Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2026.015

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ ĐỂ PHÂN BIỆT BA LOÀI CÂY THUỐC DỄ NHẦM LẪN THUỘC CHI BA BÉT (*Mallotus* Lour.)

Nguyễn Diệp Anh, Nguyễn Thị Thu, Trương Khánh Huyền, Kiều Bảo My, Trần Thị Thùy Anh, Lã Thị Thùy, Nguyễn Anh Đức, Tô Thanh Thúy, Trần Đức Long và Nguyễn Thị Kim Thanh*
Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): nguyenthikimthanh@hus.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 15/05/2025
Sửa bài (Revised): 04/08/2025
Duyệt đăng (Accepted): 11/12/2025

Title: *Application of molecular markers to distinguish three easily confused medicinal plant species of the genus Mallotus Lour*

Author(s): *Nguyen Diep Anh, Nguyen Thi Thu, Truong Khanh Huyen, Kieu Bao My, Tran Thi Thuy Anh, La Thi Thuy, Nguyen Anh Duc, To Thanh Thuy, Tran Duc Long and Nguyen Thi Kim Thanh*

Affiliation(s): *Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Viet Nam*

TÓM TẮT

Chi Ba bét (Mallotus) có nhiều loài giống nhau về hình thái, dễ bị nhầm lẫn. Trong đó, ba loài M. floribundus, M. peltatus và M. philippensis là những loài có giá trị làm thuốc, có vùng phân bố rộng và có hình thái cơ quan sinh dưỡng tương tự nhau, dễ nhầm lẫn trong quá trình thu hái. Chỉ thị DNA đang được dùng ngày càng nhiều và có thể giúp xác định đúng loài ngay cả khi thiếu chuyên gia phân loại hình thái. Trong nghiên cứu này, ba chỉ thị DNA cốt lõi cho thực vật là rbcL, matK và ITS được nghiên cứu để phân biệt ba loài dược liệu có hình thái tương tự là M. floribundus, M. peltatus và M. philippensis. Kết quả cho thấy tổ hợp ba chỉ thị ITS, rbcL và matK hoặc tổ hợp hai chỉ thị ITS và rbcL hoặc ITS và matK hoặc chỉ riêng chỉ thị ITS hoặc một phần của ITS là ITS1 hoặc ITS2 có thể dùng để phân biệt ba loài Ba bét này.

Từ khóa: *Chỉ thị DNA, định danh, Mallotus*

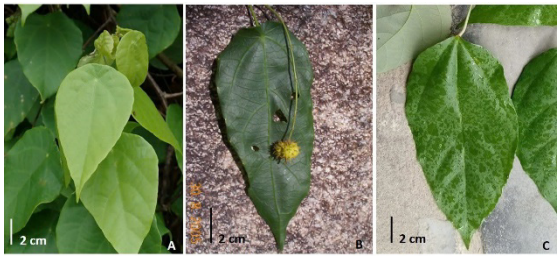
ABSTRACT

The genus Mallotus has many species with similar morphologies, making them easily confused. Among these, M. floribundus, M. peltatus, and M. philippensis are valuable medicinal plants with a wide distribution range and similar morphologies, leading to confusion during harvesting. DNA markers are increasingly used to accurately identify species, reducing the reliance on classification experts. In this study, three core DNA barcodes for plants, rbcL, matK, and ITS were studied to distinguish the three morphologically similar medicinal species M. floribundus, M. peltatus, and M. philippensis. The results show that the combination of the three markers ITS, rbcL, and matK, or the combination of the two markers ITS and rbcL, or ITS and matK, or ITS alone, or a part of ITS such as ITS1 or ITS2, can be used to differentiate these three Mallotus species.

Keywords: *DNA markers, identification, Mallotus*

1. GIỚI THIỆU

Chi Ba bét (*Mallotus* Lour.) thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae), gồm 33 loài ở Việt Nam (Nguyen, 2007). Trong số đó, 11 loài Ba bét có giá trị làm thuốc, đặc biệt ba loài bục lá sáp (*M. floribundus* (Blume) Müll. Arg.), cánh kiến (*Mallotus philippensis* (Lam.) Müll. Arg.) và bục lọng (*M. peltatus* (Geiseler) Müll. Arg.) là những cây thuốc có vùng phân bố rộng khắp cả nước và được sử dụng để chữa nhiều bệnh trong dân gian (Nguyen et al., 2022; Do, 2000; Vo, 2012). *M. philippensis* được dùng để giảm đau, sát trùng, cầm máu, chữa các bệnh ngoài da; *M. floribundus* được dùng để chữa sốt, trị tiêu chảy, nhiễm trùng phụ khoa (Rivière et al., 2010); *M. peltatus* ăn sống để chữa đau bụng (Bhargava, 1983). Các nghiên cứu hóa sinh cho thấy ba loài này sinh tổng hợp nhiều hợp chất có dược tính cao. Cụ thể, *M. floribundus* chứa nhiều tannins có khả năng chống oxy hóa (Nguyen et al., 2011; Nguyen et al., 2009). *M. peltatus* có chứa các hợp chất như axit ursolic và β- sitosterol có tác dụng kháng khuẩn, bảo vệ gan, hạ sốt (Chattopadhyay et al., 2002, 2003). *M. philippensis* có chứa rottlerin có tác dụng kháng viêm, ức chế protein kinase và chống ung thư (Furusawa et al., 2005; Yin et al., 2016; Liao et al., 2005), mallotophilippen F có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh lao (Nguyen et al., 2010).



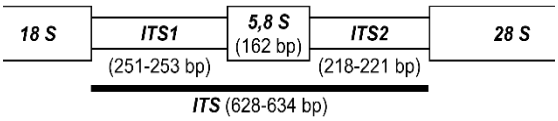
Hình 1. Hình thái lá giống nhau của các loài nghiên cứu

