

ĐẶC ĐIỂM MÃ VẠCH ADN CÁC VÙNG GEN *rbcl*, *ITS* VÀ *rpoC1* CHO LOÀI BÌNH VÔI NHỊ NGẮN TẠI THÁI NGUYÊN (*Stephania brachyandra* Diels.) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Lê Sơn

Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Bình vôi nhị ngắn (*Stephania brachyandra* Diels.) là loài cây dược liệu quý thuộc chi *Stephania*, hiện đang chịu áp lực suy giảm mạnh do khai thác quá mức và suy thoái sinh cảnh tự nhiên. Việc giám định chính xác loài có ý nghĩa quan trọng trong công tác bảo tồn và quản lý bền vững nguồn gen. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và đánh giá hiệu quả của các mã vạch ADN trong nhận dạng loài Bình vôi nhị ngắn tại tỉnh Thái Nguyên. Năm mẫu Bình vôi nhị được thu thập tại năm huyện khác nhau của tỉnh Thái Nguyên và tiến hành phân tích tại ba vùng gen gồm *rbcl*, *ITS* và *rpoC1*. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB cải tiến, sau đó các vùng gen được khuếch đại bằng PCR, giải trình tự và phân tích so sánh với các trình tự đã công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI). Kết quả cho thấy các mẫu nghiên cứu có mức độ tương đồng di truyền cao với loài *S. brachyandra* tại các vùng gen *rbcl* và *ITS* (với mã số trên Ngân hàng Gen Quốc tế lần lượt là OR389485 và OR364122). Đặc biệt, trình tự vùng gen *rpoC1* có chiều dài 465 bp đã được xác định và đăng ký lần đầu tiên cho loài Bình vôi nhị ngắn trên Ngân hàng gen với mã số OR389484, cho thấy khả năng phân biệt rõ ràng với các loài *Stephania* gần gũi. Nghiên cứu khẳng định việc kết hợp phân tích đa vùng gen có tốc độ tiến hóa khác nhau là hướng tiếp cận hiệu quả trong giám định loài và nghiên cứu quan hệ phát sinh loài, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học tin cậy phục vụ công tác bảo tồn và phát triển bền vững nguồn gen cây Bình vôi nhị ngắn ở Việt Nam.

Từ khóa: Bảo tồn nguồn gen, Bình vôi nhị ngắn, *ITS*, mã vạch AND, *rbcl*, *rpoC1*, *Stephania brachyandra*,

DNA BARCODING ANALYSIS OF *rbcl*, *ITS*, AND *rpoC1* REGIONS FOR SPECIES IDENTIFICATION OF *Stephania brachyandra* DIELS. IN THAI NGUYEN PROVINCE

Le Son

Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology

Stephania brachyandra Diels. is a valuable medicinal plant species belonging to the genus *Stephania*, which is currently facing serious threats due to overexploitation and habitat degradation. Accurate species identification is therefore essential for effective conservation and sustainable management of its genetic resources. This study aimed to develop and evaluate DNA barcoding markers for the identification of *S. brachyandra* collected from Thai Nguyen province, Northern Vietnam. Five samples were collected from five different districts and analyzed using three genetic regions, including *rbcl*, *ITS*, and *rpoC1*. Total genomic DNA was extracted using a modified CTAB method, followed by PCR amplification, sequencing, and comparative analysis with reference sequences available in the NCBI GenBank database. The results revealed high sequence similarity between the studied samples and *S. brachyandra* at both the *rbcl* and *ITS* regions. Notably, the *rpoC1* region with a length of 465 bp was successfully characterized and deposited for the first time for *S. brachyandra* under the accession number OR389484, demonstrating clear discriminatory power from closely related *Stephania* species. The findings indicate that the combined analysis of multiple genetic regions with different evolutionary rates is an effective strategy for species authentication and phylogenetic studies. This study provides reliable molecular markers and a solid scientific basis to support the conservation and sustainable utilization of genetic resources of *Stephania brachyandra* in Vietnam.

