

Nghiên cứu đặc điểm hình thái và xây dựng dữ liệu mã vạch DNA của Tang ký sinh (*Scurrula parasitica* L.) và một số loài dễ nhầm lẫn

Nguyễn Quỳnh Nga*, Phan Văn Trường, Nguyễn Thị Lan Hoa, Trần Đức Trung, Phạm Thanh Huyền, Nguyễn Hoàng, Nguyễn Khương Duy, Lê Thị Tú Linh, Đặng Minh Tú
Viện Dược liệu

Morphology characterization and DNA barcodes establishment for *Scurrula parasitica* L. and other commonly misidentified adulterant mistletoes

Nguyen Quynh Nga*, Phan Van Truong, Nguyen Thi Lan Hoa, Tran Duc Trung, Pham Thanh Huyen, Nguyen Hoang, Nguyen Khuong Duy, Le Thi Tu Linh, Dang Minh Tu
National Institute of Medicinal Materials

*Corresponding author: nguyenquynhnga@gmail.com

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.15.3.2026.044-054>

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/10/2025

Ngày phản biện: 20/11/2025

Ngày quyết định đăng: 23/12/2025

Từ khóa:

Đặc điểm hình thái, *matK*, *nrITS*, *rbcl*, *Scurrula parasitica*, *trnL-trnF*.

Keywords:

MatK, Morphological characteristics, *nrITS*, *rbcl*, *Scurrula parasitica*, *trnL-trnF*.

TÓM TẮT

Ở Việt Nam, dược liệu Tang ký sinh từ loài *Scurrula parasitica* L. sống ký sinh trên cây Dâu (*Morus alba* L.) là thành phần quan trọng trong nhiều chế phẩm y học cổ truyền. Tuy nhiên, nhiều loài tầm gửi khác sống ký sinh trên cây Dâu vẫn được thu hái và làm dược liệu Tang ký sinh gây ảnh hưởng đến chất lượng và hiệu quả điều trị. Nghiên cứu này đã so sánh đặc điểm hình thái kết hợp xây dựng, phân tích dữ liệu bốn vùng mã vạch DNA (*nrITS*, *matK*, *rbcl* và *trnL-trnF*) của *Scurrula parasitica* L. và 4 loài tầm gửi dễ nhầm lẫn sống ký sinh trên cây Dâu. Kết quả cho thấy, *Scurrula parasitica* L. phân biệt với 4 loài dễ nhầm lẫn ở các đặc điểm hình thái hoa, quả và lông che chở. Về dữ liệu mã vạch DNA, ngoài trừ vùng *nrITS* cho kết quả giải trình tự kém chất lượng, cả 3 vùng mã vạch DNA lục lạp ở 5 loài nghiên cứu đều cho dữ liệu giải trình tự chất lượng cao, với tỷ lệ thành công đạt 100% số mẫu. Trong đó, *matK* và *trnL-trnF* thể hiện độ đa dạng trình tự và khả năng phân biệt loài vượt trội, trong khi *rbcl* ổn định nhưng độ phân giải thấp hơn.

ABSTRACT

In Vietnam, the herbal medicine "Tang ky sinh" is derived from the stems, branches, and leaves of *Scurrula parasitica* L., a parasitic plant on the mulberry tree (*Morus alba* L.), and is an important component in many traditional medicinal preparations. However, various other mistletoe species parasitic on mulberry trees are still indiscriminately harvested and used as "Tang ky sinh" material, which affects the quality and treatment efficacy. This study compared morphological characteristics and analyzed data from four DNA barcode regions (*nrITS*, *matK*, *rbcl*, and *trnL-trnF*) of *Scurrula parasitica* L. and four easily confused mistletoe species parasitic on mulberry trees. The results showed that *Scurrula parasitica* L. is distinguished from the four easily confused species by characteristic morphological features of the flowers, fruits and stellate hairs. Regarding the DNA barcode data, except for *nrITS*, which produced low-quality sequences, all three chloroplast barcode regions from the five studied species yielded high-quality sequences, with 100% of the samples successfully sequenced. Among them, *matK* and *trnL-trnF* demonstrated superior nucleotide diversity and species discrimination ability, while *rbcl* was stable but had lower resolution.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, Tang ký sinh là thành phần chính trong nhiều chế phẩm Y học cổ truyền đã được thương mại hoá. Phổ biến nhất là sản phẩm thuốc cổ truyền Độc hoạt Tang ký sinh chủ trị can, thận hư, phong hàn thấp gây đau nhức mỏi thắt lưng, đầu gối, các chi dưới co duỗi khó khăn, cảm giác nặng nề. Dược điển Việt Nam V quy định dược liệu Tang ký sinh được lấy từ loài *Scurrula parasitica* L. sống ký sinh trên cây Dâu - *Morus alba* L.[1].

Đề tài “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen Tang ký sinh (*Scurrula parasitica* L.) làm dược liệu” qua thực tế triển khai đã ghi nhận, ngoài loài *Scurrula parasitica* L. còn có 4 loài tầm gửi khác sống ký sinh trên cây Dâu bao gồm: *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq., *Macrosolen tricolor* (Lecomte) Danser, *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Tieghem, *Taxillus chinensis* (DC.) Danser. đều được người dân thu hái và gọi chung là dược liệu Tang ký sinh gây ảnh hưởng tới tính ổn định, chất lượng dược liệu và hiệu quả sử dụng thuốc.

Công tác kiểm nghiệm, định danh cây thuốc bằng phương pháp hình thái và vi phẫu thường gặp khó khăn đối với mẫu dược liệu không mang cơ quan sinh sản (hoa, quả) hoặc không còn nguyên vẹn (băm, thái vụn) do không đủ đặc dữ liệu để phân biệt hoặc với những loài có quan hệ gần gũi về mặt di truyền (cùng chi). Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận sự tương đồng về đặc điểm giải phẫu giữa các loài Tầm gửi trong họ Loranthaceae khiến cho việc phân biệt trở nên phức tạp [2, 3].