A. M. floribundus, B. M. peltatus, C. M. philippensis.

Theo hệ thống phân loại về hình thái, loài *M. philippensis* thuộc nhánh *Philippinenses* (với quả phủ dày đặc tuyến hạt; có ba gân gốc, khi khô không có mùi hắc), còn hai loài *M. peltatus* và *M. floribundus* thuộc nhánh *Stylanthus* (với quả có tuyến hạt rải rác hoặc không; lá mọc gần như đối ở đầu cành, gân lông chim hoặc chân vịt 5 - 9 gân gốc, khi khô có mùi hắc) (Nguyen, 2007). Trong tự nhiên, do ảnh hưởng của điều kiện sống, ba loài này có nhiều dạng hình thái thân và lá tương tự nhau nên người thu hái dược liệu rất dễ nhận diện nhầm (Hình 1), đặc biệt là khi thu hái vào mùa không có hoa, quả. Cụ thể, cả ba loài đều là các cây gỗ nhỏ hoặc cây bụi, lá mọc so le hoặc mọc đối/gần đối; hình dạng lá hình trứng thuôn, gốc lá tròn, chót lá có mũi, mép lá phẳng hoặc có gợn răng cưa nông. Riêng loài *M. peltatus* lá có thể dạng lọng, gân chân vịt giống lá của loài *M. floribundus* hoặc không dạng lọng, ba gân gốc giống lá *M. philippensis.* Khu vực phân bố của ba loài xen lẫn nhau làm tăng nguy cơ thu hái nhầm. Để khai thác tài nguyên cây thuốc hợp lý, việc xác định chính xác loài thực vật là một trong những yêu cầu quan trọng. Việc định danh loài bằng chỉ thị DNA là phương pháp hiệu quả, có thể được thực hiện trên mẫu mô nhỏ, không nguyên vẹn như dược liệu đã sơ chế.

Kết quả nghiên cứu các chỉ thị DNA khác nhau ở trên nhiều loài thực vật cho thấy không có một chỉ thị DNA toàn năng có khả năng phân biệt được tất cả các loài. Tổ hợp nhiều chỉ thị DNA thường được sử dụng phối hợp. Bốn chỉ thị *trnL-F* (*trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer), *ITS* (rDNA internal transcribed spacer), *ncpGS* (glutamine synthetase) và *phyC* (phytochrome C) được dùng để nghiên cứu phát sinh chủng loại của chi Ba bét và một số chi khác thuộc họ Thầu dầu (Kulju et al., 2007). Kết quả cho thấy chi Ba bét không phải là một nhóm đơn nguồn (monophyly). Chi Ba bét có thể được biến thành nhóm đơn nguồn nếu tách các loài thuộc nhánh *Hancea* và *Oliganthae* ra khỏi chi và gộp các loài thuộc chi *Coccoceras*, *Neotrewia*, *Octospermum* và có thể cả *Trewia* vào chi Ba bét (Kulju et al., 2007). Sau đó, hai chỉ thị khác là *matK* (maturase K) và *gpd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) được kết hợp với đặc điểm hình thái để phân tích phát sinh chủng loại trong nội bộ chi Ba bét (Sierra et al., 2010). Ba nhánh *Mallotus*, *Polyadenii* và *Stylanthus* là các nhóm đơn nguồn; còn ba nhánh *Philippinenses*, *Axenfeldia* và *Rottleropsis* không đơn nguồn. Ngoài ra, có thể lập thêm vài nhánh khác trong chi Ba bét dựa trên phát sinh chủng loại (Sierra et al., 2010). Trên cơ sở đánh giá riêng rẽ từng chỉ thị DNA hay tổ hợp gồm hai hoặc ba chỉ thị DNA lục lạp, tổ hợp hai chỉ thị *matK* và *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) đã được đề xuất làm bộ chỉ thị DNA tối thiểu để định danh thực vật (Hollingsworth et al., 2009). Kết quả nghiên cứu thêm chỉ thị *ITS* và *ITS2* (Hình 2) cho thấy *ITS* có thể phân biệt được 96% số loài, còn *ITS2* phân biệt được 90% số loài trong số 871 loài thuộc họ Thầu dầu (Pang et al., 2010). Sau đó, *ITS* được đề xuất bổ sung vào bộ chỉ thị cốt lõi cùng với *matK* và *rbcL* dựa trên kết quả phân tích trên gần 1800 loài thực vật (Li et al., 2011). Bộ chỉ thị cốt lõi này đã giúp

khẳng định khu vực phân bố mới của loài *M. tokiae* ở Myanmar (Toyama et al., 2020). Gần đây, hai chỉ thị *ITS* và *matK* được dùng làm minh chứng cho việc thiết lập loài mới *Mallotus bullatus* (Yu et al., 2024).



Hình 2. Cấu trúc chỉ thị *ITS*

Trong nghiên cứu này, ba chỉ thị cốt lõi của thực vật *matK*, *rbcL* và *ITS* được giải trình tự và đánh giá khả năng phân biệt ba loài *M. philippensis*, *M. peltatus* và *M. floribundus*. Kết quả nghiên cứu cho thấy bộ ba chỉ thị, bộ hai chỉ thị bao gồm *ITS* hay riêng chỉ thị *ITS/ITS1/ITS2* đơn lẻ đều phân biệt được ba loài có hình thái dễ nhầm lẫn này. Đây là công bố đầu tiên về ứng dụng chỉ thị DNA nhằm phân biệt các loài thuộc chi Ba bét ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Sáu mẫu của loài *M. floribundus*, 14 mẫu của loài *M. peltatus* và 11 mẫu của loài *M. philippensis* được thu hái trực tiếp từ các khu vực khác nhau ở Việt Nam (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách mẫu và địa điểm thu mẫu

STT	Tên loài	Địa điểm thu mẫu	Số lượng mẫu	Ký hiệu mẫu
1	*M. floribundus*	Đà Nẵng	06	Mflo04, Mflo05, Mflo06, Mflo07, Mflo08, Mflo09
2	*M. peltatus*	Đồng Nai	02	Mpel01, Mpel03
		Kiên Giang	01	Mpel02
		Bình Định	09	Mpel04, Mpel05, Mpel06, Mpel07, Mpel08, Mpel09, Mpel1, Mpel12, Mpel13
		Khánh Hòa	01	Mpel14
		Ninh Thuận	01	Mpel15
3	*M. philippensis*	Hải Phòng	03	Mphi01, Mphi11, Mphi12
		Kiên Giang	01	Mphi05
		Hà Nội	06	Mphi02, Mphi03, Mphi06; Mphi07, Mphi08, Mphi09
		Quảng Ninh	01	Mphi14

2.2. Phương pháp hình thái so sánh

Tên khoa học của các mẫu vật được xác định bằng phương pháp hình thái so sánh: các mẫu được phân tích hình thái, so sánh với mô tả gốc, hình ảnh mẫu chuẩn (type) và tham khảo các tài liệu về phân loại học, các Thực vật chí của Trung Quốc, Thái Lan (Welzen & Chayamarit, 2007; Wu et al., 2008).

