

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Tiến Nga

**SỬ DỤNG THÔNG TIN DI TRUYỀN TRÊN VÙNG GEN ITS DNA
TRONG ĐỊNH LOẠI CÁC MẪU SÂM (*PANAX L.*) THU THẬP Ở
TỈNH HÀ GIANG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Tiến Nga

**SỬ DỤNG THÔNG TIN DI TRUYỀN TRÊN VÙNG GEN ITS DNA
TRONG ĐỊNH LOẠI CÁC MẪU SÂM (PANAX L.) THU THẬP Ở
TỈNH HÀ GIANG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS. TS. Phan Kế Long

A handwritten signature in blue ink, appearing to be the name "Phan Kế Long", written over the printed name.

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Lê Tiến Nga

LỜI CẢM ƠN

Luận văn thạc sĩ này được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu Khoa học sự sống, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới PGS. TS. Phan Kế Long – người thầy đáng kính đã tận tình chỉ dạy, hướng dẫn, truyền đạt nhiều kiến thức quý báu và định hướng giúp cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu khoa học hoàn thành luận văn.

Tôi cũng muốn gửi lời cảm ơn đến các thầy, cô thuộc Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam vì đã hướng dẫn cho tôi những kiến thức nền tảng quan trọng trong quá trình học tập tại Học viện.

Một lần nữa, tôi xin cảm ơn đến gia đình, bạn bè của tôi, luôn là chỗ dựa vững chắc, là điểm tựa về mặt tinh thần, luôn cổ vũ động viên tôi, xuyên suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn tất cả!

Hà Nội, Ngày 11 tháng 11 năm 2024

Tác giả



Lê Tiên Nga

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI.....	1
2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI.....	2
3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU	3
4. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. GIỚI THIỆU VỀ CHI SÂM <i>PANAX L.</i>	4
1.2. TỔNG QUAN CÁC NGHIÊN CỨU VỀ CHI <i>PANAX L.</i> TRÊN THẾ GIỚI	4
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU SÂM TẠI VIỆT NAM.....	7
1.4. ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG VIỆC ĐỊNH LOẠI SÂM TẠI VIỆT NAM.....	10
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.1. VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ NGHIÊN CỨU	13
2.1.1. Vật liệu	13
2.1.2. Địa điểm và hóa chất dùng trong nghiên cứu	13
2.1.3. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu.....	14
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu	15
2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu.....	15
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử	15
2.2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	15
2.2.3.2. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)	16
2.2.3.3. Điện di sản phẩm PCR.....	17
2.2.3.4. Tinh sạch sản phẩm PCR	18
2.2.3.5. Thu thập dữ liệu vùng gen ITS -rDNA của các loài trong chi <i>Panax</i> trên Genbank	18
2.2.3.6. Phân tích số liệu.....	20
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	21
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	21
3.1.1 Đặc điểm hình thái các mẫu Sâm thu được tại Hà Giang	21
3.1.2. Đặc điểm sinh học phân tử	25
3.1.2.1. Kết quả tách DNA tổng số.....	25
3.1.2.2. Kết quả thực hiện phản ứng PCR.....	25
3.1.2.3. Kết quả giải trình tự vùng gen ITS – rDNA	26
3.1.2.4. Kết quả thu thập trình tự vùng gen ITS – rDNA của các loài trong chi <i>Panax</i> trên Genbank	28

3.1.2.5. Kết quả phân tích, so sánh trình tự của các mẫu nghiên cứu với các loài trong chi <i>Panax</i>	31
3.2. THẢO LUẬN	35
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	40
TÀI LIỆU THAM KHẢO	41

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
bp	Cặp bazơ nitơ	Base pair
CR	Cực kỳ nguy cấp	Critically endangered
cs	Cộng sự	
dNTP	Deoxyribonucleotit triphosphat	Deoxyribonucleotide triphosphate
DNA	Axit deoxyribonucleic	Deoxyribonucleic acid
EW	Tuyệt chủng ngoài tự nhiên	Extinct in the Wild
ITS	Vùng không phiên mã	Internal transcribed spacer
matK		Maturase K
ML		Maximum likelihood
MP		Maximum parsimony
OD	Mật độ đo quang	Optical density
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp DNA	Polymerase chain reaction
RNA	Axit Ribonucleic	Ribonucleic acid
rDNA	DNA tái tổ hợp	Recombinant DNA
SCN	Sau công nguyên	
TBE	Đệm gồm Tris, borate và EDTA	Tris/ borate/ EDTA buffer
TE	Đệm gồm có Tris và EDTA	
TCN	Trước công nguyên	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Danh sách các loài Sâm trên thế giới

Bảng 2.1. Danh sách mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 2.2. Trình tự cặp môi nhân bản vùng gen ITS-rDNA

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR

Bảng 2.4. Mã số trình tự vùng gen ITS – rDNA của các loài/ thứ Sâm thu thập trên Genbank

Bảng 3.1. Kết quả đo chỉ số OD260/OD280 của các mẫu nghiên cứu

Bảng 3.2. Danh sách mã số Genbank của các thứ thuộc loài *P. vietnamensis* trong công bố của Nông Văn Duy và cs., 2016

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Phân bố các loài Sâm trên thế giới.

Hình 1.2. Sơ đồ vùng gen ITS

Hình 2.1. Sơ đồ các bước thí nghiệm

Hình 2.2. Máy Nanodrop one

Hình 2.3. Chu trình phản ứng PCR

Hình 3.1. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG1, Pa_HG2 thu được tại thôn Phìn Hồ, xã Tân Thành, huyện Bắc Quang, tỉnh Hà Giang

Hình 3.2. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG3, Pa_HG4 thu được tại thôn Nậm Piên, xã Nậm Ty, huyện Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang

Hình 3.3. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG5, Pa_HG6 thu được tại thôn Tham Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang

Hình 3.4. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG7, Pa_HG8 thu được tại thôn Sam Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang

Hình 3.5. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG9, Pa_HG10 thu được tại thôn Chiến Thắng, xã Hồ Thầu, huyện Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang

Hình 3.6. Mẫu (K.M.Feng 13694) isotype (*Panax stipuleanatus*) hiện đang lưu trữ tại phòng tiêu bản Viện Thực vật Bắc Kinh (PE0025805)

Hình 3.7. Hình ảnh điện di kết quả PCR

Hình 3.8. So sánh kết quả giải trình tự vùng gen ITS – rDNA của các mẫu nghiên cứu

Hình 3.9. Kết quả so sánh trình tự vùng gen ITS của các thứ thuộc loài *P. vietnamensis* trong công bố của Nông Văn Duy và cs., (2016)

Hình 3.10. Mối quan hệ họ hàng của các mẫu nghiên cứu với các loài/thứ trong chi *Panax* với mã số Genbank tương ứng, trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide bằng phương pháp Maximum Likelihood. Giá trị ở gốc là giá trị bootstrap > 50%

Hình 3.11. So sánh trình tự vùng gen ITS – rDNA của các mẫu nghiên cứu với loài gần gũi

MỞ ĐẦU

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Việt Nam là quốc gia nằm trong khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa, nóng ẩm với sáu tiểu vùng khí hậu đặc trưng, nên có nguồn tài nguyên về động thực vật rất phong phú và đa dạng. Từ xưa, người dân Việt Nam đã có kinh nghiệm sử dụng các loại thảo dược làm thuốc, trong đó có Sâm.

Nhân sâm (*Panax ginseng*) được sử dụng trong y học phương Đông từ hàng ngàn năm trước [1]. Từ rất lâu đời, người Trung Quốc đã biết đến Sâm là một dược liệu quý, nó chiếm vị trí quan trọng trong danh mục các loại thuốc tự nhiên bán chạy nhất trên toàn thế giới [2]. Tác dụng của Nhân sâm đã được đề cập từ những năm 200 SCN trong tác phẩm của Shanghan Lun.

Chi Nhân sâm (*Panax L.*) là một chi nhỏ trong họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*), các loài thuộc chi này đều có công dụng làm thuốc chữa bệnh. Một số loài thuộc chi *Panax L.* (*Araliaceae*) đã được sử dụng và có giá trị kinh tế cao như *Nhân sâm* (*P. ginseng*), *Tam thất* (*P. notoginseng*) [2,3,4].

Hiện nay ở Việt Nam đã biết có 3 loài Sâm mọc tự nhiên bao gồm: *Sâm việt nam* (hay *Sâm ngọc linh*, *P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) loài này sống ở vùng núi Ngọc Linh thuộc địa bàn Quảng Nam và Kon Tum, với 2 thứ bao gồm: *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* phân bố ở Vân Nam (Trung Quốc), Mường Tè, Sìn Hồ, Tam Đường (Lai Châu) và *P. vietnamensis* var. *langbianensis* phân bố ở vùng núi Langbian thuộc huyện Lạc Dương (Lâm Đồng); *Sâm lông chim* (còn gọi là *Sâm vũ diệp*) (*P. bipinnatifidus*) và *Tam thất hoang* (*P. stipuleanatus*) ở vùng núi Hoàng Liên Sơn thuộc địa bàn Lào Cai, Lai Châu, vùng núi Phu Xai Lai Leng (Nghệ An) [5]. Trong số các loài/thứ Sâm ở Việt Nam nêu trên, loài *Sâm ngọc linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) có giá trị cao nhất, đến hàng trăm triệu USD, do chúng có chứa nhiều saponin có tính an thần cao và đặc biệt có chứa saponin majonoside-R2 [6]. Loại saponin này có khả năng kháng EBV- EA (Epstein-Barr virus early antigen là tác nhân gây ung thư vòm họng) [7].