Trong bối cảnh đó, kỹ thuật mã vạch DNA (DNA barcode) nổi lên như một công cụ hỗ trợ

đặc lực cho các phương pháp định danh cổ điển. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh hiệu quả của các vùng gen như nrITS, *trnL-trnF*, *rbcl* và *matK* trong việc phân biệt chính xác loài Tầm gửi *Taxillus chinensis* với một số loài khác chi (*Scurrula*, *Helixanthera*, *Dendrophthoe*, *Loranthus*, *Macrosolen*) trong họ Loranthaceae [4-6]. Tại Việt Nam, một số mẫu đã được thu thập và kết hợp trong nghiên cứu so sánh và phân loại giữa các loài thuộc họ Loranthaceae. Tuy nhiên dữ liệu mã vạch DNA của các loài tầm gửi trên cây Dâu còn khiêm tốn nên khả năng áp dụng phương pháp phân tử trong định danh, kiểm nghiệm loài *Scurrula parasitica* L. cho dược liệu Tang ký sinh còn rất hạn chế [7]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm hai mục tiêu: (1) So sánh, xác định đặc điểm hình thái đặc trưng và (2) Xây dựng bộ dữ liệu mã vạch DNA cho các vùng gen nrITS, *matK*, *rbcl*, and *trnL-trnF* giữa loài *Scurrula parasitica* L. và 4 loài tầm gửi dễ nhầm lẫn cùng sống ký sinh trên cây Dâu. Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp cơ sở khoa học góp phần định danh và đảm bảo tính đúng của dược liệu Tang ký sinh trên thị trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Phân tích đặc điểm hình thái: 18 mẫu của loài *Scurrula parasitica* L. và 4 loài dễ nhầm lẫn sống ký sinh trên cây Dâu được thu thập ở 7 tỉnh trên cả nước vào tháng 3 đến tháng 6 năm 2023. Mẫu được lưu giữ tại Phòng Tiêu bản của Viện Dược liệu (NIMM). Danh sách mẫu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Danh sách mẫu tầm gửi ký sinh trên cây Dâu

TT	Tên khoa học	Nơi lấy/Ký hiệu mẫu nghiên cứu
1	Tang ký sinh - <i>Scurrula parasitica</i> L.	QN28 (Hà Nội), QN32 (Hà Nội), QN39 (Hưng Yên), QN50 (Hưng Yên), QN52 (Hưng Yên), QN56 (Bắc Giang)
2	Mộc ký ngũ hùng - <i>Dendrophthoe pentandra</i> (L.) Miq.	QN46 (TP HCM), QN59 (Đồng Nai)
3	Đại cán ba màu - <i>Macrosolen tricolor</i> (Lecomte) Danser	QN03 (Đắk Lắk), QN29 (Hà Nội), QN30 (Hưng Yên), QN42 (Hưng Yên), QN44 (Hưng Yên), QN48 (Bắc Giang), QN53 (Bắc Giang)
4	Đại cán nam - <i>Macrosolen cochinchinensis</i> (Lour.) Tieghem	QN13 (Quảng Nam)
5	Mộc vệ tàu - <i>Taxillus chinensis</i> (DC.) Danser	QN11 (Quảng Nam), QN24 (Lâm Đồng)

Phân tích ADN mã vạch: mẫu lá (tươi) thu thập từ 18 mẫu của 5 loài tầm gửi sống ký sinh trên cây Dâu kể trên. Dữ liệu trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS2 (nrITS) và hệ gen lục lạp hoàn chỉnh của các loài thuộc chi *Scurrula*, *Helixanthera*, *Dendrophthoe*, *Loranthus* và *Macrosolen* được thu thập từ cơ sở dữ liệu nucleotide từ Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

2.2. Phương pháp

- Xác định tên khoa học các mẫu nghiên cứu bằng phương pháp so sánh hình thái (Nguyễn Nghĩa Thìn, 2007) [8] căn cứ vào bản mô tả và khóa phân loại của các loài thuộc họ Loranthaceae theo Nguyễn Tiến Bân (1994); Qiu và cộng sự (2003) [9, 10]. Lập bảng so sánh một số đặc điểm hình thái đặc trưng của các loài.

- Thiết kế bộ mồi khuếch đại đặc hiệu các vùng mã vạch DNA từ các mẫu:

Bộ mồi cho các vùng nrITS, *matK*, *rbcl*, *trnL-trnF* thu thập từ các công trình đã công bố cho các loài Loranthaceae được sử dụng để khảo sát khả năng khuếch đại các vùng mã vạch quan tâm từ bộ mẫu nghiên cứu.

Để tăng khả năng khuếch đại đặc hiệu cũng như hiệu quả giải trình tự, nghiên cứu đã thiết kế bổ sung một số bộ mồi đặc hiệu cho các vùng mã vạch quan tâm bằng phần mềm Geneious R11 (<https://www.geneious.com>) theo công bố của Trần Đức Trung (2024) [11]. Các đoạn mồi được tổng hợp bởi Công ty Phù Sa Genomic (<https://phusagenomics.com/>). Trình tự và thông số các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện tại Bảng 2.

Bảng 2. Thông số các cặp mồi khuếch đại mã vạch DNA cho các loài Loranthaceae

TT	Vùng mã vạch DNA	Tên mồi	Trình tự (5' – 3')	Tm (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn
1.	nrITS	C26A	GTTTCTTTTCCTCCGCT	50 - 54	Thay đổi theo loài	[12]
		18S10	AGGAGAAGTCGTAACAAG			
2.	<i>rbcl</i>	F	ATGTCACCACAAACAGARAC	52 - 54	Thay đổi theo loài	[13]
		R1	TAGTAAAAGATTGGGCCGAG	53		
3.	<i>matK</i>	R2	CTATCAATAACTGCATGCAT	48	Thay đổi theo loài	[13]
		78F	CAGGAGTATATTTATGCACT	47		
4.	<i>trnL-F</i>	1420R	TCGAAGTATATACTTTATTCG	44	Thay đổi theo loài	[14]
		F	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	56		
4.	<i>trnL-F</i>	R	ATTTGAACTGGTGACACGAG	54	Thay đổi theo loài	[14]
		Tax-ITS-1734F	GTCCACTGAACCTTATCATTTAGAG	57,2		
5.	nrITS	Tax-ITS-2535R	CTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC	58,3	802	Nghiên cứu này
		Scu-ITS-1746F	TATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCG	57,7		
		Scu-ITS-2507R	GGAATCCTTGTAAGTTTCTTTTCC	58,3	762	
		TKS-matK-F	ATGATTGACTAGATCGTTGATACA	55,5		
6.	<i>matK</i>	TKS-matK-Fin1	ATACCAAACWACGMCCTTCTCT	53,8 - 57,6	1.270 ~ 1.330	Nghiên cứu này
		TKS-matK-Fin2	ACGAGCTAMAGTTCTAGTACA	53,8 - 55,6		
		TKS-matK-R	CCAGGAGTATATTTATGCACTTAC	54,9		
		TKS-matK-Rin1	TTAGTTACTAATTGTGAAACG	52,2		
		TKS-matK-Rin2	TTTTCCAGGAGTATATTTATGC	51,7		
		TKS- <i>rbcl</i> -F	CATGTGCGAGTAGATCTTGTTGT	56		
7.	<i>rbcl</i>	TKS- <i>rbcl</i> -Fin	TGTCACCACAAACAGAGACT	56,6	~1.300	Nghiên cứu này
		TKS- <i>rbcl</i> -R1	TCATTACGAGCTTGTACACAT	55,1		
		TKS- <i>rbcl</i> -R2	CATACCTCACAAGCAGCAG	56		
8.	<i>trnL-trnF</i>	TKS- <i>trnL-trnF</i> -F	GAAATTGGTAGACGCTACGGA	57,8	810	Nghiên cứu này
		TKS- <i>trnL-trnF</i> -R	GTGCCAGGAACCAGATTTGAA	58,8		

- Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại các vùng mã vạch DNA và giải trình tự Sanger:

DNA tổng số được tách chiết từ lá tươi của các mẫu tầm gửi bằng bộ Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, CHLB Đức) theo quy trình khuyến cáo của nhà sản xuất. Mức độ nguyên vẹn của các mẫu DNA tổng số được kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose 0,7%, trong khi độ tinh sạch và nồng độ được xác định thông qua đo độ hấp thụ quang. Các bước khuếch đại các đoạn mã vạch DNA mục tiêu, kiểm tra và tinh sạch sản phẩm khuếch đại được tiến hành theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Lan Hoa (2022) [15]. Sản phẩm PCR tinh sạch được gửi đi giải trình tự từ hai đầu bằng phương pháp Sanger tại Công ty GenLab (<https://genlab.vn/>).

- Xử lý dữ liệu trình tự thô và phân tích mã vạch DNA các mẫu Tầm gửi.

Các bước xử lý và phân tích giống hàng trình tự mã vạch DNA được thực hiện bằng các công cụ trên phần mềm Geneious R11 theo mô tả của Nguyen Thi Lan Hoa (2022) [15]. Trình tự mã vạch DNA được đối chiếu với cơ sở dữ liệu nucleotide của Genbank bằng công cụ BLAST và xác định giá trị đa dạng trình tự (Pi) bằng phần mềm DnaSP v6.12.03. Kết quả BLAST tốt nhất

được lựa chọn dựa trên giá trị mức đánh giá (Grade) là trọng số đánh giá dựa trên giá trị kỳ vọng (E-value), mức độ tương đồng và mức độ bao phủ của phân tích BLAST giữa trình tự mã vạch với trình tự tham chiếu trên GenBank.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. So sánh đặc điểm hình thái loài *Scurrula parasitica* L. và các loài dễ nhầm lẫn

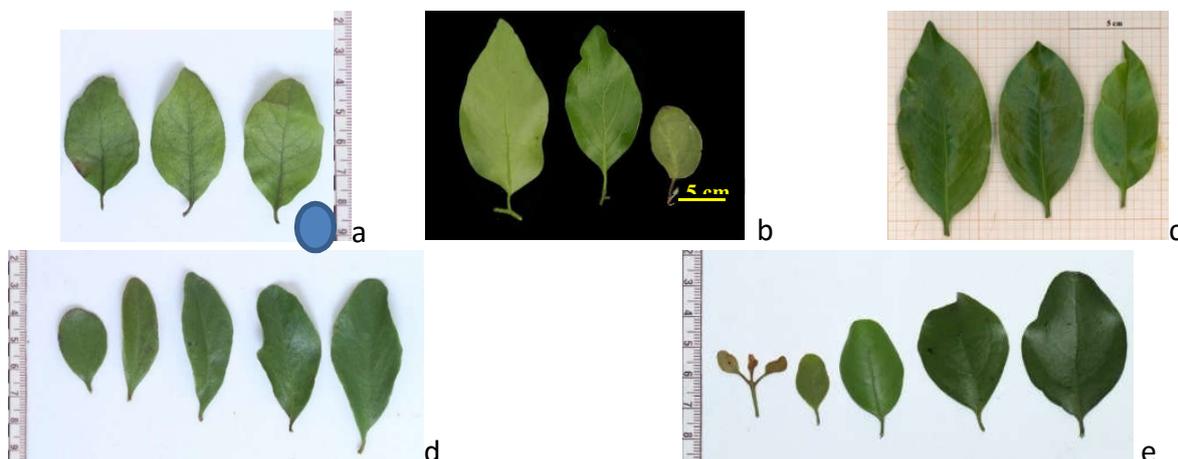
Scurrula parasitica L. và 4 loài tầm gửi dễ nhầm lẫn đều thuộc họ Loranthaceae (tầm gửi) với các đặc điểm đặc trưng như: cây bụi, ký sinh trên các cây thuộc nhóm thực vật có hạt khác, thường mọc lan trên thân cây chủ bằng rễ bám vào vỏ thân cây chủ; quả mọng, bên trong có lớp nhựa dính bao quanh hạt; đài dính với bầu tạo thành ống đài, tồn tại cùng quả; bộ nhị có số lượng bằng số lượng cánh hoa; xếp đối diện với cánh hoa.

Căn cứ vào khóa phân loại và bản mô tả các chi và loài trong họ Loranthaceae và kết quả phân tích đặc điểm hình thái [9, 10] lập bảng so sánh một số đặc điểm chìa khoá giúp phân biệt *Scurrula parasitica* L. và 4 loài dễ nhầm lẫn cùng ký sinh trên cây Dâu (Bảng 3) bao gồm lá bắc, lá bắc nhỏ, lá, hoa (tính đối xứng của hoa, số cánh hoa, số ô trong bầu), quả (hình dạng).

Bảng 3. So sánh một số đặc điểm hình thái giữa loài *Scurrula parasitica* L. và 4 loài dễ nhầm lẫn cùng ký sinh trên cây Dâu

Đặc điểm	<i>Scurrula parasitica</i> L.	<i>Dendrophthoe pentandra</i> (L.) Miq.	<i>Macrosolen tricolor</i> (Lecomte) Danser	<i>Macrosolen cochinchinensis</i> (Lour.) Tieghem	<i>Taxillus chinensis</i> (DC.) Danser
Lông bảo vệ	Lông hình sao, mọc dày ở những bộ phận còn non	Lông tơ mềm, tập trung chủ yếu ở nụ hoa	Không có	Không có	Lông hình sao, mọc dày ở những bộ phận còn non
Lá (Hình 1)	Lá mọc đối, hơi phồng, phiến lá mỏng, hình bầu dục	Lá mọc cách hay gần đối, dai, phiến lá hình bầu dục-thuôn, trứng hay tròn, gân chính và gân bên nổi rõ	Lá mọc đối, dày, dai như da, phiến lá hình trứng ngược hoặc hình trứng thuôn, gân lá hình quạt	Lá mọc đối, dày và dai như da, phiến lá hình mác, gân lá hình lông chim, khó quan sát	Lá mọc đối hay gần đối, mỏng; phiến lá hình trứng, ít khi hình trứng ngược hay tròn
Lá bắc	Hoa có 1 lá bắc hình tam giác với nhiều lông hình sao ở mép	Hoa có 1 lá bắc, hình trứng rộng hay hình tam giác	Mỗi hoa có 1 lá bắc lớn và 2 lá bắc nhỏ, lá bắc nhỏ thường có đỉnh tròn	Mỗi hoa có 1 lá bắc lớn và 2 lá bắc nhỏ, lá bắc nhỏ thường có đỉnh tròn	Hoa có 1 lá bắc, hình tam giác