2.3. Phương pháp phân tích chỉ thị DNA

DNA được tách chiết từ mẫu lá theo phương pháp của Liu et al. (2000) Click or tap here to enter text.với một số điều chỉnh về thời gian ủ mẫu và ly tâm. Khoảng 10 - 25 mg mẫu được nghiền trong 500 µl đệm chiết (Tris-HCl 400 mM pH 8,0, EDTA 60 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS 1%) trong ống vi ly tâm 1,5 ml và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, 150 µl CH_3COOK 3M pH 4,8 được bổ sung vào đệm chiết và trộn đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Dung dịch được ly tâm ở nhiệt độ phòng với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút rồi 450 µl dịch nổi được chuyển sang sang ống 1,5 ml mới. Tiếp đó, 450 µl isopropanol 100% được bổ sung vào vào ống, trộn đều và ủ ở 4 ^oC trong 10 phút để tăng hiệu suất kết tủa DNA. Kết tủa DNA được thu nhận bằng ly tâm ở nhiệt độ phòng với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút rồi được rửa bằng 500 µl ethanol 70% và để khô tự nhiên. Cuối cùng, DNA được hòa tan trong 50 µl TE 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0), bảo quản ở -20^oC và dùng làm khuôn để nhân bản các chỉ thị *rbcL, matK* và *ITS* bằng PCR. Đoạn gen *rbcL* được nhân bản bằng cặp mồi 5'ATGTCACCACAAACAGAGAC3'/5'CCTTCCATACTTCACAAGCAG3'; *matK* bằng cặp mồi 5'TCTTCTTTAGGAAGGTCAGAG3'/5'GCGAAATAGAAGAAACTCTTGG3' hoặc cặp mồi 5'TCAAATCCTTCGCTATTGGG3'/5'GCGAAATAGAAGAAACTCTTGG3' (chung mồi ngược); *ITS* bằng cặp mồi 5'GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG3'/5'TGATATGCTTAAACTCAGCGG3' hoặc cặp mồi 5'ATGGTCCGGTGAAGTGTTCG3'/5'TGATATGCTTAAACTCAGCGG3' (chung mồi ngược). Các mồi này được nhóm nghiên cứu thiết kế mới hoàn toàn hoặc biến đổi từ mồi của nhóm nghiên cứu khác, ví dụ mồi 5'ATGGTCCGGTGAAGTGTTCG3' được tạo thành bằng cách loại bỏ 08 nucleotide ở đầu 5' mồi 17SE của Sun et al. (1994)Click or tap here to enter text.. Sản phẩm nhân bản được giải trình tự bởi công

ty 1st Base (Malaysia) theo hai chiều đối với chỉ thị *rbcL*, một chiều đối với chỉ thị *matK* bằng mồi ngược. Đoạn *ITS* của một số mẫu được giải trình tự theo cả hai chiều, các mẫu khác được giải trình tự theo một chiều bằng mồi xuôi. Các vị trí nucleotide có điểm chất lượng (Phred score) nhỏ hơn 30 được loại bỏ. Công cụ BLAST (Altschul et al., 1990) được sử dụng để tìm kiếm các trình tự tương đồng trong ngân hàng gen. Trình tự chỉ thị DNA của các loài thuộc chi Ba bét có ở Việt Nam được thu nhận (Bảng 2) cùng với trình tự ba chỉ thị *rbcL, matK* và *ITS* của loài *Macaranga tanarius* thuộc chi gần với chi Ba bét làm nhóm ngoài (outgroup).

Bảng 2. Các trình tự tham khảo thu nhận từ Ngân hàng gen

STT	Tên loài	*rbcL*	*matK*	*ITS*
1	*M. apelta*	KP094220.1	KP093310.1	KP092932.1
2	*M. barbatus*	KR529656.1	EF582633.1	DQ866591.1
3	*M. decipiens*	không có	EF582644.1	DQ866596.1
4	*M. floribundus*	JF738574.1	không có	AJ275677.1
5	*M. glabriusculus*	AB925308.1	AB924698.1	không có
6	*M. japonicus*	LC694464.1	MT447323.1	MT444828.1
7	*M. khasianus*	không có	EF582650.1	DQ866601.1
8	*M. macrostachyus*	OM837710.1	EF582656.1	DQ866604.1
9	*M. mollissimus*	KM895720.1	EF582662.1	không có
10	*M. nanus*	AB925750.1	AB925120.1	không có
11	*M. paniculatus*	KP094351.1	EF582671.1	DQ866609.1
12	*M. peltatus*	MN885802.1	EF582672.1	DQ866610.1
13	*M. philippensis*	KP094430.1	EF582674.1	DQ866614.1
14	*M. pierrei*	không có	EF582675.1	DQ866615.1
15	*M. repandus*	KP094979.1	EF582678.1	DQ866617.1
16	*M. resinosus*	không có	EF582679.1	DQ866618.1
17	*M. tetracoccus*	KR529670.1	không có	MG762734.1
18	*M. thorelii*	không có	không có	DQ866624.1
19	*Macaranga tanarius*	AB233866.1	EF582630.1	DQ866585.1

Các trình tự được dóng cột (align) bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999) và ước tính khoảng cách di truyền *p*-distance ($p = n_d/n$) bằng phần mềm MEGA11 (Tamura et al., 2021). Mô hình tiến hóa phân tử được phân tích bằng phần mềm jModelTest 2 (Darriba et al., 2012). Mô hình tiến hóa phân tử TrN+G được dùng để phân tích trình tự *ITS*, mô hình K80 cho trình tự *rbcL* và mô hình TPM1uf cho trình tự *matK*. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp suy luận Bayes (Bayes inference) bằng phần mềm MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012) với riêng lẻ từng trình tự hoặc kết hợp hai hoặc ba chỉ thị DNA với nhau. Hai chuỗi Markov Monte Carlo (MCMC) được khởi chạy trên hai cây khởi đầu riêng rẽ với 10 triệu thế hệ, thu nhận kết quả mỗi 500 thế hệ và phân tích mỗi 5000 thế hệ để tìm ra cây đồng thuận cuối cùng. Kết quả cây phát sinh chủng loại được hiển thị bằng phần mềm FigTree.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích khoảng cách di truyền

Ba chỉ thị *rbcL, matK* và *ITS* được nhân bản và giải trình tự. Kết quả giải trình tự thu được khoảng 1.200 bp trình tự *rbcL* của 6/6 mẫu *M. floribundus*, 14/14 mẫu *M. peltatus* và 6/11 mẫu *M. philippensis*; ~1.000 bp trình tự *matK* của 6/6 mẫu *M. floribundus*, 10/14 mẫu *M. peltatus* và 6/11 mẫu *M. philippensis*; ~700 bp trình tự *ITS* của 6/6 mẫu *M. floribundus*, 12/14 mẫu *M. peltatus* và 11/11 mẫu *M. philippensis* (Bảng 3).

