

**Nghiên cứu xác định một số trình tự DNA mã vạch
phục vụ giám định loài Sâm lai châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*)**

Nguyễn Thị Huyền*, Nguyễn Thế Hường, Lê Huệ Anh, Hà Bích Hồng
Trường Đại học Lâm nghiệp

**Research for identification of some DNA barcode of
Lai Chau ginseng species (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*)**

Nguyen Thi Huyen*, Nguyen The Huong, Le Hue Anh, Ha Bich Hong
Vietnam National University of Forestry
*Corresponding author: huyennt@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.2.2025.013-022>

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/11/2024
Ngày phản biện: 10/12/2024
Ngày quyết định đăng: 22/01/2025

Từ khóa:

ADN mã vạch, ITS2,
Panax, *Panax vietnamensis* var.
fuscidiscus, Sâm lai châu,
trnH-psbA.

Keywords:

DNA barcoding, ITS2, Lai chau
ginseng, *Panax*, *Panax*
vietnamensis var. *fuscidiscus*,
trnH-psbA.

TÓM TẮT

Phương pháp định danh và phân loại loài sinh vật dựa trên trình tự ADN mã vạch hiện đang được sử dụng rộng rãi trên thế giới, bao gồm cả Việt Nam. Ở thực vật, các trình tự DNA mã hóa và không mã hóa nằm trong hệ gen nhân hoặc lục lạp thường được ứng dụng để xác định loài. Nghiên cứu tập trung vào việc sử dụng hai trình tự vùng gen nhân (ITS2) và vùng lục lạp (*trnH-psbA*) để giám định loài Sâm lai châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), một loài sâm quý có giá trị kinh tế cao nhưng rất khó phân biệt với các loài Sâm khác, chẳng hạn như Sâm Trung Quốc. Kết quả phân tích trình tự nucleotide cho thấy, cả hai trình tự ITS2 và *trnH-psbA* của 10 mẫu Sâm nghiên cứu đều hình thành các nhóm riêng biệt, với 03 vị trí nucleotide sai khác và toàn bộ đã được đăng ký trên Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank). Cụ thể, trình tự ITS2 của các mẫu nghiên cứu có sự tương đồng di truyền cao nhất (100%) với loài Sâm lai châu có tên khoa học là *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, trong khi trình tự *trnH-psbA* cũng cho thấy tỷ lệ tương đồng 100% khi so sánh với dữ liệu của loài này trên Ngân hàng gen Quốc tế. Cây phát sinh loài được xây dựng từ dữ liệu trình tự cũng xác nhận rằng cả 10 mẫu Sâm nghiên cứu đều có mối quan hệ gần nhất với loài *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, qua đó chứng minh hiệu quả của các trình tự ITS2 và *trnH-psbA* trong việc giám định và phân loại loài.

ABSTRACT

The method of identifying or classifying organism species based on DNA barcode sequences is widely used in the world as well as in Vietnam. In plants, coding and non-coding DNA sequences located in the nuclear or chloroplast genome are often used in species identification. In this study, two sequences including ITS2 and *trnH-psbA* were used to evaluate the ability to differentiate Lai Chau ginseng (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), a precious and economically valuable ginseng species but very difficult to distinguish from other ginseng species such as Chinese ginseng. The results of nucleotide sequence analysis indicated that both ITS2 and *trnH-psbA* sequences of 10 ginseng samples formed several groups with 03 different positions in the nucleotide sequence and were all deposited on GenBank. With the ITS2 sequence, the studied sample has the highest genetic similarity (100%) with the species *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, while the *trnH-psbA* sequence has a similarity rate of 100% when compared with the sequence of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* on GenBank. The results of the phylogenetic tree construction show that all 10 studied ginseng samples have the closest relationship with the species *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Nhân sâm (*Panax* L.) thuộc họ Ngũ gia bì (Araliaceae) gồm có 15 loài và dưới loài [1], hầu hết đều là nguồn dược liệu quý cho y học cổ truyền, như Nhân sâm, Nhân sâm Hoa kỳ, Tam thất, Sâm Nhật bản và Sâm ngọc linh. Đây là nhóm cây thuốc quan trọng ở Bắc Mỹ và Đông Á, nổi bật với hàm lượng cao các hợp chất thuộc nhóm Saponin. Tại Việt Nam chi này gồm 3 loài được biết đến: Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*), Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) và Sâm vũ diệp (*P. bipinnatifidus*), phân bố tại các vùng núi cao [2-4]. Cả ba loài đều thuộc nhóm loài quý hiếm, cần được bảo vệ và đã được ghi vào Sách đỏ Việt Nam năm 2007 [5]. Loài *P. vietnamensis* hiện được ghi nhận có ba thứ: Sâm ngọc linh - *P. vietnamensis* var. *vietnamensis*, phân bố ở Kon Tum và Quảng Nam; Sâm langbian - *P. vietnamensis* var. *langbianensis*, phân bố ở Lang Giang, Lâm Đồng; và Sâm lai châu - *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*, phân bố ở Lai Châu, gồm các huyện Mường Tè, Tam Đường, Phong Thổ và Sìn Hồ.

