

ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA BẢY MẪU GIỐNG NHA ĐAM Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG DỰA VÀO HÌNH THÁI VÀ DẤU PHÂN TỬ ITS

ĐỖ VĂN MÃI¹, TRƯƠNG TRỌNG NGÔN^{2*}, THIỀU VĂN ĐƯỜNG¹,

Tóm tắt

Lô hội hay Nha đam (*Aloe sp.*) là loại cây quý không những dùng làm thuốc trong y học mà chúng còn được chế biến nhiều dạng nước uống khác nhau. Loài này có nguồn gốc từ Bắc Phi, chúng hiện nay được trồng khá phổ biến tại các tỉnh vùng đồng bằng sông Cửu Long. Bảy mẫu giống nha đam nam Mỹ đã sưu tập và được trồng trong chậu theo kiểu bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, trong nhà lưới thí nghiệm tại Cần Thơ. Kết quả cho thấy về mặt hình thái dạng, màu sắc lá cũng như dạng và màu sắc hoa đều không thay đổi. Đánh giá 5 đặc tính nông học cho thấy chiều cao thân và chiều dài rễ tương đối biến động nhiều. Trong khi đó, kích thước hoa ít biến động nhất. Kết quả phân tích kiểu gen dựa vào trình tự vùng gen ITS cho thấy bảy mẫu đều có chỉ số tương đồng cao với loài *Aloe vera*. Dựa vào cây phả hệ bảy mẫu giống được xếp thành 3 nhóm rõ rệt, trong đó nhóm I chiếm đa số với 3 mẫu giống, trong khi đó nhóm II và nhóm III chỉ có 2 mẫu giống.

Từ khóa: Nha đam, dấu ITS, cây phủ hệ

Abstract

Aloe vera (*Aloe sp.*) is a value plant that is not only used as medicine but also processed for many different forms of drinking. This species is origin from North Africa, it is now widely grown in the Mekong Delta. Seven samples of *Aloe vera* from South American were collected and grown in pots with three replications with a completely randomized design, in net house at Can Tho. The results showed that leaf shape and color as well as flower form and color did not change. Evaluation of five agronomic characteristics showed that the stem height and root length were relatively variable. Meanwhile, flower size was the least variable. Through genotype analysis based on the ITS1 gene region sequence showed that seven samples had high similarity index with *Aloe vera* species. Based on the phylogenetic tree, the seven samples were classified into three distinct groups, of which group I accounted for three samples of three provinces; meanwhile, there are two samples in group II and III.

Keywords: *Aloe sp.*, ITS marker, phylogenetic tree

¹ Đại học Tây Đô

² Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Trọng Ngôn (email: ttngon@ctu.edu.vn)

1. DẪN NHẬP

Nha đam (*Aloe sp.*) hay còn gọi Lô hội có nguồn gốc từ châu Phi chúng thuộc họ Aloeaceae (Liliaceae) (1). Loài hoa màu này hiện nay đang được trồng khá rộng rãi ở các tỉnh thuộc vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Nha đam là một loại hoa màu được trồng khá phổ biến với nhiều mục đích sử dụng khác nhau. Từ lâu chúng chỉ được dùng làm cây cảnh và để chữa một số bệnh thông thường ngoài da do chúng có chứa nhiều dược tính bên trong lá. Bên cạnh đó, chúng cũng được chế biến các loại nước uống giải khát, gần đây nhiều đặc tính quý hiếm của nha đam được công bố và áp dụng (2,3,4,5). Hiện nay ở nước ta đa số nha đam được trồng chủ yếu có 3 nhóm giống: nha đam nam Mỹ, nha đam Thái Lan và nha đam Việt Nam, nhưng phần lớn là nha đam nam Mỹ (lá to) và nha đam Việt Nam (lá nhỏ). Tuy nhiên, cho đến nay việc nghiên cứu về giống/loài này chưa được chú trọng nhiều và có hệ thống. Nhằm đáp ứng nhu cầu về khai thác nguồn dược liệu hiện nay cũng như chế biến áp dụng hiện nay như nước uống giải khát v.v... Ở thực vật, ngoài việc phân tích dựa vào hình thái bên ngoài, việc phân tích kiểu gen dựa vào dấu phân tử (markers) đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu xác định mối quan hệ phát sinh chủng loại (phylogeny), phân loại (taxonomy) và nhận dạng loài (identity) cũng thường sử dụng (6,7). Đặc biệt trên cây nha đam các dấu phân tử cũng được dùng (8). Đặc biệt vùng gen ITS (Internal Transcribed Spacer) đã được thực hiện và áp dụng (9,10,11). DNA ribosome nhân (rDNAs) mã hóa cho ba vùng gen rRNA (18S, 23S và 26S) (12), vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) xác định các vùng gen rRNA chuyên biệt. Nhiều nghiên cứu

