

## SỬ DỤNG VÙNG *ITS-rDNA* VÀ GEN *MATK* ĐỂ XÁC ĐỊNH LOÀI SÂM THUỘC CHI SÂM (*PANAX*) Ở VÙNG NÚI PHU XAI LAI LENG, KỶ SƠN, NGHỆ AN

Vũ Đình Duy<sup>2,6</sup>, Trần Thị Việt Thanh<sup>1,6</sup>, Phan Kế Lộc<sup>3</sup>, Nguyễn Minh Tâm<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Hương<sup>4,6</sup>, Nguyễn Thị Hiền<sup>5,6</sup>, Phan Kế Long<sup>1,6,✉</sup>

<sup>1</sup>Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Sinh thái Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>4</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>5</sup>Trường THPT Ngô Sỹ Liên, Thành phố Bắc Giang

<sup>6</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: pkelong@gmail.com

Ngày nhận bài: 20.9.2019

Ngày nhận đăng: 23.12.2019

### TÓM TẮT

Mã vạch sử dụng các đoạn DNA trong hệ gen được tiêu chuẩn hóa hiện là một công cụ hữu ích để xác định, nhận dạng loài. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng mã vạch DNA vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) và vùng gen lục lạp (*matK*) để xác định 32 mẫu sâm tự nhiên thu tại núi Phu Xai Lai Leng và 19 mẫu sâm tại Vườn Dược liệu của Công ty TH, xã Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An và xác định mối quan hệ họ hàng của chúng với các loài trong chi nhân sâm (*Panax*). Tỷ lệ thành công cho phản ứng khuếch đại PCR vùng gen *ITS-rDNA* và *matK* là 100%. Tỷ lệ đọc thành công trình tự hai chiều đạt được từ sản phẩm PCR là 100%. Độ dài trình tự nucleotide phân tích thuộc vùng *ITS-rDNA* và *matK* là 616 bp, 1433 bp, tương ứng. Trên cơ sở phân tích dữ liệu vùng *ITS-rDNA*, tất cả 32 mẫu sâm tự nhiên (*Panax* TB) đều có mối quan hệ chặt chẽ với loài Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) (MLBS = 99%, BPP = 100%), 19 mẫu sâm (*Panax* TH) tại Vườn Dược liệu đều có mối quan hệ chặt chẽ với loài Tam thất (*P. notoginseng*) (MLBS = 100%, BPP = 100%). Sự khác biệt di truyền giữa các loài trong chi *Panax* thay đổi từ 0,2% đến 7,9%, trung bình 4% đối với vùng *ITS-rDNA* và trung bình 1,2% (0,1- 2,9%) đối với vùng *matK*. Mối quan hệ di truyền của các loài/thứ trong chi *Panax* cũng chỉ ra rằng các loài trong chi *Panax* có cùng nguồn gốc tiến hóa và ghi nhận Tam thất hoang có phân bố tại núi Phu Xai Lai Leng, xã Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An, trên cơ sở đó chính thức mở rộng vùng phân bố của loài này ở Việt Nam.

**Từ khoá:** DNA mã vạch, *ITS*, *matK*, *Panax*, *P. stipuleanatus*, *P. notoginseng*

### MỞ ĐẦU

Chi nhân sâm *Panax* (Araliaceae) là cây thuốc quan trọng của Bắc Mỹ và Đông Á (Shu, 2007; Mabberley, 2008; Nguyễn Văn Đạt và Trần Thị Phương Anh, 2013; Phan Kế Long *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2015; Taram *et al.*, 2018). Trong 19 loài thuộc chi *Panax* (Pankey and Ali, 2012; Taram *et al.*, 2018), ba loài được

biết đến là Sâm việt nam (*Panax vietnamensis*), Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) và Sâm vũ diệp (*P. bipinnatifidus*) được tìm thấy ở vùng núi cao của Việt Nam (Phạm Hoàng Hộ, 2000; Nguyễn Tập, 2005). Cả 3 loài sâm này đều thuộc nhóm loài quý hiếm cần bảo vệ ghi trong Sách đỏ Việt Nam (2007). Loài *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. hiện được ghi nhận gồm 3 thứ: Sâm ngọc linh - *P. vietnamensis* Ha

et Grushv. var. *vietnamensis*, phân bố ở Kon Tum (núi Ngọc Linh, Đăk Tô, Đăk Glei), Quảng Nam; Sâm lai châu - *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* Komatsu, Zhu, Cai, 2003, phân bố ở Lai Châu (Mường Tè, Tam Đường, Sin Hồ), Vân Nam (Jinping, Trung Quốc); Sâm langbian - *P. vietnamensis* var. *langbianensis* phân bố ở núi Lang Bian (Lâm Đồng) (Sách đỏ Việt Nam, 2007; Phan Ke Long *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2015; Nong *et al.*, 2016). Các loài *Panax* được biết đến với nhóm hoạt chất saponin nhiều loại và hàm lượng cao, đặc biệt là 3 hoạt chất đặc trưng Ginsenosid Rb1, Ginsenosid Rg1, Majonosid R2 (MS2) có trong *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* có khả năng điều trị một số bệnh ung thư (Nguyen *et al.*, 1993, 1994; Duc *et al.*, 1994; Huong *et al.*, 1997; Konoshima *et al.*, 1999; Yamasaki, 2000).

Việc xác định chính xác các loài/thứ của Sâm là rất quan trọng đối với việc xác định giống cây, lựa chọn cha mẹ để nhân giống, sử dụng và bảo tồn nguồn gen của chúng. Các phương pháp truyền thống xác định các loài trong chi *Panax* chủ yếu dựa trên các quan sát kiểu hình trong khi các đặc điểm hình thái thường bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường (Jo *et al.*, 2013). Đặc biệt, trong giai đoạn chưa ra hoa, quả, đặc điểm hình thái của nhiều loài Sâm rất tương đồng, khiến việc phân biệt chúng rất khó khăn. Do đó, một phương pháp nhận dạng đơn giản và chính xác cho các loài Sâm là rất cần thiết.

