



## ĐỊNH DANH HAI LOÀI BÌNH VÔI AN GIANG BẰNG HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ GEN VÙNG ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER)

Nguyễn Thị Mỹ Duyên<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Mộng Kha<sup>2</sup>, Nguyễn Minh Trang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học An Giang, ĐHQG-HCM

<sup>2</sup>Sở Khoa học và Công nghệ An Giang

<sup>3</sup>Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn An Giang

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 26/09/2020

Ngày nhận kết quả bình duyệt:

19/10/2021

Ngày chấp nhận đăng:

12/2023

### Title:

Identification two stephania in an giang by sequencing of its (internal transcribed spacer) region gene

### Keywords:

Stephania, medicinal plant, identification, Polymerase Chain Reaction, ITS (Internal Transcribed Spacer)

### Từ khóa:

Bình vôi, cây thuốc, định danh, kỹ thuật PCR, trình tự ITS (Internal Transcribed Spacer)

### ABSTRACT

The tuber of *Stephania* sp. (*Menispermaceae*) contains many alkaloids rotundine that have used very common to the treatment of sedative drugs. Some species of *Stephania* in Vietnam contain many medicinal components that treat diseases that were scarce and included in the Red Book. However, studies on the morphological characters of species of the *Stephania* were not completely accurate. Therefore, identification species of stephania based on morphology and genotype combinations would determine the exact species. Based on the method of morphological evaluation and separation DNA of the two species *Stephania* and PCR results, then the specific human genome area of ITS peculiarities. The results have determined two species of the genus *Stephania* in An Giang were *Stephania kwangsiensis* và *Stephania cephalantha*.

### TÓM TẮT

Củ Bình vôi (thuộc họ Tiết dê) được sử dụng trong điều trị bệnh và có chứa nhiều alkaloid rotundine được sử dụng rất phổ biến để điều chế các loại thuốc an thần. Một số loài Bình vôi ở Việt Nam có chứa nhiều thành phần được tính điều trị bệnh đã khan hiếm và được đưa vào sách đỏ. Tuy nhiên, dựa vào các tài liệu hiện nay phân loại các loài Bình vôi dựa trên hình thái chưa rõ. Vì vậy, việc định danh loài dựa vào hình thái kết hợp với trình tự gen được quan tâm hơn để xác định đúng loài. Dựa trên đánh giá hình thái và ly trích DNA lá của hai loài Bình vôi và kết quả PCR, sau đó giải trình tự gen vùng ITS đặc thù của loài. Kết quả đã xác định được 2 loài Bình vôi tại vùng núi An Giang là *Stephania kwangsiensis* và *Stephania cephalantha*.

## 1. GIỚI THIỆU

An Giang là tỉnh được thiên nhiên ưu đãi, nơi có nhiều loài cây dược liệu quý dùng làm thuốc trị bệnh. Trong đó, cây Bình vôi (còn gọi ngải tọng) là cây dược liệu có nhiều lợi ích cho sức khỏe con người. Thành phần chính trong củ Bình vôi là chất rotundin, một hoạt chất rất cần trong y học.

Rotundin nguồn gốc tự nhiên có những ưu điểm nổi bật như độc tính thấp, sự dung nạp thuốc tốt, mang lại giấc ngủ sinh lý (Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 2014). Năm 1991, Võ Văn Chi đã tiến hành điều tra và ghi nhận tại An Giang có 2 loài Bình vôi là *Stephania rotunda* Lour. và *Stephania pierei* Diels. Tuy nhiên, đến nay việc du nhập mới