Do có giá trị kinh tế cao và giá trị sử dụng lớn, các loài Nhân sâm này bị tìm kiếm, khai thác và đang có nguy cơ bị cạn kiệt trong môi trường tự nhiên. Cả ba loài Sâm này đều đã được đưa vào Sách đỏ Việt Nam với tình trạng rất nguy cấp (CR) (2007), thêm vào đó chúng là ba trong số hai mươi một loài/nhóm loài thực vật thuộc Phụ lục I Danh mục Thực vật rừng, Động vật rừng nguy cấp quý hiếm, theo Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22/9/2013 của Thủ tướng Chính phủ [8].

Hà Giang nằm ở khu vực Đông Bắc Việt Nam thuộc tiểu vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, có mùa đông lạnh, mưa hè, thời kỳ khô từ 0.1 đến 1 tháng. Địa hình tại đây khá đa dạng, nguồn tài nguyên động và thực vật phong phú, độc đáo, trong đó có nhiều loài dược liệu quý [9-11].

Hiện nay ở tỉnh Hà Giang có hai loài thuộc chi Sâm gồm *Tam thất hoang* (*P. stipuleanatus*) và *Sâm vũ diệp* (*P. bipinnatifidus*) [12]. Tuy nhiên, nghiên cứu trên chỉ dừng lại ở mức độ ghi nhận sự có mặt của các loài thuộc chi Sâm ở Hà Giang, chưa xác định được tên loài cụ thể, vì còn thiếu dữ liệu hình thái và đặc biệt là dữ liệu sinh học phân tử. Việc phân biệt các loài/thứ Sâm trên thị trường đang gặp khó khăn vì hình thái lá và củ rất giống nhau. Để phân biệt được về hình thái cần có đầy đủ lá, hoa, quả và hạt, nhưng không phải mẫu nào cũng có được đầy đủ các bộ phận nêu trên, thêm vào đó các đặc điểm hình thái cũng bị ảnh hưởng bởi chu kỳ sinh trưởng của cây, và điều kiện sinh trưởng [13]. Việc xác định đúng các loài/ thứ là hết sức cần thiết và có ý nghĩa, do đó kỹ thuật sinh học phân tử hỗ trợ trong định loại, giám định là hết sức quan trọng [14].

Kỹ thuật giải trình tự gen đã trở thành công cụ quan trọng trong nghiên cứu sinh học phân tử và sinh thái học. Nhờ vào tính ổn định và độ chính xác cao, cho phép các nhà nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền, xác định mối quan hệ tiến hóa giữa các loài, cũng như tìm hiểu cấu trúc gen và chức năng của chúng [15]. DNA là đại phân tử có tính ổn định cao, không dễ bị ảnh hưởng bởi tác động bên ngoài, và việc xác định loài dựa trên dữ liệu DNA được xem như là một công cụ bổ sung cho các phương pháp phân loại truyền thống [16]. Trong nghiên cứu năm 2011, trên vùng gen *atpF-atpH*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *psbM-trnD*, *matK*, *rps16*, *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, ITS và *nad1* của 33 quần thể *Panax bipinnatifidus*, 5 quần thể *P. japaonicus*, 2 quần thể *P. stipuleanatus*, 2 quần thể *P. trifolius* và các quần thể của *P. gingseng*, *P. notogingseng*, *P. pseudogingseng*, *P. quinquefolius* [15], kết luận được tác giả đưa ra đó là vùng gen ITS là vị trí có mức độ đa dạng di truyền cao nhất, khả năng phân biệt loài lên đến 87.5% và dưới loài là 84.21%.

Do đó, vấn đề cần làm hiện nay là xác định chính xác có bao nhiêu loài/ thứ Sâm đang được trồng, bảo tồn tại Hà Giang, điều đó giúp cho công tác bảo tồn và phát triển được bền vững, phục vụ cho công cuộc phát triển kinh tế địa phương, luận văn đã lựa chọn đề tài: **“Sử dụng thông tin di truyền trên vùng gen ITS-DNA trong định loại các mẫu Sâm thu thập ở tỉnh Hà Giang”**.

2. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

Mô tả đặc điểm trình tự vùng gen ITS của các mẫu Sâm (*Panax L.*) thu thập được ở tỉnh Hà Giang.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Đối tượng: Các mẫu Sâm (*Panax L.*) thu thập được ở tỉnh Hà Giang.

Phạm vi nghiên cứu: Thôn Phìn Hồ (xã Tân Thanh, huyện Bắc Quang), thôn Nậm Piên (xã Nậm Ty, huyện Hoàng Su Phì, thôn Tham Vè (xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên), thôn Sam Vè (xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên) và thôn Chiến Thắng (xã Hồ Thầu, huyện Hoàng Su Phì)

4. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU

Ý nghĩa khoa học:

Bổ sung, hoàn thiện kiến thức về sự phân bố của các loài thuộc chi Sâm (*Panax L.*) ở tỉnh Hà Giang, và Việt Nam.

Ý nghĩa thực tiễn:

Kết quả này là cơ sở khoa học để nhận biết, bảo tồn và phát triển các nguồn lợi của các loài thuộc chi Sâm (*Panax L.*) tại Việt Nam.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ CHI SÂM *PANAX L.*

Chi *Panax L.* là một chi nhỏ trong họ Ngũ gia bì (Araliaceae), phân bố tại khu vực Đông Á và Bắc Mỹ [17]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, chi *Panax L.* chủ yếu được tìm thấy ở khu vực Bắc bán cầu, bao gồm khu vực Bắc Mỹ và Tây – Nam Canada (*P. quinquefolius* và *P. trifolius*) [18]. Ở khu vực Đông Bắc Á (cụ thể là các khu vực như vùng Viễn Đông Nga, Đông Bắc Trung Quốc, Triều Tiên và Nhật Bản) đã phát hiện được *P. ginseng* và *P. pseudoginseng*. Ba loài (*P. notoginseng*, *P. quinquefolius*, *P. trifolius*) thì được phát hiện tại khu vực Bắc Mỹ. Chi *Panax L.* phân bố tại khu vực phía Nam đó chính là loài *Sâm việt nam* (*P. vietnamensis*), loài này được phát hiện tại miền Trung Việt Nam [19].

1.2. TỔNG QUAN CÁC NGHIÊN CỨU VỀ CHI *PANAX L.* TRÊN THẾ GIỚI

Panax ginseng CA Meyer (hay được gọi là *Sâm hàn quốc*), lần đầu được mô tả trong văn bản Oracle bone (1600-1100 TCN), sau đó được ghi lại trong “Shen Nong’s Herbal Classic”, loài Sâm này được đánh giá rất cao về những tác dụng tuyệt vời mà nó mang lại [20].

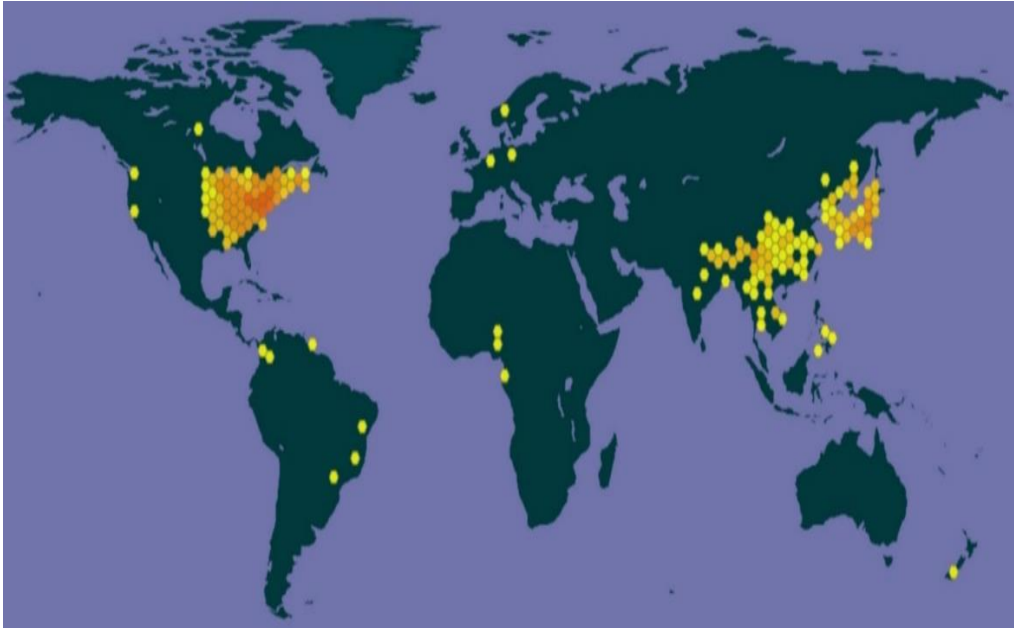
Vào năm 1753, Carl Linnaeus đã mô tả loài *P. quinquefolius*, loài này được tìm thấy ở Bắc Mỹ [21]. Các loài thuộc chi *Panax L.* được sử dụng để hỗ trợ tăng cường sức khỏe, chức năng cơ thể, phát huy chức năng chống ung thư và bảo vệ thần kinh [22], đó là một trong những lý do chính khiến nhu cầu sử dụng các loài thuộc chi *Panax L.* ngày càng tăng cao. Mặc dù bộ phận được sử dụng phổ biến nhất là củ do hàm lượng dưỡng chất và dược tính cao [23], các bộ phận khác như lá, hoa, thân rễ và rễ sợi cũng có thể được khai thác để làm thuốc [24]. Các bộ phận này cũng chứa nhiều hợp chất có lợi cho sức khỏe, góp phần làm tăng sự đa dạng nguồn nguyên liệu cho ngành dược liệu và đáp ứng nhu cầu sử dụng ngày càng lớn trong y học. Một số loài như *Nhân sâm* (*P. ginseng*); *Giả nhân sâm* (*P. pseudoginseng*); *Sâm mỹ* (*P. quinquefolius*) và *Tam thất* (*P. notoginseng*) được trồng với quy mô lớn ở nhiều quốc gia, không chỉ sử dụng riêng tại trong y học phương Đông mà còn là trên toàn thế giới. Trên thế giới hiện nay, số lượng loài sâm đã được cập nhật lên con số là 17 loài.

