

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY KHOAI MÔN - SỢ BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ DNANguyễn Văn Giang^{1*}, Vũ Ngọc Lan^{2*}, Tống Văn Hải¹¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội² Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email*: nvgiang@hua.edu.vn, vungoclan@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 08.12.2012

Ngày chấp nhận: 23.01.2013

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử - Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội với 60 mẫu giống khoai môn - sọ được thu thập tại các địa phương khác nhau, để đánh giá đa dạng di truyền các mẫu giống khoai môn - sọ với 2 loại chỉ thị DNA là RAPD và SSRs. Sản phẩm PCR của hai chỉ thị này được phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 Kết quả 67 alen được nhận lên đối với 5 chỉ thị RAPD, trong đó có 47 alen đa hình chiếm 70,1% và 20 alen được nhận lên đối với 5 chỉ thị SSRs, có 9 alen đa hình chiếm 45%. 60 mẫu giống khoai môn - sọ được phân thành 12 nhóm với hệ số tương đồng là 0,8. Kết quả trong nghiên cứu này có thể sử dụng trong công tác bảo tồn cũng như lai chọn tạo giống khoai môn sọ mới.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử DNA, chỉ thị SSR, chỉ thị RAPD, đa dạng di truyền, khoai môn - sọ.

Study on Genetic Diversity in Taro (*Colocasia esculenta*) by DNA Markers**ABSTRACT**

In this study, we used DNA markers (5 RAPD markers and 5 SSR markers) to analyze genetic diversity of 60 taro (*Colocasia esculenta*) samples collected from different locations. Total of 67 alleles were amplified by RAPD markers, of which 47 alleles are polymorphic. 20 alleles were amplified by SSR markers and 9 alleles were polymorphic. From the electrophoresis of PCR products of RAPD and SSR markers, 60 taro accessions were grouped into 12 clusters with similarity coefficient of 0.8 by NTSYSpc 2.1 software. The information found in this study may be used for taro conservation and breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, DNA Marker SSR marker, RAPD marker, Taro (*Colocasia esculenta*).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây khoai môn - sọ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), thuộc họ Ráy (*Araceae*) là một trong những cây lương thực có lịch sử trồng trọt lâu đời, từ khoảng 9000 năm trước. Nó được thuần hóa đầu tiên ở Ấn Độ và Đông Nam châu Á, sau đó tiếp tục phát triển khắp thế giới (Ramanatha Rao cs., 2010). Khoai môn - sọ có ưu điểm vừa là cây lương thực, cây thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, làm thuốc chữa bệnh, vừa có tiềm năng chế biến cao (Lakhanpaul & cs., 2003). Cây khoai môn - sọ được trồng rộng rãi ở các vùng sinh thái từ 8°N đến 23°N vĩ độ Nam và từ 102°E đến 110°E kinh độ Đông, từ đồng bằng đến miền núi (Nguyen Thi Ngoc Hue & cs.,

2010). Ở nước ta khoai môn - sọ là cây lấy củ quan trọng thứ 4 sau khoai tây, khoai lang và sắn, đóng vai trò quan trọng đối với an ninh lương thực của hộ nông dân sản xuất nhỏ, diện tích trồng khoai môn sọ hàng năm khoảng 15000ha (Nguyen Thi Ngoc Hue & cs., 2010). Tại các địa phương trồng khoai môn - sọ, tên gọi của các giống khoai môn - sọ không thống nhất. Việc phân biệt các giống khoai môn - sọ chủ yếu dựa vào hình thái đã gây không ít khó khăn trong việc chọn giống cũng như bảo tồn nguồn gen cây khoai môn - sọ. Bên cạnh đó do thay đổi hệ thống canh tác, đưa vào canh tác các loại cây trồng mới nên tài nguyên di truyền khoai môn sọ đang bị xói mòn nghiêm trọng (Nguyen Thi Ngoc Hue & cs., 2010; Nguyễn Thị Ngọc Huệ và

Nguyễn Văn Việt, 2004). Chính vì thế, đánh giá đa dạng di truyền để khai thác sử dụng và bảo tồn nguồn gen là vô cùng cần thiết góp phần hữu ích trong công tác chọn tạo giống cũng như bảo tồn cây khoai môn - sọ.