từ các rừng núi kế cận là Lào và Campuchia, cùng với sự thay đổi theo thời gian dẫn đến các loài Bình vôi tại An Giang đã khác, người dân chỉ biết gọi là Bình vôi đỏ và Bình vôi trắng (dựa vào màu sắc củ). Trong khi đó, Nguyễn Chiêu và Ngô Văn Trại báo cáo ở Việt Nam có 11 loài Bình vôi là *S. cambodica* Gagnep, *S. pierrei* Diels, *S. brachyandra* Diels, *S. cephalantha* Hay., *S. excentrica* H.S.Lo, *S. hainanensis* H.S.Lo, *S. dielsiana* Y.C (Củ dôm), *S. kwangsiensis* H.S.Lo, *S. longa* Lour. và *S. hernandiifolia* Willd (Nguyễn Tiến Vững, 2000). Theo Nguyễn Quốc Huy và đồng tác giả (2009) cho biết Nguyễn Thị Tâm đã nghiên cứu loài *S. pierrei* Diels mọc ở Nghĩa Bình, Nguyễn Tiến Vững đã nghiên cứu loài *S. glabra* (Roxb.) Miers mọc ở Ninh Bình và loài *S. kuinanensis* H.S.Lo et M.Yang mọc ở Lạng Sơn. Đồng thời, tác giả cũng báo cáo đã phân loại dựa trên đặc điểm thực vật học của hai loài Bình vôi là *S. dielsiana* Y.C.Wu thu hái ở Hà Nội và loài *S. brachyandra* Diels thu hái ở Sapa (Lào Cai) (Nguyễn Quốc Huy cs., 2009). Tính đến nay, việc gọi tên loài Bình vôi xuất hiện ở Việt Nam đa số chỉ dựa trên phân tích hình thái. Việc xác định trên hình thái đôi khi còn khó phân biệt. Hiện tại Bình vôi tại An Giang có đúng tên như Võ Văn Chi đã điều tra năm 1991 hay không. Do đó, rất cần phải xác định chính xác vì mỗi loài Bình vôi sẽ có giá trị riêng, nên đòi hỏi cần phải xác định đúng loài.

Bằng kỹ thuật sinh học phân tử người ta đã ứng dụng trong đánh giá kiểu gen để định danh loài. Phương pháp này kết hợp với hình thái học sẽ giúp xác định chính xác các loài thực vật. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện như Bùi Văn Thắng và ctv. (2017) giám định một số loài nưa tại Thanh Hóa bằng các dẫn liệu hình thái và phân tử bằng cách phân tích trình tự vùng gen. Nguyễn Thị Thu Nga và Sỹ Danh Thường (2020) định danh loài Cáp gai nhỏ *Capparis* sp. Bằng mã vạch DNA,... Trong các phương pháp sinh học phân tử dùng cho việc định danh, dấu ITS (Internal Transcribed Spacer) được ứng dụng nghiên cứu nhiều trong phân tích các mối quan hệ di truyền,

phát sinh loài trên thực vật, kỹ thuật đánh giá tính đa dạng di truyền của sinh vật học thì ITS là một công cụ hữu ích cho việc nghiên cứu phá hệ ở thực vật hạt kín. Kỹ thuật này dựa vào phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) khuếch đại các đoạn gen đặc trưng cho từng loài để phân tích sự phát sinh loài, mối quan hệ giữa các loài (Baldwin cs., 1992; Baldwin cs., 1995). Như nghiên cứu sự phát sinh loài của 12 loài của giống *Dendrobium* từ Đài Loan (Tsai cs., 2004) hay nghiên cứu định danh và đánh giá mối quan hệ của 25 loài hoa lan của Nguyễn Thị Mỹ Duyên và đồng tác giả (2010) được thực hiện dựa trên kỹ thuật ITS.

Để tìm hiểu và xác định chính xác hai loài Bình vôi đang hiện hữu ở An Giang, nghiên cứu được thực hiện dựa trên đánh giá hình thái và trình tự đoạn gen vùng ITS của hai loài Bình vôi đặc thù của An Giang.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Hai loài Bình vôi 1 và 2 là *Stephania kwangsiensis* và *Stephania cephalantha* được thu thập tại vùng Bảy Núi An Giang.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Định danh loài dựa trên hình thái

Thu thập và phân tích các chi tiêu dựa trên hình thái, màu sắc lá, thân, hoa và củ của 2 loài Bình vôi. Sau đó, so sánh và đánh giá theo các mô tả phân loại của Võ Văn Chi (2012), Đỗ Tất Lợi (2009), Trần Hùng (1989), Nguyễn Quốc Huy và ctv. (2009).

#### 2.2.2 Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử - kỹ thuật ITS

##### Tách chiết DNA

Tách chiết DNA từ các mẫu lá Bình vôi non theo phương pháp CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) được mô tả bởi Rogers và Bendich (1988). Sau khi tách chiết DNA, tiến hành đo quang phổ xác định nồng độ DNA ở bước sóng 260 nm và 280 nm và điện di trên gel agarose

0,8% với sự hiện diện của Ethidium Bromide (EtBr) để kiểm tra chất lượng DNA.