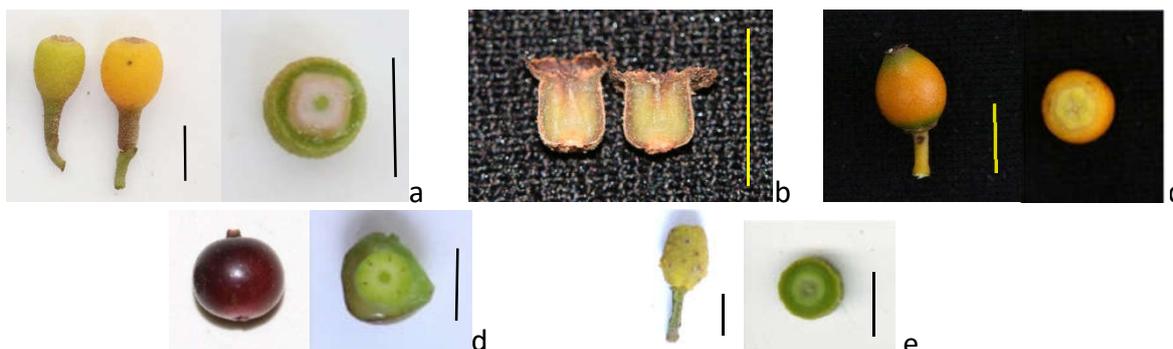
Đặc điểm	<i>Scurrula parasitica</i> L.	<i>Dendrophthoe pentandra</i> (L.) Miq.	<i>Macrosolen tricolor</i> (Lecomte) Danser	<i>Macrosolen cochinchinensis</i> (Lour.) Tieghem	<i>Taxillus chinensis</i> (DC.) Danser
Hoa (Hình 2)	Cuống cụm hoa 2-3 mm Hoa mẫu 4 đối xứng 2 bên, khi nở theo 1 khe nứt dọc xuống ống tràng	Cuống cụm hoa 7-20 mm Hoa mẫu 5 đều, khi nở không theo 1 khe nứt dọc xuống ống tràng	Cuống cụm hoa 1-4 mm Hoa mẫu 6, gần đều, khi nở không theo 1 khe nứt dọc xuống ống tràng	Cuống cụm hoa 15-20 mm Hoa mẫu 6, gần đều, khi nở không theo 1 khe nứt dọc xuống ống tràng	Cuống cụm hoa 2-4 mm Hoa mẫu 4 đối xứng 2 bên, khi nở theo 1 khe nứt dọc xuống ống tràng
Bầu	1 ô	1 ô	3 ô	3 ô	1 ô
Quả (Hình 3)	Quả hình quả lê, mọng, có lông bảo vệ, cuống quả thót lại, khi chín màu vàng, vàng đỏ đến vàng nâu	Quả hình trứng, mọng, có lông bảo vệ, khi chín màu đỏ, có vành đài tồn tại	Quả tròn, mọng, nhẵn, khi chín có màu đỏ sậm	Quả tròn, mọng, nhẵn, khi chín màu vàng đến vàng cam	Quả hình trái xoan hay trứng ngược, có lông bảo vệ, bề mặt nhiều nốt sần, khi chín màu vàng



Hình 1. Hình thái lá của loài *Scurrula parasitica* L. và 4 loài dễ nhầm lẫn
 a. *Scurrula parasitica*, b. *Dendrophthoe pentandra*,
 c. *Macrosolen cochinchinensis*, d. *M. tricolor*, e. *Taxillus chinensis*



Hình 2. Hình thái hoa của loài *Scurrula parasitica* L. và 4 loài dễ nhầm lẫn
 a. *Scurrula parasitica*, b. *Dendrophthoe pentandra*, c. *Macrosolen cochinchinensis*,
 d. *M. tricolor*, e. *Taxillus chinensis* (Các thước đo trong hình có độ dài là 1 cm)



Hình 3. Hình thái quả của loài *Scurrula parasitica* L. và 4 loài dễ nhầm lẫn

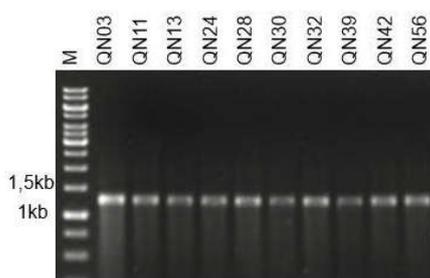
a, c, d, e - Hình thái quả (trái) và quả cắt ngang (phải) của các loài *Scurrula parasitica*, *Macrosolen cochinchinensis*, *M. tricolor*, *Taxillus chinensis*, *b*. Bào hoa cắt dọc của loài *Dendrophthoe pentandra* (các thước đo trong hình có độ dài là 0,5 cm)

Từ kết quả so sánh trên cho thấy loài *Scurrula parasitica* L. phân biệt với 4 loài tầm gửi dễ nhầm lẫn ở các đặc điểm đặc trưng như cây có lông hình sao ở những bộ phận còn non, cuống cụm hoa rất ngắn 2-3 mm, mỗi hoa chỉ có 1 lá bắc, hoa mẫu 4, đối xứng hai bên, cánh hoa dính nhau thành ống tràng, hoa nở theo 1 khe nứt dọc xuống ống tràng, bầu 1 ô.