Mã vạch DNA (DNA barcoding) sử dụng đoạn DNA ngắn đã chuẩn hóa phân biệt giữa các loài (Hebert *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012a) trở thành công cụ phục vụ có hiệu quả cho công tác giám định, phân loại, đánh giá quan hệ di truyền, phát hiện loài mới, quản lý chất lượng, nguồn gốc, xuất xứ, bản quyền của sản phẩm từ sinh vật (Chen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012b). Ở thực vật, một số vùng gen lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*...) và vùng gen nhân (*ITS-rDNA*) đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại (phylogeny), phân loại (taxonomy) và nhận dạng loài (identity) (CBOL Plant Working Group, 2009; China Plant BOL Group, 2011). Các chỉ thị di truyền phân tử đã

được sử dụng rộng rãi trong việc xác định các loài Sâm, đặc biệt, cũng có khá nhiều công bố về mối quan hệ di truyền và nhận dạng loài Sâm trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA*, *matK*, *rbcL*, *rpoB*, (Phan Ke Long *et al.*, 2014a; Nguyễn Thị Phương Trang *et al.*, 2011, 2016; Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2016; Lê Thanh Hương *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017; Phạm Quang Tuyền *et al.*, 2018). Wen *et al.* (1996) đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 12 loài Sâm khác nhau phân bố ở Bắc Mỹ và Đông Á dựa trên trình tự vùng gen *ITS* có độ dài từ 606 đến 608 bp. Komatsu *et al.* (2001) giải trình tự các gen *18S* và *matK* nhằm so sánh đặc điểm di truyền của *P. vietnamensis* và *P. quinquefolium*. Kết quả chỉ ra rằng hai loài hoàn toàn tương đồng ở gen *18S* và khác nhau ở 10 vị trí trên gen *matK*. Lee and Wen (2004) công bố một barcode khác của chi Nhân sâm là vùng *trnC-trnD* nằm xen giữa hai gen *trnC* và *trnD* trong hệ gen lục lạp. Dựa trên trình tự vùng này kết hợp với *ITS*, nhóm nghiên cứu đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 18 loài trong chi Nhân sâm và 2 loài thuộc chi *Aralia*. Phan Kế Long *et al.* (2014a) đã sử dụng phương pháp nghiên cứu hình thái và phân tích trình tự nucleotide vùng *matK* và *ITS-rDNA* xác định được thứ *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* có phân bố tại vùng núi thuộc các huyện Mường Tè, Sin Hồ và Tam Đường, tỉnh Lai Châu, trong đó giữa các quần thể ở Mường Tè và Sin Hồ có thể phân biệt được với quần thể ở Tam Đường bằng 1 nucleotide đặc trưng cho vùng địa lý trên vùng gen *ITS-rDNA*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã giải mã trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* và *matK* để xác định các mẫu sâm tự nhiên thu tại núi Phu Xai Lai Leng và mẫu sâm tại Vườn Dược liệu công ty TH, xã Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA nhằm cung cấp nền tảng cho các nghiên cứu bảo tồn, tiến hóa và hệ thống sinh học của loài.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Trong 3 chuyến đi khảo sát thực địa tại núi

Phu Xai Lai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An (4/2018, 8/2018 và 6/2019), chúng tôi đã thu được 32 mẫu sâm tự nhiên (Ký hiệu *Panax* TB1 đến *Panax* TB32) với tọa độ (19°13'47.8''; 104°07'07.2''; 1852 m) và 19 mẫu sâm (Ký

hiệu *Panax* TH1 đến *Panax* TH19) được thu tại Công ty TH, Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An với tọa độ 19° 14' 11.9", 104° 7' 36.5", 1360m) được dùng làm vật liệu nghiên cứu (Hình 1).



**Hình 1.** A, C – mẫu sâm tự nhiên thu tại núi Phu Xai Lai Leng; B, D - loài Sâm thu tại Vườn Dược liệu công ty TH, Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An.

### Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng bộ hóa chất Plant DNA isolation Kit (Norgenbiotek, Canada).

### Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR

Nhân bản vùng gen *ITS-rDNA* và *matK* bằng kỹ thuật PCR sử dụng các cặp mồi gen *ITS*: PaITSF 5'-CAC TGA ACC TTATCA TTT AG AG -3' và PaITSR 5'-CTT ATT GAT ATGCTT AAA CTC AG-3'; gen *matK*: kFa 5'-TTT GAC TGT ATC GCA CTA TG-3' và kRb 5'-ATT TAC ACG GAT TCCTAA CG-3' (Phan Kế Long *et al.*, 2014a). Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 $\mu$ L với các thành phần: 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O deion, 12,5  $\mu$ L PCR Master mix kit (2X), 1,25  $\mu$ L mỗi xuôi (10 pmol/ $\mu$ L), 1,25  $\mu$ L mỗi ngược (10 pmol/ $\mu$ L), 3  $\mu$ L DNA (10 – 20 ng). Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700

(GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: 94°C trong 3 phút; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72°C trong 10 phút, giữ sản phẩm ở 4°C.

### Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại công ty Macrogen, Hàn Quốc. Trình tự DNA sau khi giải trình tự được hiệu chỉnh và loại bỏ các tín hiệu nhiễu với sự trợ giúp của phần mềm ChromasPro2.1.6 (Technelysium, 2013) được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank (sử dụng công cụ BLAST trong NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần

mềm Bioedit v7.0.5.2 (Hall, 1999). Các vùng không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích.