*Thực hiện phản ứng PCR*

Vùng ITS bao gồm ITS1, 5,8S rDNA và ITS2 được khuếch đại bằng PCR thực hiện trên máy

PCR Perkin Elmer 9700, thành phần bao gồm: H<sub>2</sub>O, PCR buffer, dNTPs 200 μM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, primer (ITS1 và ITS4) 100 pmol/μL, Taq polymerase 0,5 U/μL, DNA 50 ng/μL.

**Bảng 1. Trình tự cặp mồi (primer) ITS**

Stt	Mồi	Trình tự	Nhiệt độ
1	ITS1	5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3'	T <sub>m</sub> = 59,5° C
2	ITS4	5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'	T <sub>m</sub> = 46° C

(White *cs.*, 1995)

Các chu kỳ nhiệt 30 chu kỳ: 95° C: 50 giây, 58° C: 70 giây, 72° C: 90 giây. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 2%, nhuộm ethidium bromide 1x trong 30 phút và quan sát dưới đèn UV.

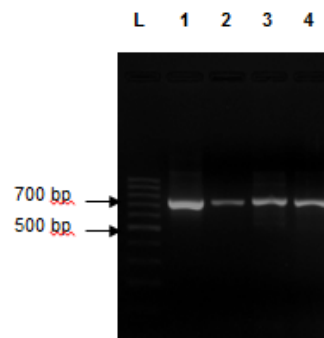
Những mẫu DNA có độ tinh sạch đạt sẽ được thực hiện phản ứng PCR với 2 mồi ITS1 và ITS4. Kiểm tra trên gel agarose 2%, chụp hình gel ta thấy hiện các băng với kích thước gần khoảng 700 bp (Hình 3).

Các mẫu PCR sau đó sẽ được tinh sạch và đưa vào máy giải trình tự ABI 3130, thu được các

trình tự nucleotide của 2 loài Bình vôi 1 và 2. Các chuỗi trình tự này được phân tích bằng phần mềm Bio Edit Version 7.0.

Sau khi thu được trình tự đoạn gen vùng ITS của 2 loài Bình vôi phân tích. Kết quả được tra cứu trong Ngân hàng trình tự gen

quốc tế để tìm độ tương đồng trình tự gen của 2 loài Bình vôi 1 và Bình vôi 2 nhằm định danh loài.



**Hình 3. Các băng đoạn ITS trên gel agarose của 2 loài Bình vôi**

*Ghi chú:* L: Ladder (thang chuẩn 1 kp); 1. Mẫu Bình vôi 1a;

2. Mẫu Bình vôi 1b; 3. Mẫu Bình vôi 2a; 4. Mẫu Bình vôi 2b.

*Giải trình tự (sequencing)*

Sau phản ứng PCR, tiến hành tinh sạch sản phẩm Cycle Sequencing, biến tính và giải trình tự trên máy giải trình tự ABI 3130. Sau đó, định danh hai

loài Bình vôi dựa trên chuỗi trình tự gen với cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen của NCBI.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

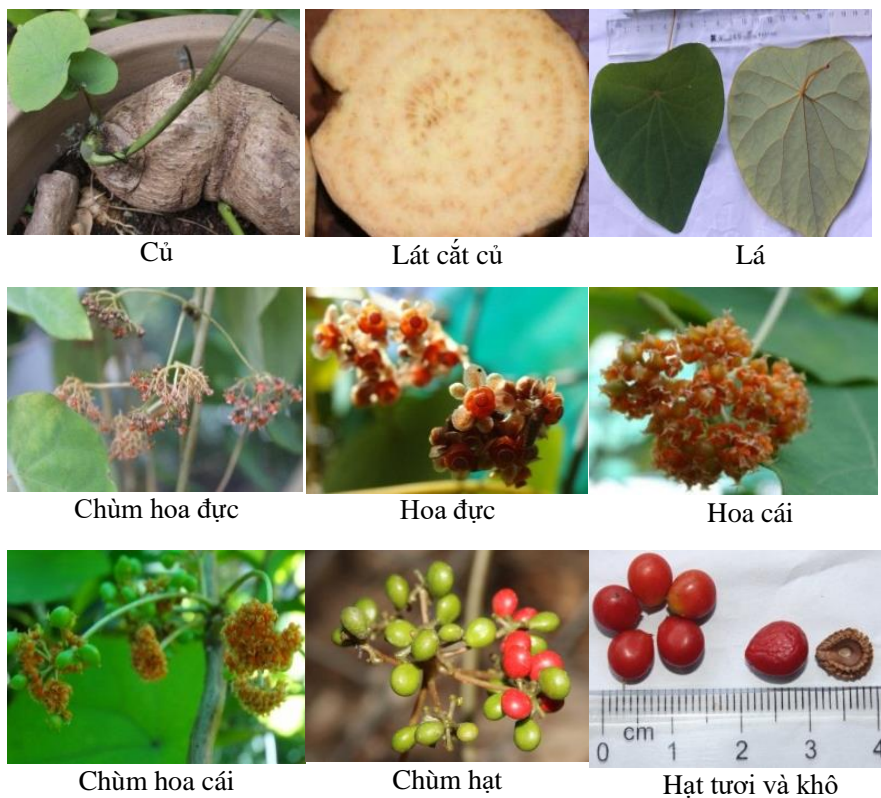
**3.1 Định danh loài dựa trên hình thái**