Để đánh giá mức độ đa dạng di truyền của các giống khoai môn - sọ, ngoài sử dụng các đặc điểm hình thái, việc áp dụng chỉ thị phân tử DNA được coi là phương pháp hữu hiệu nhất. Tại Việt Nam, những nghiên cứu về sử dụng chỉ thị phân tử để đánh giá đa dạng di truyền các giống khoai môn - sọ còn khiêm tốn, mới chỉ có một dự án hợp tác của Trung tâm Tài nguyên thực vật với CIRAD nghiên cứu đa dạng di truyền của tập đoàn môn - sọ bằng kỹ thuật đẳng men (isosyme). Trong nghiên cứu

này chúng tôi tiến hành đánh giá mối quan hệ di truyền của 60 mẫu giống khoai môn - sọ được thu thập từ các địa phương bằng các chỉ thị phân tử DNA.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu cây

60 mẫu giống khoai môn - sọ được thu thập ở các vùng khác nhau (Bảng 1). Các mẫu giống sau khi thu thập được trồng tại vùng Giang Biên - Long Biên - Hà Nội với mật độ 35000 cây/ha, trồng bằng củ và được chăm sóc theo đúng kỹ thuật trồng khoai môn - sọ (Nguyễn Thị Ngọc Huệ và Nguyễn Văn Việt, 2004).

Bảng 1. Các mẫu giống khoai môn - sọ được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mẫu giống	Nơi thu thập	STT	Tên mẫu giống	Nơi thu thập
1	Khoai sọ đôi	Hà Nội	31	Khoai bé em	Thanh Hoá
2	Phước	Thanh Hoá	32	Phước hóm	Lạng Sơn
3	Khoai sọ nướng	Quảng Ninh	33	Phước my	Lạng Sơn
4	Khoai sọ tím	Lào Cai	34	Hậu đàn đao	Lào Cai
5	Khoai sọ	Hà Bắc	35	Môn bạc hà	Gia Lai
6	Phước đao	Lạng Sơn	36	Khoai trại	Bắc Giang
7	Môn voi Cam Lộ	Quảng Trị	37	Khoai môn	Bắc Giang
8	Khoai sọ	Hà Nội	38	Khoai muộn	Bắc Giang
9	Khoai sọ trứng dọc tím	Hà Bắc	39	Khoai sọ trắng	Bắc Giang
10	khoai sọ trứng dọc tím	T. Quang	40	Khoai sọ tía	Bắc Giang
11	Khoai sọ chân trắng	Lạng Sơn	41	Co cay	Sơn La
12	Phước my	Lạng Sơn	42	Hậu rão	Tuyên Quang
13	Phứa lạnh	Lai Châu	43	Khoai sọ nướng	Quảng Ninh
14	Môn trốn	Quảng Ngãi	44	Cò lằng	Sơn La
15	Khoai sọ trắng	Bắc Kạn	45	Cò trơ	Điện Biên
16	Cỏ hát háng	Sơn La	46	Khoai sọ	Lạng Sơn
17	Khoai môn sọ	Hà Tĩnh	47	Măng phứa	Lai Châu
18	Phước mán	Thanh Hoá	48	Phước bơn bét	Bắc Giang
19	Phước hóm	Hoà Bình	49	Khoai chân chó	Cao Bằng
20	Mặc Phước nành	Hoà Bình	50	Hậu pun chó	Lào Cai
21	Khoai sọ	Hoà Bình	51	Srôclock	Sơn La
22	Hậu zan (khoai sọ chân hổ)	Quảng Ninh	52	Co ch Ha	Nghệ An
23	Hậu	Quảng Ninh	53	Mặc phiệc cỏ	Nghệ An
24	Khoai sọ Hà Bắc	Quảng Ninh	54	Khoai sọ	Nghệ An
25	Khoai sọ	Quảng Ninh	55	Co ch Ha	Nghệ An
26	Khoai xanh	Bình Thuận	56	Môn áp	Quảng Bình
27	Khoai môn	Bình Thuận	57	Khoai sọ trắng	Hoà Bình
28	Co chu hang	Sơn La	58	Hầu vàng (khoai sọ)	Thanh Hoá
29	Phước lớn	Hoà Bình	59	Khoai sọ Tây Ninh	Tây Ninh
30	Khoai tròn	Thanh Hoá	60	Hậu pun chó	Lào Cai