chỉ ra rằng trái với vùng gen mã hóa, vùng ITS biểu hiện nhiều biến dị cả về chiều dài và trình tự. Các vùng ITS1 và ITS2 rất hữu ích trong việc xác định loài hay quần thể và được dùng như dấu phân tử giúp xác định mối quan hệ di truyền cũng như phân tích di truyền quần thể ở thực vật (13; 14;15). Nhằm bước đầu tìm hiểu mối quan hệ di truyền giữa tám mẫu giống nha đam có nguồn gốc nam Mỹ dựa vào đặc điểm hình thái và dấu phân tử ITS1, từ đó bổ sung nguồn gen nhằm đa dạng hóa nguồn giống nha đam địa phương, đồng thời một chiến lược phù hợp nhằm nhân giống, và khai thác nguồn gen đạt hiệu quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Các mẫu giống nha đam nam Mỹ trồng tại tám điểm bao gồm An Giang, Bạc Liêu, Cần Thơ, Hồng Ngự-Đồng Tháp, An Biên-Kiên Giang, Sóc Trăng, và Phú Quốc-Kiên Giang. Mỗi địa điểm tiến hành khảo sát và thu các mẫu với độ tuổi cây trung bình từ 6-8 tháng. Sau đó đem về và trồng trong chậu. Mỗi mẫu giống trồng trong 3 chậu riêng và được lặp lại 3 lần. Như vậy mỗi mẫu giống được trồng tất cả tổng cộng là 9 chậu. Mỗi chậu có kích thước như sau: đường kính 40cm, đáy 30cm và chiều cao khoảng 25cm. Đất được chuẩn bị bằng cách pha trộn với tỷ lệ 2/3 đất sạch TRiBAT do Công ty TNHH Công nghệ Sinh học Sài Gòn xanh sản xuất, trộn với 1/3 tro trấu sau đó được trộn đều trước khi cho vào chậu để trồng.... Thời gian đã được thực hiện từ tháng 01/2020 đến tháng 06/2021.

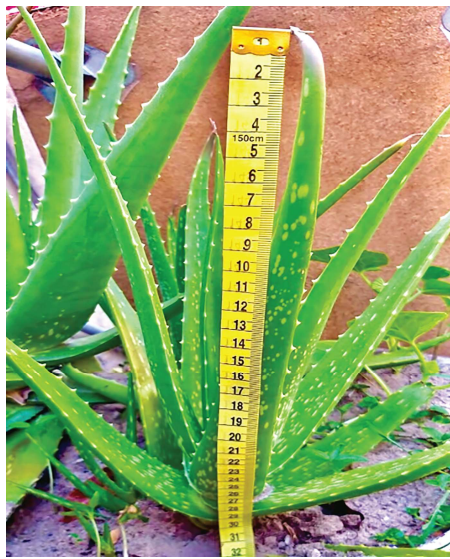
Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (Complete Random Design-CRD) với tám nghiệm thức là bảy mẫu giống sưu tập ở các tỉnh vùng ĐBSCL. Các chỉ tiêu

nông học cũng như quan sát hình thái được đánh giá trên 6 cây mẫu sau một năm cây phát triển.