Keywords: DNA barcoding, genetic conservation, *ITS*, *rbcl*, *rpoC1*, species identification, *Stephania brachyandra*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Bình vôi (chi *Stephania*) là nhóm dược liệu quý có giá trị cao trong y học cổ truyền, phân bố rộng ở Việt Nam nhưng đang bị suy giảm mạnh do khai thác quá mức và mất sinh cảnh. Hiện nay, nhóm loài này đang được tập trung vào nghiên cứu, bảo tồn và phát triển ở một số tỉnh ở nước ta như Thái Nguyên, Quảng Ninh,... Chi Bình Vôi hay chi Thiên kim đằng (*Stephania* spp.) là một chi thực vật có hoa trong họ Biển bức cát (*Menispermaceae*) hay còn gọi là họ Tiết dê, có nguồn gốc ở miền Đông và miền Nam châu Á và Úc. Đây là một chi lớn, trên thế giới hiện có trên 100 loài trong đó ở Trung Quốc có khoảng 37 loài và ở Việt Nam có trên 20 loài và đã có 4 loài có tên trong Sách Đỏ Việt Nam (Hoàng Văn Thủy, 2020). Ở nước ta có khoảng 10 loài có rễ phình thành củ, nhìn hình thái bên ngoài chúng tương đối giống nhau, vì vậy có tên gọi chung là “bình vôi” như *S. brachyandra* Diels.; *S. cambodica* Gagnep.; *S. cepharantha* Hayata v.v... nên thường bị nhầm lẫn trong thu hái và sử dụng. Các loài thuộc chi Bình vôi phân bố rộng khắp cả 3 miền, Bắc, Trung, Nam (Hoàng Văn Thủy, 2020). Tất cả những loài này đều được dùng làm thuốc, có tác dụng an thần, dưỡng huyết thanh nhiệt, giải độc, điều hòa tim mạch, hạ huyết áp, chống viêm (Võ Văn Chi, 1997).

Hiện nay, các loài bình vôi thuộc chi *Stephania* spp. được xếp vào nhóm IIA thuộc danh mục thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm (Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22 tháng 9 năm 2021 của Chính phủ). Loài này hiện đang bị xâm phạm do nạn chặt phá rừng, tàn phá do khai thác đá và phát động khai thác ồ ạt để làm thuốc dẫn đến loài này ở các tỉnh miền núi phía Bắc mau cạn kiệt và có nguy cơ tuyệt chủng cao. Với những lý do trên, việc nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Bình vôi ở nước ta, đặc biệt là các tỉnh miền núi phía Bắc là việc làm cần thiết và có ý nghĩa cho việc

thực hiện chiến lược phát triển công nghiệp dược trong tương lai.

Mã vạch ADN (DNA barcoding) là phương pháp sử dụng các đoạn trình tự ADN ngắn, được chọn từ những vùng bảo thủ của hệ gen sinh vật, nhằm phục vụ cho việc định danh và giám định loài dựa trên sự khác biệt về trình tự nucleotide (Hebert *et al.*, 2003). Mã vạch ADN đã được ứng dụng rộng rãi trong công tác định danh loài (Fazekas *et al.*, 2008), ngoài ra nó còn được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác như bảo vệ quyền sở hữu và sở hữu trí tuệ (Stewart, 2005), phát hiện các loài ẩn sinh (Hebert *et al.*, 2004), giám định pháp y sinh học (Mildenhall, 2006), nghiên cứu sinh thái và môi trường (Valentini *et al.*, 2009). Việc áp dụng DNA barcoding cho các loài Bình vôi không chỉ góp phần khắc phục hạn chế của phương pháp phân loại hình thái, mà còn cung cấp bằng chứng khoa học khách quan cho nghiên cứu phát sinh loài và bảo tồn nguồn gen.

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phát triển các mã vạch ADN đặc trưng để phân biệt loài Bình vôi nhị ngắn với các loài gần gũi khác. Từ đó, cung cấp nguồn thông tin hữu ích trong việc đề ra những giải pháp phù hợp và cần thiết cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Bình vôi trong thời gian tới.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng 05 mẫu Bình vôi được thu tại 5 huyện (cũ) của tỉnh Thái Nguyên (1 mẫu/xuất xứ) bao gồm: Đại Từ, Đồng Hỷ, Định Hoá, Phú Lương và Võ Nhai. Các mẫu lá bánh tẻ được thu và bảo quản lạnh trong hộp xốp chứa đá gel, vận chuyển tới phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết DNA tổng số.

