

**GIẢI MÃ TRÌNH TỰ GEN *RBCL*, *RPOB* CỦA SÂM LAI CHÂU
(*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S. Q. Cai)
VÀ SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.)
LÀM CƠ SỞ SO SÁNH KHOẢNG CÁCH DI TRUYỀN**

Nguyễn Thị Phương Trang^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Mai¹, Zhuravlev Yury N², Reunova Galina D²

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Viện Sinh học Thổ nhưỡng Viễn đông, Viện Hàn lâm khoa học Liên bang Nga

TÓM TẮT: Mẫu sâm, *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, được thu tại huyện Phong Thổ, tỉnh Lai Châu, có đặc điểm hình thái rất giống với Sâm ngọc linh, *Panax vietnamensis*. Để so sánh khoảng cách di truyền của hai loài sâm này với nhau, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự nucleotide vùng gen *rbcL* và *rpoB*. Các kết quả phân tích trình tự cho thấy, vùng gen *rbcL* của hai mẫu sâm với kích thước khoảng 700 bp có 9 vị trí nucleotide sai khác và có độ tương đồng là 98,8%, trình tự gen *rpoB* với kích thước khoảng 500 bp có 2 vị trí sai khác và có khoảng cách di truyền là 0,4%. Trình tự các đoạn gen *rbcL* và *rpoB* của *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* và *P. vietnamensis* đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số lần lượt là KT194325.1, KT194324.1 và KT154685.1, KT154686.1.

Từ khóa: *Panax*, DNA lục lạp, gen *rbcL*, gen *rpoB*, sâm lai châu, sâm ngọc linh.

MỞ ĐẦU

Chi *Panax* L. thuộc họ Ngũ gia bì (Araliaceae) gồm 15 loài và dưới loài (Lê Thanh Sơn & Nguyễn Tập, 2006), tất cả đều có giá trị làm thuốc. Ở Việt Nam, những loài mọc tự nhiên đã biết gồm Sâm vũ diệp (*P. bipinnatifidus*), Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) và Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) (Nguyễn Tập, 2005). Sâm lai châu, một cây thuốc mới, ít được biết đến ở Việt Nam đã được Phan Kế Long và nnk. (2013) xác định là *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai. Theo IUCN (2015), Sâm lai châu hiện được liệt kê ở thứ hạng rất nguy cấp (CR) vì đáp ứng các tiêu chí A2a,c,d; B2b(ii, iii, v); C2a(i); E. Theo Phan Kế Long et al., (2013), Sâm lai châu và sâm ngọc linh đều có nhiều đặc điểm về hình thái cây, lá, hoa và rễ giống nhau như đều là cây thân thảo, lá mọc vòng, thường có 4 lá, đôi khi là 5 hoặc 6, dài khoảng 7-12 cm, lá hình trái xoan, mũi nhọn, mép lá có răng cưa đều. Cụm hoa mọc từ giữa thân, hình cầu, bán kính 3-4 cm, hoa 5 cánh màu vàng nhạt. Quả khi chín màu đỏ, có 1 chấm đen ở đỉnh. Điểm khác nhau nhỏ về hình thái giữa hai loài này là đĩa mật của hoa sâm lai châu có màu tím trong khi đĩa mật của hoa sâm ngọc linh có màu nhạt hơn. Chiều cao trung bình của cây *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* cao hơn

so với *P. vietnamensis*, thân rễ *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* thường dài, có khi đến 20 cm hoặc hơn trong khi *P. v.* thân rễ nhỏ hơn và thường có xu hướng co cụm lại. Lát cắt củ *P. v.* thường chỉ có 1 màu vàng trong khi củ *P. v.* var. *fuscidiscus* thường có vòng tròn tím nhạt bên trong và có vị đắng hơn so với *P. vietnamensis*. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào hình thái ngoài rất khó phân biệt. Để làm rõ hơn sự sai khác giữa hai loài này cũng như bổ sung thêm cơ sở dữ liệu về di truyền cho 2 giống cây quý của Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành giải mã trình tự gen *rbcL* và *rpoB* là 2 trong 7 chỉ thị về mã vạch DNA thường được sử dụng trong nghiên cứu phân loại ở thực vật (CBOL, 2009).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu lá và củ *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* thu tại huyện Phong thổ, tỉnh Lai Châu, tọa độ: 22°20N, 102°32E, độ cao 1.500m.