Ngân hàng gen có trình tự *rbcL* và *ITS* của cả ba loài *M. floribundus, M. peltatus* và *M. philippensis*, nhưng không có trình tự *matK* của loài *M. floribundus* (Bảng 2). Sau khi dóng cột và loại bỏ những vùng thiếu dữ liệu trình tự nucleotide, độ dài của chỉ thị *rbcL, matK* và *ITS* dùng cho phân tích lần lượt là 427 bp, 622 bp và 678 bp. Khoảng cách di truyền được ước tính trong nội bộ loài và giữa ba loài phân tích dựa trên từng chỉ thị riêng lẻ hoặc các tổ hợp hai hoặc ba chỉ thị *rbcL, matK* và *ITS.*

Bảng 3. Thống kê trình tự DNA của các mẫu nghiên cứu.

Tên loài	Các mẫu được giải trình tự thành công		
	rbcL	*matK*	*ITS*
M. floribundus	Mflo04, Mflo05, Mflo06, Mflo07, Mflo08, Mflo09	Mflo04, Mflo05, Mflo06, Mflo07, Mflo08, Mflo09	Mflo04, Mflo05, Mflo06, Mflo07, Mflo08, Mflo09
M. peltatus	Mpel01, Mpel02, Mpel03, Mpel04, Mpel05, Mpel06, Mpel07, Mpel08, Mpel09, Mpel10, Mpel12, Mpel13, Mpel14, Mpel15	Mpel01, Mpel02, Mpel03, Mpel04, Mpel06, Mpel07, Mpel10, Mpel12, Mpel13, Mpel15	Mpel01, Mpel02, Mpel03, Mpel04, Mpel05, Mpel06, Mpel07, Mpel08, Mpel12, Mpel13, Mpel14, Mpel15
M. philippensis	Mphi01, Mphi05, Mphi06, Mphi07, Mphi08, Mphi14	Mphi01, Mphi05, Mphi06, Mphi07, Mphi08, Mphi14	Mphi01, Mphi02, Mphi03, Mphi05, Mphi06, Mphi07, Mphi08, Mphi09, Mphi11, Mphi12, Mphi14

Kết quả phân tích cho thấy *p*-distance giữa các loài lớn hơn nhiều so với khoảng cách di truyền giữa các cá thể cùng loài (Bảng 4). Cụ thể, khoảng cách di truyền nhỏ nhất giữa các cặp loài dựa trên chỉ thị *ITS* là 6,441%, trong khi khoảng cách di truyền lớn nhất trong nội bộ mỗi loài là 3,170%, khác biệt đủ lớn để có thể phân biệt ba loài bằng chỉ thị *ITS*. Ngoài ra, khác biệt rõ ràng về khoảng cách di truyền trong nội bộ loài và giữa các loài cũng được thể hiện khi sử dụng các tổ hợp chỉ thị bao gồm *ITS* như *ITS* + *rbcL* (2,659% và 4,008%), *ITS* + *matK* (1,387% và 3,249%) và *ITS* + *rbcL* + *matK* (1,452% và 2,533%) (Bảng 4). Với số mẫu mỗi loài đủ lớn, có thể xác định được chính xác hơn giá trị giới hạn giúp phân biệt được các mẫu cùng loài hay khác loài và có thể dùng *p*-distance tính theo trình tự *ITS* hay các tổ hợp trình tự chứa *ITS* để phân biệt ba loài *M. floribundus, M. peltatus* và *M. philippensis*.

Bảng 4. *p*-distance (%) giữa ba loài nghiên cứu dựa trên các tổ hợp trình tự có *ITS*

	M. floribundus	***M. peltatus***	***M. philippensis***
		ITS	
M. floribundus	0,000 -3,170		
M. peltatus	6,441 - 8,333	0,000 - 1,917	
M. philippensis	10,789 - 11,765	10,161 - 11,727	0,000 - 1,274
		ITS + rbcL	
M. floribundus	0,000 - 2,268		
M. peltatus	4,008 - 5,709	0,000 - 1,331	
M. philippensis	6,340 - 8,815	6,339 - 8,815	0,000 - 2,659
		ITS + matK	
M. floribundus	0,000 - 0,081		
M. peltatus	3,249 - 4,461	0,000 - 1,387	
M. philippensis	5,719 - 6.618	5,835 - 6,742	0,000 - 0,889
		ITS + rbcL + matK	
M. floribundus	0,000 - 0,060		
M. peltatus	2,533 - 3,735	0,000 - 1,452	
M. philippensis	4,482 - 5,162	4,576 - 5,549	0,000 - 0,781

Ghi chú: Giá trị trong các ô được tô xám là p-distance giữa các cá thể trong cùng một loài.

Ngoài ra, để đánh giá khoảng cách di truyền giữa ba loài nghiên cứu với các loài khác trong chi Ba bét, *p*-distance được ước tính dựa trên trình tự *ITS* (Bảng 5). Khoảng cách giữa một số loài khác thuộc chi Ba bét với các mẫu thuộc loài *M. floribundus* nằm trong khoảng 4,662% - 15,147%, với các mẫu thuộc loài *M. peltatus* 7,496% - 14,566%, với các mẫu thuộc loài *M. philippensis* 9,018% - 14,984%. Loài *M. floribundus* và loài *M. peltatus* có khoảng cách di truyền nhỏ nhất với loài *M. thorelii*, với *p*-distance lần lượt là 4,662% - 5,873% và 7,496% - 8,267%. Loài *M. philippensis* có khoảng cách di truyền nhỏ nhất với loài *M. repandus* với *p*-distance 7,656% - 8,082%. Kết quả này tương đồng với phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự *ITS*, trong đó ba loài *M. floribundus*, loài *M. peltatus* và *M. thorelii* tạo thành một nhóm đơn nguồn còn hai loài *M. philippensis* và *M. repandus* tạo thành một nhóm

đơn nguồn khác (Hình 4). Điều thú vị là *p*-distance giữa năm loài *M. apelta*, *M. paniculatus*, *M. japonicus*, *M. barbatus* và *M. macrostachyus* còn nhỏ hơn *p*-distance trong nội bộ loài *M. floribundus* (Bảng 5).