Sâm Lai Châu, còn được biết đến với tên gọi Tam thất hoang Mường Tè, Tam thất đỏ và Tam thất đen, lần đầu được ghi nhận vào năm 2023 tại Vân Nam, Trung Quốc, bởi Zhu và cộng sự [6]. Nhóm tác giả đã mô tả đây là một thứ mới của Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*). Đến năm 2013, nhóm nghiên cứu của Phan Kế Long và cộng sự đã phát hiện loài này phân bố ở tỉnh Lai Châu, Việt Nam và đặt tên là Sâm lai châu [7]. Sâm lai châu được đánh giá có giá trị tương đương với Sâm ngọc linh. Sâm ngọc linh đặc trưng bởi 7 loại saponin: majonoside R2, vinaginsenoside R13 (V-R13), ginsenoside Rd (G-Rd), ginsenoside Rb1 (G-Rb1), notoginsenoside Fa (N-Fa), pseudoginsenoside Rs1 (PG-Rs1) và quinquenoside R1 (Q-R1). Trong khi đó, Sâm lai châu chứa 6 loại saponin đặc trưng: majonoside R1 (M-R1), vinaginsenoside R2 (V-R2), ginsenoside Rb2 (G-Rb2), notoginsenoside Fc (N-Fc), notoginsenoside R2 (N-R2) và notoginsenoside R4 (N-R4) [8]. Nhờ vào giá trị dược liệu cao, Sâm lai châu có tiềm

năng lớn để phát triển thành ngành công nghiệp trồng trọt và chế biến, đáp ứng nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Tuy nhiên, loài này đang bị người dân bản địa khai thác quá mức để làm thuốc và bán sang Trung Quốc, dẫn đến tình trạng bị đe dọa tuyệt chủng. Điều này đòi hỏi phải có những biện pháp giám định, bảo tồn và phát triển nguồn gen để bảo vệ loài trong tương lai.

Phương pháp ADN mã vạch đã trở thành công cụ quan trọng và hiệu quả trong phân loại sinh vật, đánh giá sự đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền của cả động vật và thực vật. Kỹ thuật này dựa trên một đoạn ADN ngắn (khoảng 400-800 bp) được sử dụng như tiêu chuẩn để xác định loài nhanh chóng và chính xác. Các mã vạch ADN mang đặc điểm riêng biệt, giúp phân biệt sinh vật từ cấp họ, chi, loài đến phân loài. Trên thế giới, việc sử dụng các chỉ thị AND mã vạch để phân loại các loài trong chi *Panax* rất phổ biến, mang lại giá trị ứng dụng cao. Các vùng gen thường được sử dụng bao gồm gen nhân (*ITS*, *18S*) trong lục lạp như *matK*, *trnH-psbA*... [6, 9, 10]. Tại Việt Nam, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào mối quan hệ di truyền và giám định các loài Sâm trên cơ sở phân tích trình tự vùng gen nhân và lục lạp (*ITS*, *matK*, *rbcL*, *rpoB*) [11-15]. Kết quả cho thấy, các vùng gen này có khả năng phân biệt rõ ràng các loài và thứ trong chi *Panax*. Nghiên cứu của Phan Kế Long và cộng sự (2013) sử dụng 2 trình tự *matK* và *ITS-rDNA* đã xác định Sâm lai châu tạo thành một nhánh riêng biệt với Sâm ngọc linh và có quan hệ họ hàng gần gũi với loài *P. zingiberensis* [7]. Tương tự, nghiên cứu của Vũ Đình Duy và cộng sự (2019) phân tích 32 mẫu Sâm từ vùng núi Phú Xai Lai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An dựa trên trình tự *ITS* và *matK* cho thấy các mẫu Sâm này có cùng nguồn gốc tiến hóa chung với loài Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) [15]. Những kết quả trên khẳng định rằng việc kết hợp các chỉ thị từ gen nhân và gen lục lạp là phương pháp khả quan để giám định và phân biệt các loài trong chi *Panax*.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã giải mã trình tự nucleotide của các vùng *ITS2* và

trnH-psbA từ các mẫu Sâm thu thập tại một số địa phương thuộc tỉnh Lai Châu nhằm xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch ADN, phục vụ cho công tác giám định, bảo tồn và phát triển nguồn gen quý này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu: 10 mẫu sâm có độ tuổi từ 1 đến 4 tuổi thu trong vườn trồng tại một số địa phương thuộc tỉnh Lai Châu, được kí hiệu từ P1-P10.



Hình 1. Các mẫu Sâm lai châu sử dụng trong nghiên cứu thu tại một số địa phương thuộc tỉnh Lai Châu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: ADN tổng số được tách chiết bằng bộ kit tách chiết DNA thực vật của hãng Analytik Jena – Đức theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nhân bản gen đích bằng kĩ thuật PCR: Phản ứng PCR được thực hiện trên máy Biometra Tadvanced PCR Systems 96S (Analytik Jena, Đức) với thành phần bao gồm: 10µl PCR master mix 2X, 1µl mỗi xuôi (10 µM)

và 1 µl mỗi ngược (10 µM), 1µl DNA khuôn (50 ng), bổ sung H₂O deion tới 20 µl. Chương trình nhiệt độ của phản ứng PCR như sau: biến tính ở 95°C trong 5 phút; 35 chu kì lặp lại của ba bước 95°C – 30 giây, 50°C đến 60°C (tùy mỗi) – 30 giây, 72°C – 1 phút; kết thúc tổng hợp ở 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Cặp mỗi sử dụng để nhân bản đoạn trình tự *trnH-psbA*, *ITS2* được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự và thông tin về cặp mỗi sử dụng trong nghiên cứu

Gen đích	Tên mỗi	Trình tự mỗi 5' – 3'	Nhiệt độ gắn mỗi (°C)	Kích thước đoạn gen (bp)	Tham khảo
<i>ITS2</i>	<i>ITS2_F</i>	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	50	400	[16]
	<i>ITS2_R</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<i>trnH-psbA</i>	<i>trnH_F</i>	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	50	500	[17]
	<i>psbA_R</i>	GTTATGGATGAACGTAATGCTC			

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% có bổ sung thuốc nhuộm axit nucleic (Redsafe). Sau khi điện di, bản gel agarose được soi dưới đèn UV và chụp ảnh bằng hệ thống chụp ảnh gel Quantum CX5 (Vilber, Pháp).

