

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ *ITS* TRONG NHẬN DIỆN LOÀI MÃ TIỀN (*STRYCHNOS NITIDA*) TẠI THANH HÓA

Lê Đình Chấn¹, Trịnh Thị Hồng¹, Nguyễn Thị Hằng¹, Nguyễn Thị Thanh Chung²

TÓM TẮT

Vùng *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*) là một chỉ thị phân tử được sử dụng phổ biến trong định danh thực vật nhờ khả năng phân giải tốt ở cấp độ loài, cho phép phân biệt các loài có hình thái tương đồng. Do đó, *ITS* đóng vai trò quan trọng trong kiểm định chất lượng, bảo tồn và nghiên cứu phân loại loài thực vật. Nghiên cứu này phân lập, giải trình tự và phân tích phát sinh chủng loại vùng *ITS* của loài Mã tiền (*Strychnos nitida*) thu tại Pù Luông, Thanh Hóa. Trình tự *ITS* thu được từ mẫu nghiên cứu có kích thước 724 bp, được phân tích so sánh với các trình tự tham chiếu trên GenBank và cây phát sinh chủng loại, cho thấy, mẫu nghiên cứu có quan hệ di truyền gần với *S. nitida* và các loài cùng chi *Strychnos*. Kết quả khẳng định *ITS* là chỉ thị phân tử hữu ích trong nhận diện loài Mã tiền và có thể ứng dụng trong kiểm soát chất lượng dược liệu.

Từ khoá: Mã tiền, *Strychnos nitida*, chỉ thị *ITS*, mã vạch DNA, nhận diện loài.

DOI: <https://doi.org/10.70117/hdujs.86.4.2026.1233>

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mã tiền (*Strychnos nitida* G.Don, tên đồng danh *Strychnos cathayensis*), có tên gọi khác là Gio, Mã tiền Trung Quốc, là nguồn dược liệu có giá trị cao, được biết đến với sự hiện diện của các alkaloid indol như strychnine và brucine-những hợp chất có khả năng kích thích dẫn truyền thần kinh, cải thiện chức năng vận động và được ứng dụng trong điều trị một số rối loạn thần kinh cơ khi sử dụng ở liều kiểm soát [8]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, chiết xuất từ các loài *Strychnos* còn có tiềm năng kháng viêm, giảm đau và hoạt tính gây độc chọn lọc trên tế bào ung thư, mở ra hướng phát triển dược phẩm mới [10]. Tuy nhiên, độc tính cao của strychnine đặt ra yêu cầu nghiêm ngặt trong kiểm soát nguồn gốc, nghiên cứu, kiểm soát chất lượng và an toàn sử dụng dược liệu.

Trong chi *Strychnos*, nhiều loài có đặc điểm hình thái tương đồng, gây khó khăn cho định danh dựa trên hình thái truyền thống. Công nghệ mã vạch DNA (DNA barcoding), đặc biệt khi sử dụng vùng *ITS/ITS2*, đã chứng minh hiệu quả cao trong nhận diện dược liệu nhờ tính ổn định và khả năng phân biệt ở cấp độ loài [9]. *ITS2* được đánh giá có độ chính xác nhận diện cao và có thể áp dụng rộng rãi trong kiểm định dược liệu cũng như phát hiện tạp

¹ Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức; Email: ledinhchac@hdu.edu.vn

² Trường Đại học Y khoa Vinh

chất hoặc gian lận thương mại [4]. Ngoài ra, các phương pháp metabarcoding kết hợp *ITS* cho phép nhận diện đồng thời nhiều loài trong chế phẩm phức hợp, nâng cao độ tin cậy trong kiểm soát chất lượng [7].