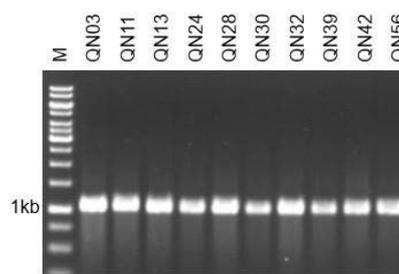
3.2. Kết quả thiết kế và khảo sát các cặp mồi đặc hiệu cho một số vùng mã vạch ở tầm gửi

Một số mã vạch DNA thuộc nhóm "core barcode" bao gồm nrITS, *matK*, *rbcl* và *trnL-trnF* đã được khuếch đại và sử dụng thành công trong phân tích phát sinh loài cho các loài thuộc họ Loranthaceae [7, 13, 16] Tuy nhiên, bộ mồi cho

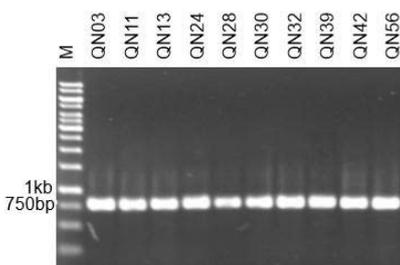
các mã vạch DNA này cho tỷ lệ khuếch đại đặc hiệu thấp trên bộ mẫu tầm gửi thu thập tại Việt Nam. Chính vì vậy trong nghiên cứu này, dựa trên dữ liệu trình tự thu thập được từ Genbank, các cặp mồi đặc hiệu cho một mã vạch gen nhân nrITS và ba vùng mã vạch lục lạp gồm *matK*, *rbcl* và *trnL-trnF* đã được thiết kế mới. Khảo sát trên 18 mẫu tầm gửi, các cặp mồi mới cho thấy hiệu quả khuếch đại đặc hiệu cho các mã vạch nghiên cứu. Các cặp mồi cho kết quả khuếch đại tốt nhất bao gồm Tax-ITS-1734F/Tax-ITS-2535R (cho vùng nrITS), TKS-*matK*-F/TKS-*matK*-Rin2 (cho vùng *matK*), TKS-*rbcl*-Fin/TKS-*rbcl*-R1 (cho vùng *rbcl*), TKS-*trnL-trnF*-F/TKS-*trnL-trnF*-R (cho vùng *trnL-trnF*) (Hình 4).



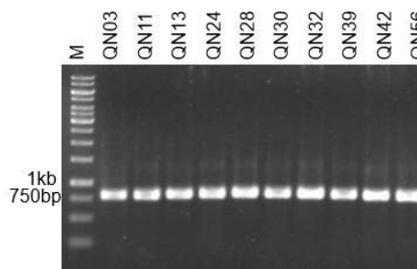
a. Khuếch đại vùng gen *matK* bằng mồi thiết kế cho các mẫu nghiên cứu



b. Khuếch đại vùng gen *rbcl* bằng mồi thiết kế cho các mẫu nghiên cứu



c. Khuếch đại vùng gen *trnL-trnF* bằng mồi thiết kế cho các mẫu nghiên cứu



d. Khuếch đại vùng gen nrITS bằng mồi thiết kế cho các mẫu nghiên cứu

Hình 4. Sản phẩm PCR đặc hiệu bốn vùng mã vạch của một số mẫu tầm gửi

Kết quả nghiên cứu cho thấy các cặp mồi mới thiết kế cho vùng mã vạch nhân nrITS và ba vùng mã vạch lục lạp có tính đặc hiệu và hiệu quả khuếch đại cao trên các mẫu tầm gửi. Điều này khẳng định rằng việc thiết kế mồi chuyên biệt cho nhóm thực vật ký sinh có thể cải thiện đáng kể tỷ lệ thành công so với việc sử dụng các cặp mồi phổ biến vốn được phát triển cho thực vật nói chung.

3.3. Kết quả giải trình tự và phân tích trình tự vùng mã vạch DNA thu được từ các mẫu tầm gửi

Mã vạch DNA là công cụ hiệu quả trong định danh thực vật ở mức độ loài và dưới loài. Đối với nhóm tầm gửi có tính đa dạng cao và hình thái biến động, việc lựa chọn mã vạch DNA phù hợp có vai trò tiên quyết để đảm bảo độ tin cậy cho các phân tích phân loại cũng như các ứng dụng thực tiễn trong bảo tồn và quản lý tài nguyên sinh học. Kết quả giải trình tự Sanger cho thấy hầu hết vùng mã vạch nhân nrITS thu được từ các mẫu tầm gửi (13/18 mẫu) có chất lượng thấp, giản đồ chromatogram cho thấy

xuất hiện nhiều vị trí nhiễu do hiện tượng lệch khung trong quá trình ghi nhận tín hiệu. Điều này xuất phát từ đặc điểm cấu trúc của vùng nrITS ở thực vật: sự hiện diện đồng thời nhiều bản sao (paralogs), hiện tượng tái tổ hợp gen, cũng như các đoạn polymer kéo dài ở vùng 5,8S rDNA gây nhiễu tín hiệu giải trình tự [17]. Đối với 5 mẫu tầm gửi giải trình tự thành công thì chiều dài vùng nrITS thu được biến động từ 351 bp (chỉ là vùng ITS1) đến 886 bp (Bảng 4). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu gần đây, trong đó thống nhất rằng nên tách biệt hai vùng ITS1 và ITS2 khi sử dụng cho phân tích mã vạch DNA, thay vì áp dụng toàn bộ trình tự nrITS, nhằm giảm thiểu nguy cơ nhầm lẫn do các dị bản hoặc tái tổ hợp [18, 19]. Như vậy, mặc dù vùng mã vạch nhân nrITS có thể được khuếch đại đặc hiệu bằng cặp mồi mới thiết kế, số lượng trình tự đạt yêu cầu thấp và không mang tính đại diện nên không được sử dụng cho phân tích đa dạng trình tự giữa các mẫu tầm gửi nghiên cứu.

Bảng 4. Thống kê đặc điểm trình tự mã vạch DNA thu được từ 18 mẫu tầm gửi

TT	Vùng mã vạch DNA	Chiều dài mã vạch (bp)	Chiều dài trình tự giống cột (bp)	Số vị trí đa hình	Mức độ đa dạng trình tự (Pi)
1	nrITS	351 ~ 886	NA	NA	NA
2	matK	859 ~ 1.352	1.079	137	0,06137
3	rbcl	1.189 ~ 1.201	1.190	52	0,01806
4	trnL-trnF	622 ~ 693	719	58	0,03944

Ghi chú: NA – không có dữ liệu.