Mẫu lá và củ *P. vietnamensis* thu tại huyện Nam Trà My, Quảng Nam, tọa độ: 15°08N-108°09E, độ cao 1.400 m.

Tách chiết DNA tổng số

Mẫu được nghiền trong nitrogen lỏng (-196°C) thành dạng bột mịn, lấy 100 mg bột để tách DNA, sử dụng kit tách Dneasy plant mini

kit (Qiagen, CHLB Đức).

Nhân bản DNA

Vùng gen *rbcL* dài 700 bp và vùng gen *rpoB* dài 500bp được khuếch đại bằng cặp mồi Universal. Trình tự mồi dùng khuếch đại gen *rbcL* như sau: mồi xuôi F: 5'-ATGTCACCA CAAACAGAGACTAA-3', mồi ngược R: 5'-TTCGGCACAAAATACGAAACGATCTCTC CA-3'. Trình tự mồi cho khuếch đại gen *rpoB*: mồi xuôi F: 5'-GCC ACC ATC GAA TAT CTG GT-3', mồi ngược R: 5'-ACA CGA TCT CGT CGC TAA CC-3' (CBOL, 2009).

Thành phần mỗi phản ứng PCR 25 µl gồm: 12,5 µl PCR Master Mix 2X Promega, Hoa Kỳ); 1 µl mồi xuôi (10 pmol); 1 µl mồi ngược (10 pmol); 1 µl DNA (50 ng/ µl); 9,5 µl H₂O khử ion. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu

trình nhiệt: 94°C trong 5 phút; 30 chu kỳ (94°C trong 1 phút; 54°C trong 1 phút; 72°C trong 1 phút), 72°C trong 7 phút; bảo quản mẫu ở 4°C (Nguyễn Đức Thành và nnk., 2014).

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5% và tinh sạch bằng Kit tinh sạch Qiaquick gel extraction (Qiagen, Đức);

Giải trình tự 2 chiều bằng kit BigDye terminator v3.1, đọc trình tự bằng máy ABI 3100 Avant genetic analyzer (Applied Biosystems).

Phân tích số liệu

Các trình tự thu được sau khi đọc được xử lý bằng phần mềm Bioedit version 7.0.5.3. So sánh với các trình tự trên Ngân hàng gen Thế giới (Genbank) bằng phần mềm MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011).

Bảng 1. Danh sách và mã số Genbank các loài trong chi *Panax* lấy trên Ngân hàng Gen thế giới được dùng để so sánh

STT	Tên loài/thứ	Mã số GB	
		<i>rbcL</i>	<i>rpoB</i>
1	<i>Panax ginseng</i>	KM210143.1	KF412449.1
2	<i>Panax quinquefolius</i>	GQ436709.1	HQ112593.1
3	<i>Panax japonicus</i>	KF208380.1	HQ112579.1
4	<i>Panax japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	KM210141.1	HQ112595.1
5	<i>Panax trifolius</i>	HQ112614.1	HQ112591.1
6	<i>Panax stipuleanatus</i>	KM210157.1	HQ112578.1
7	<i>Panax pseudoginseng</i>	KJ667625.1	HQ112592.1
8	<i>Panax notoginseng</i>	GQ436706.1	HQ112577.1

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích trình tự nucleotide vùng gen *rbcL*

Sau khi chỉnh sửa và loại bỏ tất cả các vị trí trống, một đoạn gen *rbcL* dài 700bp của mẫu sâm thu tại Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và Sâm ngọc linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) được so sánh với nhau và so sánh với 8 loài khác trong chi *Panax* lấy từ Ngân hàng gen thế giới. Kết quả so sánh trên Mega 5.0 cho thấy mẫu sâm thu tại Lai Châu có 9 vị trí sai khác với mẫu Sâm ngọc linh ở vị trí số 18, 47; 105; 151; 241; 343; 467; 599; 64 (bảng 2).

Sự khác nhau giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo mô hình Kimura 2 thông số

(Kimura, 1980) cũng đã chỉ ra mức độ sai khác di truyền giữa loài *P. vietnamensis* và *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* là 1,2% (bảng 3).

Mối quan hệ di truyền của mẫu sâm thu tại Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và Sâm ngọc linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) với 8 loài khác thuộc chi *Panax* trên cơ sở tiến hóa của vùng gen *rbcL* được xây dựng bằng phương pháp Neighbor Joining chỉ ra mối quan hệ di truyền của các loài (hình 1). Kết quả cho thấy mẫu sâm thu ở Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) nằm cùng một nhóm và có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài Sâm ngọc linh (*P. vietnamensis*) với mức độ tương đồng di truyền lên tới 98,2%.