Bảng 1.1. Danh sách các loài Sâm trên thế giới

STT	Tên khoa học	Tên thường gọi	Khu vực phân bố	TLTK
1	<i>P. assamicus</i> R.N.Banerjee	N/A	Ấn Độ	[25]

2	<i>P. bipinnatifidus</i> Seem.	<i>Sâm lông chim</i>	Ấn Độ, phía Bắc Trung Quốc, phía Nam Trung Quốc, phía Đông Himalaya; Myanmar, Nepal, Thái Lan và phía Tây Himalaya	[26]
3	<i>P. bipinnatifidus</i> var. <i>angustifolius</i> (Burk.) J. Wen	N/A	Ấn Độ, phía Nam Trung Quốc, Đông Himalaya, Nepal, Thái Lan và Tây Himalaya	[27]
4	<i>P. bipinnatifidus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	N/A	Phía Bắc Trung Quốc, Đông Himalaya, Myanmar, Nepal và Thái Lan	[28]
5	<i>P. ginseng</i> C.A. Mey.	<i>Sâm hàn quốc</i>	Phía bắc Trung Quốc, Khabarovsk, Korea, Manchuria and Primorsky	[29]
6	<i>P. japonica</i> C.A. Mey	<i>Sâm nhật bản</i>	Phía nam núi Himalaya, phía nam Trung Quốc, phía tây Nepal, Bhutan,...	[30]
7	<i>P. notoginseng</i> (Burkill) F.H.Chen	<i>Tam thất</i>	Phía Nam Vân Nam, Trung Quốc, Vùng núi cao phía Tây Tứ Xuyên,...	[31]
8	<i>P. pseudoginseng</i> Wall.	<i>Himalaya ginseng</i>	Phía nam Tây Tạng, Trung Quốc và Nepal	[32]

9	<i>P. quinquefolius</i> L.	<i>Sâm mỹ</i>	Đông Canada, phía Nam Florida Mỹ	[33]
10	<i>P. sokpayensis</i> Shiva K. Sharma & Pandit	N/A	Đông Himalaya	[34]
11	<i>P. stipuleanatus</i> H.T.Tsai & K.M.Feng	<i>Tam thất hoang</i>	Phía nam Vân Nam và phía Bắc Việt Nam	[35]
12	<i>P. trifolius</i> L.	<i>Sâm lùn</i>	Geoggia, Kentucky, Michigan, Ohio, New York, Bắc California,....	[36]
13	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> K. Komatsu, S.Zhu & S.Q.Cai	<i>Sâm lai châu</i>	Phía Bắc Trung Quốc, Việt Nam	[37]
14	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>vietnamensis</i>	<i>Sâm việt nam,</i> <i>Sâm ngọc linh</i>	Phía Bắc Trung Quốc, phía Nam Trung Quốc, Việt Nam	[38]
15	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>langbianensis</i> N.V.Duy, V.T.Tran & L.N.Trieu	<i>Sâm lâm đồng</i>	Langbian, Lâm Đồng, Việt Nam	[39]
16	<i>P. wangianus</i> S.C. Sun	<i>Sâm lá hẹp</i>	Nam Trung Quốc	[40]
17	<i>P. zingiberensis</i>	<i>Sâm gừng</i>	Phía Bắc Vân Nam Trung Quốc, phía Nam Việt Nam	[41]



Hình 1.1. Phân bố các loài sâm trên thế giới [42]

Một số tác dụng dược lý của Sâm phải kể đến như: tăng trí nhớ, bảo vệ cơ thể chống stress [43, 44] và tác động lên hệ miễn dịch giúp chống viêm, bảo vệ tế bào chống lão hóa, tăng cường sức đề kháng cho cơ thể và điều trị bệnh tim mạch. Điều đó đã được kiểm chứng qua nhiều nghiên cứu của các nhà khoa học trong nước và quốc tế [45]. Do đó, nó là thành phần chính trong nhiều loại thuốc tại Trung Quốc, đã được sử dụng trên toàn thế giới và mang lại nguồn kinh tế đáng kể cho quốc gia này [46]. Không chỉ vậy, tại một số Quốc gia Châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản,.. việc sử dụng Nhân sâm còn có tính lịch sử, văn hóa, và là một nét đẹp truyền thống độc đáo và lâu đời, được duy trì qua nhiều thế kỷ.

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU SÂM TẠI VIỆT NAM

Ngô Chính Dật là một nhà thực vật học người Trung Quốc, vào năm 1964 ông đã tiến hành kiểm tra tiêu bản thuộc chi *Panax* L. tại Viện Dược liệu ở Việt Nam. Trong số các tiêu bản, mẫu số 911 và 348 đã được xác định chính xác có tên khoa học là loài *Panax bipinnatifidus* Seem. Địa điểm thu thập các mẫu này đó là tại xã Tả Phìn, Sa Pa, Lào Cai. Việc xác định danh pháp khoa học các loài thuộc chi *Panax* tại Việt Nam là một bước tiến quan trọng trong nghiên cứu về hệ thực vật của quốc gia. Điều này có giá trị lớn trong y học truyền thống nhờ tính chất dược liệu của chúng. Việc định danh chính xác không chỉ giúp trong việc bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu mà còn hỗ trợ trong việc mở rộng hiểu biết về phân bố, sinh thái, và đặc điểm sinh học của các loài này trong tự nhiên. Điều này tạo điều kiện cho các nghiên cứu tiếp theo về tiềm năng dược liệu và kinh tế của các loài *Panax* ở Việt Nam.

Đến năm 1969, Grushvitzky và cs. công bố các loài *Sâm vũ diệp* trong các công trình nghiên cứu về họ Araliaceae ở miền Bắc Việt Nam [47, 48, 49, 50]. Từ đó, trong tất cả các tài liệu về cây thuốc và hệ thực vật tại Việt Nam, *Sâm vũ diệp* đều được đề cập đến. Năm 1970, thứ *Sâm nhật* (*P. schinseng* Nees var. *japonicum* Mak) được mô tả trong bộ “Cây cỏ Việt Nam” của tác giả Phạm Hoàng Hộ [51]. Đã có những mô tả ngắn gọn về đặc điểm hình thái, sự phân bố và bao gồm cả hình ảnh minh họa. Năm 1973, tác giả Võ Văn Chi trong cuốn “Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam” mô tả *Panax pseudoginseng* Nees [52]. Đến năm 1993, 3 loài thuộc chi *Panax* L. có ở Việt Nam là *Sâm hai lần chẻ* - *P. bipinnatifidus* Seem., có ở Hoàng Liên Sơn, *Sâm nhật* - *P. japonica* (Nees) Meyer có ở Langbian, Kontum và *Giả nhân sâm* - *P. pseudoginseng* Wall, có ở Sa Pa được tác giả Phạm Hoàng Hộ mô tả trong cuốn “Cây cỏ miền Nam Việt Nam” [53]. Trong lần tái bản vào năm 2000, tác giả Phạm Hoàng Hộ đã bổ sung thêm loài *Sâm ngọc linh* - *P. vietnamensis* Ha & Grushv. Loài này có ở Gia Lai - Kon Tum [54]. Đồng thời ghi nhận *Sâm nhật* có ở cả Langbian và Kon Tum.

Việc thiếu thông tin rõ ràng về nguồn gốc mẫu và địa điểm phân bố cụ thể của cây *Sâm nhật* tại Kon Tum gây ra khó khăn trong việc xác định xem loài này có thực sự phân bố trong tự nhiên ở Việt Nam hay không. Để đánh giá chính xác, các nhà khoa học cần có dữ liệu về nơi thu thập mẫu, môi trường sống tự nhiên, và những nghiên cứu so sánh với các loài đã được mô tả trước đó. Khi thông tin về mẫu và phân bố không đầy đủ, việc xác định chính xác loài, cũng như xác thực của sự hiện của nó trong hệ sinh thái bản địa cũng có thể gặp nhiều trở ngại.