Hiện nay, nhiều trình tự *ITS* của các loài thuộc chi *Strychnos* đã được công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank, tạo điều kiện thuận lợi cho việc so sánh và xác định mối quan hệ di truyền, nhưng dữ liệu về *S. nitida* tại Việt Nam vẫn còn hạn chế. Do đó, ứng dụng trình tự *ITS* trong nhận diện loài là hướng tiếp cận thiết yếu nhằm định hướng nghiên cứu, bảo tồn và chuẩn hóa nguồn dược liệu từ cây Mã tiền.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu Mã tiền được thu tại Pù Luông thuộc huyện Bá Thước (cũ), tỉnh Thanh Hóa, tọa độ: 20°29'33,66'' vĩ độ Bắc; 105°5'19,90'' kinh độ Đông. Mẫu được ký hiệu là MH718312-PL.

Cặp mồi đặc hiệu sử dụng để khuếch đại (nhân bản trình tự) vùng *ITS* được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các nucleotide của cặp mồi sử dụng

Gene	Tên mồi	Trình tự	Kích thước dự kiến	Tác giả
ITS	ITS-F	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	700 bp	Chen và cộng sự, 2010 [5]
	ITS-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		Chen và cộng sự, 2010 [5]

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ lá Mã tiền

DNA tổng số được tách chiết từ lá Mã tiền theo phương pháp CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) [1]. Phương pháp này dựa trên khả năng của CTAB trong việc loại bỏ polysaccharide và tạp chất, giúp thu nhận DNA có độ tinh sạch phù hợp cho các phân tích sinh học phân tử tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp khuếch đại vùng *ITS* bằng kỹ thuật PCR

Vùng chứa đoạn gene *ITS* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu *ITSr/ITSl* có kích thước dự kiến là khoảng 700 nucleotide.

Chu trình nhiệt cho phản ứng của PCR như sau: Biến tính khởi động ở 94°C trong 4 phút; lặp lại 25 chu kỳ (Sambrook và cộng sự, 1989 [2]) (biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 40 giây, tổng hợp và kéo dài ở 72°C trong 40 giây); ổn định mẫu và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 10 phút và bảo quản mẫu ở 4°C.

Thành phần phản ứng PCR được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μ l)
1	PCR Master Mix	2X	12,5
2	Mồi xuôi	10 pmol/ml	1
3	Mồi ngược	10 pmol/ml	1
4	DNA khuôn	10ng/ μ L	1
5	Nước khử ion	-	9,5
Tổng thể tích			25

2.2.3. Phương pháp chạy điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (w/v) nhằm đánh giá kích thước của đoạn DNA mục tiêu. Sau khi điện di, gel được nhuộm với ethidium bromide trong 10 phút, rửa bằng nước cất trong 2-3 phút để loại bỏ thuốc nhuộm dư, sau đó quan sát dưới đèn UV để xác định sự hiện diện của băng DNA có kích thước dự kiến. Hình ảnh các băng DNA được ghi nhận bằng hệ thống chụp ảnh gel chuyên dụng.

2.2.4. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit GenJET PCR Purification (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nhằm loại bỏ thành phần phản ứng dư và các tạp chất ảnh hưởng đến giải trình tự. Sau khi tinh sạch, DNA đạt độ tinh khiết cao, phù hợp cho giải trình tự và phân tích tiếp theo.

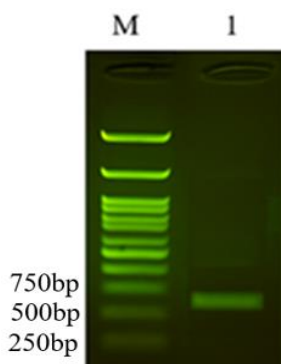
2.2.5. Phương pháp giải trình tự, phân tích trình tự nucleotide của vùng ITS và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Trình tự nucleotide của vùng ITS được xác định bằng hệ thống giải trình tự tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ hóa chất BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit cùng cặp mồi đặc hiệu. Dữ liệu thu được được hiệu chỉnh và so sánh bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu GenBank [3] để xác định độ tương đồng trình tự với các mẫu đã công bố.

Các trình tự có độ tương đồng cao được chọn để xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA XII [6] nhằm đánh giá mối quan hệ di truyền giữa mẫu *S. nitida* nghiên cứu và các loài cùng chi *Strychnos*.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**3.1. Kết quả nhân bản trình tự vùng ITS**

DNA sau khi tách chiết thành công được sử dụng để nhân bản trình tự *ITS* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu, sau đó tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% và ghi nhận kết quả (Hình 3.1).