Những sản phẩm PCR sau khi khuếch đại

thành công sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit Purification Kit của hãng Analytik Jena - Đức.

Phương pháp giải trình tự nucleotide tự động theo nguyên lý Sanger

Sản phẩm PCR tinh sạch được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự nucleotide theo cả hai chiều xuôi và

ngược. Trình tự nucleotide của đoạn DNA được xác định bằng máy giải trình tự tự động dựa trên nguyên lý của Sanger, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing.

Phương pháp phân tích và xử lý trình tự nucleotide

Các trình tự nucleotide được phân tích và xử lý bằng phần mềm tin sinh BioEdit 7.2.5 [18], Mega X [19] và các công cụ trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây quan hệ di truyền được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum likelihood theo mô hình tiến hóa Tamura – Nei [20], với số lần lặp (Bootstrap) là 1000.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết ADN tổng số

Tách chiết ADN là bước khởi đầu quan trọng quyết định sự thành công của phản ứng PCR sau này. ADN tổng số sau khi tách từ các mẫu lá Sâm lai châu được xác định nồng độ và độ tinh sạch thông qua phương pháp đo quang phổ. Kết quả tách chiết ADN tại Bảng 2 cho thấy: dung dịch ADN tổng số có nồng độ dao động từ 93,6- 736 ng/μl; tỉ số OD_{260/280nm} trong khoảng từ 1,65-1,84, kết quả này khẳng định đã tách chiết được ADN có nồng độ tương đối cao và đảm bảo để thực hiện phản ứng PCR. Các mẫu có nồng độ ADN cao sẽ được pha loãng đến nồng độ 50 ng/μl và sử dụng 1 μl cho phản ứng PCR.

Bảng 2. Độ tinh sạch và nồng độ của ADN tổng số các mẫu Sâm Lai châu

Mẫu	Độ tinh sạch (A260/A280)	Nồng độ (ng/μl)
P1	1,67	465,8
P2	1,84	430
P3	1,77	592
P4	1,65	93,6
P5	1,67	381,6
P6	1,65	143,34
P7	1,68	404
P8	1,79	375
P9	1,73	461
P10	1,64	736

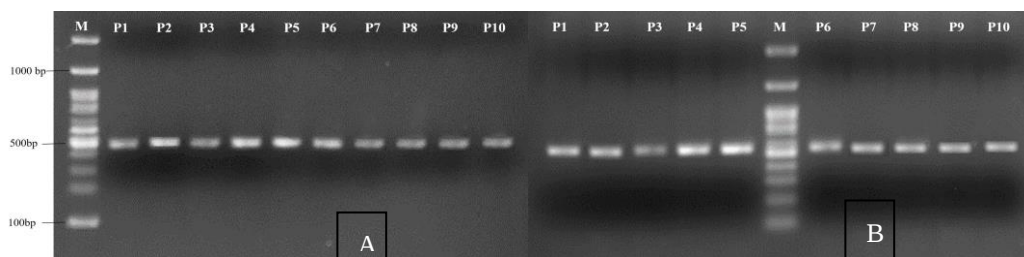
3.2. Nhân bản các trình tự ADN mã vạch bằng kỹ thuật PCR

Trong nghiên cứu này, các cặp mồi được sử dụng bao gồm *ITS2-F/R* và *trnH-F/psbA-R* nhằm khuếch đại các vùng ADN mã vạch tương ứng là vùng *ITS2* trong hệ gen nhân và vùng *trnH-psbA* trong hệ gen lục lạp. 10 mẫu ADN tổng số Sâm lai châu được tách chiết từ lá của 10 cây Sâm lai châu được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Trong tế bào, rDNA được sắp xếp thành các đơn vị lặp lại ngẫu nhiên bao gồm ADN mã hóa cho ribosome 18S, 5.8S và 28S và xen kẽ với các trình tự không mã hóa *ITS1* và *ITS2* (internal transcribed spacers). Vùng *ITS* vừa bảo thủ nhưng cũng vừa có đủ tính đa dạng

để phân biệt các loài có quan hệ họ hàng gần nhau. Kết quả khuếch đại đoạn gen *ITS2* của các mẫu nghiên cứu được thể hiện ở hình 2A.

Kết quả cho thấy đoạn gen *ITS2* được khuếch đại thành công ở tất cả các mẫu. Sản phẩm PCR cho thấy một dải ADN sáng rõ ràng có kích thước trên 400 bp. Bế Thị Cúc và cộng sự (2023) cũng sử dụng cặp mồi *ITS2-F/R* có cùng trình tự như cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này trên loài Chò nâu, đoạn *ITS2* được nhân bản có kích thước gần 400 bp [21]. Điều này cho thấy rằng kích thước đoạn *ITS2* có thể thay đổi tùy thuộc vào loài và phân loài. Tuy nhiên, để xác nhận chính xác tính đa dạng của trình tự nucleotide cần phải giải trình tự đoạn gen và thực hiện các bước phân tích so sánh tiếp theo.