Bảng 5. *p*-distance (%) giữa một số loài thuộc chi Ba bét (*Mallotus*) dựa trên trình tự *ITS*

		1	2	3	4	5	6
1	*M. floribundus*	0,000-3,160					
2	*M. peltatus*	6,441-8,814	0,000-1,917				
3	*M. philippensis*	9,740-11,410	9,677-11,252	0,000-1,274			
4	*M. apelta*	12,077-13,514	11,962-12,878	12,320-13,196			
5	*M. barbatus*	12,077-13,514	11,661-12,719	11,840-12,719	1,752		
6	*M. decipiens*	12,825-13,782	12,742-13,622	12,439-13,323	15,781	16,103	
7	*M. japonicus*	11,736-13,175	11,324-12,381	12,121-13,016	1,749	1,272	15,434
8	*M. khasianus*	8,828-9,984	7,656-8,772	9,585-10,493	8,439	8,599	12,520
9	*M. macrostachyus*	12,560-13,990	12,141-13,419	13,120-14,013	2,707	2,866	16,747
10	*M. paniculatus*	13,043-14,149	12,600-13,514	12,80013,990	0,954	2,389	16,747
11	*M. pierrei*	12,862-13,810	11,34212,381	11,502-12,222	14,195	14,673	12,660
12	*M. repandus*	10,433-11,410	10,367-11,587	7,656-8,082	10,510	10,828	12,862
13	*M. resinosus*	11,840-12,796	10,652-11,551	12,179-12,995	12,719	12,719	11,502
14	*M. tetracoccus*	14,191-15,147	13,421-14,566	14,098-14,984	4,568	4,568	17,327
15	*M. thorelii*	4,662-5,873	7,496-8,267	9,018-9,713	14,035	13,898	14,148
16	*Macaranga tanarius*	13,183-14,127	11,661-12,719	10,789-11,483	11,483	11,164	14,654

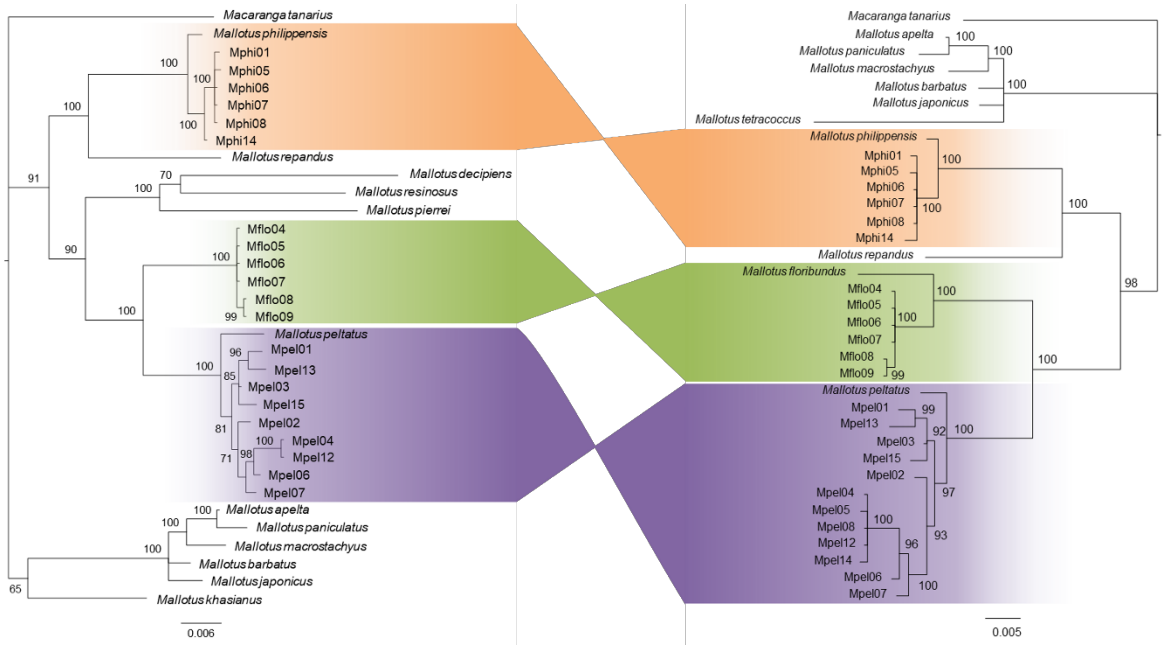
		7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	*M. floribundus*									
2	*M. peltatus*									
3	*M. philippensis*									
4	*M. apelta*									
5	*M. barbatus*									
6	*M. decipiens*									
7	*M. japonicus*									
8	*M. khasianus*	7,949								
9	*M. macrostachyus*	2,544	9,554							
10	*M. paniculatus*	2,703	9,395	3,662						
11	*M. pierrei*	14,013	11,606	14,992	14,992					
12	*M. repandus*	10,175	9,683	11,306	11,465	11,447				
13	*M. resinosus*	12,222	9,968	13,672	13,196	10,127	10,460			
14	*M. tetracoccus*	3,909	10,604	5,057	5,546	15,686	12,398	14,658		
15	*M. thorelii*	13,557	10,510	14,217	14,514	14,013	10,669	12,678	15,548	
16	*Macaranga tanarius*	10,828	9,713	11,164	12,440	14,195	10,987	13,175	13,399	13,876

Ghi chú: Giá trị trong ba cột 1-3 là là khoảng giá trị p-distance tối thiểu-tối đa giữa các mẫu thuộc ba loài nghiên cứu với trình tự tham khảo của các loài khác, trừ ba ô được tô xám là p-distance giữa các mẫu trong nội bộ loài.