2.2. Tách chiết DNA

Để tách chiết DNA, mẫu được thu từ các lá non của 60 mẫu giống khoai môn sọ, mỗi mẫu giống được ghi số và bảo quản trong túi nylon, bảo quản trong tủ lạnh -20°C. DNA được chiết tách từ mẫu lá của các mẫu giống theo phương pháp được Sharma mô tả (Sharma & cs., 2008).

Sau khi tách chiết DNA, tiến hành kiểm tra sản phẩm bằng cách điện di trên gel agarose 1%, nhuộm sản phẩm DNA trong gel agarose bằng Ethilium bromide nồng độ 10mg/ml trong 15 phút. Quan sát và phân tích các vệt băng bằng đèn UV. Nếu kết quả tách chiết tốt, không làm đứt gãy DNA, vệt băng sẽ sáng rõ nét và ngược lại.

2.3. Phân tích bằng chỉ thị SSRs và RAPD

Sử dụng 5 mỗi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) và 5 cặp mỗi SSRs (Single Sequence Repeats hoặc Microsatellite) có trình tự được trình bày ở bảng 2. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Eppendorf với thể tích phản ứng 25µl, trong đó DNA tổng số 1µl (100 ng DNA), primer 2µl (10pM) mỗi loại, dNTP 0,4µl (10mM), Taq polymerase 0,1µl (5 Unit), buffer 2,0µl, nước free nucleare cho đến 25µl. Chu kỳ nhiệt đối với mỗi nhân chỉ thị RAPD: 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 30-40°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút), cuối cùng 72°C trong 10 phút. Chu kỳ nhiệt đối

với mỗi nhân chỉ thị SSR: 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 55-67°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút), cuối cùng 72°C trong 10 phút.

Điện di sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, hiệu điện thế 60V trong 1,5-2 giờ trong dung dịch đệm TAE (Tris-HCl, Axitacetic và EDTA). Sau đó gel được nhuộm trong Ethilium Bromide 1%, 15 phút, soi dưới đèn UV và chụp ảnh. Các băng trên gel được xác định bằng cách cho điểm (0) không có băng, (1) có băng.

2.4. Phân tích thống kê kết quả

1) Chỉ số đồng hình di truyền (GS): $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$, trong đó N_{ij} là số allele SSR và RAPD của mẫu giống i và j, N_i và N_j là tổng số allele quan sát của mẫu giống i và j. Cây phả hệ (dendrogram) xây dựng bằng phương pháp nhóm cặp không trọng số UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) và phân tích bằng phần mềm NTSYS-pc version 2.10.