Hình 2. Kết quả nhân bản 02 trình tự ADN mã vạch của 10 mẫu Sâm lai châu (A: trình tự ITS2; B: trình tự *trnH-psbA*. Giếng 1-10: mẫu P1-P10, M: thang đo ADN 100 bp)

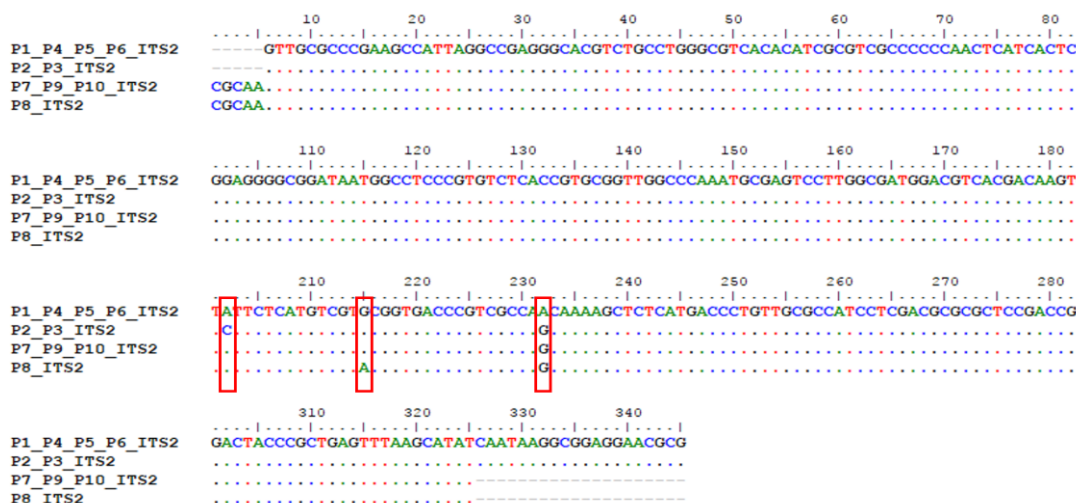
Hình 2B cho thấy tất cả 10 mẫu Sâm lai châu đều xuất hiện băng sản phẩm PCR đặc hiệu với cặp mồi *trnH-F/psbA-R*, băng ADN rõ và tương đồng nhau, kích thước khoảng 500 bp khi so với thang ADN chuẩn 100 bp. Kết quả này cho thấy cặp mồi *trnH-F/psbA-R* đặc hiệu và có khả năng nhân bản thành công ở tất cả các mẫu Sâm lai châu nghiên cứu.

3.3. Phân tích trình tự nucleotide các đoạn ADN mã vạch phục vụ giám định loài

3.3.1. Phân tích trình tự nucleotide đoạn ITS2

Trình tự vùng ITS2 của các mẫu Sâm lai châu có sự sai khác nhau ở các vị trí 197, 215, 232 và phân thành 4 nhóm với 3 vị trí

nucleotide sai khác (Hình 3). Trong đó, nhóm 1 gồm các mẫu P1, P4, P5, P6 có sự tương đồng 100%; nhóm 2 gồm các mẫu P2, P3 có sự tương đồng 100%; nhóm 3 gồm các mẫu P7, P9, P10 tương đồng 100%; và nhóm 4 gồm có mẫu P8. Trình tự ITS2 là trình tự không mã hóa nên có thể sự biến đổi giữa các cá thể cùng loài cũng như sự biến đổi giữa các loài với nhau. Cả 4 nhóm trình tự này được đăng kí trên GenBank với các mã số từ PQ358442-PQ358445.



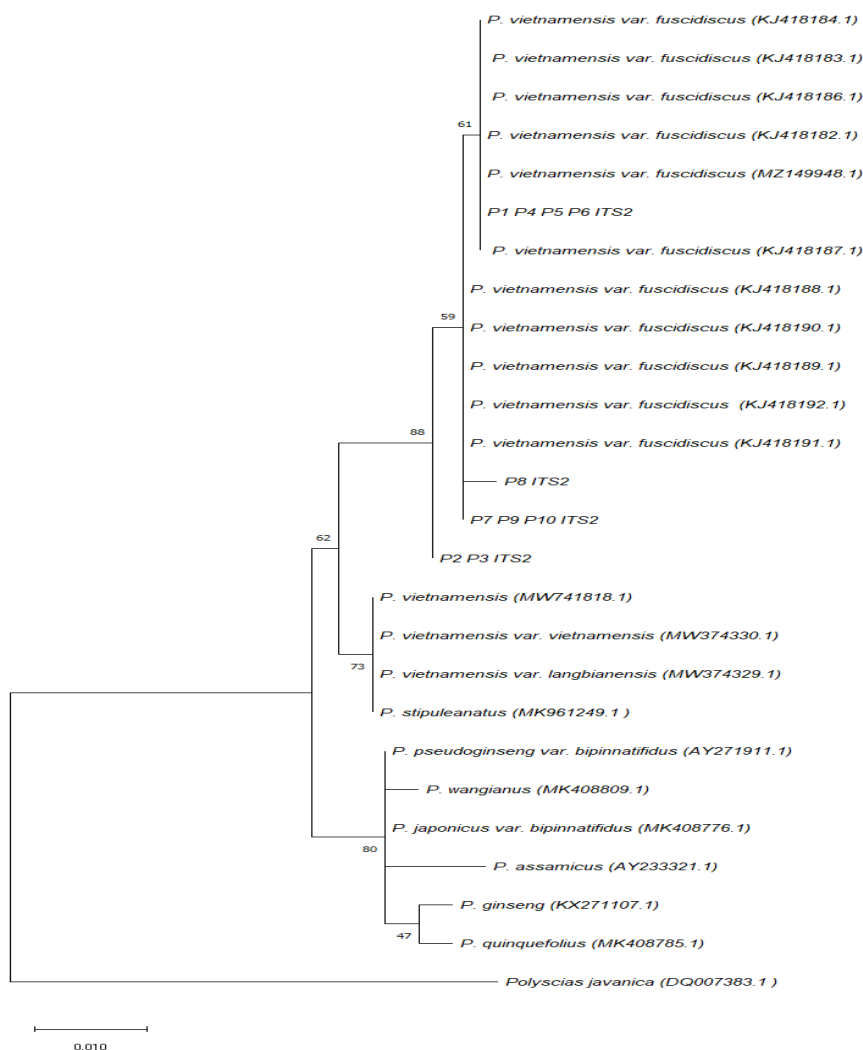
Hình 3. So sánh trình tự ITS2 giữa các mẫu Sâm lai châu trong nghiên cứu