3.1.1 Đặc điểm hình thái và xác định loài Bình vôi 1

Thân leo, nhỏ, yếu. Cành non màu xanh nâu, khi già chuyển màu nâu xám. Toàn cây không lông, có nhựa màu đỏ. Lá đơn màu xanh, mép nguyên, mọc so le. Cuống lá dài 3 - 9 cm. Phiến lá tròn dạng tam giác đến gần tròn hoặc hình tim, dài và rộng đều 5 - 12 cm. Chóp lá nhọn, gốc lá hơi lõm. Gân 9 - 12 chiếc, tỏa tròn xuất phát từ đỉnh của cuống lá. Gân lá màu nâu đỏ. Cuống lá dính vào 1/5 đến 1/3 phiến lá tính từ gốc. Cù dạng thay đổi, vỏ xù xì, màu nâu xám, nâu nhạt hay màu đất, **ruột củ màu vàng**, lát cắt có nhiều xơ.

Hoa đơn tính khác gốc. Cụm hoa mọc ở nách lá hoặc ở kẽ những cành ngắn, có khi mọc từ gốc thân gần củ (đối với hoa đực).

- Cụm hoa đực tán kép, cuống cụm hoa dài 5 - 8 cm, gồm nhiều tán kép, mỗi tán gồm 7 - 11 tán nhỏ, cuống tán rất ngắn. Hoa đực nhỏ, lá đài 6, rời, xếp thành 2 vòng 3 (3 cánh ngoài nhỏ, 3 cánh trong lớn hơn, đều nhau), màu hồng cam nhạt. Cánh hoa 3, rời, đều nhau, mép cuộn vào bên trong, màu hồng cam. Chỉ nhị dính liền nhau, xếp thành vòng tròn trên 1 mặt phẳng.
- Cụm hoa cái có cuống dài như hoa đực nhưng không có tán kép, mỗi tán hoa cũng gồm nhiều tán nhỏ, cuống tán rất ngắn. Hoa cái nhỏ hơn hoa đực, nhưng cánh hoa màu vàng cam rất đẹp, mép dưới cuộn vào trong; cánh hoa 2, rời, dày.



Hình 1. Đặc điểm hình thái loài Bình vôi 1

Quả hình trứng ngược, dài 0,8 - 1,2 cm, khi chín có màu đỏ tươi. Hạt hình móng ngựa (kích thước 6 - 8 mm, 3 - 5 mm) có lỗ nhỏ ở giữa hình trái

xoan, trên lưng có 4 hàng gai, mỗi hàng có 13 - 17 gai. Ra hoa vào tháng 3, có quả vào tháng 5.

Qua các đặc điểm của loài nghiên cứu và tham khảo mô tả loài Bình vôi *Stephania dielsiana*

Y.C.Wu. trong nghiên cứu Nguyễn Quốc Huy và đồng tác giả (2009) thu thập tại Ba Vì thì loài Bình vôi 1 thu thập tại An Giang giống loài trên ở phần thân cây có nhựa màu đỏ nhưng khác ruột củ màu vàng chứ không phải màu hồng. Tương tự, cũng không giống loài *Stephania brachyandra* Diels của ông thu thập ở Sapa là nhựa cây trong suốt không màu, nhưng loài Bình vôi 1 An Giang nhựa cây có màu đỏ. Theo Võ Văn Chi thì loài này được ông mô tả có tên là *Stephania rotunda* Lour, họ Tiết Dê (Menispermaceae), còn được gọi là Ngải Tượng. Đồng thời, hình thái Bình vôi 1 cũng rất giống loài *Stephania kwangsiensis* H. S. Lo được mô tả trong Từ điển Cây Thuốc Việt Nam - Tập 1 của Võ Văn Chi (2012).