### **Xây dựng cây phát sinh chủng loại**

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood) sử dụng phần mềm Treefinder v 2011 (Jobb, 2011) và phương pháp Bayesian inference (BI) bằng phần mềm MrBayes v 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Trước khi phân tích ML và BI, dữ liệu trình tự nucleotide sẽ được khảo sát phân bố nucleotide, kiểm tra các giả thuyết và xác định mô hình tiến hóa tối ưu sử dụng bởi Kakusan 4.0 (Tanabe, 2011) dựa trên thông tin Akaike được hiệu chỉnh (corrected AICc - Akaike Information Criterion). Mô hình tiến hóa tốt nhất được chọn cho ML là mô hình đảo chiều thời gian tổng thể (GTR) với giá trị tham số gamma (G: 0,605 trong ML và 0,704 trong BI) trên vùng gen *ITS - rDNA*. Trong vùng gen *matK* mô hình tiến hóa tốt nhất được chọn cho ML là mô hình đảo chiều thời gian tổng thể (GTR) với giá trị tham số gamma (G: 0,166 trong ML và 0,165 trong BI). Kiểm tra ước lượng tham số và điểm hội tụ bằng cách sử dụng phần mềm Tracer 1.5 (Rambaut and Drummond, 2009). Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap) trong cây ML (MLBS) và BI (BPP) với 1.000 lần lặp lại. Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi được tính toán bằng Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **Trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* của 32 mẫu sâm tự nhiên (*Panax TB*) và 19 mẫu sâm tại vườn Dược liệu (*Panax TH*)**

Sau khi chỉnh sửa và loại bỏ tất cả các vị trí trống thì đa số các mẫu sâm thu được ở Nghệ An có chiều dài vùng gen *ITS-rDNA* là 616 bp và các trình tự này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI) với mã số từ MN809281 đến MN809318. Kết quả so sánh chỉ ra tất cả 32 mẫu *Panax TB* và 19 mẫu *Panax*

TH có mức độ tương đồng nucleotide 100% trong vùng gen này nên chúng tôi đã sử dụng kết quả của 1 mẫu để tiến hành các phân tích tiếp theo. Trình tự nucleotide thu được từ các mẫu này được kiểm tra tính tương đồng (similarity) với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự nucleotide của các mẫu này tương đồng cao với các loài trong chi *Panax*. Cụ thể, mẫu *Panax TB* tương đồng di truyền cao 99,85% với loài *P. stipuleanatus* (MK408811). Tuy nhiên, mẫu *Panax TB* có mức độ tương đồng di truyền khá thấp với loài *P. wangianus* - MK408809 (97,65%); *P. ginseng* - KM207668 (97,5%); *P. vietnamensis* - AY271924 (97,65%); *P. assamicus* - AY233321 (95,77%). Mẫu *Panax TH* có mức độ tương đồng cao 100% với loài *P. notoginseng* (MK408810) và có mức độ tương đồng di truyền cũng khá thấp với loài *P. wangianus* - MK408809 (96,2%); *P. zingiberensis* MK408787 (96,06%); *P. ginseng* - KF727974 (96,19%); *P. vietnamensis* - AY271924 (96,2%); *P. assamicus* - AY233321 (95,77%). Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự nucleotide truy vấn. Kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (99%) cũng không thể suy ngược lại tên loài bởi kết quả BLAST chỉ hiển thị trình tự nucleotide tương đồng nhất mà trên Genbank hiện có. Do kết quả của BLAST cho ra những điểm nghi vấn chưa chuẩn xác, vì vậy chúng tôi đã sử dụng phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại để xác định tên khoa học cho các mẫu sâm trong nghiên cứu.

Trình tự nucleotide vùng gen *ITS -rDNA* của các mẫu sâm nghiên cứu sẽ được so sánh về khoảng cách di truyền với trình tự của 16 loài trong cùng chi (dữ liệu các loài lấy trên Genbank). Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, các vị trí còn lại được sử dụng cho phân tích. Kết quả phân tích cho thấy có 118/616 vị trí biến đổi (Variable), 43/616 vị trí có giá trị mang thông tin (Parsimony informative). Khoảng

cách di truyền giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo phương pháp *p-distance* đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài trong chi *Panax*. Khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi *Panax* dao động khá lớn trung bình 4% (0,2 - 7,9%) (Bảng 1). Không có sự sai khác về di truyền giữa mẫu *Panax* TH với *P. notoginseng*. Sự sai khác rất thấp (0,2%) cũng được tìm thấy giữa mẫu *Panax* TB với loài *P. stipuleanatus*. Khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi *Panax* (4%) thấp hơn so với khoảng cách di truyền giữa các loài gỗ quý thuộc chi *Dalbergia* trung bình 8,1% (6,5-9,3%) (Dương Văn Tăng *et al.*, 2011). Kết quả này phản ánh các mẫu *Panax* TB trên có tên khoa học là *P. stipuleanatus* và mẫu *Panax* TH có tên khoa học *P. notoginseng*. Để có thêm các bằng chứng

khoa học chúng tôi xác định vị trí phân loại của các mẫu sâm này.

Sơ đồ mối quan hệ họ hàng của các mẫu sâm thu tại Nghệ An với 16 loài thuộc chi *Panax* đã được xây dựng theo cả 2 phương pháp ML và BI (Hình 2) chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau. Các phân tích ML và BI đã tạo ra với thông số (-lnL) = 1975.403 và 2004.675, tương ứng. Mẫu *Panax* TB / Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) và mẫu *Panax* TH/Tam thất *P. notoginseng* tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (100%) và quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap (MLBS = 99%, BPP = 100%). Kết quả này cho phép nhận định các mẫu *Panax* TB có chung nguồn gốc với loài Tam thất hoang và mẫu *Panax* TH có chung nguồn gốc với loài Tam thất.