Để xác định tính tương đồng của các trình tự ITS2 của các mẫu nghiên cứu cũng như của các trình tự nucleotide đã được công bố trên ngân hàng gen thế giới, nhóm tác giả sử dụng công cụ BLAST để so sánh. Kết quả BLAST cho thấy các mẫu từ P1-P10 trong nghiên cứu có mức độ tương đồng di truyền cao nhất (99,38-100%) với loài Sâm lai châu có tên khoa

học là *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* (MZ149948.1), tiếp đến là loài *P. vietnamensis* (MW741818.1) với tỷ lệ tương đồng 97,92-98,51%. Tuy nhiên, các mẫu Sâm nghiên cứu cũng có mức độ tương đồng di truyền khá thấp ở mức 96,73% với loài *P. ginseng* (KX271097.1) và loài *P. quinquefolius* (MK408785.1).

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide của đoạn *ITS2* giữa 10 mẫu Sâm nghiên cứu với 21 loài tương đồng trong chi *Panax* trên GenBank, sử dụng phương pháp Maximum likelihood với 1000 lần lặp. Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại được thể hiện trên Hình 4. Trong đó, các mẫu nghiên cứu có khoảng cách di truyền tương đối nhỏ (từ 0,0031 – 0,0062) và cùng nằm trong một nhóm với các loài của chi *Panax* đã được công bố trên GenBank. Tất cả các mẫu Sâm lai châu nghiên cứu cùng nằm trong một nhánh với loài *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* (KJ418191; KJ418189; KJ418190; KJ418192; KJ418188; KJ418187; KJ418183; KJ418191; KJ418186; KJ418184; KJ418182 và MZ149948). Bên cạnh đó, cây phát sinh chủng loại cũng cho thấy, các mẫu Sâm lai

châu nằm trong một nhóm có sự tương đồng di truyền cao với các loài thuộc nhóm Sâm Việt Nam, các loài còn lại trong chi *Panax* nằm ở các nhánh khác. Loài *Polyscias javanica* thuộc cùng họ Ngũ gia bì (Araliaceae) nhưng khác chi được sử dụng như một loài ngoài nhóm (outgroup). Kết quả này cho phép nhận định các mẫu Sâm lai châu nghiên cứu có mức độ tương đồng cao nhất với loài *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*. Do đó, dựa vào trình tự *ITS2* có thể giúp giám định các loài trong chi *Panax* một cách hiệu quả. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu đã công bố trước đó của tác giả Vũ Đình Duy và cộng sự (2019) chỉ ra vùng *ITS* là vùng trình tự ADN giúp xác định các loài *Panax* ở giai đoạn chưa ra hoa cũng như chứng minh khả năng phân biệt thành công giữa các loài [15].