2) Khoảng cách di truyền ước lượng bằng khoảng cách Rogers cải tiến (Balestre &cs., 2008) như sau:

$$d_{ij} = \sqrt{\frac{1}{2n_{loci}} \sum_k (x_{ki} - y_{kj})^2}$$

Trong đó: n = số locus, x_{ki} và y_{kj} là tần suất allele thứ k của mẫu giống i và j

Bảng 2. Chỉ thị và trình tự mỗi

Chỉ thị RAPD	Trình tự	Chỉ thị SSR	Trình tự
OPM-12	5'-ggg acg ttg g-3'	Uq 75-100	f: 5'-ttg gtc aga tca agg ctg ag-3' r: 5'-gac taa cat cac aca cac acg-3'
OPA-12	5'-tcg gcg ata g-3'	uq95-219	f: 5'-aca act cgt gta tcc tac atc c-3' r: 5'-tca act ctc aaa ccc ttc cc-3'
OPN 07	5'-cag ccc aga g-3'	uq77-174	f: 5'-gat ctc aag cac aag aga cg-3' r: 5'-tca acc ttc tcc atc agt cc-3'
OPN 14	5'-ctg ttg cta c-3'	uq82-117	f: 5'-tca agc gta ggg gaa aaa c-3' r: 5'-cca caa cac aaa act gta aac c-3'
OPO 01	5'-ggc acg taa g-3'	uq90-102	f: 5'-tgg tgc gtt ggt cag atc aag g-3' r: 5'-aca aca cac aca cga gca cac-3'

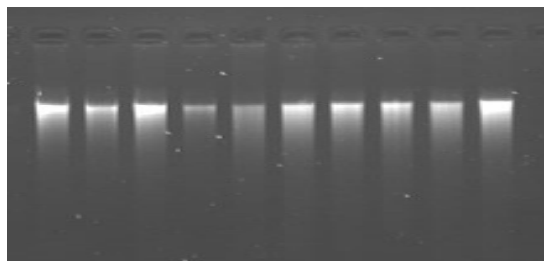
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng di truyền của 60 mẫu giống khoai môn - sọ

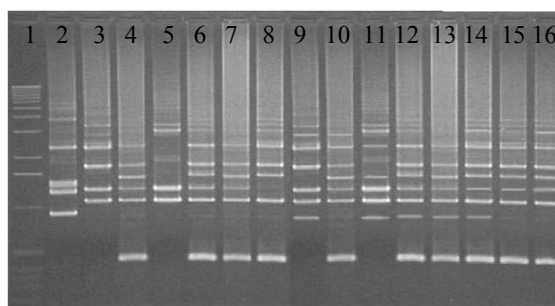
Mẫu DNA sau khi tách chiết được kiểm tra như đã nêu ở trên. Kết quả thu được các vạch DNA đồng đều sáng, nét và gọn không bị đứt gãy. Mặt khác không thấy xuất hiện các vết sáng RNA phía dưới, điều đó chứng tỏ RNA đã được loại bỏ hoàn toàn khỏi dịch chiết DNA.

Tất cả 5 môi RAPD và 5 cặp môi SSRs đều xuất hiện vết băng DNA (allen) với kích thước khác nhau. Đối với chỉ thị RAPD, kích thước các vết băng trong khoảng từ 100 bp đến 900 bp. Kết quả thu được tổng số 67 allen/5 locus với giá trị trung bình 13,4 allen/1locus. Số băng đa hình là 47 (chiếm 70,1%). Số lượng allen trên 1 locus dao động từ 9-16, với locus OPM12 biểu hiện số allen lớn nhất, 16 allen. Locus OPO 07 có tỷ lệ băng đơn hình cao nhất (Bảng 3). Số allen đa hình càng cao thì việc thiết lập mối quan hệ di truyền càng chính xác. Một số locus có tỷ lệ allen đa hình cao, dao động 61,1-87,5% điều này đã chứng tỏ sự khác nhau giữa các vùng trong genome của các giống khoai môn - sọ. RAPD là chỉ thị ngẫu nhiên các đoạn DNA trong genome trên cơ sở phương pháp PCR dùng một đoạn mỗi. Các môi này sẽ bắt cặp một cách ngẫu nhiên vào DNA khuôn ở một vị trí bất kỳ mà tại đó có trình tự bổ sung với nó. Chỉ thị RAPD phát hiện tính đa dạng đáng tin (sự mất đoạn nhiễm sắc, sự thay đổi, thêm bớt nucleotit, xen đoạn... đều làm thay đổi kích thước đoạn nhân bản). Tuy nhiên phương pháp rất nhạy cảm với yếu tố tham gia phản ứng như: thành phần tham gia phản ứng, điều kiện thí nghiệm, lặp lại nhiều lần, đặc biệt là nhiệt độ gắn mỗi cần tuân thủ nghiêm ngặt quy trình; khoảng cách thích hợp giữa 2 điểm bắt cặp mỗi; các đoạn có cùng kích thước từ 2 mẫu DNA khác nhau có thực sự tạo ra từ cùng một vị trí trên hệ gen hay không. Chính vì vậy để đánh giá mối quan hệ di truyền các mẫu giống khoai môn - sọ một cách chính xác, chỉ thị SSRs được tiếp tục sử dụng để nghiên cứu. Chỉ thị SSRr dùng để nhân hoặc lai những đoạn DNA lặp lại nhiều lần trong genome. Chỉ thị này được áp dụng trong phân tích đa hình giữa các loại cây