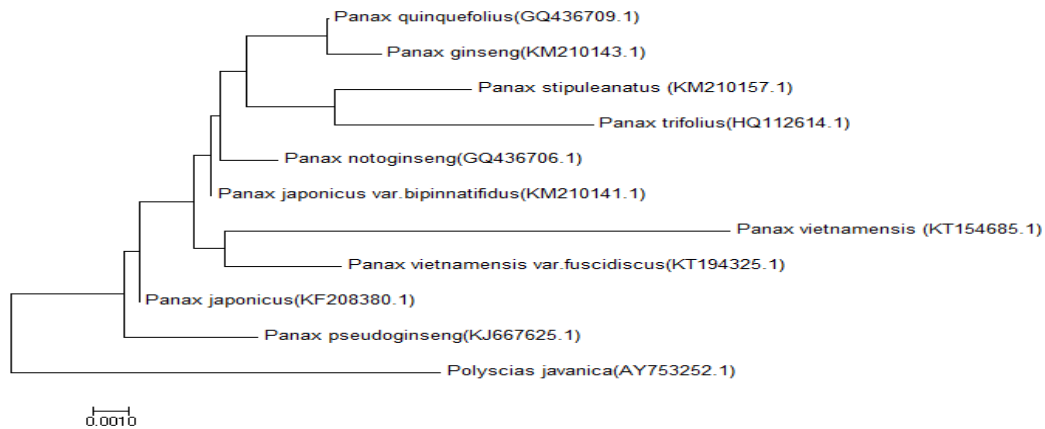
Bảng 2. Kết quả so sánh các Nucleic sai khác trên vùng gen *rbcL* giữa các mẫu sâm thu ở Lai Châu với *P. v.* và các loài/thứ có quan hệ gần gũi

	1	2	3	3	4	4	7	7	0	0	2	5	5	8	4	4	6	7	8	9	9	0	1
<i>P. vietnamensis</i> (KT154685.1)	T	G	T	G	C	C	C	G	A	T	G	G	A	C	G	G	T	G	G	A	T	G	T
<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> (KT194325.1)	C	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	A	.	.	A	A	.	.	.	C
<i>P. japonicas</i> var. <i>bipinnatifidus</i> (KM210141.1)	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	A	.	.	A	A
<i>P. japonicus</i> (KF208380.1)	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	A	.	.	A	A
<i>P. notoginseng</i> (GQ436706.1)	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	A	.	.	A	A
<i>P. pseudoginseng</i> (KJ667625.1)	C	.	A	A	.	.	A	T	.	.	A	.	.	.	A	.	.	A	A	.	.	.	C
<i>P. quinquefolius</i> (GQ436709.1)	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	T	A	.	.	A	A	.	.	.
<i>P. ginseng</i> (KM210143.1)	.	.	.	A	.	T	.	T	.	.	A	.	.	.	T	A	.	.	A	A	.	.	.
<i>P. stipuleanatus</i> (KM210157.1)	.	.	.	A	.	.	.	T	.	C	A	.	.	.	T	C	.	.	A	A	.	.	.
<i>P. trifolius</i> (HQ112614.1)	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	A	A	.	.	.
<i>Polyscias javanica</i> (AY753252.1)	.	A	A	A	T	G	G	C	G	.	T	T	T	A	A	T	C	T	.	C	C	T	.

	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	
<i>P. vietnamensis</i> (KT154685.1)	1	3	4	5	5	5	1	1	6	6	0	2	4	6	6	0	0	1	3	3	3	3	
<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> (KT194325.1)	3	6	4	0	6	7	1	5	7	8	9	4	4	4	8	1	6	7	1	4	7	7	
<i>P. japonicas</i> var. <i>bipinnatifidus</i> (KM210141.1)	T	G	A	A	G	G	A	A	G	T	T	A	T	G	G	A	G	T	T	G	T	T	
<i>P. japonicus</i> (KF208380.1)	.	A	A	A	G	.
<i>P. notoginseng</i> (GQ436706.1)	.	A	.	G	A	A	T	.	.
<i>P. pseudoginseng</i> (KJ667625.1)	.	A	.	G	A	A	T	.	.
<i>P. quinquefolius</i> (GQ436709.1)	.	A	A	.	.	.	G	.	A	T	.	.
<i>P. ginseng</i> (KM210143.1)	.	A	A	.	.	.	G	.	A	T	.	.
<i>P. stipuleanatus</i> (KM210157.1)	.	A	A	A	A	C	T	.	.
<i>P. trifolius</i> (HQ112614.1)	G	A	A	A	C	.	.	.	A	T	.	G
<i>Polyscias javanica</i> (AY753252.1)	A	T	T	C	T	A	C	T	A	A	A	.	.	T	C	.	A	C	.	T	G	A	.