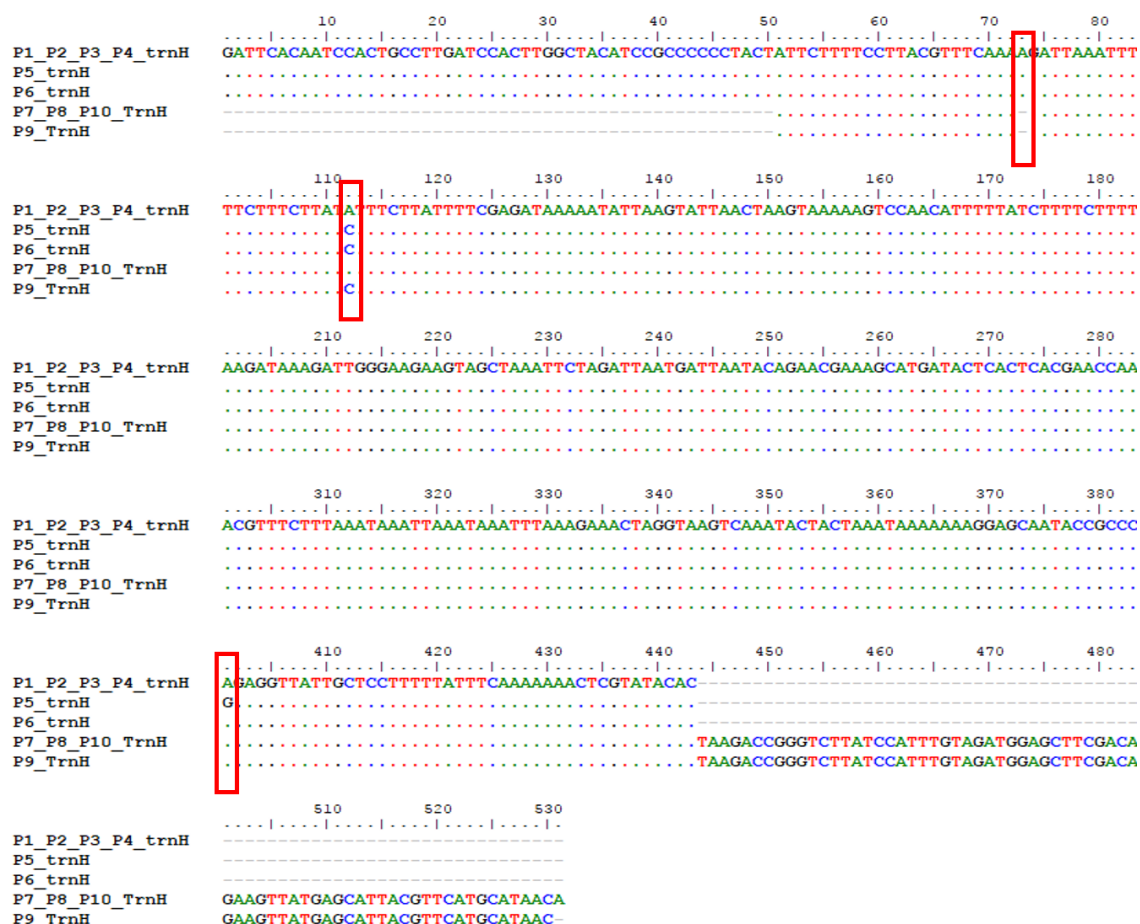


Hình 4. Cây quan hệ di truyền của loài Sâm lai châu và một số loài trong chi *Panax* dựa trên trình tự *ITS2*, sử dụng phương pháp Maximum likelihood

3.3.2. Phân tích trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide đoạn *trnH-psbA* cho thấy có 3 vị trí sai khác là các vị trí 73, 112 và 401 và phân thành 5 nhóm như trong Hình 5. Tại các vị trí sai khác có thể thấy

các mẫu P1, P2, P3 và P4 tương đồng nhau 100%; mẫu P7, P8 và P10 tương đồng nhau 100%; các mẫu còn lại có sự sai khác một cách ngẫu nhiên 1-3 vị trí. 5 trình tự đại diện cho 5 nhóm trình tự này được đăng kí trên GenBank với các mã số từ PQ421516 đến PQ421520.



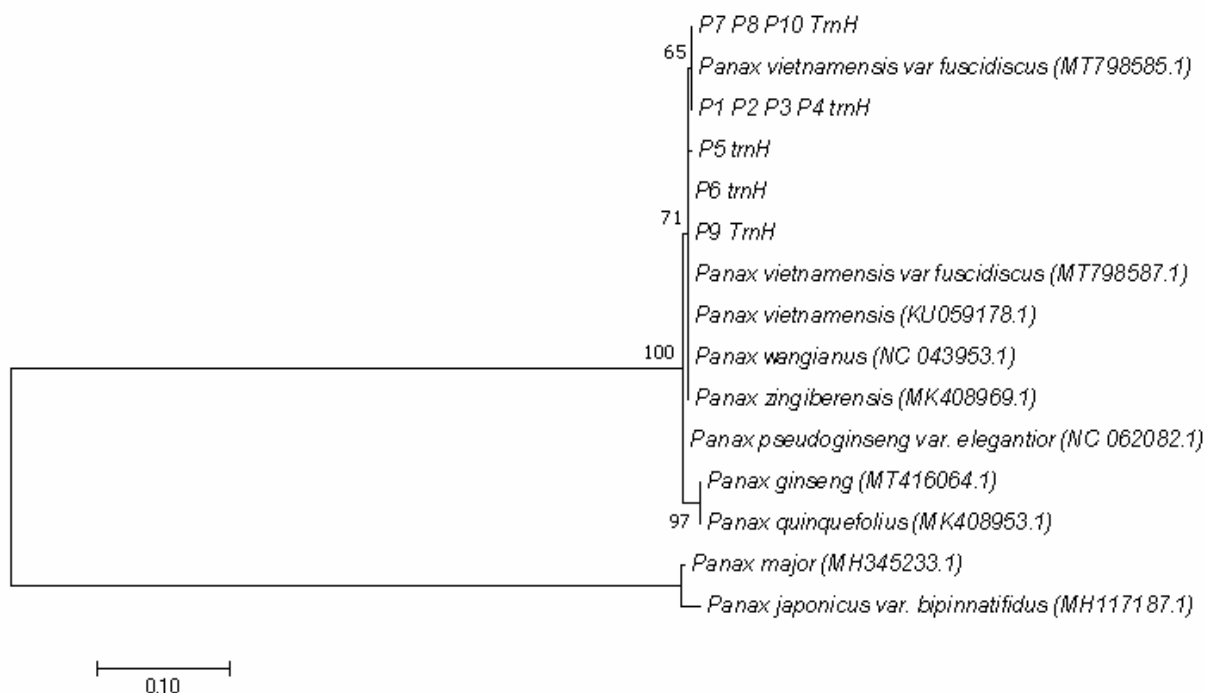
Hình 5. So sánh trình tự *trnH-psbA* giữa các mẫu Sâm lai châu nghiên cứu