**Bảng 1.** Khoảng cách di truyền (%) của các mẫu *Panax* TB và mẫu *Panax* TH với các loài trong chi *Panax* trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA*.

| Mẫu/loài                            | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18 |  |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|
| 1. <i>Panax</i> TB                  | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 2. <i>Panax</i> TH                  | 5,0 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 3. <i>P. stipuleanatus</i> MK408811 | 0,2 | 4,9 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 4. <i>P. pseudoginseng</i> AY233327 | 3,6 | 6,3 | 3,4 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 5. <i>P. notoginseng</i> MK408810   | 5,0 | 0,0 | 4,9 | 6,3 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 6. <i>P. assamicus</i> AY233321     | 4,5 | 3,2 | 4,3 | 5,9 | 3,2 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 7. <i>P. ginseng</i> AY548192       | 4,5 | 3,2 | 4,3 | 5,6 | 3,2 | 1,4 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 8. <i>P. quinquefolius</i> FJ606755 | 4,1 | 2,7 | 4,0 | 5,2 | 2,7 | 1,3 | 0,9 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 9. <i>P. sinensis</i> AY271920      | 4,5 | 3,1 | 4,3 | 5,4 | 3,1 | 1,6 | 1,3 | 1,1 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 10. <i>P. vietnamensis</i> MK979392 | 4,3 | 2,5 | 4,1 | 5,8 | 2,5 | 1,8 | 1,8 | 1,3 | 1,6 | -   |     |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 11. <i>P. variabilis</i> AY271923   | 4,5 | 3,1 | 4,3 | 5,2 | 3,1 | 1,6 | 2,0 | 1,4 | 2,2 | 2,0 | -   |     |     |     |     |     |     |    |  |
| 12. <i>P. omeiensis</i> POU41686    | 4,9 | 3,4 | 4,7 | 6,3 | 3,4 | 1,4 | 1,8 | 1,4 | 2,0 | 2,0 | 1,8 | -   |     |     |     |     |     |    |  |
| 13. <i>P. wangianus</i> PWU41690    | 4,9 | 3,2 | 4,7 | 6,5 | 3,2 | 1,8 | 2,2 | 1,6 | 2,3 | 2,2 | 2,0 | 2,0 | -   |     |     |     |     |    |  |
| 14. <i>P. shangianus</i> AY233328   | 4,1 | 2,9 | 4,0 | 5,6 | 2,9 | 1,1 | 1,4 | 0,9 | 1,6 | 1,4 | 1,3 | 1,3 | 1,4 | -   |     |     |     |    |  |
| 15. <i>P. japonicus</i> AY271918    | 5,0 | 4,1 | 4,9 | 6,1 | 4,1 | 2,7 | 2,0 | 1,8 | 2,5 | 2,7 | 2,9 | 2,9 | 3,1 | 2,3 | -   |     |     |    |  |
| 16. <i>P. bipinnatifidus</i> U41679 | 7,0 | 5,6 | 6,8 | 7,9 | 5,6 | 4,3 | 4,1 | 3,6 | 3,8 | 4,1 | 4,7 | 4,3 | 4,9 | 4,1 | 4,7 | -   |     |    |  |
| 17. <i>P. trifolius</i> HQ112445    | 6,5 | 7,4 | 6,3 | 7,4 | 7,4 | 7,2 | 7,2 | 6,8 | 7,0 | 6,7 | 7,0 | 7,4 | 7,7 | 7,0 | 7,9 | 9,7 | -   |    |  |
| 18. <i>P. major</i> PMU41683        | 4,0 | 2,9 | 4,1 | 5,4 | 2,9 | 1,6 | 1,4 | 0,9 | 1,3 | 1,4 | 2,0 | 2,0 | 2,2 | 1,4 | 2,3 | 3,1 | 7,0 | -  |  |

**Trình tự nucleotide vùng gen *matK* của 32 mẫu sâm tự nhiên (*Panax* TB) và 19 mẫu sâm tại Vườn Dược liệu (*Panax* TH)**

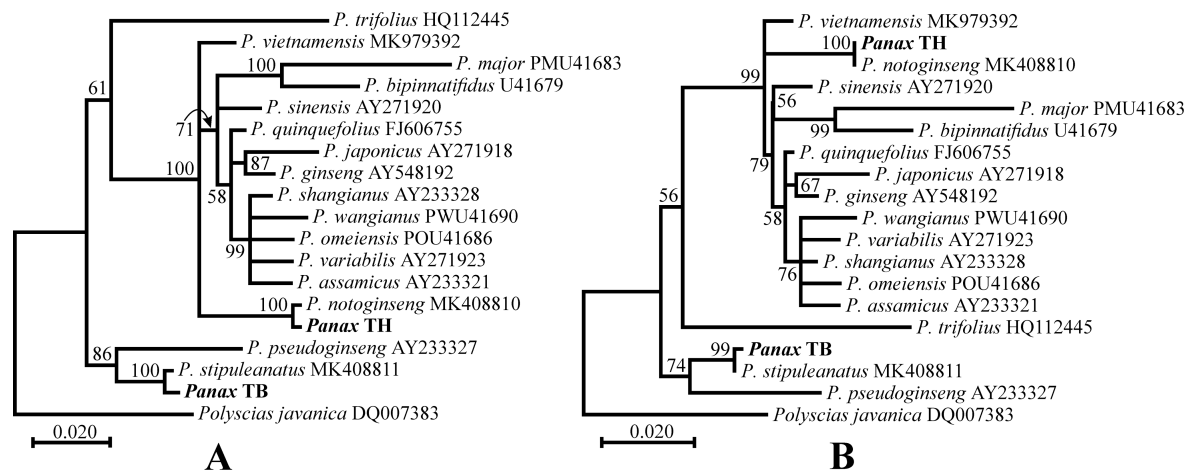
Sau khi chỉnh sửa và loại bỏ tất cả các vị trí trống vùng gen *matK* của các mẫu Sâm thu được ở Nghệ An có chiều dài 1433 bp và được đăng ký trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI) với mã số từ MN829825 đến MN829830. Kết quả so sánh chỉ ra tất cả 32 mẫu *Panax* TB và