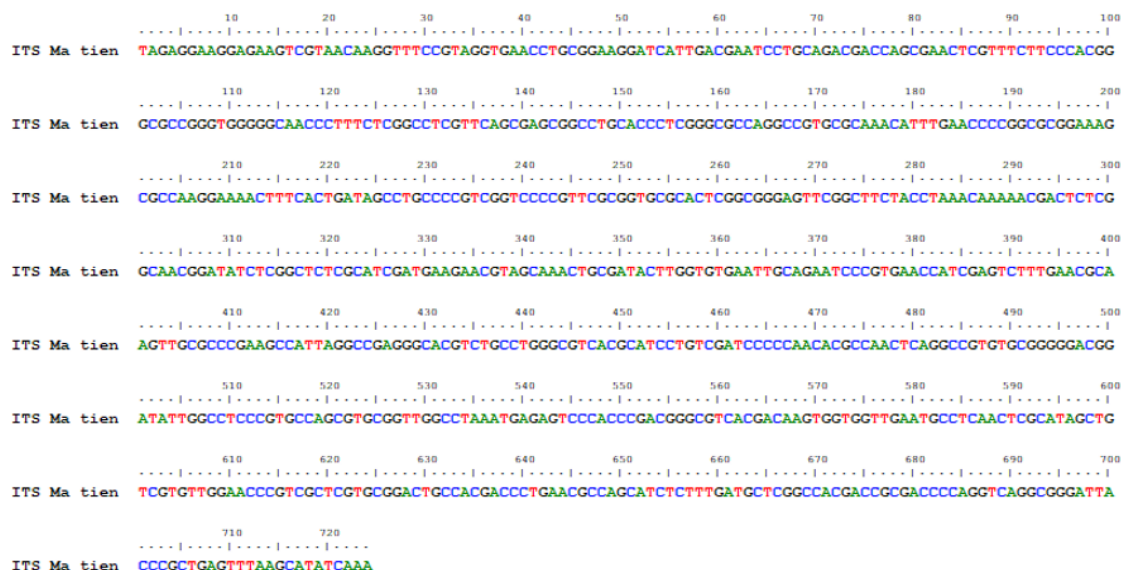


Hình 1. Kết quả PCR với cặp mồi ITS (Làn M: Marker; Làn 1: MH718312-PL)

Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm PCR của mẫu MH718312-PL tại làn 1 xuất hiện duy nhất một băng đơn với kích thước khoảng hơn 600 bp so với làn marker, phù hợp với độ dài dự kiến của vùng *ITS*. Kết quả này xác nhận, phản ứng khuếch đại đã diễn ra thành công, sản phẩm thu được phù hợp, có đủ độ tinh sạch cho việc giải trình tự *ITS* và các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả đọc trình tự đoạn gene ITS của loài Mã tiền

Trình tự nucleotide vùng *ITS* được xác định trên hệ thống ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả trình tự được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Trình tự vùng ITS thu được từ mẫu nghiên cứu

Trình tự vùng *ITS* của mẫu nghiên cứu là 724 bp, phù hợp với kích thước dự kiến của vùng *ITS* khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Kết quả đạt độ tin cậy cao để tiến hành phân tích, so sánh quan hệ di truyền của vùng *ITS* của mẫu nghiên cứu với vùng *ITS* của một số loài trong chi *Strychnos* đã công bố trên GenBank.

3.3. Kết quả phân tích trình tự vùng ITS

Trình tự vùng *ITS* thu được được xử lý và phân tích bằng phần mềm MEGA XII để xây dựng cây phát sinh chủng loại, đánh giá mối quan hệ di truyền với các trình tự tham chiếu trên GenBank. Các trình tự tham chiếu được lựa chọn dựa trên độ tin cậy của cơ sở dữ liệu và độ bao phủ trình tự cao (bảng 3, hình 3). Kết quả BLAST và phân tích phát sinh chủng loại cho thấy, mẫu MH718312-PL nằm trong nhóm cùng chi *Strychnos* và có quan hệ di truyền gần gũi với *Strychnos nitida*.