Trình tự nucleotide đoạn gen *trnH-psbA* của 10 mẫu Sâm lai châu nghiên cứu được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự có sẵn trên GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả cho thấy trình tự nucleotide của các mẫu này tương đồng cao với các loài trong chi *Panax*. Cụ thể, các mẫu từ P1-P10 tương đồng di truyền cao với loài *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* (MT7988585 – từ 99,55-100%), loài *P. vietnamensis* var. *langbianensis* (MT798583 – 99,77%), loài *P. vietnamensis* (KU059178.1 - 99,77%). Dù kết quả so sánh cho thấy sự tương đồng di truyền về trình tự *trnH-psbA*

với các loài trong chi *Panax* tương đối cao, nhưng để có thêm các bằng chứng khoa học, chúng tôi xác định vị trí phân loại của các mẫu Sâm lai châu nghiên cứu với 10 trình tự có sẵn trên Ngân hàng gen của 10 loài khác trong chi. Sơ đồ cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ họ hàng với các loài thuộc chi *Panax* sử dụng phương pháp Maximum likelihood với giá trị Bootstrap 1000 được thể hiện như Hình 6. Kết quả cho thấy các mẫu Sâm lai châu nghiên cứu gồm P1-P4, P7, P8, P10 đều nằm cùng một nhóm với các loài (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* – MT798585.1). Các mẫu còn

lại gồm P5, P6, P9 nằm trong cùng nhánh với loài *P. vietnamensis* var *fuscidiscus* (MT798587.1), loài *P. vietnamensis* (KU059178.1), loài *P. wangianus* (NC043953.1) và loài *P. zingiberensis* (MK408969.1). Từ kết quả này có thể thấy rằng dựa trên trình tự *trnH-psbA* có thể khẳng định các mẫu Sâm lai

châu nghiên cứu có mức độ tương đồng cao với loài *P. vietnamensis* var *fuscidiscus* và rất gần gũi với loài Sâm Việt Nam (*P. vietnamensis*). Do đó, với kết quả thu được, 3 mẫu P5, P6 và P9 chưa thể giám định loài mà chỉ dựa vào vùng gen *trnH-psbA*.



Hình 6. Cây quan hệ di truyền của loài Sâm lai châu và một số loài trong chi *Panax* dựa trên trình tự *trnH-psbA*, sử dụng phương pháp Maximum likelihood

Kỹ thuật ADN mã vạch ngày càng được sử dụng rộng rãi trên thế giới cũng như tại Việt Nam khi chứng minh được tính chính xác và nhanh chóng trong việc giám định, xác định loài. Đối với chi *Panax* việc sử dụng mã vạch ADN càng tỏ ra quan trọng hơn do sự giống nhau về mặt hình thái giữa các loài trong chi. Các nghiên cứu xây dựng cây phát sinh chủng loại để tìm hiểu mối quan hệ họ hàng của các loài trong chi *Panax* chủ yếu sử dụng trình tự *ITS* kết hợp với các trình tự khác như *matK*, *rpoB*, *trnH-psbA*... [9, 10, 15, 22]. Trình tự *ITS2* và trình tự *trnH-psbA* đều là trình tự không mã hóa và có thể xảy ra một vài biến đổi giữa các cá thể trong cùng loài. Trong nghiên cứu này, cả hai trình tự *ITS2* và *trnH-psbA* đều xuất hiện các biến thể với một vài vị trí sai khác trên trình tự nucleotide. Dựa vào kết quả so sánh

trình tự nucleotide và so sánh cây phân loại sử dụng 2 chỉ thị ADN mã vạch *ITS2*, *trnH-psbA*, nhóm tác giả nhận thấy rằng cả hai trình tự này đều cho phép phân biệt Sâm lai châu với các loài khác trong chi, đặc biệt là những loài có mối quan hệ di truyền gần và hình thái giống nhau như *P. vietnamensis*, *P. zingiberensis*. Kết quả này cũng cho thấy sự phù hợp với các nghiên cứu trên chi Nhân sâm đã được công bố trước đây khẳng định rằng các trình tự *ITS2* và *trnH-psbA* là các trình tự hiệu quả trong việc nhận diện các loài thuộc chi *Panax* [9, 22]. Tuy nhiên, do sự giống nhau về mặt hình thái giữa các loài trong chi nên việc sử dụng kết hợp đa dạng giữa các phương pháp phân tích khác nhau từ hình thái đến phân tử giúp kết quả phân biệt, nhận dạng các loài nhanh chóng và chính xác hơn.

4. KẾT LUẬN

- Nghiên cứu đã xác định được 02 trình tự ADN mã vạch của loài Sâm lai châu là trình tự *ITS2* với các mã số đăng ký trên Genbank là PQ358442, PQ358443, PQ358444, PQ358445 và trình tự *trnH-psbA* với các mã số trên GenBank là PQ421516, PQ421517, PQ421518, PQ421519, PQ421520.

- Giám định được 10 mẫu Sâm lai châu có mức độ tương đồng cao nhất với loài có tên khoa học là *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* sử dụng hai trình tự ADN mã vạch *ITS2* và *trnH-psbA*.

Lời cảm ơn

Kinh phí thực hiện đề tài được hỗ trợ bởi nhiệm vụ cấp cơ sở năm 2024 “Nghiên cứu giám định loài Sâm lai châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) bằng chỉ thị DNA mã vạch” – Trường Đại học Lâm nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Nguyễn Thị Phương Trang, Nguyễn Giang Sơn, Lê Thanh Sơn & Phan Kế Long (2011). Phát hiện về một loài sâm mới *Panax* sp.(Araliaceae) ở Việt Nam. Tạp chí Dược học. 10: 59-63.

[2]. Dinh Duy Vu, Syed Noor Muhammad Shah, Mai Phuong Pham, Van Thang Bui, Minh Tam Nguyen & Thi Phuong Trang Nguyen (2020). De novo assembly and Transcriptome characterization of an endemic species of Vietnam, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., including the development of EST-SSR markers for population genetics. BMC Plant Biology. 20: 1-16.

[3]. Nong Van Duy, Trieu Le Ngoc, Nguyen Duy Chinh & Tran Van Tien (2016). A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence. Phytotaxa. 277(1): 047-058.