Sử dụng các cặp mồi *ITS*, *rbcl* và *rpoC1* để khuếch đại vùng gen của các mẫu Bình vôi đại diện cho các xuất xứ trong nghiên cứu này. Danh sách và trình tự mồi được trình bày cụ thể ở bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Trình tự các môi *rbcL*, *ITS*, *rpoC1* được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Môi	Trình tự 5' - 3'		Nhiệt độ bắt môi Tm (°C)	Nguồn
1	<i>rbcL</i>	<i>rbcL1F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	57	Wang <i>et al.</i> , 2020; Xie <i>et al.</i> , 2015
		<i>rbcL724R</i>	TCGCATGTACCTGCAGTAGC		
2	<i>ITS</i>	<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	56	
		<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
3	<i>rpoC1</i>	<i>rpoC1-F</i>	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	52	Mahima <i>et al.</i> , 2022
		<i>rpoC1-R</i>	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC		

2.1. Phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của các mẫu Bình vôi được tách chiết theo phương pháp của Doyle JJ. và Doyle JL. (1987). DNA tổng số thu được, tiến hành kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8% và quan sát kết quả bằng máy soi gel sử dụng tia UV. Đồng thời kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ hấp thụ Nanodrop. Mẫu DNA tổng số đủ điều kiện cho thí nghiệm tiếp theo phải có nồng độ ≥ 20 ng/ μ l và độ tinh sạch đạt tiêu chuẩn ($OD_{260nm/280nm} = 1,8 - 2,0$).

2.1.2. Phản ứng PCR

DNA tổng số của các mẫu nghiên cứu được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với các cặp môi (bảng 1) để nhân bản các vùng gen *ITS*, *rbcL* và *rpoC1*. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR MiniAmp™ Plus Thermal Cycler với tổng thể tích 100 μ l gồm 50 μ l Mastermix 10X, 2,5 μ l môi xuôi (F) 10 μ M, 2,5 μ l môi ngược (R) 10 μ M, 10 μ l DNA tổng số, 35 μ l nước deion. Chương trình chạy PCR được tiến hành theo chu trình nhiệt: 4 phút ở 94°C, 40 chu kỳ (1 phút 30 giây ở 94°C, 60 giây ở Tm (bảng 1), 1 phút 30 ở 72°C) và ở 72°C trong 7 phút, giữ mẫu ở 12°C.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,8% và tinh sạch sản phẩm PCR bằng GeneJET PCR Purification Kit. Sau đó, sản phẩm tinh sạch sẽ được đọc trình tự các vùng gen với cả chiều xuôi và ngược theo phương pháp giải trình tự Sanger trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

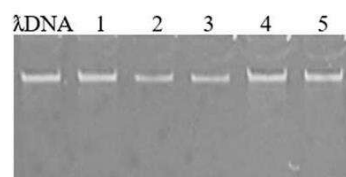
2.1.3. Xử lý số liệu

Kết quả giải trình tự các vùng gen được đối chiếu với nhau theo 2 chiều nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do đọc trình tự và phát hiện các đa hình nucleotide đơn. Sử dụng phần mềm BioEdit để phân tích mức độ sai khác và mối quan hệ các mẫu nghiên cứu. Trình tự các vùng gen *rbcL*, *rpoC1* và *ITS* của các mẫu Bình vôi được phân tích và so sánh với các trình tự tương ứng đã được công bố với các loài có sẵn trên Ngân hàng Gen Quốc tế NCBI. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp NJ (Neighbor Joining) phần mềm MEGA 7 với giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại (1.000 replicates) cho các mẫu nghiên cứu và trình tự nucleotide của một số loài thuộc chi *Stephania*

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Kiểm tra kết quả DNA tổng số của các mẫu Bình vôi trên gel agarose 0,8% được thể hiện ở hình 1 dưới đây.



Hình 1. Kết quả DNA tổng số của các mẫu Bình vôi nghiên cứu (số 1 - 5 lần lượt tương ứng là mẫu thu tại Đại Từ, Đồng Hỷ, Định Hoá, Phú Lương và Võ Nai)