### 3.1.2 Đặc điểm hình thái và xác định loài Bình vôi 2

Thân leo, nhỏ, yếu. Cành non màu xanh, khi già chuyển màu xanh xám. Toàn cây không lông, có nhựa trong suốt không màu. Lá đơn màu xanh, mép nguyên, mọc so le. Cuống lá dài 3 - 9 cm. Phiến lá tròn dạng tam giác đến gần tròn, dài và rộng đều 5 - 12 cm. Chóp lá nhọn, gốc lá hơi lõm. Phiến lá Bình vôi 2 hơi dày hơn so với Bình vôi 1. Gân lá và phiến lá đều màu xanh. Gân 9 - 12 chiếc, tỏa tròn xuất phát từ đỉnh của cuống lá. Cuống lá dính vào 1/5 đến 1/3 phiến lá tính từ gốc. Củ dạng thay đổi, vỏ xù xì, màu nâu xám, nâu nhạt hay màu đất, ruột củ màu vàng, lát cắt có nhiều xơ. Hoa đơn tính khác gốc. Tuy nhiên, chưa quan sát được hoa và trái của loài này.



Hình 2. Đặc điểm hình thái loài Bình vôi 2

Qua các đặc điểm hình thái của loài nghiên cứu và tham khảo mô tả loài Bình vôi *Stephania brachyandra* Diels trong nghiên cứu Nguyễn Quốc Huy và đồng tác giả (2009) thu thập tại Sapa thì loài Bình vôi 2 thu thập tại An Giang giống loài trên. Tuy nhiên, vì chưa quan sát được hoa của loài này nên chỉ dựa vào hình thái lá và củ nên chưa chắc chắn. Theo Võ Văn Chi khi ông điều tra cây thuốc tại An Giang năm 1991, loài Bình vôi thứ 2 có tên là *Stephania pieriei* Diels, họ Tiết Dê (Menispermaceae), còn được gọi là Ngải Tượng trắng. Trong mô tả của Võ Văn Chi trong Từ điển Cây Thuốc Việt Nam - Tập 1 (2012) thì Ngải Tượng Trắng có hình thái không hề giống hình thái của Bình vôi 2, như ngọn non có nhiều chấm màu tím hồng, trong khi Bình vôi 2 toàn thân màu xanh.

### 3.2 Định danh loài bằng phương pháp sinh học phân tử - Kỹ thuật ITS

#### 3.2.1 Bình vôi 1

Kết quả phân tích được trình tự đoạn gen vùng ITS của loài Bình vôi 1 có kích thước khoảng 592 bp. Khi trình tự đoạn gen này được tra cứu trong Ngân hàng gen quốc tế (NCBI) thì ta thấy không có tên *Stephania rotunda* Lour như Võ Văn Chi đã mô tả khi điều tra ở An Giang vào năm 1991, chỉ có loài *Stephania kwangsiensis* có độ tương đồng ở mức 98% (Hình 4); tương ứng có sự sai khác 8 vị trí nucleotide là 23, 29, 439, 543, 548, 555, 563, 587 (Hình 5). Trong khi đó, theo mô tả hình thái loài Bình vôi *Stephania kwangsiensis* trong nghiên cứu của Lê Đình Mễ và đồng tác giả (2003) hoàn toàn phù hợp với hình thái loài

Bình vôi 1. Đây là 1 trong 5 loài Bình vôi được đưa vào danh lục sách đỏ Việt Nam. Bên cạnh đó, trong Ngân hàng gen có sự hiện diện của loài *S. viridiflavens*, tuy nhiên loài này chưa tài liệu nào được mô tả có ở Việt Nam.