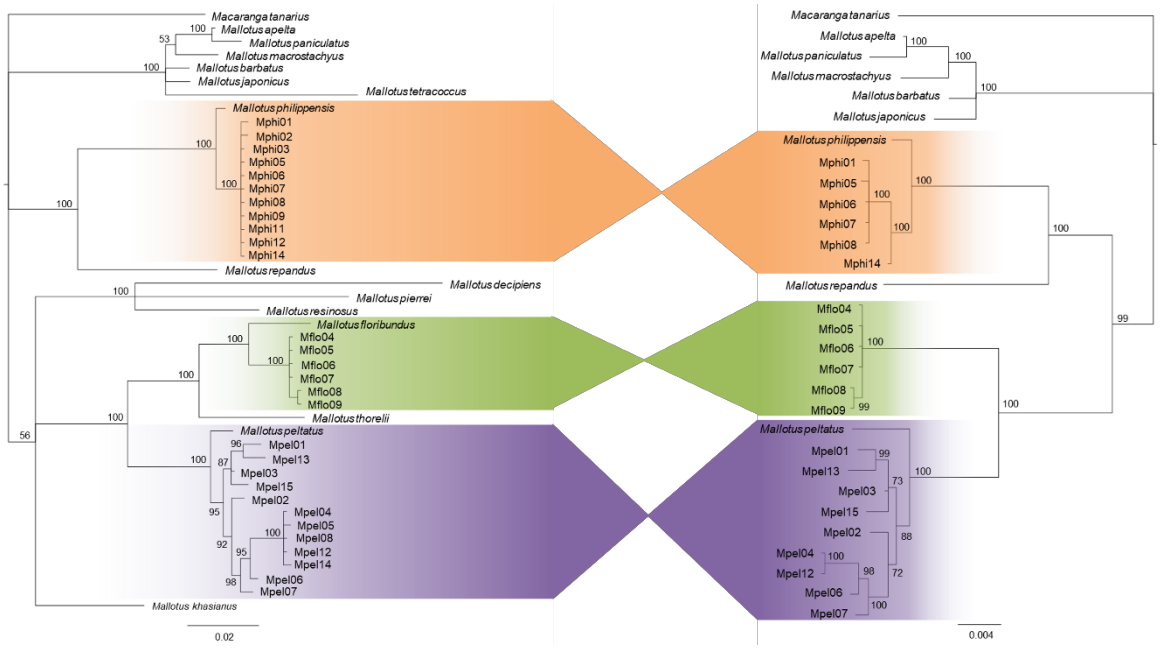
3.2. Phân tích phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Suy luận Bayes sử dụng trình tự *ITS* đơn lẻ hoặc một trong các tổ hợp *ITS* + *rbcL, ITS* + *matK,* hoặc *ITS* + *rbcL*+ *matK*. Các cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị *ITS* hoặc tổ hợp chứa *ITS* đều thể hiện mối quan hệ tiến hóa tương tự như nhau giữa ba loài phân tích (Hình 3 và Hình 4). Các mẫu thuộc cùng một trong ba loài tạo thành một nhóm đơn nguồn riêng biệt với nhóm đơn nguồn của loài khác với xác suất hậu nghiệm 100%. Như vậy, trình tự *ITS* đơn lẻ hoặc các tổ hợp *ITS* + *rbcL, ITS* + *matK* hoặc *ITS* + *rbcL*+ *matK* có thể dùng để phân biệt ba loài *M. floribundus, M. peltatus* và *M. philippensis*. Ngoài ra, hai loài *M. floribundus* và *M. peltatus* có quan hệ gần gũi với nhau hơn so với loài *M. philippensis*. Điều này phù hợp với phân loại hình thái trong đó *M. floribundus* và *M. peltatus* thuộc nhánh *Stylanthus* trong khi loài *M. philippensis* thuộc nhánh *Philippinenses*. Thêm vào đó, năm loài *M. apelta*, *M. paniculatus*, *M. japonicus*, *M. barbatus* và *M. macrostachyus* luôn thuộc cùng một nhóm

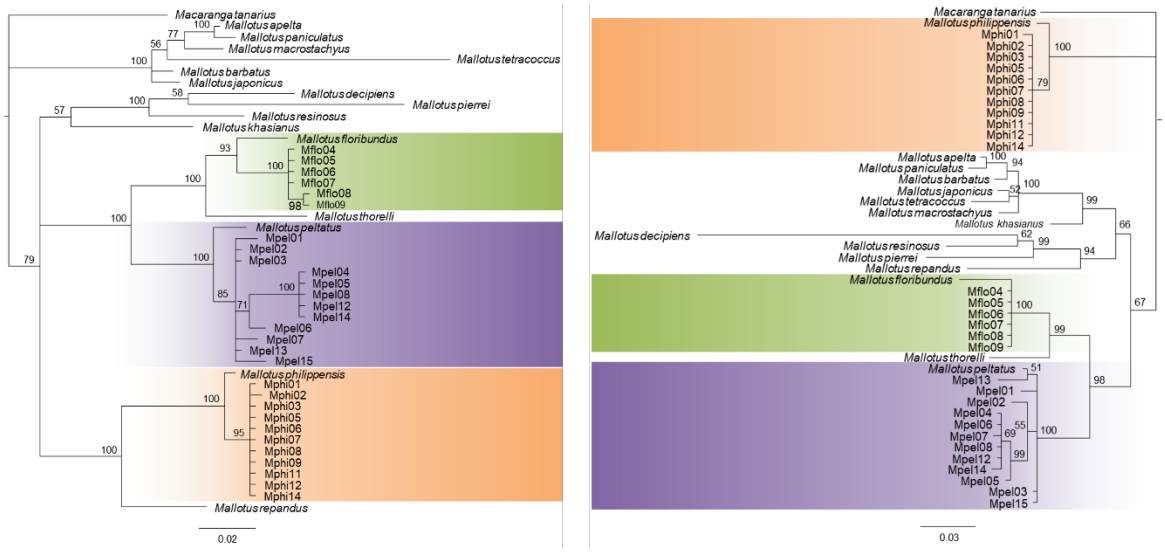
đơn nguồn ở cả bốn cây phát sinh chủng loại dựa trên các trình tự khác nhau với xác suất hậu nghiệm 100% (Hình 3 và Hình 4), phù hợp với hệ thống phân loại bằng hình thái với các loài này cùng thuộc cùng nhánh *Mallotus* của chi Ba bét (Nguyen, 2007).



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự *ITS* + *matK* (trái) hoặc *ITS* + *rbcL* (phải)



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự *ITS* (trái) hoặc *ITS* + *rbcL* + *matK* (phải)



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự *ITS1* (trái) hoặc *ITS2* (phải)

3.3. Phân tích riêng rẽ *ITS1* hoặc *ITS2*

Trình tự *ITS* bao gồm *ITS1*, gen mã hóa 5,8S rRNA và *ITS2* (Hình 2). Trình tự *ITS* đủ ngắn để có thể nhân bản bằng PCR và giải trình tự theo phương pháp Sanger. Tuy nhiên, đoạn trình tự ngắn hơn có thể thuận lợi hơn cho phân tích nếu vẫn có khả năng phân biệt được các loài. Do đó, *ITS1* hoặc *ITS2* đôi khi được sử dụng riêng rẽ để xác định một số loài sinh vật. Kết quả ước tính *p*-distance dựa trên *ITS1* hoặc *ITS2* cho thấy khác biệt rõ rệt giữa khoảng cách di truyền nội bộ loài và giữa các loài (Bảng 6). Cụ thể, *ITS1* có khoảng cách *p*-distance nội bộ loài 0,000% - 4,762%, giữa các loài 9,312% - 16,000% trong khi *ITS2* có *p*-distance nội bộ loài 0,000% - 4,977% và giữa các loài 6,481% - 14,220% (Bảng 6). Khác biệt giữa *p*-distance trong nội bộ loài và giữa các loài ở cả *ITS1* và *ITS2* đều đủ lớn để phân biệt được ba loài này.