2.2. Phương pháp hình thái

Về mặt hình thái đối với nha đam, các phần thường được chú trọng là lá, và hoa. Các quan sát và mô tả hình thái cây dựa vào các phương pháp nghiên cứu thực vật của Nguyễn

Nghĩa Thìn (2006) (16) có cải tiến, các bộ phận mô tả và đo đếm bao gồm rễ, thân, lá, hoa, quả. Các chỉ tiêu hình thái bao gồm: chiều cao cây được mô tả và cách đo như trình bày ở Hình 1; chiều dài và chiều rộng lá được mô tả và đo như ở Hình 2. Kích thước hoa được mô tả và đo như trong Hình 3. Hình 4 trình bày cách đo chiều dài rễ.



Hình 1. Đo chiều cao thân (cm)



Hình 2. Đo chiều dài và rộng lá (cm)



Hình 3. Đo kích thước hoa (cm)



Hình 4. Đo chiều dài rễ (cm)

2.3. Phương pháp phân tử

Các mẫu lá non và tươi được thu và trữ lạnh ở -20°C . Việc tách chiết DNA được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ. DNA toàn phần của tám mẫu giống nha đam được ly trích từ các mẫu lá tươi theo quy trình tách chiết bằng phương pháp CTAB có cải

ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCGCGG-3' (300 ~340 bp)

Phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) được thực hiện với 35 chu kỳ gia nhiệt. Mỗi chu kỳ bao gồm 3 bước cụ thể như sau: bước 1 biến tính (denature) với 5 phút 60 giây ở 95°C ; bước 2 bắt cặp mồi (annealing) kéo dài 50 giây ở 54°C ; và bước 3 kéo dài 90 giây ở 72°C . Sau 35 chu kỳ, kéo dài chuỗi trong 5 phút ở 72°C , và các sản phẩm PCR (trung bình từ 300~340pb) được trữ ở 10°C trong 20 phút. Điện di sản phẩm PCR rồi tinh chế bằng bộ kit Wizard SV gel và PCR Clean-up System (Promega). Dựa theo phương pháp Sanger (19). Việc giải trình tự cho vùng gen *ITS1* được thực hiện bởi công ty DNA Sequencing Services General Order Information, Hàn Quốc trên máy đọc trình tự tự động.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu hình thái và nông học được tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (Standard deviation-SD) bằng phần mềm Microsoft Excell 10.0. Phân đoạn ADN khuếch đại (base pairs-bp) được tính toán bằng phần mềm Gel Analyzer. Kết quả giải trình tự đoạn ITS1 được lưu trữ dạng FASTA và các trình tự ITS của tám mẫu được canh hàng (alignment) bằng phần mềm BioEdit ver. 7.0.5. Sau đó bằng phương pháp BLAST trên hệ thống ngân hàng

tiến (17). Sau khi tinh sạch việc kiểm tra chất lượng DNA bằng điện di trên gel agarose 1%; sau khi điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm redsafe (Biobasic, UK).

Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài đã được thực hiện với cặp mồi và giải trình tự cho vùng gen *ITS* (18), trình tự của cặp mồi như sau:

gen NCBI (National Center for Biotechnology Information) dùng cho việc nhận diện loài. Cây phá hệ được vẽ bằng phần mềm Mega 7.0 để xác định mối quan hệ di truyền giữa tám mẫu giống Nha đam đã sưu tập.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Đặc tính hình thái và nông học

Các đặc điểm hình thái và nông học chủ yếu là dạng lá (màu sắc và kích thước) và dạng hoa (màu và kích thước). Sau khi thu thập và trồng trong chậu được 1 năm, kết quả các đặc điểm hình thái và đặc tính nông học của tám mẫu giống nha đam sưu tập ở đồng bằng sông Cửu Long được trình bày ở Bảng 1. Về hình thái lá, các lá có dạng dài, bẹ lá to, và nặng. Lá có nhiều gai nhọn ở bìa, mặt sau lá thường có phấn trắng. Về màu sắc lá được ghi nhận màu xanh đậm đối với tất cả các mẫu. Hoa nha đam mọc ra từ nách lá, có cuống dài, đâm thẳng lên trời. Hoa nha đam mọc theo cụm với nhiều hoa rũ xuống. Mỗi hoa 6 cánh dính nhau ở phần gốc và có 6 nhị. Quả là dạng quả nang, chứa nhiều hạt. Về màu sắc hoa được ghi nhận màu vàng cam (20). Như vậy, đứng về mặt hình thái tám mẫu giống nha đam sưu tập hầu như không khác biệt nhiều. Sự biến động nhiều được ghi nhận ở các đặc tính nông học.6