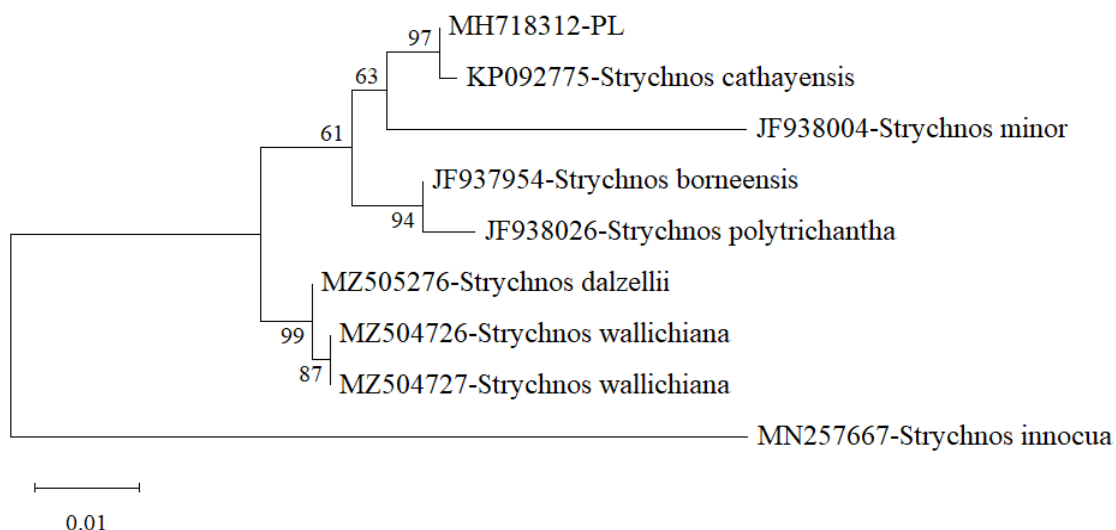
Bảng 3. Vùng *ITS* đã công bố trên GenBank được sử dụng để so sánh với vùng *ITS* của mẫu *Strychnos nitida* nghiên cứu

STT	Loài	Mã số	Kích thước gene	Tác giả công bố	Nơi công bố	Năm công bố
1	<i>Strychnos cathayensis</i>	KP092775	713	Liu, J., Yan, H.-F., Newmaster, SG, Pei, N., Ragupathy, S. và Ge, X.-J.	2015	Trung Quốc
2	<i>Strychnos wallichiana</i>	MZ504726	660	Ravindran, A. và Das,BN	2022	Ấn Độ
3	<i>Strychnos dalzellii</i>	MZ505276	635	Ravindran, A.	2021	Ấn Độ
4	<i>Strychnos borneensis</i>	JF937954	618	Frasier, C. và Struwe, L.	2025	Hoa Kỳ
5	<i>Strychnos polytrichantha</i>	JF938026	619	Frasier, C. và Struwe, L.	2025	Hoa Kỳ
6	<i>Strychnos wallichiana</i>	MZ504727	609	Ravindran, A. và Das,BN	2022	Ấn Độ
7	<i>Strychnos innocua</i>	MN257667	721	Veldman,S., Ju,Y., Otieno,JN, bihudi,S., Posthouwer,C., Gravendeel,B., van Andel,TR và de Boer,HJ	2019	Thụy Điển
8	<i>Strychnos minor</i>	JF938004	618	Frasier, C. và Struwe, L.	2025	Hoa Kỳ

Kết quả so sánh mối quan hệ di truyền của mẫu nghiên cứu với các loài khác trong chi *Strychnos* dựa trên vùng *ITS* được thể hiện trên hình 3.