Bảng 3. Bảng khoảng cách di truyền giữa loài Sâm ngọc linh và mẫu sâm thu tại Lai Châu, so sánh với 8 loài *Panax* khác

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>P. vietnamensis</i>										
<i>P. vietnamensis</i> var.										
2 <i>fuscidiscus</i>	0,012									
3 <i>P. japonicus</i>	0,012	0,004								
<i>P. japonicus</i> var.										
4 <i>bipinnatifidus</i>	0,011	0,003	0,001							
5 <i>P. notoginseng</i>	0,012	0,003	0,002	0,001						
6 <i>P. pseudoginseng</i>	0,015	0,005	0,003	0,004	0,005					
7 <i>P. quinquefolius</i>	0,013	0,005	0,003	0,002	0,003	0,006				
8 <i>P. ginseng</i>	0,014	0,006	0,004	0,003	0,004	0,007	0,001			
9 <i>P. stipuleanatus</i>	0,015	0,009	0,006	0,005	0,006	0,010	0,005	0,006		
10 <i>P. trifolius</i>	0,016	0,010	0,007	0,006	0,007	0,011	0,009	0,010	0,007	
11 <i>Polyscias javanica</i>	0,649	0,641	0,639	0,639	0,641	0,636	0,642	0,642	0,645	0,651



Hình 1. Mối quan hệ di truyền của một số loài trong chi *Panax* (phương pháp Neighbor Joining)

Phân tích trình tự nucleotide vùng gen *rpoB*

Với vùng gen *rpoB*, sau khi chỉnh sửa và loại bỏ tất cả các vị trí trống, một đoạn gen *rpoB* dài 500 bp của mẫu sâm thu tại Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và mẫu Sâm ngọc linh đã được dùng để so sánh với nhau và so sánh với 8 loài khác trong chi *Panax* lấy từ ngân hàng gen thế giới. Kết quả so sánh trên Mega 5.0 cho thấy đã tìm thấy 2 vị trí sai khác nucleotide giữa mẫu *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* và *P. vietnamensis* ở vị trí số 11 và 13 (bảng 4).

Kết quả so sánh sự khác nhau giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo mô hình Kimura 2 thông số (Kimura, 1980) đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa loài *P. vietnamensis* và mẫu *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* là 0,4%.

Zhu et al. (2003) đã mô tả *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* là một thứ của *P. vietnamensis* có phân bố ở Vân Nam, Trung Quốc và thứ này khác với *P. vietnamensis* ở 4 vị trí nucleotide trên gen *trnK*. Việc phát hiện *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* có phân bố tại Lai Châu, chính thức mở rộng vùng phân bố của thứ này ở Việt Nam. Kết quả phân tích trình tự 2 vùng gen *rbcL* và *rpoB* cho thấy *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* có quan hệ gần gũi với loài *P. vietnamensis*, thể hiện khả năng *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* sẽ có đầy đủ các thành phần về hợp chất hoá học như loài Sâm ngọc linh. Trình tự các đoạn gen *rbcL* và *rpoB* của *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* và *P. vietnamensis* đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số lần lượt là KT194325.1, KT194324.1 và KT154685.1, KT154686.1.