Chiều cao thân dao động từ 22,4cm (Bạc Liêu) đến 50,6cm (Phú Quốc). Kết quả này phù hợp với các kết quả đã công bố trước đây (*Từ điển Bách Khoa Dược học*) (21) trung bình là 39,07cm, dao động từ 30 - 1,0m (riêng loài *Aloe ferox* Mill. Có thân cao từ 2-5m).

Chiều dài trung bình lá là 39,2 cm, biến thiên từ 30,8 cm (Sóc Trăng) đến 48,4 cm (Phú Quốc, và An Biên, Kiên Giang). Kết quả này phù hợp với các kết quả đã công bố trước đây (*Từ điển Bách Khoa Dược học*) (21) dao động từ 30-60cm. Trong khi đó chiều rộng lá biến thiên từ 2,5 cm (Sóc Trăng) đến 5,0 cm (Phú Quốc, Kiên Giang), kết quả này cho thấy nhỏ

hơn các kết quả đã công bố (*Từ điển Bách Khoa Dược học*) (21), với chiều rộng ở gốc là 10cm.

Chiều dài rễ trung bình là 19,5 cm, ngắn nhất là 15,28 cm (Phú Tân-An Giang) và dài nhất 26,2 cm (Hồng Ngự-Đồng Tháp; và An Biên-Kiên Giang). Chưa tìm thấy kết quả này công bố trong *Từ điển Bách Khoa Dược học* (21).

Kích thước trung bình hoa là 3,5cm. kích thước này dao động từ 3,3cm (Cần Thơ) đến 4,04 cm (Phú Quốc, Kiên Giang). Chưa thấy kết quả nào được công bố trong *Từ điển Bách khoa Dược học* (21).

Bảng 1. Đặc điểm nông học của bảy mẫu giống nha đam nam Mỹ được dùng trong thí nghiệm
(đơn vị: cm).

Tỉnh/Địa điểm	Chiều cao thân	Chiều dài lá	Chiều rộng lá	Kích thước hoa	Kích thước rễ
Q. Cái Răng, Cần Thơ	35,0 ± 3,67	36,1 ± 2.07	3,90 ± 0.27	3,30 ± 0.35	25,30 ± 2.68
H. Phú Tân, An Giang	40,7 ± 1,06	43,5 ± 1.66	4,80 ± 0.35	3,42 ± 0.51	15,28 ± 1.39
Tp. Sóc Trăng, Sóc Trăng	48,0 ± 0.71	30,8 ± 0.57	2,50 ± 0.50	3,50 ± 0.35	22,0 ± 0.71
H. Hòa Bình, Bạc Liêu	22,4 ± 1.14	35,4 ± 4.94	2,68 ± 2.28	3,88 ± 0.99	15,4 ± 1.14
Phú Quốc, Kiên Giang	50,6 ± 5.77	48,4 ± 5.86	5,00 ± 0.79	4.04 ± 0.76	23,6 ± 4.39
Tx. Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp	38,4 ± 2.88	36,8 ± 1.92	3,72 ± 0.56	3,44 ± 0.44	26,2 ± 3.42
H. An Biên, Kiên Giang	38,4 ± 2.88	48,4 ± 5.86	3,72 ± 0.56	3,44 ± 0.44	26,2 ± 3.42

Ghi chú: các giá trị là trung bình đo của 6 cây mẫu và trình bày (Mean ± SD)

3.2. So sánh trình tự tương đồng

Kết quả so sánh trình tự ITS với ngân hàng NCBI được trình bày ở Bảng 2. Đa số các trình tự của bảy mẫu giống/loài Nha đam

đều cho giá trị tương đồng cao, thấp nhất 80,26% (L7- Tx Hồng Ngự, Đồng Tháp) và cao nhất 99,17% (L1- Q. Cái Răng, Thành phố Cần Thơ).