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Strychnos nitida small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	<i>Strychnos nitida</i>	1338	1338	100%	0.0	100.00%	724	MH718312.1
Strychnos nitida small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	<i>Strychnos nitida</i>	1338	1338	100%	0.0	100.00%	724	MH718311.1
Strychnos cathayensis isolate SCBGP424_1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans...	<i>Strychnos cathayensis</i>	1312	1312	98%	0.0	99.86%	716	KP092775.1
Strychnos wallichiana isolate B11.ab1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	<i>Strychnos wallichiana</i>	1123	1123	91%	0.0	97.42%	663	MZ504726.1
Strychnos dalzellii isolate A11.ab1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	<i>Strychnos dalzellii</i>	1096	1096	88%	0.0	97.80%	635	MZ505276.1
Strychnos borneensis voucher M. J. E. Coode et al. 7856 (HUH) internal transcribed spacer 1, partial se...	<i>Strychnos borneensis</i>	1068	1068	85%	0.0	97.74%	618	JF937954.1
Strychnos polytrichantha voucher J. S. Burley and B. Lee 268 (HUH) internal transcribed spacer 1, parti...	<i>Strychnos polytrichantha</i>	1064	1064	85%	0.0	97.74%	619	JF938026.1
Strychnos wallichiana isolate B11.ab2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	<i>Strychnos wallichiana</i>	1048	1048	84%	0.0	97.70%	609	MZ504727.1
Strychnos minor voucher Ridsdale et al. ISU49 (HUH) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5...	<i>Strychnos minor</i>	996	996	85%	0.0	95.63%	618	JF938004.1
Strychnos innocua voucher CP180 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc...	<i>Strychnos innocua</i>	996	996	100%	0.0	91.57%	825	MN257667.1
Strychnos minor voucher J. Molina 7 (CHRB) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos...	<i>Strychnos minor</i>	990	990	85%	0.0	95.47%	617	JF938042.1
Strychnos cathayensis isolate PANAF_6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal...	<i>Strychnos cathayensis</i>	987	987	74%	0.0	99.81%	537	PX830303.1

Hình 3. Cây phát sinh loài dựa trên vùng ITS của loài Mã tiền được thu ở Pù Luông, Thanh Hoá với các loài khác trong chi *Strychnos*.



Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh chủng loại giữa loài *Strychnos nitida* (MH718312-PL) được thu ở Bá Thước, Thanh Hoá với một số loài khác trong chi *Strychnos*

Trên cây phát sinh chủng loại (hình 3) có sự phân nhóm rõ ràng giữa các loài thuộc chi *Strychnos*, phản ánh mối quan hệ tiến hóa ở cấp độ loài với mức độ tin cậy khác nhau. Mẫu MH718312-PL nằm cùng nhánh với *S. cathayensis* với giá trị bootstrap = 97%, chứng tỏ sự tương đồng di truyền cao và xác nhận mối quan hệ họ hàng gần. Nhánh này tiếp tục liên kết với một số loài khác (*S. minor* và *S. borneensis*), tuy nhiên giá trị bootstrap ở mức trung bình (61–63%), phản ánh mức độ phân hóa di truyền rõ rệt giữa cụm (MH718312-PL và *S. cathayensis*) và cụm (*S. minor* và *S. borneensis*).

Nhánh *S. borneensis* và *S. polythrichantha* có giá trị phân tích bootstrap cao (94%), cho thấy mối quan hệ tiến hóa chặt chẽ giữa hai loài này. Trong khi đó, nhóm *S. dalzellii* và *S. wallichiana* (hai mẫu độc lập) hình thành một nhóm riêng với giá trị bootstrap 87-99%, khẳng định tính nhất quán nội loài và sự phân biệt rõ ràng với các nhóm khác trong cây phát sinh chủng loại.

Đáng chú ý, *S. innocua* nằm ở vị trí phân tách xa nhất, thể hiện khoảng cách di truyền lớn và đóng vai trò như một nhóm ngoài tương đối, góp phần làm rõ hướng phân nhánh trong cây phát sinh chủng loại tổng thể.