Năm 1993, cuốn sách “1900 loài cây có ích ở Việt Nam” được tác giả Trần Đình Lý cho ra mắt [55], loài *P. vietnamensis* Ha & Grushv., *P. bipinnatifidus* Seem. và *P. pseudoginseng* Wall đã được tác giả mô tả về sự phân bố và tác dụng một cách tóm tắt. Trong cuốn sách xuất bản năm 1995 “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam”, các nội dung về lịch sử ra đời, hình thái, thành phần, tác dụng, công dụng và liệu dùng của hai loài là *P. vietnamensis* Ha & Grushv và *P. pseudoginseng* đều được tác giả Đỗ Tất Lợi đề cập đến [56].

Năm 1997, trong cuốn “Từ điển cây thuốc Việt Nam” của tác giả Võ Văn Chi, *P. pseudoginseng* Wall đã được mô tả là một loài của Nam Trung Quốc và Bắc Việt Nam [57]. Ở Việt Nam, các loài thuộc chi *Panax* mọc hoang và được trồng nhiều ở các tỉnh như Hà Giang, Lào Cai, Cao Bằng, chủ yếu tại các vùng núi có độ cao từ 1200 đến 1500m. Trong số đó, loài *Panax bipinnatifidus* Seem. có tên gọi khác là *Sâm vũ diệp* hay *Tam thất hoang*. Loài này phân bố tại khu vực Nam Trung Quốc và miền Bắc Việt Nam, sống tại độ cao từ 1900 đến 2400 m trong các khu rừng ẩm. Loài

này mọc hoang tại các vùng núi của tỉnh Lào Cai. Cả hai loài này (*Panax bipinnatifidus* và *Tam thất*) đều được trồng và có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt. Ngoài ra, loài *Sâm ngọc linh* (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv) cũng là một loài quý hiếm và có giá trị cao. Cả ba loài này đã được các tác giả nghiên cứu và mô tả chi tiết về đặc điểm, chức năng và thành phần trong các bộ phận, môi trường sống, phương pháp thu hái, và các ứng dụng trong y học thực tiễn, từ đó cung cấp cơ sở cho việc bảo tồn và khai thác bền vững.

Năm 1997, trong cuốn “Cây thuốc Việt Nam trồng hái chế biến trị bệnh ban đầu” Loài *P. pseudoginseng* Wall đã được tả lại rất chi tiết về các khía cạnh như đặc điểm bên ngoài, điều kiện sống, kỹ thuật trồng, phương pháp chăm sóc, cùng với các cách thu hái và chế biến. Ngoài ra công dụng của loài này cũng được nêu rõ. *P. pseudoginseng* là một loài có giá trị dược liệu cao, với các bộ phận như củ, rễ và lá đều được sử dụng để làm thuốc, đặc biệt trong việc bồi bổ sức khỏe và điều trị nhiều loại bệnh [58]. Tác giả có cho biết thêm *P. vietnamensis* Ha & Grushv và củ *Tam thất hoang* – *P. bipinnatifidus* Seem cũng được sử dụng và cho hiệu quả gần như khi sử dụng *P. pseudoginseng* Wall.

Trong cuốn “Cây cỏ Việt Nam” xuất bản năm 1999, Phạm Hoàng Hộ có ghi nhận rằng tại Việt Nam có 3 loài Sâm đó là *P. bipinnatifidus* ở Hoàng Liên Sơn, *P. pseudoginseng* ở Sa Pa, Lào Cai và loài *P. schinseng* Nees var. *japonicum*. Dù vậy, tác giả không đề cập đến loài *P. vietnamensis* Ha & Grushv đã được công bố năm 1985, bởi tác giả Hà Thị Dung và Grushvitzky. Đến năm 2000, tác giả Phạm Hoàng Hộ đã bổ sung *P. vietnamensis* phân bố ở tỉnh Gia Lai và tỉnh Kon Tum vào phiên bản cập nhật này [59].

Năm 2014, tác giả Phan Kế Long và cs. đã ghi nhận bổ sung cho hệ thực vật Việt Nam thứ *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai vốn được phát hiện trước đó ở Vân Nam, Trung Quốc [60]. Loài này được đặt tên là *Sâm lai châu*, địa điểm phát hiện sự có mặt của loài là tại Mường Tè, Tam Đường và Sìn Hồ đều thuộc địa bàn tỉnh Lai Châu. Trong nghiên cứu này tác giả đã mô tả đầy đủ, chi tiết về loài. Các đặc điểm như hình thái, sự phân bố, hay công dụng đều được tác giả nêu rõ trong nghiên cứu.

Năm 2016, Trần Ngọc Lân và cs. nghiên cứu hình thái và chỉ thị DNA của các mẫu *Sâm puxailaileng* [61]. Dựa vào các kết quả thu được từ các mẫu phân tích, tác giả đã chỉ ra rằng *Sâm việt nam* (*Panax vietnamensis*) có mối quan hệ gần với các mẫu được đưa đi nghiên cứu, và các mẫu này có sự khác biệt rõ rệt so với *Tam thất*

hoang (*Panax stipuleanatus*) và *Sâm vũ diệp* (*Panax bipinatifidus*). Từ đó rút ra kết luận, loài “*Sâm Phu Xai Lai Leng*” thuộc loài *Panax vietnamensis* Ha & Grushv.

Năm 2016 tác giả Nông Văn Duy và cs. đã công bố thứ *P. vietnamensis* var *langbianensis* [62]. Theo nghiên cứu năm 2005, tác giả Nguyễn Tập cho rằng tại Việt Nam có 5 loài thuộc chi *Panax*, trong đó có ba loài mọc ngoài tự nhiên và là đối tượng cần được bảo tồn gồm *Sâm vũ diệp*, *Tam thất hoang* và cuối cùng là *Sâm ngọc linh* là loài này là loài đặc hữu của vùng núi Ngọc Linh (thuộc hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum). Năm 2011, nhóm tác giả Nguyễn Thị Phương Trang phát hiện loài Sâm mới, dựa trên việc khai thác trình tự vùng ITS [63]. Một số loài sâm khác như *Sâm lâm đồng*, *Sâm na hang* (Tuyên Quang), *Sâm Phu Xai lai leng* (Nghệ An), cũng sử dụng phương pháp nghiên cứu tương tự.

Tuy vậy, những đặc điểm chưa được mô tả cụ thể như: có lá kèm không, hình dạng màu sắc của quả khi chín và chưa chín. Thêm vào đó, việc không đưa ra, hay đề cập đến vị trí thu mẫu, địa điểm lưu giữ tiêu bản mẫu vật dùng trong nghiên cứu và sự thiếu sự nhất quán trong các kết quả nghiên cứu, về đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS-rDNA trên cá thể thuộc chi *Panax* cùng thu thập ở vùng núi Phu Xai lai leng. Giả thuyết được đặt ra là tại địa điểm này có nhiều hơn một loài *Panax*. Việc áp dụng song song nghiên cứu về hình thái kết hợp dữ liệu sinh học phân tử được cả hai nhóm tác giả thống nhất, để đi đến một kết luận thống nhất và chính xác hơn.

Kết luận từ những nghiên cứu ở trên chỉ ra rằng, 03 loài được phát hiện tại Việt Nam là *Sâm vũ diệp* (*P. bipinnatifidus*), *Tam thất hoang* (*P. stipuleanatus*), *Sâm việt nam* hay còn được gọi là *Sâm ngọc linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*); 02 thứ của *Sâm ngọc linh* là *Sâm lai châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidicus*) và *Sâm langbian* (*P. vietnamensis* var. *langbianensis*).

1.4. ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG VIỆC ĐỊNH LOẠI SÂM TẠI VIỆT NAM

Mặc dù đã các nhà nghiên cứu áp dụng nhiều phương pháp khác nhau như: hóa học, chế biến và nhân giống, tuy nhiên việc nghiên cứu về hệ gen, đánh giá đa dạng di truyền ở mức độ phân tử vẫn còn hạn chế. Năm 2003, tác giả Zhu và cs. ứng dụng trình tự *trnK* và 18S rRNA, áp dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền trên các mẫu Sâm tại Việt Nam [64]. Kết quả từ nghiên cứu thu được là hai mẫu *Sâm ngọc linh* và *Sâm lai châu* có giá trị bootstrap là 74%, từ đó kết luận hai loài này là hai loài có quan hệ gần gũi với nhau. Đến năm 2007, dựa vào kỹ thuật RAPD, tác giả Nguyễn Tập và cs. đã xây dựng nên cơ sở dữ liệu DNA bao gồm *Sâm ngọc linh* [65]. Năm 2011, trong khi phân tích mối quan hệ trên cơ sở di truyền dựa vào trình tự các

nucleotide vùng gen ITS-rDNA, tác giả Nguyễn Thị Phương Trang và cs. đã có được một số kết quả quan trọng, kết luận được đưa ra là, mẫu *Sâm vũ diệp* thuộc nhánh riêng so với *Sâm ngọc linh* [66].

Sử dụng mã vạch phân tử đã được biết đến và sử dụng ngày càng nhiều hơn, nhưng thu được kết quả vẫn chưa được phong phú, hai vùng gen chủ yếu được sử dụng trong kỹ thuật này là vùng *matK* và ITS [67]. Trên đối tượng là loài *Sâm ngọc linh*, Vũ Huyền Trang và cs. đã sử dụng năm chỉ thị phân tử DNA, các mã vạch được sử dụng ở đây là *psbA-trnH*, *matK*, *trnL*, *rbcL* và ITS. Kết luận chỉ ra rằng trong nghiên cứu này thì *psbA-trnH* là chỉ thị cho độ giá trị chính xác cao nhất [68]. Việc xác định được các chỉ thị có độ chính xác, vừa góp phần làm phong phú thêm các nghiên cứu về áp dụng chỉ thị phân tử DNA vừa góp phần đảm bảo chất lượng các mẫu Sâm tại Việt Nam nói chung và *Sâm ngọc linh* nói riêng.