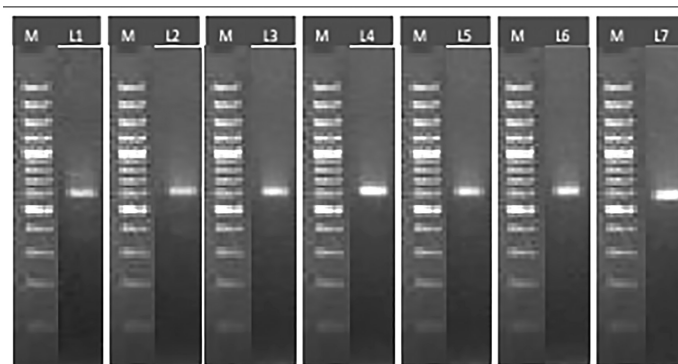
Bảng 2. Giá trị tương đồng của 7 giống/loài Nha đam khi so sánh trình tự trên ngân hàng NCBI

Giống/loài	Địa điểm	Ngân hàng NCBI	Giá trị tương đồng	Tác giả
L1	Quận Cái Răng, TP. Cần Thơ	<i>Aloe vera</i> ITS 1	99,17%	Krishnamoorthy,S. and Whang,S.S.
L2	Huyện Phú Tân, tỉnh An Giang	<i>Aloe vera</i> ITS 1	83,87%	Krishnamoorthy,S. and Whang,S.S.
L3	Tp. Sóc Trăng, tỉnh Sóc Trăng	<i>Aloe vera</i> ITS 1	88,96%	Krishnamoorthy,S. and Whang,S.S.
L4	Huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu	<i>Aloe vera</i> ITS 1	97,96%	Krishnamoorthy,S. and Whang,S.S.
L5	Huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang	<i>Aloe vera</i> ITS 1	83,86%	Adams,S.P., Leitch, I.J., Bennett, M.D., Chase, M.W. and Leitch, A.R.
L6	Tx. Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp	<i>Aloe vera</i> ITS 1	80,26%	Adams,S.P., Leitch,I.J., Bennett,M.D., Chase,M.W. and Leitch,A.R.
L7	Huyện An Biên, tỉnh Kiên Giang	<i>Aloe vera</i> ITS 1	98,77%	Krishnamoorthy,S. and Whang,S.S.

3.3. Kết quả trình tự đoạn ITS và mối quan hệ di truyền

Các sản phẩm của tám mẫu đều cho bằng

khúc đại khoảng 700 bp, kết quả được trình bày ở Hình 5, các kết quả phù hợp với các nghiên cứu trước đây.