19 mẫu *Panax* TH có mức độ tương đồng nucleotide 100% trong vùng gen này nên chúng tôi đã sử dụng kết quả của 1 mẫu để tiến hành các phân tích tiếp theo. Trình tự nucleotide thu được từ các mẫu này được kiểm tra tính tương đồng (similarity) với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự nucleotide của các mẫu này tương đồng cao với các loài trong chi *Panax*. Cụ thể, mẫu *Panax* TB tương đồng

di truyền cao 99,16% với loài *P. stipuleanatus* (MK408965); *P. quinquefolius* - KM088018 (98,32%); *P. ginseng* - KM088019 (98,12%); *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* - KJ418199 (97,84%); *P. wangianus* - MK408951 (97,91%). Mẫu *Panax* TH có mức độ tương đồng khá cao 98,71% với loài *P. notoginseng* (MK408955); *P. zingiberensis* NC043954 (98,23%); *P. ginseng* - MK408938 (98,31%).

Trình tự nucleotide vùng gen *matK* của các mẫu sâm nghiên cứu sẽ được so sánh về khoảng cách di truyền với trình tự của 11 loài trong cùng chi (dữ liệu các loài lấy trên Genbank). Sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống, các vị trí còn lại được sử dụng cho phân tích. Kết quả phân tích cho thấy có 66/1433 vị trí biến đổi (Variable), 29/1433 vị trí có giá trị mang thông tin (Parsimony informative). Khoảng cách di

truyền giữa các cặp loài trên cơ sở phân tích theo phương pháp *p-distance* đã chỉ ra mức độ khác nhau giữa các cặp loài trong chi *Panax*. Khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi *Panax* dao động rất thấp trung bình 1,2% (0,1 - 2,9%) (Bảng 2). Sự sai khác rất thấp (0,3%) cũng được tìm thấy giữa mẫu *Panax* TB/*P. stipuleanatus* và mẫu *Panax* TH/*P. notoginseng* (0,7%). Khoảng cách di truyền giữa các loài trong chi *Panax* (1,2%) thấp hơn so với khoảng cách di truyền giữa các loài gỗ quý thuộc chi *Vatica*, *Dipterocarpus*, *Shorea*, *Parashorea*, và *Hopea* (Nguyễn Thị Phương Trang *et al.*, 2014). Kết quả này phản ánh các mẫu *Panax* TB trên có tên khoa học là (*P. stipuleanatus*) và mẫu *Panax* TH có tên khoa học *P. notoginseng*. Để có thêm các bằng chứng khoa học chúng tôi xác định vị trí phân loại của các mẫu sâm này.



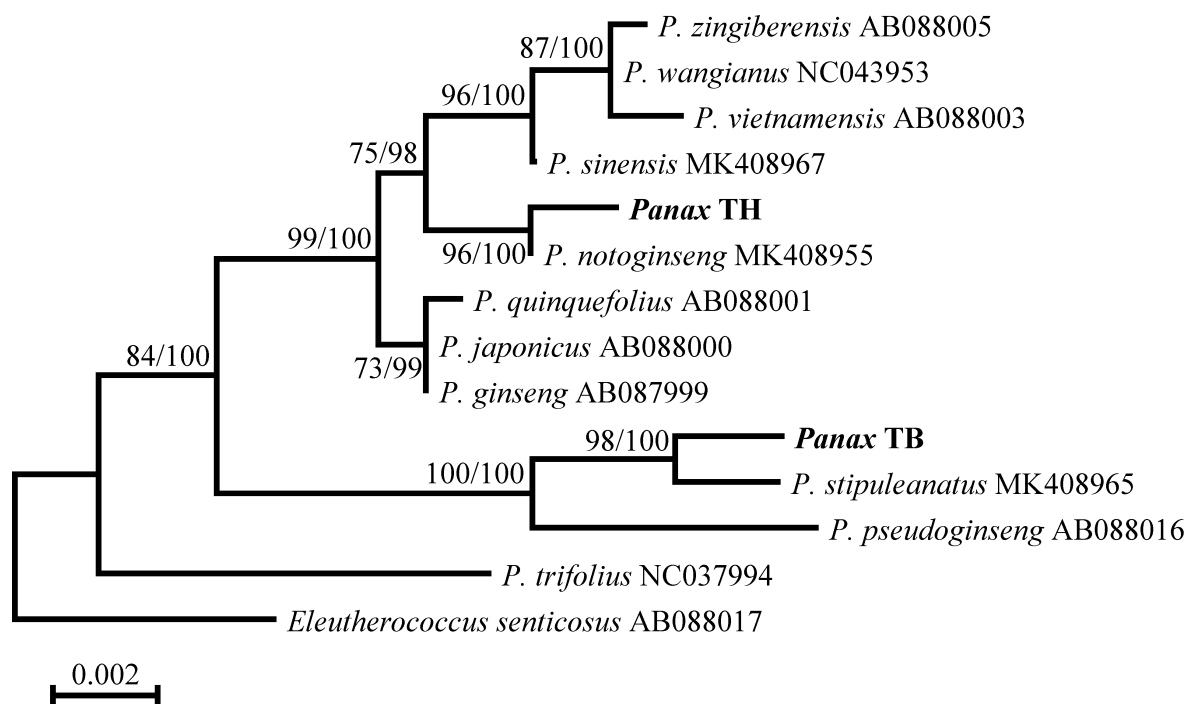
**Hình 2.** Mối quan hệ họ hàng của các mẫu nghiên cứu với các loài trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* bằng phương pháp ML (A) và BI (B). Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. Loài *Polyscias javanica* (DQ007383) là loài ngoài nhóm.