Select: All None Selected:1

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania viridiflavens voucher Xie.D. 2012016 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	989	989	96%	0.0	98%	<a href="#">KJ566153.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephania kwangsiensis voucher Xie.D. 2012020 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	989	989	96%	0.0	98%	<a href="#">KJ566143.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania sinica voucher Xie.D. 2013012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	983	983	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ566150.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania intermedia voucher Xie.D. 2012028 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	983	983	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ566141.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania officinarum voucher Xie.D. 2013004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	979	979	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ566149.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania dicentrinifera voucher Xie.D. 2012034 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	977	977	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ566130.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania ebracteata voucher Xie.D. 2013011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	976	976	95%	0.0	98%	<a href="#">KJ566133.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania brachyandra voucher Xie.D. 2012029 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rRNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, full length sequence; complete rDNA set</a>	974	974	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ566126.1</a>

**Hình 4. Độ tương đồng của trình tự gen đoạn ITS của Bình vôi 1**

Range 1: 53 to 632 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
989 bits(535)	0.0	567/581(98%)	8/581(1%)	Plus/Plus
Query 19	ACGA-CCGTG-ACCATTGACACCGTAACATTTGCTACGCAGGCGGCCCATTTGGTCCCTTG			76
Sbjct 53	ACGACCCGTGAACCATTTGACACCGTAACATTTGCGACGCAGGCGGCCCATTTGGTCCCTTG			112
Query 77	TTGTTTCAGCAACAAAATCCGGCGCGACACGCGCCAAAGGAATCTAAATTAGAATAGAAATG			136
Sbjct 113	TTGTTTCAGCAACAAAATCCGGCGCGACATGCGCCAAGGAATCTAAATTAGAATAGAAATG			172
Query 137	ACACGTTGAAGTGGTTCGTCCTCATTGTTGCGTTTCTTAATACTTGAACGACTCT			196
Sbjct 173	ACACGTTGAAGTGGTTCGTCCTCATTGTTGCGTTTCTTAATACTTGAACGACTCT			232
Query 197	CGACAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT			256
Sbjct 233	CGACAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGT			292
Query 257	GTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGACTTC			316
Sbjct 293	GTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGACTTC			352
Query 317	GGTTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACATGATGCACCGCAATCCATTTTTTGCATGTG			376
Sbjct 353	GGTTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACATGATGCACCGCAATCCATTTTTTGCATGTG			412
Query 377	GTAATGGAGATTGGCCTCCCGCGACGAGTGCACGGTTGGCTAAAATAGCAGCCTCGATGC			436
Sbjct 413	GTAATGGAGATTGGCCTCCCGCGACGAGTGCACGGTTGGCTAAAATAGCAGCCTCGATGC			472
Query 437	TC-GAAGACGCGATCAGTGGTGGTTGATGAGAACCTTTGTCAAACGAGTACGCGGTTCCGG			495
Sbjct 473	TTGGAAGACGCGATCAGTGGTGGTTGATGAGAACCTTTGTCAAACGAGTACGCGGTTCCGG			532
Query 496	ATCGGCACGAATCGAGTGGAGCACCCCTTTTCATATACTTTGCGACCCC-GGTC-GGCGG			553
Sbjct 533	ATCGGCACGAATCGAGTGGAGCACCCCTTTTCATATACTTTGCGACCCCAGGTCAGGCGG			592
Query 554	G-TCACCGG-TGAGTTTAAGCATATCAATAAGGCGAAGGAA			592
Sbjct 593	GGTCACCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAG-CGGAGGAA			632

**Hình 5. So sánh trình tự nucleotide của trình tự gen đoạn ITS của Bình vôi 1**

3.2.2 Bình vôi 2

Kết quả phân tích được trình tự đoạn gen vùng ITS của loài Bình vôi 2 có kích thước khoảng 576 bp. Khi trình tự đoạn gen này được tra cứu trong Ngân hàng gen quốc tế (NCBI) độ tương đồng ở mức 94% với loài *Stephania epigaea*, hay chiếm 93% với loài *Stephania cephalantha* và *Stephania excentrica* (Hình 6); Mặt khác, chúng có sự sai khác đến 16 vị trí nucleotide là 31, 264, 274, 390, 391, 417, 437, 490, 505, 511, 527, 538, 549, 557, 564, 571 (Hình 7).