trồng với nhau, từ đó tìm ra sự khác biệt giữa chúng. So với chỉ thị RAPD, chỉ thị SSRs có độ chính xác cao hơn. Trong 5 chỉ thị SSRs sử dụng,

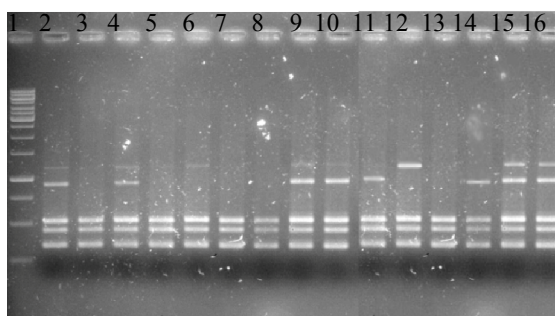


Hình 1. Kết quả tách chiết DNA của các mẫu khoai môn - sọ



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR chỉ thị

1. Marker, 2. Khoai sọ đôi, 3. Phước, 4. Khoai sọ nướng, 5. Khoai sọ, 6. Phước đào, 7. Khoai sọ trứng dọc tím, 8. Khoai sọ chân trắng, 9. Cỏ hát hang, 10. Phước mán, 11. Phước hóm, 12. Mặc phước nành, 13. Hậu zan, 14. Cò lẳng, 15. Hậu vàng, 16. Khoai sọ Tây Ninh



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR chỉ thị Uq 75-100

1. Marker, 2. Khoai sọ đôi, 3. Phước, 4. Khoai sọ nướng, 5. Khoai sọ, 6. Phước đào, 7. Khoai sọ trứng dọc tím, 8. Khoai sọ chân trắng, 9. Cỏ hát hang, 10. Phước mán, 11. Phước hóm, 12. Mặc phước nành, 13. Hậu zan, 14. Cò lẳng, 15. Hậu vàng, 16. Khoai sọ Tây Ninh

tổng số allen nhân lên là 20, trung bình mỗi chỉ thị nhân được 4 vùng. Tổng số allen đa hình là 9 chiếm 45%, số allen đơn hình là 11 chiếm 55%. Locus Uq 75-100 nhân lên được số allen cao nhất, tuy nhiên chỉ có 2 allen đa hình. Locus Uq 82-117 allel đa hình thấp nhất (1 allen).