Sơ đồ mối quan hệ họ hàng của các mẫu sâm thu tại Nghệ An với 11 loài thuộc chi *Panax* đã được xây dựng theo cả 2 phương pháp ML và BI (Hình 3) chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau. Các phân tích ML và BI đã tạo ra với thông số  $(-\ln L) = 2580,989$  và  $2600,797$ , tương ứng. Mẫu *Panax* TB/Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*) và mẫu *Panax* TH/Tam thất *P.*

*notoginseng* tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (99,3-99,7%) và quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap (MLBS = 96 và 99%, BPP = 100%). Kết quả này cho phép nhận định các mẫu *Panax* TB có chung nguồn gốc với loài Tam thất hoang và mẫu *Panax* TH có chung nguồn gốc với loài Tam thất.

**Bảng 2.** Khoảng cách di truyền (%) của các mẫu *Panax* TB và mẫu *Panax* TH với các loài trong chi *Panax* trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*.

| Mẫu/loài                             | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13 |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 1. <i>Panax</i> TB                   | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| 2. <i>Panax</i> TH                   | 2,3 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| 3. <i>P. notoginseng</i> MK408955    | 1,6 | 0,7 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| 4. <i>P. ginseng</i> AB087999        | 1,4 | 1,1 | 0,4 | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| 5. <i>P. japonicus</i> AB088000      | 1,4 | 1,1 | 0,4 | 0,0 | -   |     |     |     |     |     |     |     |    |
| 6. <i>P. quinquefolius</i> AB088001  | 1,5 | 1,2 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | -   |     |     |     |     |     |     |    |
| 7. <i>P. zingiberensis</i> AB088005  | 1,7 | 1,3 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | -   |     |     |     |     |     |    |
| 8. <i>P. wangianus</i> NC043953      | 1,6 | 1,2 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,1 | -   |     |     |     |     |    |
| 9. <i>P. vietnamensis</i> AB088003   | 1,7 | 1,3 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,2 | 0,1 | -   |     |     |     |    |
| 10. <i>P. sinensis</i> MK408967      | 1,6 | 1,1 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | -   |     |     |    |
| 11. <i>P. trifolius</i> NC037994     | 1,8 | 2,2 | 1,5 | 1,2 | 1,2 | 1,3 | 1,6 | 1,5 | 1,6 | 1,4 | -   |     |    |
| 12. <i>P. stipuleanatus</i> MK408965 | 0,3 | 2,5 | 1,8 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,9 | 1,8 | 1,9 | 1,7 | 2,0 | -   |    |
| 13. <i>P. pseudoginseng</i> AB088016 | 0,9 | 2,3 | 1,7 | 1,5 | 1,5 | 1,6 | 1,8 | 1,7 | 1,8 | 1,6 | 1,9 | 1,1 | -  |



**Hình 3.** Mối quan hệ họ hàng của các mẫu nghiên cứu với các loài trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng *matK* bằng phương pháp ML và BI. Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. Loài *Eleutherococcus senticosus* (AB088017) là loài ngoài nhóm.

Mã vạch DNA, là một kỹ thuật không còn mới, đang trên đà được chấp nhận như là tiêu chuẩn toàn cầu cho mục đích nhận dạng loài

(Zuo *et al.*, 2011). Tuy nhiên, vẫn cần rất nhiều nỗ lực trước khi mã vạch DNA của thực vật có thể được coi là đủ đáng tin cậy cho ứng dụng

rộng rãi trong thực tế. Hơn nữa, chi *Panax* dường như là một nhóm thực vật lý tưởng để kiểm tra tính khả thi của mã vạch DNA và giải quyết nhiều vấn đề mà sự phát triển mã vạch DNA thực vật có thể gặp phải trong tương lai gần. Sử dụng chi này làm mô hình, tính hữu ích của các phương pháp mã vạch và độ nhận dạng của locus mã vạch có thể được đánh giá toàn diện vì số loài trong chi tương đối nhỏ, trong khi sự biến đổi về hình thái không thật rõ ràng. Các nghiên cứu xây dựng cây phát sinh chủng loại các loài trong chi *Panax* đến nay đều sử dụng trình tự vùng gen *ITS* như một tiêu chuẩn để tham chiếu cũng như kết hợp với các barcode khác để có kết quả toàn diện hơn (Lee and Wen, 2004; Zuo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Lê Thanh Hương *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy rằng trình tự nucleotide vùng gen *ITS-rDNA* và *matK* là những vùng DNA hoàn toàn có thể xác định, giám định được loài *Panax* ở giai đoạn cây chưa ra hoa cũng như chứng minh khả năng phân biệt thành công giữa các loài (Hình 2,3). Kết quả này một lần nữa khẳng định sự phù hợp với công bố của Nguyễn Thị Phương Trang *et al.* (2017) và Lê Thanh Hương *et al.* (2017) chỉ ra vùng gen *ITS-rDNA*, *matK* và *psbA-trnH* là vùng tốt nhất cho việc nhận dạng các loài *Panax*. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng một số đặc điểm hình thái tương đồng của các loài trong chi *Panax* có thể làm cho việc phân loại các loài này gây tranh cãi. Do đó, cần thiết phải tiến hành phối kết hợp chặt chẽ phương pháp phân loại truyền thống với phương pháp phân loại hiện đại để có cơ sở khoa học xác định chính xác tên loài và mối quan hệ di truyền giữa các loài.