Tác giả Phan Kế Long và cs. sử dụng trình tự nucleotide vùng *matK* và ITS-rDNA trong phân tích và tìm mối quan hệ họ hàng, định loại các mẫu Sâm đã phát hiện ra các mẫu *Tam thất hoang* thuộc nhánh khác so với *Sâm ngọc linh*, *Sâm lai châu* [60]. Hai thứ *Sâm lai châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và *Sâm ngọc linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) của sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) có giá trị bootstrap lên đến 88% và 81%. Kết quả này dẫn tới kết luận rằng hai loài này là hai loài có quan hệ gần gũi.

Đến năm 2015, tác giả Nguyễn Văn Bình và cs. tiến hành việc giải trình tự hệ gen lục lạp trên *Sâm ngọc linh* (*P. vietnamensis*). Kết quả này là cơ sở nghiên cứu di truyền, thiết kế chỉ thị phân tử phù hợp, đặc trưng cho loài, cũng như nghiên cứu phân tử khác trên *Sâm ngọc linh* [69].

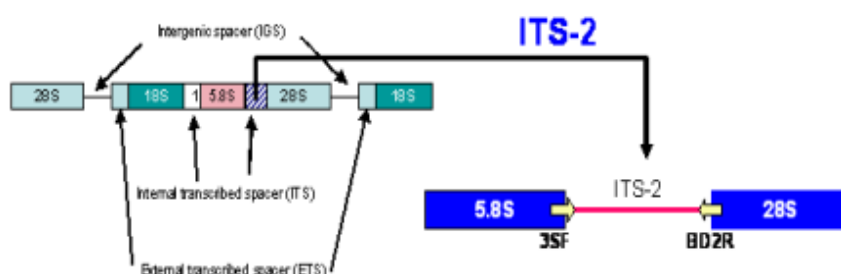
Năm 2016, Lê Ngọc Triều và cs. đánh giá sự đa dạng di truyền đối với quần thể *Tam thất hoang* (*P. stipuleanatus*) tại khu vực miền Bắc nước ta, kết quả thu được chỉ ra các mẫu *Tam thất hoang* có độ đa dạng cao [70]. Trong năm 2017, Nguyễn Thị Phương Trang và cs. cũng đã áp dụng mã vạch DNA, trong việc xác thực một số loài thuộc chi *Panax*, trong đó có *Sâm ngọc linh* và *Sâm lai châu* [71].

Để đánh giá sự đa dạng về mặt di truyền đối với mẫu *Sâm lai châu*, tác giả Phạm Quang Tuyền và cs. đã sử dụng 24 mẫu Sâm trong nghiên cứu. Địa điểm thu thập mẫu trong đánh giá lần này là tại Mường Tè. Kết quả thu được chỉ ra, quan hệ giữa 24 mẫu *Sâm lai châu* được nghiên cứu và taxon cùng chi, có quan hệ với *P. vietnamesis* var. *fuscidiscus*, trên vùng ITS – 5,8S rDNA – ITS2 hay vùng ITS – rDNA. Độ tương đồng được ghi nhận là từ 96.27 – 100% [72].

Năm 2018, trên cơ sở nghiên cứu hệ gen lục lạp, Manzanilla và cs đã kết luận sử dụng tổ hợp các vùng gen *trnC-rps16*, *trnE-trnM* và *psbM-trnD* có thể giúp phân

biệt các loài phổ biến trên thị trường như *P. ginseng*, *P. quinquefolius* với *P. vietnamensis* [73].

Vào năm 2020, trong nghiên cứu của tác giả Vũ Đình Duy và cs., mã vạch DNA được sử dụng ở đây là vùng gen (ITS - rDNA) và vùng gen *matK*. Đối tượng áp dụng trong nghiên cứu này là 32 mẫu Sâm tại núi Phu Xai Lai Leng, kết quả thu được rút ra kết luận rằng chúng thuộc loài *P. stipuleanatus* với 43 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin ở vùng gen ITS – rDNA trên tổng số 616 nucleotide, và 66 vị trí nucleotide biến đổi trên tổng 1433 vị trí, 29 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin ở vùng gen *matK* trên tổng số 1433 vị trí [74]. Việc sử dụng, xây dựng bộ mã vạch DNA, và ứng dụng phân tử trong định loại loài, giúp ích rất nhiều trong việc bảo tồn, phát triển, mang lại nhiều ý nghĩa trong nghiên cứu khoa học và là mối quan tâm hàng đầu hiện nay đối với ngành thực vật [75].



Hình 1.2. Sơ đồ vùng gen ITS

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu

Các mẫu vật được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm:

Thu được 10 mẫu từ 05 thôn thuộc 04 xã, 03 huyện, từ kết quả chuyến đi thực địa tại Hà Giang từ ngày 23/06 đến ngày 1/7/2021 của nhiệm vụ “Điều tra, đánh giá hiện trạng và phân bố các loài cây thuốc thuộc chi Sâm (*Panax* L.) ở Tuyên Quang và Hà Giang” và đã được Chủ nhiệm nhiệm vụ đồng ý cho phép sử dụng (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Danh sách mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu

TT	Số hiệu	Địa điểm thu mẫu
1	Pa_HG1	Thôn Phìn Hồ, xã Tân Thành, huyện Bắc Quang
2	Pa_HG2	Thôn Phìn Hồ, xã Tân Thành, huyện Bắc Quang
3	Pa_HG3	Thôn Nậm Piên, xã Nậm Ty, huyện Hoàng Su Phì
4	Pa_HG4	Thôn Nậm Piên, xã Nậm Ty, huyện Hoàng Su Phì
5	Pa_HG5	Thôn Tham Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên
6	Pa_HG6	Thôn Tham Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên
7	Pa_HG7	Thôn Sam Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên
8	Pa_HG8	Thôn Sam Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên
9	Pa_HG9	Thôn Chiến Thắng, xã Hồ Thầu, huyện Hoàng Su Phì
10	Pa_HG10	Thôn Chiến Thắng, xã Hồ Thầu, huyện Hoàng Su Phì

2.1.2. Địa điểm và hóa chất dùng trong nghiên cứu

Địa điểm thực hiện nghiên cứu: Trung tâm nghiên cứu Khoa học sự sống, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

Hóa chất tách DNA cho sinh học phân tử :

- Tag PCR mastermix 2x (QIAGEN, xuất xứ Mỹ)
- BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems, Mỹ)
- Dung dịch TBE 10x (10mM Tris, 0.9mM acid boric, 0.01mM EDTA) (Invitrogen, Mỹ)
- Thuốc nhuộm Ethidium bromide (Maylaysia)

- Kit tách chiết DNA: Dneasy Plant Mini Kit (Trung Quốc)
- Kit tinh sạch sản phẩm PCR: QIAgen Quick Gel Extraction Kit (QIAgen, Mỹ).
- Agarose (Invitrogen, Mỹ)
- Sephadex G50 (Sigma, xuất xứ Mỹ).
- Các hóa chất tách chiết và tinh sạch DNA (NaCl, CTAB, EDTA, Tris-HCl, β -Mercaptoethanol, Isopropanol, Sodium acetate 3M, ethanol 100%, 70%, Rnase (10mg/ml)

2.1.3. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

- Tủ lạnh thường và tủ lạnh âm sâu
- Lò vi sóng
- Máy sấy chân không.
- Máy khuấy từ, máy trộn.
- Máy khử trùng Mac – 250Nex (Sanyo, Nhật Bản)
- Máy định lượng DNA NanoDrop One (Thermo Scientific, Mỹ).
- Cân phân tích (Precisa, Thụy Sĩ)
- Máy ổn nhiệt (Mettler, Đức)
- Máy trộn rung (Vortex – Fluka, Mỹ)
- Máy ly tâm 5415D (Eppendorf, Đức)
- Máy ly tâm lạnh (Hitachi, Nhật Bản).
- Máy PCR Mastercycler (Eppendorf, Đức).
- Máy điện di agarose gel (Biorad, Mỹ).
- Máy soi gel (UVP, Mỹ).
- Pipette, đầu côn, ống Eppendorf.