Bảng 4. Kết quả so sánh các Nu sai khác trên vùng gen *rpoB* giữa mẫu *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* với *P. vietnamensis* và các loài khác thuộc chi *Panax*

	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4
	1	1	1	5	6	5	5	6	6	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	4	5	6	0	1	3	9	0	6	9	0	1	1	2
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>P. vietnamensis</i>																
var. <i>fuscidiscus</i>																
KT194324	C	G	T	T	G	G	G	A	C	A	A	G	G	C	C	C
<i>P. vietnamensis</i>																
KT154686	A	G
<i>P. ginseng</i>																
KF412449	T	.	A	.	T	.	.	.	T
<i>P. japonicus</i> var.																
<i>bipinnatifidus</i>																
HQ112595	T	.	A	.	T	.	.	.	T
<i>P. pseudoginseng</i>																
HQ112592	T	C	A	.	T	.	.	.	T	.	C	.	.	.	G	.
<i>P. trifolius</i>																
HQ112591	T	.	A	.	T	.	.	.	T	.	.	.	G	.	.	C
<i>P. quinquefolius</i>																
HQ112593	T	.	A	.	T	.	.	.	T	C	.
<i>P. japonicus</i>																
HQ112579	T	.	A	.	T	.	.	.	T
<i>P. stipuleanatus</i>																
HQ112578	T	.	A	.	T	.	.	.	T	.	.	.	G	.	C	A
<i>P. notoginseng</i>																
HQ112577	T	.	A	.	T	.	.	.	T
<i>Hedera hibernica</i>																
JN995078	T	T	G	G	T	G	.	T	T	.	.	T	T	T	A	G

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ về kinh phí từ đề tài hợp tác song phương Việt-Nga (VAST.HTQT.Nga.10/15-16).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam, phần II: Thực vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

CBOL Plant working group, 2009. A DNA barcode for land plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 12794-12797.

Chính Phủ Nước CHXHCN Việt Nam, 2006. Nghị Định 32/2006/NĐ-CP ngày 31.03.2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp quý hiếm.

IUCN, 2015. IUCN Red List of Threatened Species.

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.

Phan Kế Long, Lê Thanh Sơn, Phan Kế Lộc, Vũ Đình Duy, Phạm Văn Thế, 2013. Lai châu ginseng *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q.Cai. I. morphology, ecology distribution and conservation status. Proceedings of the 2nd VAST-KAST on Biodiversity and Bioactive Compounds: 65-73.

Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập, 2006. Những đặc điểm sinh thái cơ bản của Sâm ngọc linh. Tạp chí Dược liệu, 11: 145-147. Hà Nội.

- Nguyễn Đức Thành, 2014. Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật. Tạp chí Sinh học, 36(3): 265-294.
- Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang 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.
- Nguyễn Tập, 2005. Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam. Tạp chí Dược liệu (Hà Nội), 10: 71-76.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. Mol. Biol. Evol., 28(10): 2731-2739.
- Zhu S., Fushimi H., Cai S., Komatsu K., 2003. Phylogenetic relationship in the Genus *Panax*: inferred from Chloroplast *trnK* gene and nuclear 18S rRNA gene sequences. Planta Med., 69(7): 647-653.

***rbcL* AND *rpoB* GENE SEQUENCES OF *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* AND *Panax vietnamensis*, THE BACKGROUND FOR IDENTIFICATION AND COMPARISON**

Nguyen Thi Phuong Trang¹, Nguyen Thi Hong Mai¹, Zhuravlev Yury N², Reunova Galina D²

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

²Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch Russian Academy of Sciences

SUMMARY

The *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* samples collected at Phong Tho district, Lai Chau Province have morphological characteristics very similar with those of *Panax vietnamensis* distributed in Ngoc Linh mountain at Quang Nam and Kon Tum provinces that hinders the identification of these taxons. To supply the information to identify two species and know the genetic distance of these species with other *Panax* species, we sequenced *rbcL* and *rpoB* genes that are among DNA barcoding markers recommended for plant species identification. In the *rbcL* gene of 700 bp in length, we found 9 nucleotide differences between *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and *Panax vietnamensis* and the genetic similarity was 98,8%, while in the *rpoB* gene of 500 bp in length, only 2 nucleotide differences were discovered and the genetic distance was 0,4%. The sequences of *rbcL* and *rpoB* of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and *Panax vietnamensis* were submitted to Genbank with the accession numbers KT194325.1, KT194324.1 and KT154685.1, KT154686.1 respectively.

Keywords: *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, *Panax vietnamensis*, *rbcL*, *rpoB*, chloroplast DNA.

Citation: Nguyen Thi Phuong Trang, Nguyen Thi Hong Mai, Zhuravlev Yury N., Reunova Galina D., 2017. *rbcL* and *rpoB* gene sequences of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and *Panax vietnamensis*, the background for identification and comparison. Tap chi Sinh hoc, 39(1): 80-85. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.7870

*Corresponding author: ntptrang@yahoo.com.

Received 11 March 2016, accepted 20 March 2017