Những kết quả trên phù hợp với đặc điểm của vùng *ITS* là có khả năng phân giải tốt ở cấp loài, phản ánh sự tin cậy khi sử dụng vùng *ITS* trong việc nhận diện các loài trong chi *Strychnos*, do đó hỗ trợ hiệu quả cho định danh *S. nitida*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vùng *ITS* có giá trị thực tiễn trong nhận diện loài Mã tiền tại khu vực Thanh Hóa. Việc sử dụng chỉ thị phân tử không chỉ góp phần xác định chính xác loài mà còn có ý nghĩa trong kiểm soát, hạn chế nhầm lẫn loài và hỗ trợ bảo tồn nguồn gen bản địa.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định trình tự vùng *ITS* của mẫu Mã tiền thu tại Pù Luông, Thanh Hóa với kích thước là 724 bp. Phân tích cây phát sinh chủng loại cho thấy, mẫu nghiên cứu có quan hệ di truyền gần gũi với loài *S. nitida* (bootstrap = 97%). Kết quả này cho thấy, *ITS* là chỉ thị mã vạch DNA hiệu quả, có giá trị cao trong hỗ trợ định danh, phân biệt loài *S. nitida* với các loài khác trong chi *Strychnos* và có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát chất lượng dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Allen GC, Flores-Vergara MA, Krasynanski S, Kumar S, Thompson W F, (2006), *A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide*, Nat. Protoc., 1(5):2320-2325.
- [2] Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T, (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [3] Stoeckle M, (2003), *Taxonomy, DNA, and the bar code of life*, BioScience, 53(9): 796-797.
- [4] Mishra PK, Kumar A, Nagireddy A, Mani S, Shukla R, Tiwari AK, (2021), *DNA barcoding: an efficient tool for authentication of medicinal plants*, Plant Gene, 25: 100262-100262.
- [5] Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C, (2010), *Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species*, PLoS ONE, 5(1):e8613, doi.org/10.1371/journal.pone.0008613.

- [6] Kumar S, Stecher G, Sulesky M, Sanderford M, Sharma S, Tamura K, (2024), *MEGA12: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms for adaptive and green evolution*, Mol. Biol. Evol., 41(12): msae283. doi: 10.1093/molbev/msae263.
- [7] Pandit S, Sharma S, Joshi CS, Kumar R, Kumar D, Kumar M, (2023), *DNA metabarcoding using rbcL and ITS2 markers for medicinal plant identification*, bioRxiv: 1-15, doi:10.1101/2023.07.05.547729.
- [8] Kuete V, (2020), *Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- [9] Yang S, Chen S, Mo J, J. Han, Liu C, Luo X, Zhou X, (2024), *Application of DNA barcoding to identify medicinal plants*, J. Vis. Exp., 1-12. doi:10.3791/65483.
- [10] Yu J, Wu X, Liu C, Zhang Y, Liu Z, Wang Y, Zhang Y, (2020), *Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants*, Environ. Sci. Pollut. Res., 27(34):42963-42972.

APPLICATION OF INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) MARKERS FOR THE IDENTIFICATION OF *Strychnos nitida* IN THANH HOA PROVINCE

Le Dinh Chac, Vu Van Khanh, Ha Van Khoa

ABSTRACT

The Internal Transcribed Spacer (ITS) region is a widely used molecular marker for plant identification due to its strong species-level resolution, especially among morphologically similar taxa. ITS sequence analysis provides reliable genetic data for phylogenetic reconstruction and the authentication of medicinal materials.

*In this study, the ITS region of *Strychnos nitida* collected from Pu Luong, Thanh Hoa, was isolated, sequenced, and subjected to phylogenetic analysis. The obtained ITS sequence was 724 bp in length. Comparative analysis with reference sequences in GenBank and phylogenetic reconstruction indicated that the studied sample was closely related to *S. nitida* and other species in the genus *Strychnos*. These results confirm that ITS is a useful molecular marker for the identification of *S. nitida* and may support quality control of medicinal materials.*

Keywords: *Strychnos nitida*, ITS, DNA barcoding, species identification.

* Ngày nộp bài: 26/3/2026; Ngày gửi phản biện: 10/4/2026; Ngày duyệt đăng: 26/4/2026