Hơn nữa, Phan Kế Long *et al.* (2014b) phân tích 7 mẫu không mang cơ quan sinh sản và còn non của Sâm *Panax* sp. được thu thập trên núi đá silicat Phu Xai Lai Leng, núi cao nhất Bắc Trung bộ Việt Nam, ở vị trí 19°13' vĩ Bắc, 104°12' kinh Đông, độ cao 1600 m so với mặt nước biển, cho thấy về hình thái, chúng rất gần với loài *P. stipuleanatus* và *P. bipinnatifidus*. Tuy nhiên, chúng có lá kèm và lá chết không xé lông chim 2 lần. Trình tự vùng gen *ITS-DNA* của *Panax* sp. ở Phu Xai Lai Leng giống hệt

nhau, và có mối quan hệ gần gũi với *P. stipuleanatus* thu ở Tam Đường, Lai Châu với bootstrap 98%. Tuy nhiên, giữa chúng có sự sai khác ở 2 nucleotide. Sự sai khác 02 nucleotide giữa hai quần thể ở Tam Đường, Lai Châu và Phu Xai Lai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An có thể do đặc trưng vùng địa lý. Kết quả phân tích của chúng tôi cũng chỉ ra 32 mẫu sâm tự nhiên thu tại núi Phu Xai Lai Leng giống hệt nhau và quan hệ rất gần gũi với loài Tam thất hoang (*P. stipuleanatus*). Phát hiện này chính thức mở rộng vùng phân bố của loài này ở Việt Nam.

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, vùng gen *ITS-rDNA* và *matK* của 32 mẫu sâm tự nhiên thu tại núi Phu Xai Lai Leng và 19 mẫu sâm tại Vườn Dược liệu công ty TH, xã Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An được giải trình tự có kích thước 616 và 1433 nucleotide, tương ứng. Trong đó, 118/616 vị trí nucleotide biến đổi, 43/616 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin được xác định ở vùng gen *ITS-rDNA* và 66/1433 vị trí nucleotide biến đổi, 29/1433 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin (*matK*). Các trình tự này đã được đăng ký trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI) góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch DNA cung cấp cho các nghiên cứu tiến hóa và hệ thống sinh học của loài. Hơn nữa, kết quả phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* và *ITS-rDNA* chỉ ra các loài Sâm trong chi *Panax* có cùng nguồn gốc tiến hóa và việc phát hiện Tam thất hoang có phân bố tại núi Phu Xai Lai Leng, xã Na Ngoi, Kỳ Sơn, Nghệ An, chính thức mở rộng vùng phân bố của loài này ở Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Công trình là sản phẩm của đề tài "Điều tra, đánh giá hiện trạng cây thuốc thuộc chi sâm (*Panax* L.) ở khu dự trữ sinh quyển tây Nghệ An (Khu vực Phu Xai Lai Leng)", mã số: UQĐT.CB.01/18-19 cấp kinh phí.

## 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 KHTN & Công nghệ, Hà Nội.

CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106(31): 12794–12797

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5: e8613.

Chen X, Liao B, Song J, Pang X, Han J, Chen S (2013) A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding. *Gene* 530(1): 39-43.

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.

Chromas Pro2.1.6 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Queensland, Australia)

Duc NM, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Nham NT, Yamasaki K, Tanaka O (1994) Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. III. *Chem Phar. Bull* 42(3): 634-640.

Dương Văn Tăng, Nguyễn Quốc Bình, Đinh Thị Phòng (2011) Trình tự nucleotide vùng ITS nhân và mối quan hệ di truyền của 3 loài gỗ quý Việt Nam: Trắc (*Dalbergia cochinchinensis*), Cẩm lai (*D. oliveri*) và Sưa (*D. tonkinensis*). *Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật lần thứ 4*: 1296-1300.

Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S (2010) Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *J Ethnopharmacol* 130: 116-121.

Hall TA (1999) BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symposium Series* 41:95-98

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical

skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101: 14812-14817.

Huong NT, Matsumoto K, Yamasaki K, Duc NM, Nham NT, Watanabe H (1997) Majonoside-R2, a major constituent of Vietnamese ginseng, attenuates opioid-induced antinociception. *Pharmacol Biochem Behav* 57(1-2): 285-291.

Jo IH, Bang KH, Kim YC, Kim JU, Shin MR, Moon JY (2013) Analysis of mitochondrial DNA sequence and molecular marker development for identification of *Panax* species. *Korean J Med Crop Sci* 21: 91-96.

Jobb G (2011) TREEFINDER version March 2011. <http://www.treefinder.de>

Komatsu K, Zhu S, Fushimi H, Qui T, Cai S, Kadota S (2001) Phylogenetic analysis based on 18S rRNA gene and *matK* gene sequences of *Panax vietnamensis* and five related species. *Planta Med* 67(5): 461-465.

Konoshima T, Takasaki M, Ichiishi E, Murakami T, Tokuda H, Nishino H, Duc NM, Kasai R, Yamasaki K (1999) Cancer chemopreventive activity of majonoside-R2 from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*. *Cancer Lett* 147(2): 11-16.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-1874.

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.

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.

Lee C, Wen J (2004) Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC–trnD intergenic region and the utility of trnC–trnD in interspecific studies of plants. *Mol Phylogenet Evol* 31: 894-903.

Liu J, Provan J, Gao LM, Li DZ (2012a) Sampling strategy and potential utility of indels for DNA barcoding of closely related plant species: A case study in *Taxus*. *Int J Mol Sci* 13: 8740-8751.