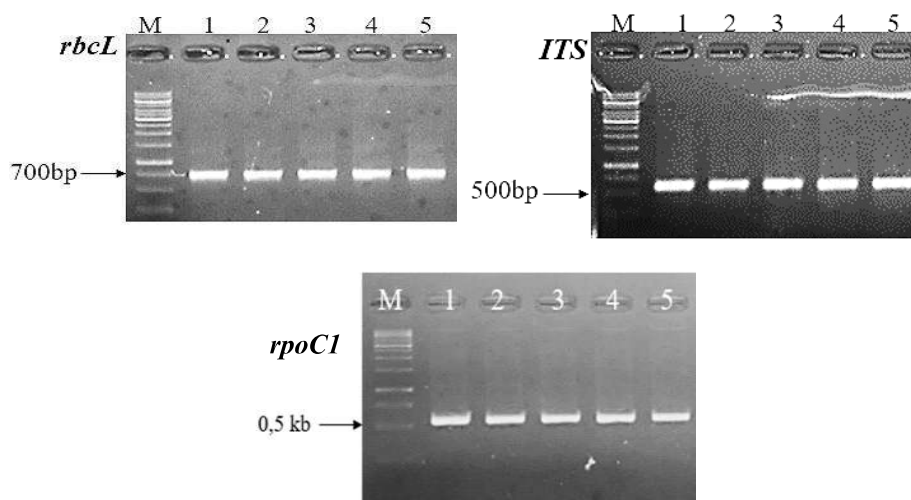
Kết quả phân tích trên gel điện di cho thấy, DNA tổng số của các mẫu Bình vôi nghiên cứu có băng chính sáng, rõ nét và không bị đứt gãy. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số thu được bằng máy Nanodrop cho thấy nồng độ > 20 ng/ μ l và độ tinh sạch $OD_{260/280}$ đạt trong

khoảng 1,8 - 2,0 đảm bảo chất lượng và đủ điều kiện để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Kết quả nhân bản PCR tại các vùng gen *rbcL*, *ITS* và *rpoC1*

Sản phẩm PCR của 5 mẫu Bình vôi với các vùng gen nghiên cứu được kiểm tra trên gel

agarose. Sau khi kiểm tra, nhận thấy băng lên sáng và không có hiện tượng bị đứt gãy. Kích thước của các vùng gen *rbcL*, *ITS* và *rpoC1* đạt lần lượt khoảng 700 bp, 550 bp và 500 pb, sản phẩm sau khi tinh sạch được phân tích trình tự bằng máy giải trình tự.



Hình 2. Kết quả sản phẩm PCR của các mẫu Bình vôi với 3 vùng gen nghiên cứu

(Ghi chú: M: DNA ladder, 1 - 5: các mẫu Bình vôi nghiên cứu)

3.3. Kết quả phân tích trình tự nucleotide các vùng gen của các mẫu Bình vôi nghiên cứu

Trình tự nucleotide của 3 vùng gen ở 5 mẫu Bình vôi nghiên cứu được phân tích và so sánh với trình tự các loài Bình vôi khác đã được công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế NCBI. Kết quả phân tích và xử lý, so sánh bằng cách sử dụng phương pháp ClustalW của phần mềm BioEdit và xây dựng cây phân loại trên NCBI.

3.3.1. Vùng gen *rbcL*

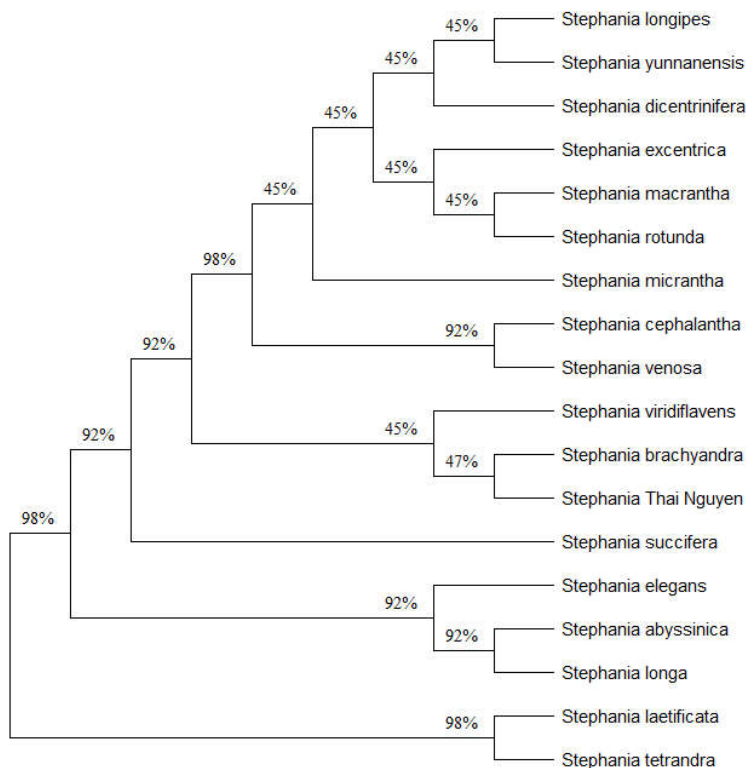
Kết quả phân tích vùng gen *rbcL* cho thấy chiều dài đạt 661 bp, các mẫu nghiên cứu đều có thành phần AT đạt 55,67% cao hơn thành phần GC (44,33%), phù hợp với đặc điểm chung của hệ gen lục lạp ở thực vật bậc cao. So sánh trình tự các mẫu Bình vôi nghiên cứu cho thấy, các mẫu này có mức độ tương đồng từ 99,99 đến 100% về trình tự vùng gen nghiên cứu, do đó, một mẫu đại diện được chọn lựa để tiến hành các phân tích tiếp theo. Trình tự vùng gen đã