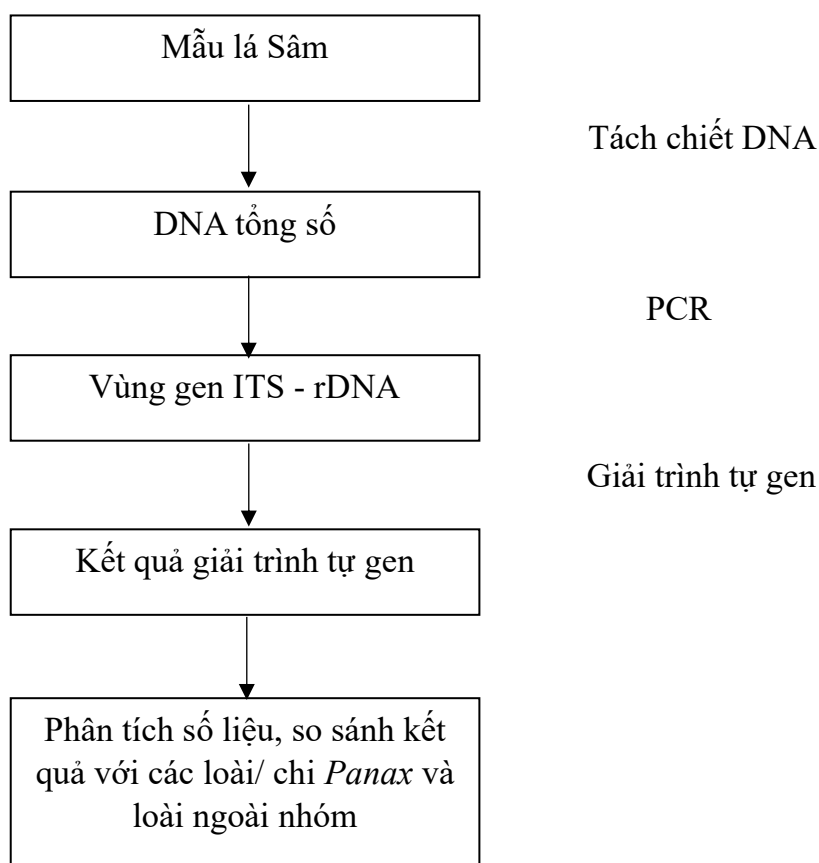
Nhân bản vùng gen ITS bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi được thiết kế trên cơ sở trình tự ITS – rDNA của các loài thuộc chi *Panax* trên Genbank.

Bảng 2.2. Trình tự cặp mồi nhân bản vùng ITS-rDNA bằng kỹ thuật PCR [60]

Ký hiệu cặp mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Kích thước lý thuyết (bp)
PaITS-F	5'- CAC TGA ACC TTA TCA TTT AG AG – 3'	700
PaITS-R	5' – CTT ATT GAT ATG CTT AA CTC AG – 3'	

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ các bước thí nghiệm

2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu

Mẫu lá để nghiên cứu DNA được thu thập trong chuyến đi thực địa tại Hà Giang và được bảo quản trong túi nilon chứa silica gel. Mẫu sau đó được đưa về Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, và lưu giữ trong tủ -20 độ C cho đến khi phân tích.

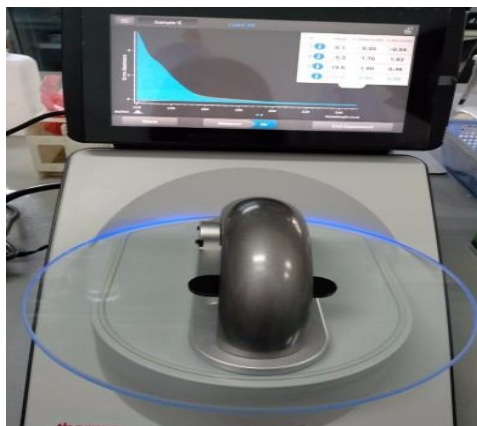
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử

2.2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Quy trình tách chiết DNA tổng số, dựa trên bộ kit tách Dneasy Plant Mini Kit được thực hiện như sau:

- Mẫu lá được bảo quản trong tủ lạnh sâu tại nhiệt độ (-20°C), sau đó được đem đi nghiên cứu trong nitrogen lỏng (-196°C) tán mẫu thành dạng mịn. Lấy 100 mg bột thu được cho vào ống Eppendorf 1.5 ml.

- Trộn 400 μl đệm AP1 và 4 μl Rnase A, sử dụng máy vortex và ủ ở 65°C trong 10 phút. Trong quá trình ủ đảo, trộn từ 2-3 lần.
- Bổ sung thêm 130 μl đệm AP2. Trộn đều, và ủ trong đá ở thời gian 5 phút
- Dịch ly giải được cho vào cột QIAshredder Mini. Tiến hành ly tâm tốc độ 14000 rpm.
- Dịch thu được di chuyển từ cột qua ống Eppendorf 1.5 ml mới (không xáo trộn). Thêm 1.5 lần thể tích đệm. AP3/E và sử dụng Pipet trộn đều.
- Chuyển 650 μl hỗn hợp dịch thu được vào cột Dneasy Mini. Tốc độ ly tâm sử dụng là 8000 rpm trong thời gian 1 phút. Loại bỏ dịch qua cột. Lặp lại bước này thêm một lần.
- Thêm 500 μl đệm AW và ly tâm với tốc độ 8000 rpm trong thời gian 1 phút. Loại bỏ phần dịch khi qua cột.
- Bổ sung 500 μl đệm AW. Tiến hành ly tâm tốc độ 14000 rpm trong thời gian 2 phút.
- Chuyển cột sang ống Eppendorf 1.5 ml đã dán nhãn. Bổ sung 100 μl đệm AE hòa tan. Ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Tốc độ ly tâm là 6000 rpm trong thời gian 1 phút. Lặp lại đến khi thu được DNA tổng số, nhiệt độ bảo quản là ở -20°C .
- Sử dụng máy Nanodrop One, kiểm tra lượng DNA tổng số thu được từ thí nghiệm.



Hình 2.2. Máy nanodrop One

2.2.3.2. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

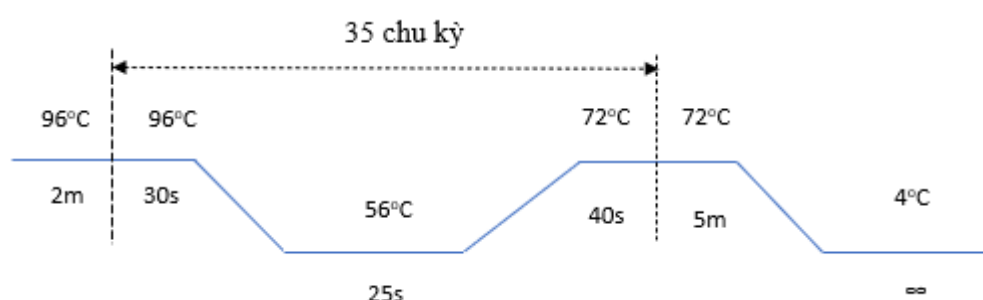
Các bước tiến hành:

- Tính và tạo các nồng độ DNA sao cho mỗi ống phản ứng thể tích DNA khuôn được giống nhau, nồng độ mỗi ống là 10 ng (tổng thể tích là 25 μl / 1 phản ứng)
- Các thành phần được trộn đều, sau đó được chia vào các ống đã có sẵn DNA.
- Chu trình thực hiện PCR (như Hình 2.3), cài đặt và khởi chạy thiết bị.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR [60]

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
1	Taq PCR Mastermix	2x	12.5
2	Môi xuôi	20 μM	1.0
3	Môi ngược	20 μM	1.0
4	DNA tổng số	10 ng	1.0
5	Nước cất khử ion		9.5
Tổng			25

Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau:

**Hình 2.3. Chu trình phản ứng PCR**

2.2.3.3. Điện di sản phẩm PCR

Quy trình thực hiện:

Chuẩn bị gel agarose:

- Cân một lượng bột agarose sau đó hòa tan trong đệm TBE 1X, nồng độ cần đạt được là 1.5%
- Đun sôi dịch trên cho đến khi quan sát thấy đã tan hết, đợi khoảng 5-10 phút cho dung dịch nguội xuống khoảng 50°C, đổ dung dịch gel này vào khuôn, đã có để sẵn lược
- Sau khoảng 20-30 phút, gel sẽ đông lại và được định hình theo khuôn có sẵn
- Rút lược, đặt gel vào bể điện di, làm ngập bản gel trong bể điện di bằng đệm TBE 1X.

Tra mẫu DNA vào giếng

- Sử dụng loading dye 6X : mẫu theo tỷ lệ 5:1, sau đó được tra vào giếng. Chạy điện di với dòng một chiều tại giá trị điện thế 75 V, thời gian chạy là 45 phút.
- Quan sát để biết thời điểm dừng quá trình điện di.

Sản phẩm sau PCR được phân tích trên gel điện di agarose 1.5% tại điện thế 60 đến 80 V, thời gian chạy điện di là 45 phút, chứng âm được sử dụng là nước cất, mẫu chứng dương sử dụng là DNA tổng số của *Sâm ngọc linh P. vietnamensis* var. *vietnamensis*.

Kết thúc điện di, chất nhuộm huỳnh quang Ethidium bromide được sử dụng. Tiến hành quan sát bản gel dưới ánh sáng đèn UV.