3.2. Biến động di truyền của 60 mẫu giống khoai môn sọ dựa trên các locus SSRs và RAPD

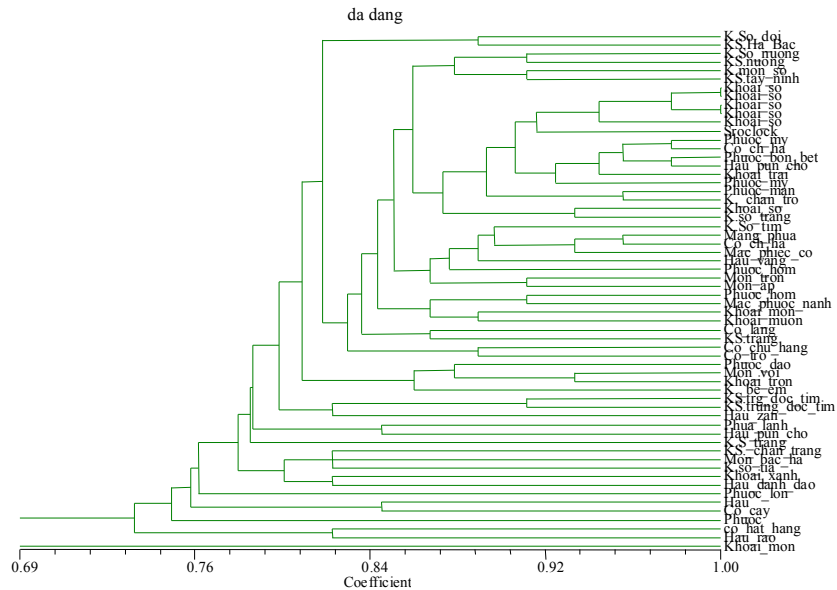
Kết quả sử dụng 2 chỉ thị RAPD và SSRs trên trường điện di được ghi điểm (0) và (1). Điểm 0 tức không có allen, điểm 1 có allen ở một vị trí trên các giống. Hình 4 cho biết hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây quan hệ di truyền của tập đoàn 60 mẫu giống. Dựa vào kết quả này có thể biết được mối quan hệ giữa các mẫu giống, từ đó nhóm chúng thành từng nhóm để có hướng sử dụng và bảo tồn hiệu quả. Các giống có hệ số tương đồng di truyền giao động từ 0,69 đến 1,00. Ở đây có 2 cặp giống có hệ số tương đồng di truyền là 1,00 tức giống hệt nhau về mặt di truyền là khoai sọ Hà Nội và khoai sọ Nghệ An; khoai sọ Quảng Ninh và khoai sọ Lạng Sơn. Trên thực tế, 2 cặp giống này giống hệt nhau về kiểu hình. 60 mẫu giống khoai môn - sọ được phân thành 12 nhóm với hệ số tương đồng là 0,8. Nhóm 1 bao gồm 38 mẫu giống (khoai sọ đồi, khoai sọ Hà Bắc, 2 mẫu khoai sọ nương, khoai môn - sọ, khoai sọ Tây Ninh, khoai

sọ Hà Nội, khoai sọ Nghệ An, khoai sọ Lạng Sơn, khoai sọ Quảng Ninh, Sroclock, 2 mẫu Phước my Lạng Sơn, 2 mẫu Co ch Ha Nghệ An, Phước sơn sét, 2 mẫu khoai sọ trắng Hòa Bình và Bắc Kạn, Phước mán, khoai chân chó, khoai sọ tím, Măng phứa, Mạc phiêu cỏ, Hấu vàng, 2 mẫu Phước hỏm Hòa Bình và Lạng Sơn, Môn trồn, Môn áp, Mạc phước nành, khoai môn, khoai muôn, Cò lằng, Cò chu hang, Cò trơ).