Bảng 6. *p*-distance (%) dựa trên trình tự *ITS1* hoặc *ITS2*

	M. floribundus	*M. peltatus*	*M. philippensis*
		ITS1	
M. floribundus	0,000 - 4,762		
M. peltatus	9,312 - 11,600	0,000 - 2,834	
M. philippensis	13,944 - 15,956	13,878 - 16,000	0,000 - 1,186
		ITS2	
M. floribundus	0,000 - 3,241		
M. peltatus	6,481 - 12,329	0,000 - 4,977	
M. philippensis	11,005 - 14,220	10,377 - 14,220	0,000 - 2,347

Ghi chú : Giá trị trong các ô được tô xám là p-distance giữa các cá thể trong cùng một loài.

Kết quả phân tích phát sinh chủng loại cho thấy trình tự *ITS1* hoặc *ITS2* đều phân tách các mẫu của mỗi một trong ba loài *M. floribundus, M. peltatus* và *M. philippensis* thành nhóm đơn nguồn tách biệt với hai loài còn lại với xác suất hậu nghiệm 100% (ngoại trừ nhánh *M. floribundus* của cây *ITS1* có xác suất hậu nghiệm 93%) (Hình 5). Hai loài *M. floribundus* và *M. peltatus* vẫn có quan hệ gần gũi với nhau hơn so với loài *M. philippensis*. Tuy nhiên, quan hệ tiến hóa giữa ba loài này với một số loài khác trong chi Ba bét thay đổi khi phân tích trình tự *ITS1* hoặc *ITS2* (Hình 5). Hai loài *M. floribundus* và *M. peltatus* gần gũi với loài *M. philippensis* hơn so với năm loài là *M. apelta*, *M. paniculatus*, *M. japonicus*, *M. barbatus* và *M. macrostachyus* khi phân tích *ITS1* nhưng lại gần gũi với năm loài này hơn loài *M. philippensis* khi phân tích *ITS2*, gợi ý tốc độ tiến hóa khác nhau của *ITS1* và *ITS2* ở các loài phân tích, phù hợp với giá trị *p*-distance giữa các loài này (Bảng 6).

3.4. Thảo luận

Ba loài bục lá sáp (*M. floribundus* (Blume) Müll. Arg.), cánh kiến (*Mallotus philippensis* (Lam.) Müll. Arg.) và bục lọng (*M. peltatus* (Geiseler) Müll. Arg.) là những cây thuốc có vùng phân bố rộng và tương đối giống nhau về đặc điểm hình thái, dễ gây nhầm lẫn trong quá trình thu hái. Việc sử dụng chỉ thị phân tử có ưu điểm giúp phân biệt chính xác, có độ lặp lại cao các mẫu dược liệu mà không nhất thiết cần đến chuyên gia phân loại hình thái và có thể phân tích các mẫu thực vật nhỏ, không nguyên vẹn, không đầy đủ các bộ phận của cây như mẫu dược liệu đã được sơ chế. Kết quả nghiên cứu trên ba chỉ thị *matK*, *rbcL* và *ITS* cho thấy trình tự *ITS* đơn lẻ cũng như các tổ hợp trình tự có *ITS* khác như *ITS* + *matK*, *ITS* + *rbcL*, *ITS* + *matK* + *rbcL* giúp phân biệt được các mẫu thuộc một trong ba loài này. Ngoài ra, một phần của *ITS* là *ITS1* hoặc *ITS2* cũng giúp phân biệt được ba loài này. Với kích thước ngắn hơn tương đối nhiều so với *ITS*, *ITS1* hoặc *ITS2* có thể được nhân bản và giải trình tự thuận lợi hơn. Ngân hàng gen hiện có 63 trình tự chứa *ITS2* và 50 trình tự chứa *ITS1* của các loài thuộc chi Ba bét. Với nhiều dữ liệu hơn, trình tự *ITS2* có ưu thế hơn trình tự *ITS1* để phân biệt các loài thuộc chi Ba bét, tương tự như đề xuất *ITS2* cần được sử dụng để định danh các loài thuộc họ Thầu dầu (Pang et al., 2010).

4. KẾT LUẬN

Tổ hợp ba chỉ thị *ITS* + *matK* + *rbcL*, hai chỉ thị *ITS* + *matK* hoặc *ITS* + *rbcL*, hoặc chỉ riêng một chỉ *ITS*, *ITS1* hoặc *ITS2* đều có khả năng phân biệt được ba loài dược liệu dễ nhầm lẫn là bục lá sáp (*M. floribundus* (Blume) Müll. Arg.), cánh kiến (*M. philippensis* (Lam.) Müll. Arg.) và bục lọng (*M. peltatus* (Geiseler) Müll. Arg.). Sự khác biệt giữa các mẫu thuộc ba loài này có thể được xác định thông qua *p*-distance cũng như cây phát sinh chủng loại. Tuy nhiên, việc phân tích cần được thực hiện thêm trên nhiều mẫu cùng loài để xác định được giá trị giới hạn của *p*-distance.

LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài mã số QG.23.01 của Đại học Quốc gia Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Bhargava, N. (1983). Ethnobotanical studies of the tribes of Andaman and Nicobar Islands, India. I. Onge. *Economic Botany*, 37, 110-119. https://doi.org/10.1007/BF02859311

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A. B., Sur, T. K., Mandal, S. C., & Bhattacharya, S. K. (2002). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: Mallotus peltatus leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *82*(2–3):229-237. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00165-4

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, S. C., Bhadra, R., & Mandal, A. B. (2003). CNS activity of the methanol extract of Mallotus peltatus (Geist) Muell Arg. leaf: An ethnomedicine of Onge. *Journal of Ethnopharmacology*, *85*(1), 99-105. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00379-3

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109

Do, T. L. (2000). *Medicinal plants and medicine in Vietnam*. Ha Noi Medical Publisher (*in Vietnamese*).