[4]. Pham Quang Tuyen, Tran Thi Kim Huong, Trinh Ngoc Bon, Phung Dinh Trung, Bui Thanh Tan, Nguyen Thi Hoai Anh, Nguyen Thanh Son, Hoang Thanh Son, Trieu Thai Hung & Ninh Viet Khuong (2019). The ecology and saponins of Vietnamese ginseng-*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* in North Vietnam.

[5]. Bộ Khoa học và công nghệ (2007). Sách Đỏ Việt Nam, Phần II – Thực vật. NXB Khoa học tự nhiên và

Công nghệ, Hà Nội.

[6]. Zhu Shu, Hirotooshi Fushimi, Shaoqing Cai & Katsuko Komatsu (2003). Phylogenetic relationship in the genus *Panax*: inferred from chloroplast *trnK* gene and nuclear 18S rRNA gene sequences. Planta medica. 69(07): 647-653.

[7]. Phan Ke Long, Le Thanh Son, Phan Ke Loc, Vu Dinh Duy & Pham Van The (2013). Lai Chau ginseng *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & SQ Cai I. morphology, ecology, distribution and conservation status. Proceedings of the 2nd VAST-KAST Workshop on Biodiversity and Bio-Active Compounds, Hanoi, Vietnam. 28-29.

[8]. Nguyen Huy Truong, Phan Long Ke, Huynh Kim-Long Vu, Duong Thuc-Huy, Le Huong Thuy, Nguyen Trang Hai-Yen, Nguyen Thi Hai Yen, Nguyen Phuoc Long & Nguyen Minh Duc (2023). Untargeted Metabolomics Approach for the Differentiation between *Panax vietnamensis* var. *vietnamensis* and *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*. Metabolites. 13(6): 763.

[9]. Zuo Yunjuan, Zhongjian Chen, Katsuhiko Kondo, Tsuneo Funamoto, Jun Wen & Shiliang Zhou (2011). DNA barcoding of *Panax* species. Planta medica. 77(02): 182-187.

[10]. Lee Chunghee & Jun Wen (2004). Phylogeny of *Panax* using chloroplast *trnC-trnD* intergenic region and the utility of *trnC-trnD* in interspecific studies of plants. Molecular phylogenetics and evolution. 31(3): 894-903.

[11]. Phạm Quang Tuyến, Nguyễn Minh Đức, Khương Thị Dương Bích, Nguyễn Thái Khoa, Nguyễn Trường Tân, Bùi Thanh Anh, Nguyễn Thị Hoài Bon, Trịnh Ngọc Hương, Trần Thị Kim Khánh & Trần Đăng (2018). Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu. Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 60(2): 27-31.

[12]. Nguyen Thi Phuong Trang & Nguyen Thi Hong Mai (2017). *rbcl* and *rpoL* gene sequences of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and *Panax vietnamensis*, the background for identification and comparison. Academia Journal of Biology. 39(1): 80-85.

[13]. Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc,

Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh & Lê Thanh Sơn (2014). Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng *matK* và *ITS-rDNA*. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 12(2): 327-337.

[14]. Lê Thị Thu Hiền, Hugo De Boer, Vincent Manzanilla, Hà Văn Huân & Nông Văn Hải (2016). Giải mã hệ gen ở thực vật và các loài thuộc chi Nhân sâm (*Panax* L.). Tạp chí Công nghệ Sinh học. 14(1): 1-13.

[15]. Vũ Đình Duy, Trần Thị Việt Thanh, Phan Kế Lộc, Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Hiền & Phan Kế Long (2020). Sử dụng vùng gen ITS-rDNA và *matK* để xác định loài Sâm thuộc chi Sâm (*Panax*) ở vùng núi Phu Xai Lai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 18(1): 75-85.

[16]. Chen Shilin, Hui Yao, Jianping Han, Chang Liu, Jingyuan Song, Linchun Shi, Yingjie Zhu, Xinye Ma, Ting Gao & Xiaohui Pang (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS one. 5(1): e8613.

[17]. Sang-Ngern Mayuramas, Ui Joung Youn, Eun-Jung Park, Tamara P Kondratyuk, Charles J Simmons, Marisa M Wall, Michael Ruf, Sam E Lorch, Ethyn Leong & John M Pezzuto (2016). Withanolides derived from *Physalis peruviana* (Poha) with potential anti-inflammatory activity. Bioorganic & Medicinal

Chemistry Letters. 26(12): 2755-2759.

[18]. Tom Hall (2004). BioEdit version 7.0.0. Distributed by the author, website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.

[19]. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz & Koichiro Tamura (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution. 35(6): 1547-1549.

[20]. Koichiro Tamura & Masatoshi Nei (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular biology and evolution. 10(3): 512-526.

[21]. Bế Thị Cúc, Hà Bích Hồng, Nguyễn Thế Hưởng, Lương Thị Thu Trang & Vũ Văn Thông (2023). Đánh giá hiệu quả giám định loài Chò nâu (*Dipterocarpus retusus*) tại tỉnh Thái Nguyên của một số chỉ thị DNA mã vạch. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 12(5): 018-028. DOI: 10.55250/jo.vnuf.12.5.2023.018-028

[22]. Lê Thanh Hương, Nguyễn Nhật Linh, Bùi Mạnh Minh, Hà Hồng Hạnh, Huỳnh Thị Thu Huệ, Nông Văn Hải, Hà Văn Huân & Lê Thị Thu Hiền (2017). Ứng dụng mã vạch DNA hỗ trợ định loại loài một số mẫu sâm thuộc chi nhân sâm (*Panax* L.). Tạp chí Công nghệ Sinh học. 15(1): 63-72.