được đăng ký thành công trên Ngân hàng Gen Quốc tế NCBI với mã số OR389485.

Kết quả so sánh với trình tự gen *rbcL* mẫu Bình vôi nghiên cứu với các loài Bình vôi đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI cho thấy, mẫu nghiên cứu có sự tương đồng cao với loài bình vôi *S. brachyandra* (JN051690.1) đã được công bố trên ngân hàng gen tại vùng gen *rbcL* với tỷ lệ từ 99,95 đến 100%, và đạt 99,85% đến 100% khi so sánh với loài *S. cephalantha* (JN051691.1). Cây phát sinh chủng loại được thiết lập dựa trên các trình tự *rbcL* của các mẫu Bình vôi nghiên cứu và của một số loài Bình vôi khác, trong đó bao gồm 2 trình tự của *S. brachyandra* (JN051690.1) và *S. cephalantha* (JN051691.1) (là 2 loài được xác định là có quan hệ gần gũi với Bình vôi Thái Nguyên) được thể hiện tại hình 3. Các mẫu bình vôi được nghiên cứu nằm cùng nhánh với *S. brachyandra* JN051690.1 trong khi mẫu *S. cephalantha* JN051691.1 nằm khác nhánh và riêng biệt so với các mẫu nghiên cứu. Kết quả này khẳng

định giá trị của *rbcL* như một chỉ thị mã vạch chuẩn trong việc giám định loài ở mức chi và nhóm loài gần gũi. Tuy nhiên, do tính bảo thủ cao, *rbcL* thường hạn chế khả năng phân biệt loài có quan hệ di truyền rất gần, điều đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu DNA barcoding trên họ *Menispermaceae* (Chinh *et al.*, 2020). Điều này thể hiện ở giá trị bootstrap

giữa loài Bình vôi Thái Nguyên và loài *S. brachyandra* (JN051690.1) có giá trị 47% hoặc nhóm 2 loài này so với loài *S. viridiflavens* với giá trị chỉ 45%, chứng tỏ vùng gen này chưa cung cấp đủ thông tin để phân biệt một cách rõ ràng giữa các loài gần gũi này. Do đó, vùng gen này thường được sử dụng để phân biệt các chi hơn là phân biệt loài.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *rbcL* của loài Bình vôi Thái Nguyên với các loài Bình vôi khác. Tỷ lệ % là giá trị bootstrap

2.3.2. Vùng gen ITS

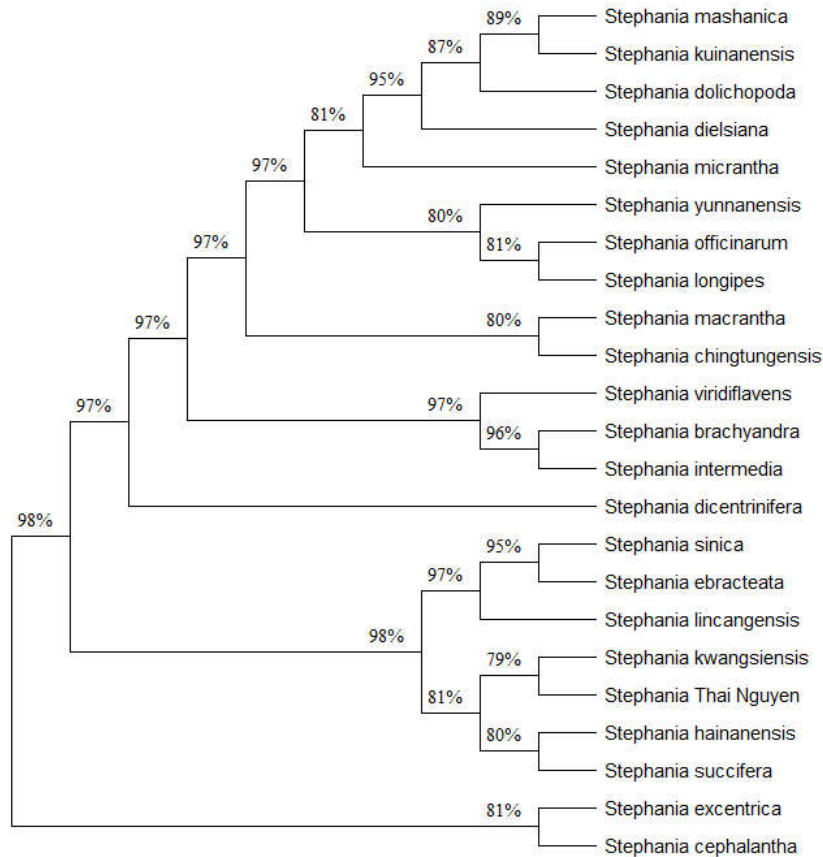
Kết quả phân tích vùng gen *ITS* cho thấy các mẫu nghiên cứu đều có thành phần % AT thấp hơn thành phần % GC. Trong đó, tỷ lệ thành phần % AT trung bình là 48,50% và tỷ lệ thành phần % GC trung bình là 51,46% với chiều dài nucleotide đạt 536 bp. So sánh các mẫu Bình vôi Thái Nguyên nghiên cứu có mức độ tương đồng từ 99,99% đến 100%. Do đó, một mẫu ngẫu nhiên được chọn để tiến hành các phân tích tiếp theo.