Furusawa, M., Ido, Y., Tanaka, T., Ito, T., Nakaya, K. I., Ibrahim, I., Ohyama, M., Iinuma, M., Shirataka, Y., & Takahashi, Y. (2005). Novel, complex flavonoids from Mallotus philippensis (kamala tree). *Helvetica Chimica Acta*, *88*(5), 1048-1058. https://doi.org/10.1002/hlca.200590076

Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K. J., John Kress, W., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., Bogarin, D., & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(31), 12794-12797 https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106

Hong, Q., Minter, D. E., Franzblau, S. G., Arfan, M., Amin, H., & Reinecke, M. G. (2010). Anti-tuberculosis compounds from Mallotus philippinensis. *Natural Product*

Communications, *5*(2), 211-217. https://doi.org/10.1177/1934578x1000500208

Kulju, K. K. M., Sierra, S. E. C., Draisma, S. G. A., Samuel, R., & Van Welzen, P. C. (2007). Molecular phylogeny of Macaranga, Mallotus, and related genera (Euphorbiaceae s.s.): Insights from plastid and nuclear DNA sequence data. *American Journal of Botany*, *94*(10), 1726-1743. https://doi.org/10.3732/ajb.94.10.1726

Li, D. Z., Gao, L. M., Li, H. T., Wang, H., Ge, X. J., Liu, J. Q., Chen, Z. D., Zhou, S. L., Chen, S. L., Yang, J. B., Fu, C. X., Zeng, C. X., Yan, H. F., Zhu, Y. J., Sun, Y. S., Chen, S. Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., & Duan, G. W. (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*, *108*(49), 19641-19646. https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108

Liao, Y. F., Hung, Y. C., Chang, W. H., Tsay, G. J., Hour, T. C., Hung, H. C., & Liu, G. Y. (2005). The PKC delta inhibitor, rottlerin, induces apoptosis of haematopoietic cell lines through mitochondrial membrane depolarization and caspases' cascade. *Life Sciences*, *77*(6), 707-719. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.01.010

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(1), 471. https://doi.org/10.1128/jcm.38.1.471-471.2000

Nguyen, H. A., SeonJu, P., Do, T. T., Duong, T. H. Y., Bui, H. T., Pham, H. Y., Phan. V. K. Kiem, Pham, T. C., Nguyen X. N. (2022). Genus Mallotus (Euphorbiaceae): a review on traditonal medicinal use, phytochemistry, and biological activities. *Vietnam Journal of Science and Technology*, *60*(2), 141-174. https://doi.org/10.15625/2525-2518/16634

Nguyen, H. N., Dejaegher, B., Tistaert, C., Nguyen, T. H. V., Rivière, C., Chataigné, G., Phan Van, K., Chau, V. M., Quetin-Leclercq, J., & Vander Heyden, Y. (2009). Development of HPLC fingerprints for Mallotus species extracts and evaluation of the peaks responsible for their antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *50*(5), 753-763. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.06.016

Nguyen, N. T. (2007). *Taxonomy of Euphorbiaceae in Vietnam*, 179–202. Vietnam National University Publishers, Hanoi.

Nguyen, T. H. V., Rivière, C., Tran. H. Q., Chataigné, G., Nguyen, H. N., Dejaegher, B., Tistaert, C., Nguyen, T. K. T., Phan, V. K., Vander Heyden, Y., Chau, V. M. , & Quetin-Leclercq, J. (2011). Identification by LC-ESI-MS of flavonoids responsible for the antioxidant properties of Mallotus species from Vietnam. *Natural Product Communications*, *6*(6), 813-818. https://doi.org/10.1177/1934578x1100600616

Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xie, C., & Chen, S. (2010). Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Medica*, *76*(15), 1784-1786. https://doi.org/10.1055/s-0030-1249806

Rivière, C., Nguyen, T. H. V., Tran, H. Q., Chataigné, G., Nguyen, H. N., Dejaegher, B., Tistaert, C., Nguyen, T. K. T., Vander Heyden, Y., Chau, V. M., & Quetin-Leclercq, J. (2010). Mallotus species from Vietnamese mountainous areas: Phytochemistry and pharmacological activities. *Phytochemistry Reviews, 9*(2), 217-253. https://doi.org/10.1007/s11101-009-9152-6

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542. https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYS029

Sierra, S. E. C., Kulju, K. K. M., Fišer, Ž., Aparicio, M., & van Welzen, P. C. (2010). The phylogeny of Mallotus s.str. (Euphorbiaceae) inferred from DNA sequence and morphological data. *Taxon*, *59*(1), 101-116. https://doi.org/10.1002/tax.591011

Sun, Y., Skinner, D. Z., Liang, G. H., & Hulbert, S. H. (1994). Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 26-32. https://doi.org/10.1007/BF00226978

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022-3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Toyama, H., Aung, M. M., Tagane, S., Naiki, A., Suddee, S., Nagamasu, H., Nagahama, A., Win, S., Tanaka, N., & Yahara, T. (2020). Contributions to the flora of Myanmar V: A new record of Mallotus tokiae (Euphorbiaceae) with the description of flower morphology from Lampi Island. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, *48*(1), 1-6. https://doi.org/10.20531/tfb.2020.48.1.01

Vo, V. C. (2012). *Dictionary of medicinal plants in Vietnam*. Vietnam: Medical Publishing House (*in Vietnamese*).

Welzen, P. C., & Chayamarit, K. (2007). *Flora of Thailand, Volume 8, Part 2: Euphorbiaceae*

(Genera G-Z) | NHBS Academic & Professional Books. The Forest Herbarium, National Park, Wildlife & Plant Conservation Department.

Wu, Z. Y., Raven, P. H., & Hong, D.Y. (2008). *Flora of China*, *Volume 11: Oxalidaceae through Aceraceae.* P. R. China and Missouri Botanical Garden Press.

Wurdack, K. J., Hoffmann, P., & Chase, M. W. (2005). Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. *American Journal of Botany*, *92*(8), 1397-1420. https://doi.org/10.3732/ajb.92.8.1397

Yin, X., Zhang, Y., Su, J., Hou, Y., Wang, L., Ye, X., Zhao, Z., Zhou, X., Li, Y., & Wang, Z. (2016). Rottlerin exerts its anti-tumor activity through inhibition of Skp2 in breast cancer cells. *Oncotarget*, *7*(41), 66512-66524. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11614

Yu, J. H., Chen, Z. R., An, M. T., Yu, D. L., Liu, F., Xu, J., Tang, Y. B., Wang, Y. R., & Zou, H. K. (2024). Mallotus bullatus (Euphorbiaceae), a new species from Southwest China based on morphological characters and phylogenetic evidence. *PhytoKeys*, 249, 13-25 https://phytokeys.pensoft.net/article/131824/