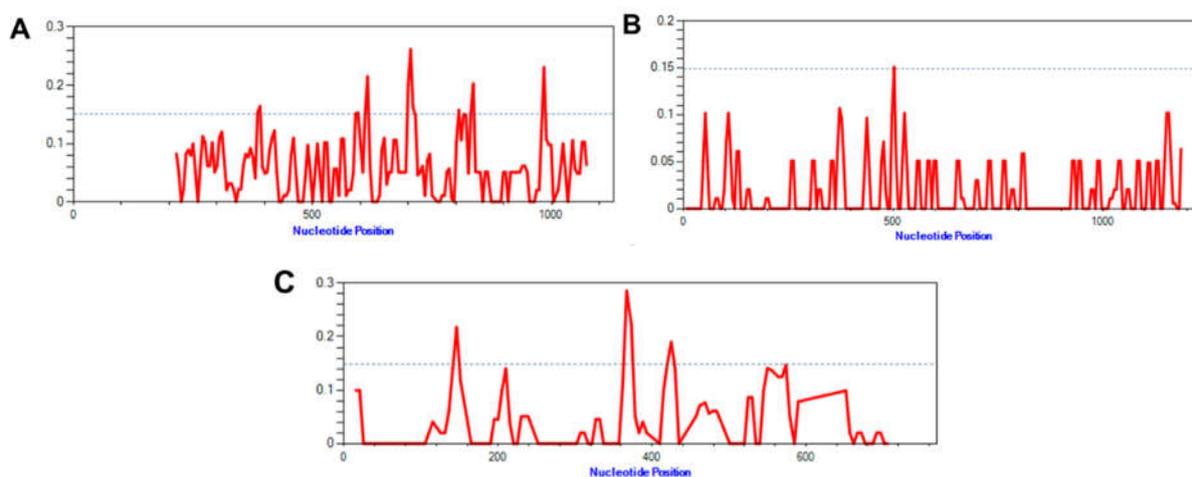
Đối với ba vùng mã vạch lục lạp, kết quả giải trình tự Sanger đều cho chromatogram chất lượng tốt, tỷ lệ base gọi chính xác đạt trên 95%. Sau khi xử lý dữ liệu thu được 18 trình tự hợp lệ cho *matK*, 18 trình tự hợp lệ cho *rbcl* và 18 trình tự hợp lệ cho *trnL-trnF* (tỷ lệ đạt 100% số mẫu tầm gửi nghiên cứu). Chiều dài các mã vạch lần lượt là 859 ~ 1.352 bp (*matK*), 1.189 ~ 1.201 bp (*rbcl*) và 622 ~ 693 (*trnL-trnF*). Sau khi giống cột bằng công cụ MAFFT, chiều dài vùng giống cột (bao gồm các vị trí gián đoạn) có độ bao phủ >75% số trình tự (tương đương 14/18

mẫu) lần lượt là 1.079 bp (*matK*), 1.190 bp (*rbcl*) và 719 bp (*trnL-trnF*) (Bảng 4). Các trình tự thu nhận được đều nằm trong dải chiều dài điển hình của các vùng mã vạch lục lạp chuẩn. Đặc tính ổn định và độ biến đổi thích hợp của các mã vạch lục lạp đã được nhiều công trình xác nhận là nền tảng cho các nghiên cứu phân loại, nhận diện loài và xây dựng hệ thống phân loại phân tử ở thực vật [18, 20].

Phân tích đa dạng trình tự cho thấy vùng mã vạch *matK* có số lượng vị trí đa hình nucleotide và chỉ số đa dạng trình tự (Pi) cao nhất (137 vị

trí, $P_i = 0,06137$), tiếp đến là vùng mã vạch *trnL-trnF* (58 vị trí, $P_i = 0,03944$), và thấp nhất là vùng mã vạch *rbcl* (52 vị trí, $P_i = 0,01806$) (Bảng 4). Căn cứ biểu đồ giá trị đa dạng trình tự P_i , vùng mã vạch *matK* có 7 vị trí đa hình cao ($P_i > 0,015$), vùng mã vạch *trnL-trnF* có 3 vị trí đa hình cao, trong khi vùng mã vạch *rbcl* chỉ có 1 vị trí đa hình cao (Hình 5). Đây là bằng chứng cho thấy *matK* có tiềm năng lớn trong việc phân

biệt các loài tầm gửi gần nhau. Trong khi đó, *rbcl* tuy dễ khuếch đại và ổn định, nhưng độ phân giải thấp ở mức loài. Vùng *trnL-trnF* cũng thể hiện mức độ đa dạng tương đối cao, gibó sung thông tin cho nhận diện loài. Việc kết hợp nhiều vùng mã vạch là cần thiết để tăng độ chính xác, trong đó *rbcl* đóng vai trò hỗ trợ nhờ tính ổn định, còn *matK* và *trnL-trnF* cung cấp độ phân giải cần thiết [7, 13].



Hình 5. Biểu đồ giá trị đa dạng trình tự (P_i) của vùng mã vạch *matK* (A), *rbcl* (B) và *trnL-trnH* (C) của 18 mẫu tầm gửi (Đường kẻ đứt đoạn đánh dấu ngưỡng đa dạng cao ($P_i > 0,015$))

Phân tích đối chiếu BLAST với cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy đối với vùng nrITS, cả 5 mẫu có dữ liệu (QN28, QN46, QN50, QN52 và QN56) đều không xác định đúng tên loài, với mức tương đồng thấp (88–97%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu cho rằng không nên sử dụng nrITS đơn lẻ trong phân tích định danh loài thực vật [13]. Ngược lại, các vùng mã vạch lục lạp cho hiệu quả cao hơn, nhưng vẫn tồn tại những trường hợp nhầm lẫn. Vùng mã vạch *matK* xác định đúng loài ở 17/18 mẫu, tuy nhiên mẫu QN59 có sự nhầm lẫn giữa chi *Dendrophthoe* và *Macrosolen*. Đây là minh chứng cho thấy mặc dù *matK* có độ biến đổi cao và thường được coi là barcode chuẩn cho thực vật, nhưng trong một số nhóm thực vật có quan hệ gần, độ phân giải vẫn chưa đủ để phân biệt chính xác giữa các loài [19]. Vùng *trnL-trnF* cho

kết quả tương tự *matK*, xác định đúng 16/18 mẫu, với hai mẫu QN46 và QN59 cũng bị nhầm lẫn giữa các loài thuộc chi *Dendrophthoe* và *Scurrula*. Điều này cho thấy *trnL-trnF* có độ phân giải khá tốt, nhưng vẫn gặp hạn chế trong các nhóm loài có quan hệ gần. Vùng *rbcl* cho kết quả thấp nhất, chỉ xác định đúng 12/18 mẫu. Đáng chú ý, 6 mẫu (QN28, QN32, QN39, QN50, QN52, QN56) đều nhầm lẫn giữa *Scurrula chingii* và *Scurrula parasitica*, với mức đánh giá BLAST đạt 100%. Điều này phản ánh đặc điểm vốn có của *rbcl*: dễ khuếch đại, ổn định, nhưng độ biến đổi thấp, dẫn đến khó phân biệt các loài gần nhau. Trường hợp nhầm lẫn với mức tương đồng tuyệt đối (100%) cho thấy sự trùng lặp hoặc thiếu dữ liệu tham chiếu đầy đủ trong GenBank cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả định danh (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả BLAST đối chiếu trình tự mã vạch thu được từ 18 mẫu tầm gửi