Trình tự vùng gen *ITS* đã được đăng ký thành công trên Ngân hàng Gen Quốc tế với mã số OR364122, và được so sánh với trình tự đã công

bố trên ngân hàng gen NCBI. Kết quả so sánh cho thấy các mẫu nghiên cứu có sự tương đồng với loài *S. brachyandra* (KJ566126.1) và *S. cephalantha* (KJ566127.1) đã công bố bởi Xie và đồng tác giả (2015). Trong đó, trình tự mẫu Bình vôi Thái Nguyên khi so sánh với *S. brachyandra* (KJ566126.1) cho hệ số tương đồng cao, nằm trong khoảng 98,47% đến 99,25%; so sánh với *S. cephalantha* (KJ566127.1) cho hệ số tương đồng thấp hơn và nằm trong khoảng 94,47% đến 95,34%. Điều này phản ánh khả năng phân biệt loài tốt hơn của *ITS* so với *rbcL*. Tiến hành xây dựng cây phát sinh dựa trên các tổ hợp trình tự *ITS* của các mẫu Bình vôi nghiên

cứu và một số loài Bình vôi khác được thể hiện như hình 4. Trong đó, mẫu Bình vôi Thái Nguyên lại có mối quan hệ di truyền gần gũi với *S. kwangsiensis* (hình 4) hơn so với *S. brachyandra* và *S. cephalantha*. Hiện tượng này cho thấy *ITS*, dù có độ phân giải cao, vẫn có thể

phản ánh lịch sử tiến hóa phức tạp hoặc sự bảo tồn trình tự giữa các loài trong cùng phân chi. Do đó, việc sử dụng đơn lẻ *ITS* có thể dẫn đến nhầm lẫn trong giám định một số loài *Stephania* có quan hệ gần, đặc biệt khi nguồn mẫu tham chiếu còn hạn chế (Nguyen *et al.*, 2014).



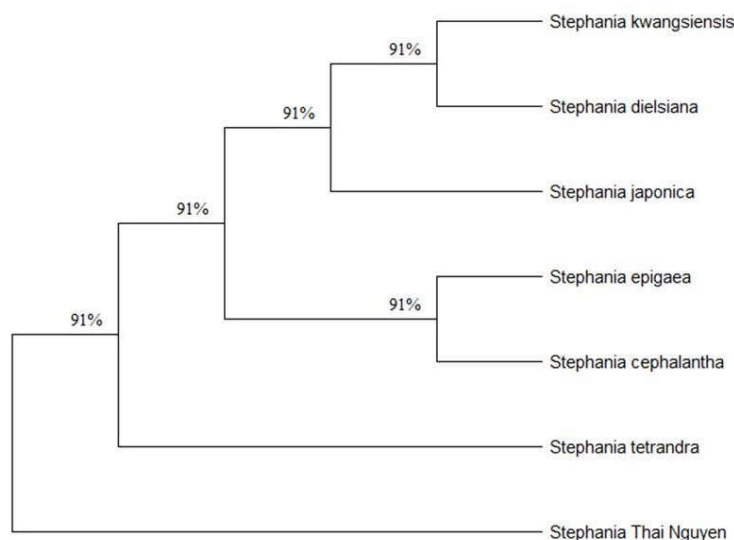
Hình 4. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *ITS* của loài Bình vôi Thái Nguyên với các loài Bình vôi khác. Tỷ lệ % là giá trị bootstrap