Nhóm 2 gồm 4 mẫu giống (phước đao, môn voi, cam lộ, khoai tròn, khoai bé em). Nhóm 3 gồm 3 mẫu giống (2 mẫu khoai sọ trứng dọc tím Hà Bắc và Tuyên Quang, Hậu Zan). Nhóm 4 gồm 2 mẫu giống (phứa lạnh, hậu pun chỏ). Nhóm 5 có 1 giống (khoai sọ trắng). Nhóm 6 gồm 3 giống (khoai sọ chân trắng, khoai môn Bắc Hà, khoai sọ tía). Nhóm 7 gồm 2 mẫu giống (khoai xanh, hậu đành đao). Nhóm 8 có 1 mẫu giống (phước lớn). Nhóm 9 có 2 giống (hậu, co ray). Nhóm 10 có 1 giống (phước). Nhóm 11 có 2 giống (cỏ hát háng, hậu rão). Nhóm 12 có 1 giống (khoai môn). Khi so sánh các đặc điểm nông sinh học của các mẫu giống với kết quả đánh giá bằng chỉ thị phân tử, chúng tôi nhận thấy các mẫu giống trong cùng một nhóm về cơ bản có đặc điểm nông sinh học giống nhau từ kiểu cây, màu sắc dọc, thời gian sinh trưởng, tuy nhiên chúng khác nhau về hình dạng củ, dải bò và hình dạng lá.

Bảng 3. Số allen nhân lên bằng sử dụng mỗi RAPD và SSRs

Mỗi RAPD	Tổng số allel	Số allel đa hình	Tỷ lệ số băng đa hình (%)
OPM-12	16	14	87,5
OPA-12	13	8	61,5
OPN 07	18	11	61,1
OPN 14	9	7	77,8
OPO 01	11	7	63,6
Tổng	67	47	70,1
Mỗi SSRs	Tổng số allel	Số allel đa hình	Tỷ lệ số băng đa hình (%)
Uq 75-100	5	2	40,0
uq95-219	4	2	50,0
uq77-174	3	2	66,6
uq82-117	4	1	25,0
uq90-102	4	2	50,0
Tổng	20	9	45,0



Hình 4. Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ di truyền của 60 mẫu giống khoai môn - sọ

4. KẾT LUẬN

Khi sử dụng chỉ thị RAPD đánh giá mối quan hệ di truyền của 60 mẫu giống khoai môn - sọ, số allele đa hình chiếm 70,1%, tương tự như vậy, đối với chỉ thị SSR số allele đa hình chiếm 45%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balestre, M., R.G. Von Pinho, J.C. Souza and J.L. Lima (2008). Comparison of maize similarity and dissimilarity genetic coefficients based on microsatellite markers, *Genet. Mol. Res.* 7 (3): 695-705
- Cardle, L., Ramsay, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D., and Waugh, R. (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156: 847-854.
- Emma, S. Mace and Ian D. Godwin, (2002). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in taro (*Colocasia esculenta*)
- Kreike, C.M., H.J. Van Eck, V. Lebot (2004), Genetic diversity of taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, in Southeast Asia and the Pacific, *Theor Appl. Genet.*, 109: 761-768
- Lakhanpaul, S., K.C. Velayudhan and K.V. Bhat (2003). Analysis of genetic diversity in Indian taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 603-609.
- Li Maolin (2000). Analysis of correlation between ethnobotany and genetic diversity of taro in China using RAPD Assay. *In Proceedings of Twelfth Symposium of The International Society for tropical root crops (ISTRC) in Tsukuba, Japan Sep., 10-16, pp.103-104.*
- Nguyễn Thị Ngọc Huệ và Nguyễn Văn Việt (2004). Tài nguyên di truyền khoai môn - sọ ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp.
- Nguyen Thi Ngoc Hue, Nguyen Van Viet, Vu Linh Chi and M.S Prana, (2010). Taro germplasm collection in Vietnam. *In The Global diversity of taro: Ethnobotany and conservation*, pp. 60-68.
- Ramanatha, Rao. V, Danny Hunter, Pablo B. Eyzaguirre and Peter J. Matthews, (2010). Ethnobotany and global diversity of taro. *In The Global diversity of taro: Ethnobotany and conservation*, pp. 1-5.
- Sharma, K., A.K. Mishra and R.S. Misra, (2008). A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. *Afr. J Biotechnol.*, 7(8): 1018-1022.