TT	Ký hiệu	Tên khoa học	Kết quả BLAST của từng mã vạch DNA (Tên loài tương đồng nhất - Mức đánh giá* (mã Genbank))			
			nrITS	matK	rbcl	trnL-trnF
1.	QN03	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 99,9% (MH161425)
2.	QN11	<i>Taxillus chinensis</i>	NA	<i>T. chinensis</i> - 99,9% (OR909707)	<i>T. chinensis</i> - 100% (OR909707)	<i>T. chinensis</i> - 100% (OR909707)
3.	QN13	<i>Macrosolen cochinchinensis</i>	NA	<i>M. cochinchinensis</i> - 99,8% (MH161424)	<i>M. cochinchinensis</i> - 99,9% (MH161424)	<i>M. cochinchinensis</i> - 99,9% (MH161424)
4.	QN24	<i>Taxillus chinensis</i>	NA	<i>T. chinensis</i> - 99,6% (OR909707)	<i>T. chinensis</i> - 99,9% (OR909707)	<i>T. chinensis</i> - 99,6% (OR909707)
5.	QN28	<i>Scurrula parasitica</i>	<i>S. chingii</i> - 95,4% (MW541863)	<i>S. parasitica</i> - 99,9% (OR909708)	<i>S. chingii</i> (OR909709)/ <i>S. parasitica</i> (OR909708) 100%	<i>S. parasitica</i> - 99,8% (OR909708)
6.	QN29	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 99,9% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)
7.	QN30	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 99,9% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)
8.	QN32	<i>Scurrula parasitica</i>	NA	<i>S. parasitica</i> - 99,9% (OR909708)	<i>S. chingii</i> (OR909709)/ <i>S. parasitica</i> (OR909708) 100%	<i>S. parasitica</i> - 100% (OR909708)
9.	QN39	<i>Scurrula parasitica</i>	NA	<i>S. parasitica</i> - 100% (OR909708)	<i>S. chingii</i> (OR909709)/ <i>S. parasitica</i> (OR909708) 100%	<i>S. parasitica</i> - 99,8% (OR909708)
10.	QN42	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 99,1% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)
11.	QN44	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 99,8% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 99,9% (MH161425)
12.	QN46	<i>Dendrophthoe pentandra</i>	<i>D. curvata</i> - 97,9% (OM249619)	<i>M. cochinchinensis</i> - 99,8% (MG808039)	<i>D. pentandra</i> - 100% (PV622733)	<i>M. cochinchinensis</i> - 99,8% (MG808039)
13.	QN48	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)
14.	QN50	<i>Scurrula parasitica</i>	<i>S. chingii</i> - 88,7% (MW541863)	<i>S. parasitica</i> - 99,9% (OR909708)	<i>S. chingii</i> (OR909709)/ <i>S. parasitica</i> (OR909708) 100%	<i>S. parasitica</i> - 100% (OR909708)

TT	Ký hiệu	Tên khoa học	Kết quả BLAST của từng mã vạch DNA (Tên loài tương đồng nhất - Mức đánh giá* (mã Genbank))			
			nrITS	matK	rbcl	trnL-trnF
15.	QN52	<i>Scurrula parasitica</i>	<i>S. chingii</i> - 88,4% (MW541863)	<i>S. parasitica</i> - 88,4% (OR909708)	<i>S. chingii</i> (OR909709)/ <i>S. parasitica</i> (OR909708) 100%	<i>S. parasitica</i> - 100% (OR909708)
16.	QN53	<i>Macrosolen tricolor</i>	NA	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)	<i>M. tricolor</i> - 100% (MH161425)
17.	QN56	<i>Scurrula parasitica</i>	<i>S. chingii</i> - 97,6% (MW541863)	<i>S. parasitica</i> - 100% (MH101514)	<i>S. chingii</i> (OR909709)/ <i>S. parasitica</i> (OR909708) 100%	<i>S. parasitica</i> - 100% (OR909708)
18.	QN59	<i>Dendrophthoe pentandra</i>	NA	<i>S. pulverulenta</i> - 99,6% (EU544452)	<i>D. pentandra</i> - 99,6% (PV622733)	<i>M. cochinchinensis</i> - 99,8% (MG808039)

Ghi chú: NA - không có dữ liệu. Các mã vạch DNA có kết quả BLAST không khớp với định danh loài được đánh dấu nền xám.

Kết quả phân tích BLAST cho thấy hiệu quả định danh loài khác nhau rõ rệt giữa các vùng mã vạch DNA, phản ánh đặc điểm tiến hóa và mức độ biến đổi trình tự của từng vùng. Vùng nrITS cho kết quả kém nhất, không xác định chính xác tên loài cho các mẫu phân tích. Hạn chế này có thể liên quan đến đặc điểm của hệ gen nhân, trong đó nrITS tồn tại dưới dạng nhiều bản sao và chịu ảnh hưởng của đồng nhất hóa không hoàn toàn, lai xa và tái tổ hợp, làm giảm độ ổn định trình tự và độ tin cậy trong định danh loài. Các vùng mã vạch lục lạp cho hiệu quả cao hơn nhưng vẫn xuất hiện một số trường hợp nhầm lẫn. Vùng *matK* xác định đúng phần lớn các mẫu, tuy nhiên độ phân giải có thể chưa đủ để phân biệt các loài có quan hệ phát sinh gần do mức độ khác biệt trình tự hạn chế và hiện tượng chia sẻ haplotype lục lạp. Vùng *rbcl* cho kết quả định danh thấp nhất trong số các vùng lục lạp, với nhiều trường hợp nhầm lẫn mặc dù mức tương đồng BLAST đạt 100%. Điều này phản ánh tính bảo tồn cao và độ biến đổi thấp của *rbcl*, khiến các loài gần nhau có thể sở hữu trình tự giống hệt nhau. Ngoài ra, sự trùng lặp hoặc thiếu hụt dữ liệu tham chiếu trong GenBank cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả định danh.

