltis* Verhoeff, 1939 (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae), with comments on the status of related species. *ZooKeys*, 156: 25-40. doi: 10.3897/zookeys.156.2009
14. Nguyen D. A., Sierwald P., 2013. A worldwide catalog of the family Paradoxosomatidae Daday, 1889 (Diplopoda: Polydesmida). *CheckList*, 9(6): 1132-1353.
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

**MOLECULAR DATA AND PRELIMINARY PHYLOGENY OF SEVERAL
PARADOXOSOMATID MILLIPEDE SPECIES IN VIETNAM (Diplopoda:
Polydesmida: Paradoxosomatidae)**

Nguyen Duc Anh, Nguyen Giang Son

Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

SUMMARY

The paper provides new data on molecular sequences of 10 millipede species of the family Paradoxosomatidae Daday, 1889 from Vietnam. A 680 bp fragment of the mitochondrial gene COI was sequenced, and registered in GenBank with accession numbers. Similarity matrix and genetic distance (p-distance) were calculated using the computer software MEGA 6.0.

The aligned dataset of the gene COI consists of 571 bp from 14 samples of 11 species including an outgroup, *Polydesmus denticulatus* (C.L. Koch, 1847). Genetic distance and similarity matrix clearly show the separation between the family Polydesmidae and members of the family Paradoxosomatidae. P-distance values among paradoxosomatid species range from 0.063 to 0.236. Almost all p-distance values of *Polydesmus denticulatus* with other paradoxosomatid species are higher than 0.2. Among same species, p-distance values are also variable from 0.047 for *Sellanucheza grandis*, 0.063 for *Tonkinosoma flexipes*, and relatively high (0.102) for *Tonkinosoma jeekeli*.

The phylogenetic trees were reconstructed using two methods: Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Both ML and BI trees support the separation of the tribe Chamberlinini from other species. The relationship among other taxa, Tonkinosomatini, Sulciferini and Orthomorphini is unsolved due to limitations of molecular data and samples. In addition, the taxonomic position of the species *Tonkinosoma jeekeli* is recommended to revise.

Keywords: Polydesmida, Paradoxosomatidae, COI gene, millipedes, molecular data, phylogeny, Vietnam.

Ngày nhận bài: 6-1-2016