3.2.3. Vùng gen *rpoC1*

Kết quả phân tích vùng gen *rpoC1* cho thấy các mẫu nghiên cứu đều có thành phần % AT thấp hơn thành phần % GC. Trong đó, tỷ lệ thành phần % AT trung bình là 49,15% và tỷ lệ thành phần % GC trung bình là 50,85% với chiều dài nucleotide 465 bp. Trình tự này đã được đăng ký thành công trên Ngân hàng Gen Quốc tế với mã số OR389484, đây là trình tự đầu tiên của vùng gen được công bố này cho loài *S. brachyandra*.

Tiến hành xây dựng cây phát sinh dựa trên các tổ hợp trình tự *rpoC1* của mẫu Bình vôi nghiên cứu với các trình tự gen của một số

loài Bình vôi trên NCBI cho thấy, mẫu Bình vôi Thái Nguyên được phân tách ở một nhánh riêng biệt, do đó, có thể phân biệt một cách rõ ràng với một số loài Bình vôi gần gũi khác, ví dụ *S. kwangsiensis* hay *S. cephalantha* (hình 5). Việc bổ sung *rpoC1* vào bộ mã vạch ADN cho chi *Stephania* có ý nghĩa quan trọng trong bối cảnh giám định dược liệu, đặc biệt khi mẫu vật bị chế biến hoặc mất đặc điểm hình thái. Trong thực tiễn quản lý dược liệu, sự kết hợp giữa *rbcL* (xác định chi, nhóm loài), *ITS* (phân biệt loài) và *rpoC1* (chi thị hỗ trợ) giúp nâng cao độ chính xác và độ tin cậy của kết quả giám định loài.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại vùng gen *rpoC1* của loài Bình vôi Thái Nguyên với các loài Bình vôi khác. Tỷ lệ % là giá trị bootstrap

Các nghiên cứu DNA barcoding trên chi *Stephania* và họ *Menispermaceae* tại Trung Quốc và Đông Nam Á cho thấy *rbcL* và *ITS* là hai vùng gen được sử dụng phổ biến nhất. Xie và đồng tác giả (2015) khi nghiên cứu một số loài *Stephania* ở Trung Quốc đã ghi nhận *ITS* có khả năng phân biệt loài tốt hơn *rbcL*, song vẫn tồn tại sự chồng lấn trình tự giữa các loài có quan hệ gần. Tương tự, các nghiên cứu tại Việt Nam cũng cho thấy việc kết hợp nhiều vùng gen là cần thiết để nâng cao độ chính xác trong giám định.

So với các nghiên cứu trước, điểm mới của nghiên cứu này là việc bổ sung dữ liệu *rpoC1* cho *S. brachyandra*. Trong khi *rpoC1* ít được sử dụng đơn lẻ, các kết quả thu được cho thấy vùng gen này có tiềm năng trở thành chỉ thị hỗ trợ hữu hiệu, đặc biệt trong các trường hợp *ITS* cho kết quả chưa đủ rõ ràng. Điều này phù hợp với xu hướng hiện nay trong DNA barcoding thực vật, khi các bộ mã vạch đa locus ngày càng được ưu tiên nhằm phục vụ giám định loài và kiểm soát chất lượng dược liệu.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy việc kết hợp phân tích đa vùng gen, đặc biệt là các vùng có tốc độ tiến hóa khác nhau, là một chiến lược hiệu quả nhằm nâng cao độ chính xác trong giám định loài và nghiên cứu quan hệ phát sinh loài. Theo đó, nghiên cứu không chỉ cung cấp hệ thống chỉ thị phân tử tin cậy phục vụ nhận

dạng loài Bình vôi nhị ngắn quý hiếm, mà còn tạo dựng cơ sở khoa học vững chắc, góp phần quan trọng vào việc xây dựng và triển khai các chiến lược bảo tồn và quản lý bền vững nguồn gen của loài cây đặc hữu này.