Bộ dữ liệu mã vạch DNA được xây dựng từ

18 mẫu tầm gửi trong nghiên cứu này là bước khởi đầu quan trọng cho việc hình thành bộ dữ liệu barcode của các loài ký sinh ở Việt Nam. Tuy nhiên, một số mẫu chưa được xác định chính xác bằng BLAST cho thấy mã vạch lục lạp có những giới hạn nhất định. Do đó, cần mở rộng số lượng mẫu và kết hợp bổ sung thêm mã vạch nhân như ITS để tăng độ phân giải, qua đó làm rõ hơn mối quan hệ phát sinh loài giữa các loài tầm gửi, đặc biệt giữa các loài có quan hệ gần trong các chi *Macrosolen* và *Dendrophthoe*.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành so sánh đặc điểm hình thái và phân tích mã vạch DNA của 18 mẫu thuộc các loài tầm gửi ký sinh trên cây Dâu, trong đó có *Scurrula parasitica* L. và bốn loài dễ nhầm lẫn khác. Kết quả cho thấy, *Scurrula parasitica* L. có thể nhận diện chính xác dựa vào các đặc điểm hình thái đặc trưng của hoa, quả và lông che chở. Đặc biệt, phân tích dữ liệu từ bốn mã vạch DNA (*nrITS*, *matK*, *rbcl*, *trnL-trnF*) cho thấy các trình tự lục lạp có khả năng phân biệt tốt giữa các loài tầm gửi nghiên cứu, trong khi trình tự nrITS không phù hợp do khả năng phân biệt loài thấp. Việc xây dựng và bổ sung bộ dữ liệu mã vạch DNA chuẩn của các loài tầm gửi cho Genbank đã góp phần hoàn thiện nguồn dữ liệu tham chiếu, tạo nền tảng cho các

nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen tầm gửi. Bên cạnh đó, tổ hợp *matK* và *trnL-trnF* có thể là mã vạch tham chiếu tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm phát triển công cụ phân tử kiểm định tính đúng loài cho dược liệu Tang ký sinh.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen Tang ký sinh (*Scurrula parasitica* L.) làm dược liệu” (mã số NVQG-2022/ĐT.18, Chương trình bảo tồn và sử dụng bền vững nguồn gen đến năm 2025, định hướng đến năm 2030). Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến các cộng sự tại Viện Dược liệu đã hỗ trợ trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Hội đồng Dược điển (2017). Dược điển Việt Nam V. NXB Y học. 1044.
- [2]. Phạm Thanh Huyền, Lại Việt Hưng, Đặng Minh Tú & Nguyễn Khương Duy (2020). Đặc điểm hình thái và bột dược liệu của một số loài cây thuốc ký sinh trên cây dâu. Tạp chí Nghiên cứu Y Dược học cổ truyền Việt Nam. 66: 85-96.
- [3]. Chun Tao Che, Hon Yeung Cheung, Robert Law, Guo An Luo, Ricky Yk Man, Karl Wk Tsim, Bao Qin Wang, Kwok Yin Wong & Zhong Zhen Zhao (2010). Hong Kong Chinese materia medica standards (English version).
- [4]. YH Li, JL Ruan, SL Chen, Jingyuan Song, Kun Luo, Dong Lu & Hui Yao (2010). Authentication of *Taxillus chinensis* using DNA barcoding technique. J Med Plants Res. 4(24): 2706-2709.
- [5]. Dequan Zhang, Yongshou Yang, Bei Jiang, Duan Lizhen & Nong Zhou (2014). How to correctly identify herbal materials in market: a case study based on DNA barcodes. African Journal of Traditional, Complementary Alternative Medicines. 11(6): 66-76.
- [6]. Zainal Muttaqin, Sri Wilarso Budi, Basuki Wasis, Corryanti Corryanti & Iskandar Zulkarnaen Siregar (2017). DNA Barcode Characterization of Mistletoe Infestation in Teak Clonal Seed Orchard (Cso) in Padangan, East Java province, Indonesia. Biotropia. 24(2): 140-152.
- [7]. Chi Toan Le, Limin Lu, Van Du Nguyen, Zhiduan Chen, Wyckliffe Omondi Omollo & Bing Liu (2024). Phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Scurrulinae* (Loranthaceae): new insights into the circumscription of the genus *Taxillus*. BMC Plant Biology. 24(1): 440.
- [8]. Nguyễn Nghĩa Thìn (2007). Các phương pháp nghiên cứu thực vật. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội. 171.
- [9]. Nguyễn Tiến Bản (1994). Họ Tầm gửi (Loranthaceae Juss.) trong hệ thực vật Việt Nam. Tạp chí Sinh học. 16(4): 47-54.
- [10]. H. S. Qiu & Gilbert M. G. (2003). Flora of China. 5. Ulmaceae through Basellaceae. Science Press.
- [11]. Trần Đức Trung, Nguyễn Thị Thu Hằng, Đào Thu Hường, Tạ Hồng Lĩnh, Nguyễn Thị Lan Hoa, Phạm Thanh Huyền, Trần Thị Huệ Hương & Nguyễn Hoàng (2024). Nghiên cứu phát triển chỉ thị phân tử SSR đặc hiệu họ gen NBS-LRR cho chanh leo *Passiflora edulis* Sims. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 66(3): 31-37
- [12]. Jun Wen & Elizabeth A Zimmer (1996). Phylogeny and biogeography of *Panax* L.(the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Molecular phylogenetics evolution. 6(2): 167-177.
- [13]. Romina Vidal-Russell & Daniel L Nickrent (2008). The first mistletoes: origins of aerial parasitism in Santalales. Molecular phylogenetics. 47(2): 523-537.
- [14]. P Taberlet (1991). Universal primers for amplifications of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology. 42: 51-57.
- [15]. T. L. H. Nguyen, K. D. Nguyen, V. H. Lai, T. H. Pham, D. T. Tran, H. Nguyen, V. T. Phan, Q. N. Nguyen, M. T. Dang, M. P. Nham & T. T. L. Le (2022). Confirmation of the presence of *Drynaria sparsisora* (Desv.) T. Moore in Vietnam: Evidence based on morphological and molecular data. Journal of Medicinal Materials. 27(6): 373-378.
- [16]. Carol A Wilson & Clyde L Calvin (2006). An origin of aerial branch parasitism in the mistletoe family, Loranthaceae. American Journal of Botany. 93(5): 787-796.
- [17]. Kathleen M Kay, Justen B Whittall & Scott A Hodges (2006). A survey of nuclear ribosomal internal transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular clock with life history effects. BMC Evolutionary Biology. 6(1): 36.
- [18]. China Plant BOL Group, DZ Li, LM Gao, HT Li, H Wang, XJ Ge, JQ Liu, ZD Chen, SL Zhou & SL Chen (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America. 19641-19646.
- [19]. Peter M Hollingsworth, De-Zhu Li, Michelle van der Bank & Alex D Twyford (2016). Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 371(1702): 20150338.
- [20]. CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. Proc Natl Acad Sci US A. 12794-12797.