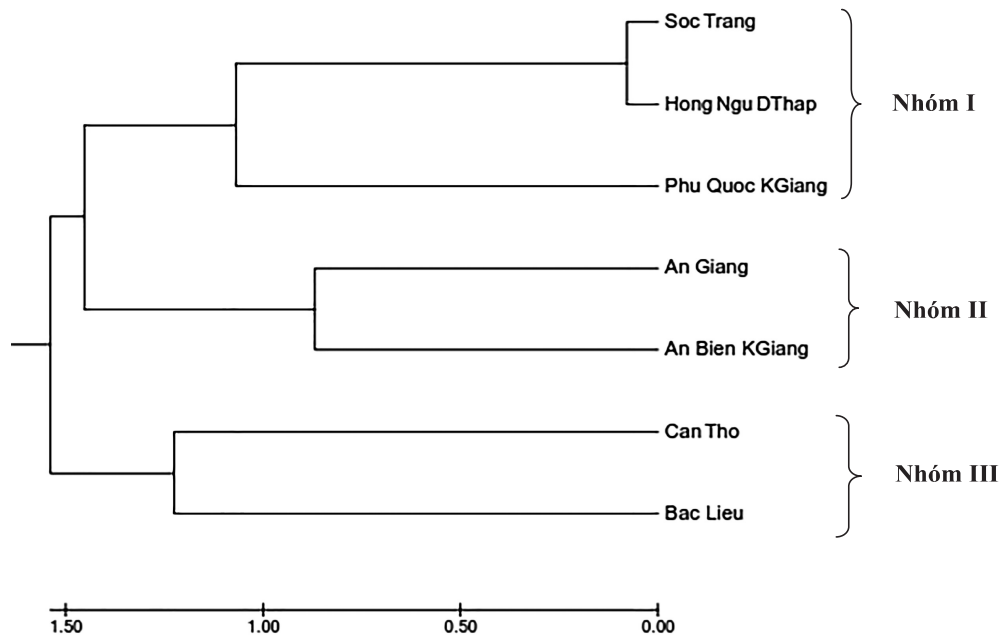


Hình 5. Sản phẩm PCR của các mẫu giống/loài Nha đam được sưu tập ở 6 tỉnh ĐBSCL
 Ghi chú: M: Ladder 1000bp, L1- Cần Thơ, L2 - An Giang, L3 - Sóc Trăng, L4 - Bạc Liêu, L5 và L7- Kiên Giang, -L6 - Đồng Tháp.

3.4. Mối quan hệ di truyền giữa bảy mẫu giống

Mối quan hệ di truyền của bảy mẫu giống nha đam dựa trên trình tự vùng gen ITS 1 được trình bày ở Hình 6, giá trị bên dưới hình biểu hiện mức độ giống khác nhau (dissimilarity) của hai mẫu. Hai mẫu giống bất kỳ có giá trị nhỏ coi như chúng giống nhau và được xếp chung một nhóm. Kết quả cho thấy bảy mẫu

giống có thể được xếp làm ba nhóm rõ rệt. Nhóm I bao gồm ba mẫu giống: Sóc Trăng (L3), Hồng Ngự - Đồng Tháp (L6), và Phú Quốc - Kiên Giang (L5); nhóm II bao gồm hai mẫu giống là An Giang (L2), và An Biên - Kiên Giang (L7); còn lại nhóm III có hai mẫu giống là Cần Thơ (L1), và Bạc Liêu (L4). Nhìn chung, các mẫu giống nha đam phân bố đều ở các nhóm với các vùng sinh thái khác nhau.



Hình 6. Mối quan hệ di truyền của 7 mẫu giống nha đam dựa trên trình tự ITS1.

(Phần mềm Mega 7.0, phương pháp UPGMA, chỉ số bootstrap là 1000)

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Qua sơ khởi việc khảo sát các đặc điểm hình thái hầu như giống nhau. Trong khi đó 5 đặc tính nông học có khác biệt giữa các vùng chủ yếu là do điều kiện sinh thái bao gồm đất, thời tiết và kỹ thuật chăm sóc khác nhau. Với việc giải trình tự ITS, tên bảy mẫu giống Nha đam bước đầu cho thấy trùng với loài *Aloe vera* với hệ số tương đồng cao. Việc phân tích mối quan hệ di truyền giữa bảy mẫu giống chia làm ba nhóm rõ rệt. Nhóm I bao gồm ba

mẫu giống: Sóc Trăng (L3), Hồng Ngự-Đồng Tháp (L6), và Phú Quốc - Kiên Giang (L5); nhóm II bao gồm hai mẫu giống là An Giang (L2), và An Biên - Kiên Giang (L7); còn lại nhóm III có hai mẫu giống là Cần Thơ (L1), và Bạc Liêu(L4). Nhìn chung, các mẫu giống nha đam phân bố đều ở các nhóm với các vùng sinh thái khác nhau.