- Liu Z, Zeng X, Yang D, Ren G, Chu G, Yuan Z, Luo K, Xiao P, Chen S (2012b) Identification of medicinal vines by ITS2 using complementary discrimination methods. *J Ethnopharmacol* 141: 242-249.
- Mabberley DJ (2008) The Plant-Book 3rd ed. *Cambridge Univ. Press*.
- Nguyen MD, Nguyen TN, Kasai R, Ito A, Yamasaki K, Tanaka O (1993) Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. I. *Chem Pharm Bull* 41(11): 2010-2014.
- Nguyen MD, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Nguyen TN, Yamasaki K, Tanaka O (1994) Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in central Vietnam. II. *Chem Pharm Bull* 42(1): 115-122.
- Nguyễn Tập (2005) Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam. *Tạp chí Dược học* 10: 71-76.
- 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 Thị Phương Trang, Nguyễn Minh Đức, Ludwig Triest, Nguyễn Minh Tâm (2014) Mối quan hệ di truyền của một số loài cây thuộc họ Dầu (Dipterocarpaceae) ở Việt Nam dựa trên phân tích trình tự gen *matK*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(1): 55-62.
- Nguyễn Thị Phương Trang, Nguyễn Thị Hồng Mai, Zhuravlev Yury N, Reunova Galina D (2016) 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. *Tạp chí Sinh học* 39(1): 80-85.
- Nguyen TPT, Nguyen THM, Yuri NZ (2017) Application of DNA Barcoding to Authentic *Panax Vietnamensis*. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences* 29(1): 60-67.
- Nguyễn Văn Đạt, Trần Thị Phương Anh (2013) Bước đầu nghiên cứu xây dựng khóa định loại các chi trong họ Ngũ gia bì (Araliaceae) ở Việt Nam. *Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5*: 44-51.
- Nong VD, Le NT, Nguyen DC, Tran VT (2016) A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence. *Phytotaxa* 277(1): 47.
- Pandey AK, Ali MA (2012) Intraspecific variation in *Panax assamicus* Ban. Populations based on internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. *Indian J Biotech* 11:30-38.
- Phạm Hoàng Hộ (2000) *Panax*: 515-516, *Cây cỏ Việt Nam II*, Nxb Trẻ.
- Phạm Quang Tuyền, Nguyễn Minh Đức, Khương Thị Bích, Nguyễn Thái Dương, Nguyễn Trường Khoa, Bùi Thanh Tân, Nguyễn Thị Hoài Anh, Trịnh Ngọc Bon, Trần Thị Kim Hương, Trần Đăng Khánh, Khuất Hữu Trung (2018) Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 60(2): 27-31
- Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh, Lê Thanh Sơn (2014a). Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* và *ITS - rDNA*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(2): 327-337
- Phan Kế Long, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Thiên Tạo, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tư Lệnh, Nguyễn Tiến Lâm, Đặng Xuân Minh (2014b) Đặc điểm hình thái và phân tử của *Panax* sp. (Araliaceae) thu ở núi Phu Xai Lai Liang, tỉnh Nghệ An, Việt Nam. *Tạp chí Sinh học* 36(4): 494-499
- Rambaut A, Drummond A, (2009) *TRACER version 1.5* <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBAYES 2.3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- Shu RS (2007) *Panax* Linnaeus, Sp. Pl. 2: 1058. 1753. *Flora of China* 13: 489-491.
- Tanabe AS (2011) Kakusan 4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol Ecol Resour* 11: 914-921.
- Taram M, Das AP, Tag H (2018) A new species of *Panax* L. (Araliaceae) from Arunachal Pradesh, India. *Pleione* 12(2): 315 - 321.
- Wen J, Zimmer EA (1996) Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, araliaceae): Inferences from ITS sequences of

*Tạp chí Công nghệ Sinh học* **18**(1): 75-85, 2020

- nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 6(2): 167-177.
- Yamasaki K (2000) Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*. *Pharm Biol* 38(1):16-24.
- Zhang GH, Ma CH, Zhang JJ, Chen JW, Tang QY, He MH, Xu XZ, Jiang NH, Yang SC (2015), Transcriptome analysis of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* discovers putative ocotillol-type ginsenosides biosynthesis genes and genetic markers. *BMC Genomics* 16: 1-19.
- Zuo Y, Chen Z, Kondo K, Funamoto T, Wen J, Zhou S (2011) DNA barcoding of *Panax* species. *Planta Med* 77: 182-187.

## **USING *ITS-rDNA* AND *MATK* GENE NUCLEOTIDE SEQUENCES FOR IDENTIFICATION GINSENG SPECIES IN *PANAX* IN PHU XAI LAI LENG, KY SON, NGHE AN**

**Vu Dinh Duy<sup>2,6</sup>, Tran Thi Viet Thanh<sup>1,6</sup>, Phan Ke Loc<sup>3</sup>, Nguyen Minh Tam<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thanh Huong<sup>4,6</sup>, Nguyen Thi Hien<sup>5,6</sup>, Phan Ke Long<sup>1,6</sup>**

<sup>1</sup>*Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Institute of Tropical Ecology, Vietnam - Russian Tropical Centre*

<sup>3</sup>*Hanoi University of Science, Vietnam National University*

<sup>4</sup>*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>5</sup>*Ngo Sy Lien High school, Bacgiang city, Bacgiang*

<sup>6</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

DNA barcoding is a useful tool for species identification using standardized genomic DNA fragments. We used DNA barcodes (*ITS-rDNA* and *matK* gene) to explore *Panax* (32 samples collected from Phu Xai Lai Leng mountain and 19 samples collected from medicinal nursery of TH), and to investigate the phylogenetic taxonomy of *Panax*. In this study, the PCR success rate for *ITS-rDNA* and *matK* region was 100%. The success rate of bidirectional sequencing of PCR product was 100% of *ITS-rDNA* and *matK* region with length of 616 bp, 1433 bp, respectively. All 32 samples (*Panax* TB) of Phu Xai Lai Leng have a close relationship with *P. stipuleanatus* (MLBS = 99%, BPP = 100%). All 19 samples (*Panax* TH) of medicinal nursery have a close relationship with *P. notoginseng* (MLBS = 100%, BPP = 100%). Interspecific genetic distances within and among *Panax* species was varied from 0.2% to 7.9%, average (4%) (*ITS-rDNA* gene) and 0.1 to 2.9%, average (1.2%) (*matK* gene). The genetic relationship of species/gender belonging to the *Panax* genus showed that they have the same evolutionary origin and discovered that new distributed of *P. stipuleanatus* in Phu Xai Lai Leng mountain in Vietnam.

**Keywords:** *DNA Barcodes, ITS, matK, Panax, P. stipuleanatus, P. notoginseng*