Trong Ngân hàng gen có sự hiện diện của loài *Stephania epigaea*, tuy nhiên loài này chưa tài liệu nào được mô tả có phân bố ở Việt Nam. Trong khi loài *Stephania cephalantha* được nhiều tài liệu công bố có phân bố ở Việt Nam (Nguyễn Tiến Dũng, 2000; Viện dược liệu 2004; Võ Văn Chi, 2012). Đây là 1 trong 5 loài Bình vôi được đưa vào danh lục sách đỏ Việt Nam.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 4

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania epigaea voucher Xie.D. 2012023 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S</a>	856	856	95%	0.0	94%	<a href="#">KJ566135.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephania excentrica voucher Xie.D. 2013015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.</a>	832	832	95%	0.0	93%	<a href="#">KJ566136.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephania cephalantha voucher Xie.D. 2012001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,</a>	826	826	95%	0.0	93%	<a href="#">KJ566127.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Stephania sinica voucher Xie.D. 2013012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r</a>	804	804	95%	0.0	92%	<a href="#">KJ566150.1</a>

Hình 6. Độ tương đồng của trình tự gen đoạn ITS của Bình vôi 2

Range 1: 69 to 640 GenBank Graphics		Next Match Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps
826 bits(447)	0.0	533/572(93%)	16/572(2%)
Strand	Plus/Plus		
Query 21	ACGACCCGCG-ACCATTGACATCGTAACATGAGCGACGCGAGGCGGCCCATTTGGGTCCTTG	79	
Sbjct 69	ACGACCCGCGAACCCATTGACACCCGTAACATGAGCGACGCGAGGCGGCCCATTTGGGTCCTTG	128	
Query 80	TCGTTGAGCAACAAAATCCGGCGGACATGCGCCAAAGGAATGTAATAGAAATAGAAATG	139	
Sbjct 129	CTGTGCGAGCAACAAAATCCGGCGGCGCATGCGCTCAAGGAATCTAAATAGAAATAGAAATG	188	
Query 140	ACACGTTGAAGTGGCTGGTCACTTCACCTGCTGTTGCATTTCTGAATACTTGAACGACTCT	199	
Sbjct 189	ACAAGATGAAGTGGCTGGTCCACTTCACCTGCTGTTGCATTTCTGAATACTTGAACGACTCT	248	
Query 200	CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTTAGCGAAATGCGATACTTGGT	259	
Sbjct 249	CGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTTAGCGAAATGCGATACTTGGT	308	
Query 260	GTGA-TTGACGAAT-CCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGACTTC	317	
Sbjct 309	GTGAATTGACGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGACTTC	368	
Query 318	GGTCGAGGGCAGCTCTGCTGGGCGTCACATGATGCACCGCAACCCATTTTTCGATGTG	377	
Sbjct 369	GGTTGAGGGCACGCTCTGCTGGGCGTCACATGATGCACCGCAACCCATTTTTCGATGTG	428	
Query 378	GGAATGGAGAT--GCCTCCCGTGACGAGTGCAGCGGTTGGCTT-AATAGCAGCCTCGATGC	434	
Sbjct 429	GGAATGGAGATGGCTCCCGTGACAGTGCACGSGTTGGCTAAAAATAGCAGCCTCGATGC	488	
Query 435	TT-GAAGACGCGATCAGTGGTGGTTGATGAGAACCTTTGCAAAACAAGTGTGCGTTC-GA	492	
Sbjct 489	TTGGAAGACGCGATCAGTGGTGGTTGATGAGAACCTTTGCAAAACAAGTGTGCGGTTTGG	548	
Query 493	TCGGCACGAAAT-GAAGT-GAGCACCCCTTTTCATATACTT-GCGACCCAG-TCAGGCGGG	548	
Sbjct 549	TGGGCACGAAATCGAGGTGAGCACCCCTTTTCATATACTTTCGACCCAGGTCAGGCGGG	608	
Query 549	--CCACCGG-TGAGTT-AAGCATATCA-TRAGC	576	
Sbjct 609	GCCACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATRAGC	640	

Hình 7. So sánh trình tự nucleotide của trình tự gen đoạn ITS của Bình vôi 2

Kết quả phân tích này không cùng tên với loài Bình vôi *Stephania brachyandra* Diels trong nghiên cứu Nguyễn Quốc Huy và đồng tác giả (2009) thu thập tại Sapa. Điều này có thể do loài Bình vôi 2 này chưa được cập nhật trình tự đoạn gen vào ngân hàng gen thế giới. Như vậy nghiên cứu này sẽ là nguồn dữ liệu hữu ích cho thế giới. Trường hợp thứ hai, có thể Bình vôi *Stephania brachyandra* Diels (Nguyễn Quốc Huy cs., 2009) cùng đồng danh với loài *Stephania cephalantha*, *Stephania epigaea*, hoặc *Stephania excentrica*. Điều này cần phải được nghiên cứu sâu hơn.