Do đây là những kết quả nghiên cứu bước đầu, vì vậy việc xác định mối quan hệ di truyền nên được thực hiện thêm nhiều nơi

và nhiều vụ trồng khác nhau. Ngoài ra, cũng cần khảo sát thêm trình tự những vùng gen chuyên biệt khác liên quan đến đặc điểm hình thái cũng như các đặc tính sinh hóa như hàm lượng các chất có trong lá và hạt nhằm có kết luận chính xác hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Arup Jyoti Pegu, Ankita Sharma, 2019. Review on Aloe vera. International Journal of Trend in Scientific Research and Development (IJTSRD). Vol. 3, Issue: 4. Available
Online: www.ijtsrd.com e-ISSN: 2456 - 6470.
- [2]. Marta Sánchez, Elena González-Burgos, Irene Iglesias and M. Pilar Gómez-Serranillos, 2020. Pharmacological Update Properties of Aloe Vera and its Major Active Constituents. *Molecules*, 25, 1324; doi:10.3390/molecules25061324
www.mdpi.com/journal/molecules
- [3]. Vinay, V.V., Yallappa Somagond, Praveen Sivakumara Banakar, 2021. Aloe vera: Immortal plant for livestock feeding to enhance nutraceutical value of milk. Research Gate. Technical Report.
<https://www.researchgate.net/publication/349073890>
- [4]. Sabina Rana, 2018. A mini review on morphological, biochemical and molecular characterization of *Aloe vera* L.. Research Gate.
<https://www.researchgate.net/publication/327280891>
- [5]. Sabina Rana, 2019. A mini review on morphological, biochemical and molecular characterization of *Aloe vera* L. Research Gate.
<https://www.researchgate.net/publication/327280893>
- [6]. CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106 (31): 12794 - 12797.
- [7]. China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that the internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS* 108: 19641-19646.
- [8]. Anusree Das, SK. Moquammel Haque, Biswajit Ghosh, Krishnadas Nandagopal and Timir Baran Jha. 2015. Morphological and Genetic Characterization of Micropropagated Field Grown Plants of Aloe vera L. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 25(2): 231-246.
- [9]. A. Das, K. Nandagopal, and T.B. Jha. 2016. Molecular characterization of some Indian *Aloe vera* populations through RAPD and ITS markers. *Plant Biosystems- An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, DOI:10.1080/11263504.2016.1203833.
- [10]. Anusree Das, SK. Moquammel Haque, Biswajit Ghosh, Krishnadas Nandagopal and Timir Baran Jha. 2015. Morphological and Genetic Characterization of Micropropagated Field Grown Plants of *Aloe vera* L. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 25(2): 231-246.
- [11]. Paul Akinduti, Yemisi D. Obafemi, Patrick O. Isibor, Rapheal Ishola, Frank E. Ahuekwe, O. A. Ayodele, O. S. Oduleye,

- Olubukola Oziegbe, O. M. Onagbesan. 2021. Antibacterial kinetics and phylogenetic analysis of Aloe vera plants. Scientific Foundation SPIROSKI, Skopje, Republic of Macedonia. Macedonian Journal of Medical Sciences. Nov 13; 9(A):946-954. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.6526>. ISSN: 1857-9655.
- [12]. Ritland, C.E., Ritland K, Straus N.A. 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex. Mol Biol Evol 10: 1273 - 1288.
- [13]. Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C., and Donoghue M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot. Gard. 82: 247 - 277.
- [14]. Jobst J., King K., and Hemleben V. 1998. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS 2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. Mol Phylogenet Evol 9: 204 - 219.
- [15]. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., and Levesque A., 2011. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proc Natl Acad Sci USA 109: 6241 - 6246.
- [16]. Nguyễn Nghĩa Thìn, 2006. Các phương pháp nghiên cứu thực vật. Nxb. Giáo Dục.
- [17]. Doyle J.J. and Doyle J.L., 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus. 12 (6). pp. 13-15.
- [18]. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In PCR protocols a guide to methods and applications, 315 - 322. Academic Press, San Diego.
- [19]. Sanger, Nicklen S., Coulson A.R, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad Sci. USA, 74 (12). pp. 5463 - 5467.
- [20]. Võ Văn Chi, 2009. Bài thuốc hay từ cây thuốc quý. Nhà xuất bản Y học. Tr. 216-217.
- [21]. Tự điển Bách khoa Dược học. <https://sachyhoc.com/Tag/sach-tu-dien-bach-khoa-duoc-hoc/>
- Ngày nhận bài: 09/08/2021*
Ngày gửi phản biện: 15/02/2022
Ngày duyệt đăng: 06/04/2022