Việc xác định chính xác *Stephania brachyandra* bằng chỉ thị phân tử có ý nghĩa trực tiếp đối với công tác bảo tồn loài nguy cấp và quản lý bền vững nguồn gen. Trong bối cảnh khai thác và buôn bán dược liệu còn nhiều bất cập, DNA barcoding cung cấp công cụ khách quan để nhận diện loài, hạn chế tình trạng nhầm lẫn hoặc thay thế dược liệu. Đồng thời, dữ liệu trình tự được công bố góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu phân tử cho các loài Bình vôi ở Việt Nam, tạo nền tảng cho các nghiên cứu sâu hơn về đa dạng di truyền, chọn giống và bảo tồn *in situ* cũng như *ex situ*.

IV. KẾT LUẬN

- Đã nhân bản và xác định được trình tự 3 vùng gen nghiên cứu là *rbcL*, *ITS* và *rpoC1* cho các mẫu Bình vôi Thái Nguyên và đăng ký thành công các trình tự gen này trên Ngân hàng Gen Quốc tế.

- Đã xác định mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Bình vôi được nghiên cứu với loài *S. brachyandra* đã được công bố trên ngân hàng gen với vùng *ITS* (KJ566126.1) và *rbcL*

(JN051690.1) với tỷ lệ tương đồng đạt tương ứng 99,25% và 100%.

- Lần đầu tiên xác định được trình tự vùng gen *rpoC1* với chiều dài 465 bp và đăng ký thành

công trên Ngân hàng Gen Quốc tế với mã số (OR389484), trình tự vùng gen này có thể được sử dụng để phân biệt rõ ràng Bình vôi Thái Nguyên với các loài Bình vôi gần gũi khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chính phủ, 2019. Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22 tháng 01 năm 2019 Về quản lý thực vật rừng, động vật rừng quý hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.
2. Chinh, V. T., Lieu, T. T., Tang, D. V., 2020. Using the chloroplast *rbcL* gene to clarify the relationship between species of the genus *Stephania* (Menispermaceae) from Vietnam. *Academia Journal of Biology*, 42(2). DOI: 10.15625/2615-9023/v42n2.15006
3. Doyle JJ, Dickson, 1987. Preservation of Plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon.*; 36(4): 715 - 22.
4. Hall TA., 1999 BioEdit: A User - friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 - 98.
5. Hebert, P. D, Cywinska A, Ball S. L, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270,:313 - 321.
6. Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 14812-14817. DOI: 10.1073/pnas.0406166101
7. Hoàng Văn Thủy, 2020. Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học hai loài *Stephania* Lour. Luận án Tiến sỹ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
8. Mahima, K., Kumar, S. K. N., Rakesh, K.V., Rajeswaran, P.S., Sharma, A., Sathishkumar, R., 2022. Advancements and future prospective of DNA barcodes in the herbal drug industry. *Front Pharmacol.* 21;13:947512. DOI: 10.3389/fphar.2022.947512..
9. Mildenhall, D.C., 2006. *Hypericum* pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: An example of forensic palynology. *Forensic Science International* 163: 231 - 235. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.11.028
10. Nguyen Thu Hang, Nguyen Quoc Huy, Pham Ha Thanh Tung, Hoang Van Thuy, 2014. Taxonomy of some species in the genus *Stephania* Lour. in Vietnam using rADN-ITS sequences. *Journal of Pharmacy*, 54(9): 55 - 59
11. Valentini, A., Miquel, C., Nawaz Ali, M., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E., Taberlet, P., 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources* 9: 51 - 60. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02352.x
12. Viện Dược liệu, 1993. Tài nguyên cây thuốc Việt Nam, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
13. Võ Văn Chi, 1997. Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, Hà Nội.
14. Xie D. A., He J. A., Huang J. A., Xie H. A., Wang Y. A., Kang Y. A. C., Jabbour F. B., Guo J. A., 2015. Molecular phylogeny of Chinese *Stephania* (Menispermaceae) and reassessment of the subgeneric and sectional classifications. *Australian Systematic Botany*, 28: 246 - 255.
15. Wang X, Xue J, Zhang Y, Xie H, Wang Y, Weng W, Kang Y, Huang J., 2020. DNA barcodes for the identification of *Stephania* (Menispermaceae) species. *Mol Biol Rep. Mar*; 47(3):2197 - 2203. DOI: 10.1007/s11033-020-05325-6. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32078092.

Email tác giả liên hệ: leson@vafs.gov.vn

Ngày nhận bài: 18/01/2026

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 03/02/2026; 04/02/2026

Ngày duyệt đăng: 24/03/2026