Như vậy, dựa vào hình thái kết hợp với trình tự đoạn gen vùng ITS có thể xác định được hai loài Bình vôi của An Giang là Bình vôi 1 là *Stephania kwangsiensis* (hoặc *Stephania rotunda*) và Bình vôi 2 có thể là *Stephania cephalantha*.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

Với phương pháp đánh giá kết hợp giữa hình thái và kiểu gen (dựa trên trình tự đoạn gen vùng ITS) đã xác định được 2 loài Bình vôi hiện diện ở An Giang là *Stephania kwangsiensis* (hoặc *Stephania rotunda*) và Bình vôi 2 là *Stephania cephalantha* đều thuộc họ Tiết Dê (Menispermaceae). Hai loài này rất có giá trị và hiện nay được xem là quý hiếm ở Việt Nam.

Sử dụng kỹ thuật ITS hỗ trợ rất hữu ích cho việc tìm và xác định loài cũng như mối quan hệ gần giữa các loài nghiên cứu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Baldwin BG. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.

Baldwin BG, Michael JS, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995). The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82(2): 247-277.

Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Hải Hà, Vũ Quang Nam, Nguyễn Thế Đại, Phan Văn Quỳnh, Nguyễn Ngọc Ánh. (2017). Giám định một số loài Nưa tại Thanh Hóa bằng dữ liệu hình thái và phân tử. *Tạp chí KH&CN Lâm Nghiệp*, số 3-2017.

Đỗ Tất Lợi. (2009). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Lã Đình Mối, Ninh Khắc Bản, Đặng Thị An, Vũ Thị My, Phạm Hoàng Ngọc. (2003). *Một vài kết quả nghiên cứu về Bình vôi (Stephania). Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*. Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc lần thứ hai, nghiên cứu cơ bản trong sinh học, nông nghiệp, y học, 685-688.

Nguyễn Quốc Huy, Phạm Thanh Kỳ, Trần Văn Ôn. (2009). Đặc điểm thực vật của 2 loài Bình vôi thuộc chi *Stephania* Lour. thu hái ở Ba Vì (Hà Nội) và Sapa (Lào Cai). *Tạp chí Dược học* 404(49): 33-38.

Nguyễn Tiến Dũng. (2000). Nghiên cứu về thực vật, hóa học và tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi *Stephania* Lour. ở Việt Nam. Truy cập từ <http://luanan.nlv.gov.vn/luanan?a=d&d=TTbF abDAcxdG2000.1.142#>

Nguyễn Thị Mỹ Duyên. (2010). Nghiên cứu đa dạng sinh học các giống hoa lan (*Orchids*) rừng có giá trị tại tỉnh An Giang bằng phương pháp ITS (internal transcribed spacer). *Luận văn Thạc sĩ Công nghệ Sinh học. Trường ĐH Cần Thơ, Việt Nam*.

Nguyễn Thị Mỹ Duyên. (2014). Nghiên cứu sự ảnh hưởng của Auxin và Cytokinin đến khả năng tạo và nhân chồi cây Bình vôi (*Stephania rotunda*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học An Giang, Vol. 1 (2): 48-54*.

Nguyễn Thị Thu Nga và Sỹ Danh Thường. (2020). Định danh loài Cáp gai nhỏ *Capparis* sp. ở khu bảo tồn thiên nhiên Tà Kóu huyện Hàm Thuận Nam, tỉnh Bình Thuận bằng mã



- vạch DNA. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2020.
- Rogers SO, Bendich AJB (1988). Extraction of DNA from plant tissues. Gelvin SB, Schilperoort RA, eds. *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, DC: 1-10.
- Tsai CC, Peng CI, Huang SC, Huang PL, Chou CH (2004). Determinator of the genetic relationship of *Dendrobium* species (*Orchidaceae*) in Taiwan based on the sequences of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Scientia Horticulturae* 101: 315-325.
- Viện dược liệu. (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam (Tập 1,2)*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Võ Văn Chi. (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam (Tập 1)*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J (1995). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, New York Academic press, DC: 315-322.