2.2.3.4. Tinh sạch sản phẩm PCR

Quy trình thực hiện:

- Tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1.5%
- Cắt lát gel chứa DNA, cho vào ống 1.5 ml
- Cân các đoạn gel đã cắt. Bổ sung thể tích dung dịch QG tương ứng khối lượng mẫu (100-200 μ l cho mỗi 100 mg gel)
- Ủ ở 50° C trong 10 phút. Đến khi lượng gel tan hoàn toàn, lắc đều ống trong quá trình ủ, mỗi lần cách nhau 3 phút
- Quan sát màu của dung dịch thu được, nếu mẫu có màu vàng thì đó là màu của QG ban đầu. Nếu dung dịch có màu cam hoặc tím, thì tiến hành bổ sung 10 μ l natri acetat 3M, pH 5.0
- Hút dịch cho vào cột MinElute đặt trong ống thu dịch ly tâm của Kit, ly tâm 13.000 rpm, thời gian 1 phút
- Chuyển ống ly tâm, bổ sung thêm 700 μ l dung dịch PE vào cột, để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó ly tâm tốc độ 13000 rpm trong thời gian 1 phút
- Chuyển cột sang ống thu khác và tiếp tục ly tâm tốc độ 13000 rpm thời gian 1 phút
- Chuyển cột sang ống thể tích 1.5 ml đã có dán nhãn, bổ sung thêm 10 μ l EB, ly tâm tốc độ 13000 rpm trong thời gian 1 phút
- Sản phẩm PCR được bảo quản trong tủ -20°C
- Sau khi PCR, bước tiếp theo sẽ là giải trình tự gen

2.2.3.5. Thu thập dữ liệu vùng gen ITS -rDNA của các loài trong chi *Panax* trên Genbank

Dữ liệu nucleotide vùng gen ITS được tìm kiếm trên www.ncbi.nlm.nih.gov và sử dụng làm cơ sở để so sánh với các dữ liệu thu thập được trong nghiên cứu này theo mã số (Bảng 2.4).

Bảng 2.4: Mã số trình tự vùng gen ITS-rDNA của các loài/ thứ Sâm cần thu thập trên Genbank

STT	Loài/ thứ	Mã số Genbank
1	<i>P. ginseng</i>	U41680
2	<i>P. quinquefolius</i> (Sâm Mỹ)	U41688
3	<i>P. japonicus</i>	AF263373
4	<i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>	U41683
5	<i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	U41679
6	<i>P. japonicus</i> var. <i>angustifolius</i>	AY271915
7	<i>P. notoginseng</i> (Tam thất bắc)	U41685
8	<i>P. zingiberensis</i> (Sâm gừng)	U41699
9	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>vietnamensis</i> (Sâm ngọc linh) Trà Linh, Quảng Nam, Việt Nam (SNL)	KJ418193
11	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> (Sâm lai châu) Mường Tè, Lai Châu, Việt Nam (MT)	KJ418191
12	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> (Sâm lai châu) Tam Đường, Lai Châu, Việt Nam (TĐ)	KJ418187
13	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> (Sâm lai châu) Sìn Hồ, Lai Châu, Việt Nam (SH)	KJ48184
14	<i>P. pseudoginseng</i> (Giả nhân sâm)	U41693
15	<i>P. assamicus</i>	AY233322
16	<i>P. trifolius</i>	U41698
17	<i>P. wangianus</i>	U41690
18	<i>P. sinensis</i>	AY271920
19	<i>P. omeisensis</i>	U41692
20	<i>P. shangianus</i>	AY233328
21	<i>P. stipuleanatus</i> (Tam thất hoang)	AY271921
22	<i>P. stipuleanatus</i> (Tam thất hoang) Tam Đường, Lai Châu, Việt Nam	KJ418196

23	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	AB570259
----	-----------------------------------	----------

2.2.3.6. Phân tích số liệu

Trình tự DNA được sử dụng so sánh với các loài/ thứ thuộc chi *Panax* và 01 loài ngoài nhóm khai thác từ Genbank (Bảng 2.4), từ đó phân tích và biện luận kết quả dựa trên phần mềm ClustalW. Xây dựng cây phát sinh hệ thống bằng phần mềm MegaX theo phương pháp Maximum likelihood.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1.1 Đặc điểm hình thái các mẫu Sâm thu được tại Hà Giang

Mẫu nghiên cứu: 10 mẫu thu được tại tỉnh Hà Giang

Địa điểm thu mẫu: Thôn Phìn Hồ, xã Tân Thành, huyện Bắc Quang, Hà Giang

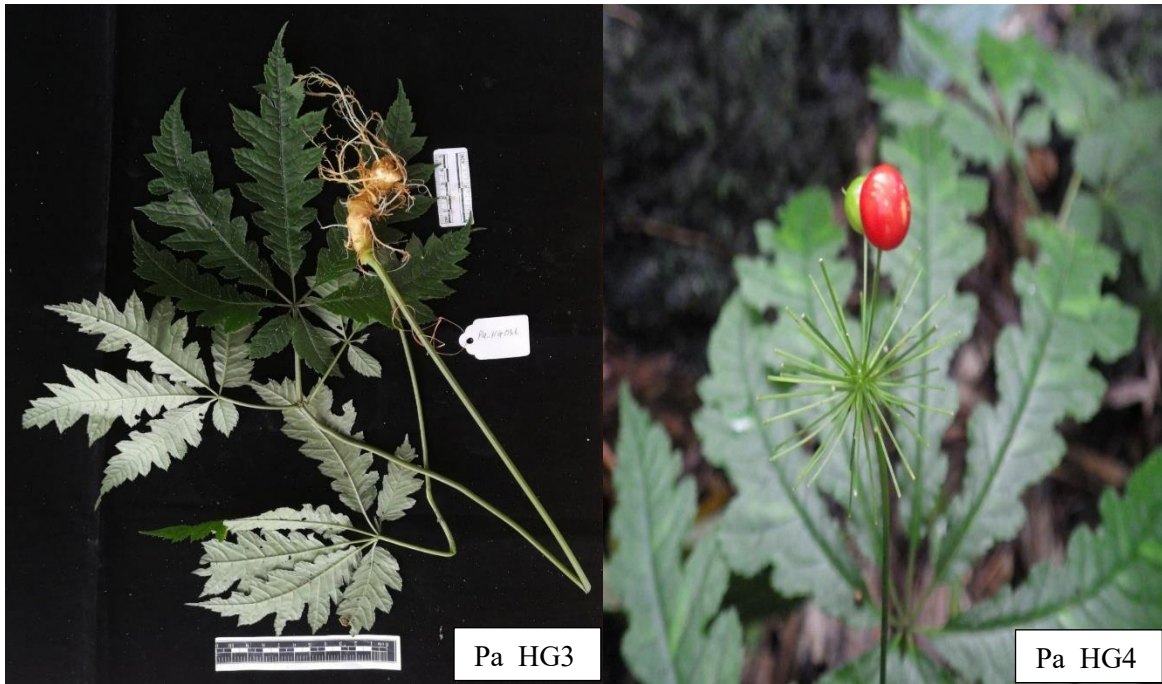
Nơi lưu trữ mẫu: Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

Đặc điểm hình thái:

Các mẫu *Panax* spp. thu được ở Hà Giang chủ yếu có dạng lá chết xẻ (hình 3.1. – 3.5.). Cây lưỡng tính, thân thảo, sống nhiều năm, cao khoảng 50 đến 70 cm, với thân rễ mập giống như rễ tre. Thân trên mặt đất đơn, mọc thẳng, nhẵn, đặc, cỡ 35 - 56 x 0.3 - 0.5 cm. Lá mọc vòng ở đỉnh thân, xòe ra. Lá kép chân vịt, có 5 đến 7 lá chét, dạng màng, gân mặt trên lá có lông dạng móc, đôi lá chét dưới cùng thường nhỏ nhất, hình thuôn rộng, với cuống nhỏ dài khoảng 0.3 đến 0.5 cm, gốc gần tròn, chóp tròn, mép có răng cưa; 3 đến 5 lá chét khác chẻ lông chim 1 lần, có gốc tù, chóp nhọn có đuôi với chiều dài từ 0.7 đến 1.5 cm, phiến lá chét hình elip, cỡ 7-15 x 7-15 cm, gốc tù rộng, mép lá có răng cưa. Cụm hoa là tán mọc đơn độc ở đỉnh thân giữa các lá, dài khoảng 12 đến 16 cm (khi mang hoa và quả).



Hình 3.1. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG1, Pa_HG2 thu được tại thôn Phìn Hồ, xã Tân Thành, huyện Bắc Quang, Hà Giang



Hình 3.2. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG3, Pa_HG4 thu được tại thôn Nậm Piên, xã Nậm Ty, huyện Hoàng Su Phì, Hà Giang



Hình 3.3. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG5, Pa_HG6 thu được tại thôn Tham Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang



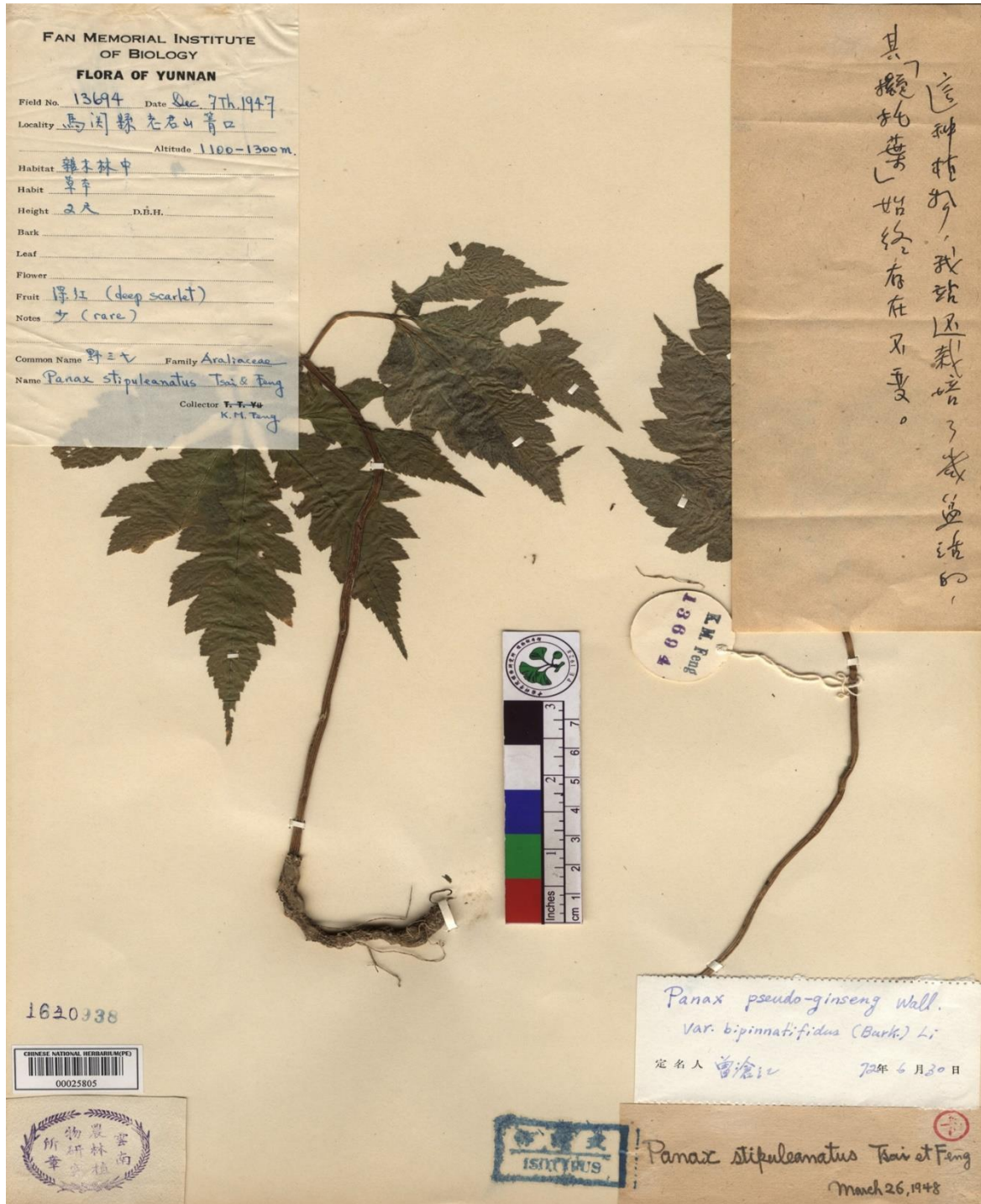
Hình 3.4. Mẫu *Panax* spp. Pa_HG7, Pa_HG8 thu được tại thôn Sam Vè, xã Cao Bồ, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang



Hình 3.5. Hình ảnh mẫu *Panax* spp. Pa_HG9, Pa_HG10 thu được tại thôn Chiến Thắng, xã Hồ Thầu, huyện Hoàng Su Phì, tỉnh Hà Giang

Khi đối chiếu với mẫu (*Panax stipuleanatus* Tsai & Feng) được lưu giữ tại Viện Thực vật Bắc Kinh, Trung Quốc (Hình 3.6) cho thấy hình thái lá của *Panax stipuleanatus* Tsai & Feng có dạng xẻ thùy giống với các mẫu thu được ở khu vực Hà Giang. Thực tế, mẫu thu tại Hà Giang có hai dạng lá (xẻ nông và xẻ sâu), so sánh với các tài liệu tham khảo trước đó, cùng các mẫu thu được tại Phú Xai Lai Leng (được

lưu trữ tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam) có thể định danh tên khoa học của các mẫu Sâm *Panax* spp. tại khu vực Hà Giang là loài *Panax stipuleanatus* Tsai & Feng. Để kiểm chứng kết quả này, chúng tôi tiếp tục thực hiện phương pháp phân tử.



Hình 3.6. Mẫu (K.M.Feng 13694) isotype (*Panax stipuleanatus*) hiện đang lưu trữ tại phòng tiêu bản Viện Thực vật Bắc Kinh (PE0025805)

3.1.2. Đặc điểm sinh học phân tử

3.1.2.1. Kết quả tách DNA tổng số

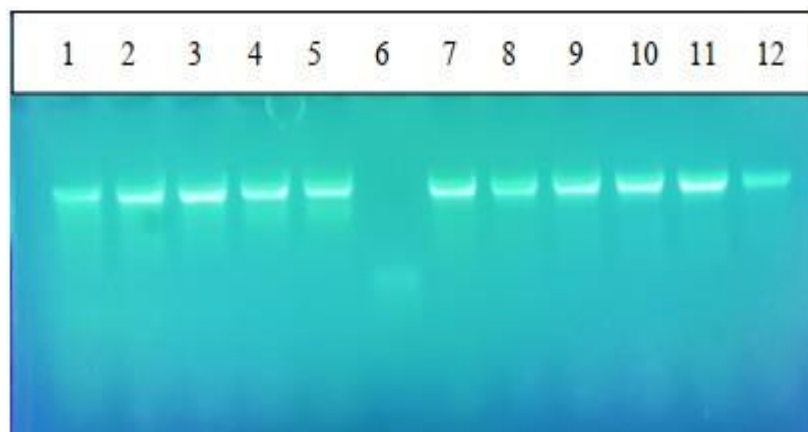
DNA tổng số của 10 mẫu lá đã được tách chiết thành công với chất lượng DNA cao. Sử dụng máy định lượng DNA (NanoDrop One) cho thấy chỉ số OD260/280 của các mẫu luôn nằm trong khoảng giá trị từ 1.8 – 2 (chỉ số này cho biết dung dịch DNA có độ tinh khiết cao)

Bảng 3.1. Kết quả đo chỉ số OD260/ OD280 của các mẫu nghiên cứu

TT	Số hiệu	Chỉ số OD260/OD280
1	Pa_HG1	1,83
2	Pa_HG2	1,86
3	Pa_HG3	1,80
4	Pa_HG04	1,89
5	Pa_HG5	1,92
6	Pa_HG6	1,98
7	Pa_HG7	1,88
8	Pa_HG8	1,94
9	Pa_HG9	1,97
10	Pa_HG10	2,0

3.1.2.2. Kết quả thực hiện phản ứng PCR

Với cặp mồi PaITSF – PaITSR, vùng gen ITS đã được nhân bản thành công vùng gen ITS cho 10 mẫu nghiên cứu (Hình 3.1). Sản phẩm PCR nhân bản gen ITS có kích thước trùng với mẫu chứng dương là Sâm ngọc linh *P. vietnamensis*. Các sản phẩm PCR chứng tỏ độ đặc hiệu của sản phẩm thu được, cho 1 băng duy nhất có độ sắc nét cao. Những mẫu này được tiến hành thổi gel, tinh sạch và giải trình tự.



Hình 3.7. Hình ảnh điện di kết quả PCR. Giếng từ 1-5 và 7-11: sản phẩm PCR thu được từ 10 mẫu nghiên cứu. Giếng 6: mẫu chứng âm dùng nước cất. Giếng 12: mẫu chứng dương sử dụng DNA tổng số của Sâm ngọc linh *P. vietnamensis* var.*vietnamensis*

3.1.2.3. Kết quả giải trình tự vùng gen ITS – rDNA

Sau khi xử lý số liệu, ta thu được trình tự ITS của các mẫu nghiên cứu có chiều dài là 587bp. Các mẫu nghiên cứu này có trình tự nucleotide vùng gen ITS hoàn toàn giống nhau. (Hình 3.8).

```

                *           20           *           40           *           60
Pa_HG1 : GTCGAAACCTGCACAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTACAACACCCGGGTGAGGGACGAA : 60
Pa_HG2 : ..... : 60
Pa_HG3 : ..... : 60
Pa_HG4 : ..... : 60
Pa_HG5 : ..... : 60
Pa_HG6 : ..... : 60
Pa_HG7 : ..... : 60
Pa_HG8 : ..... : 60
Pa_HG9 : ..... : 60
Pa_HG10 : ..... : 60

                *           80           *           100           *           120
Pa_HG1 : GGGTGCGCAAGCTCCCCAAGTTACAAACCCATGGTCGGGGACTACCCTTGGGTGTTTCCTC : 120
Pa_HG2 : ..... : 120
Pa_HG3 : ..... : 120
Pa_HG4 : ..... : 120
Pa_HG5 : ..... : 120
Pa_HG6 : ..... : 120
Pa_HG7 : ..... : 120
Pa_HG8 : ..... : 120
Pa_HG9 : ..... : 120
Pa_HG10 : ..... : 120

```

```

          *           140           *           160           *           180
Pa_HG1 : GTCCGAACAACGACCCCCGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAATCAAACCTGAACTGCACGCG : 180
Pa_HG2 : ..... : 180
Pa_HG3 : ..... : 180
Pa_HG4 : ..... : 180
Pa_HG5 : ..... : 180
Pa_HG6 : ..... : 180
Pa_HG7 : ..... : 180
Pa_HG8 : ..... : 180
Pa_HG9 : ..... : 180
Pa_HG10 : ..... : 180

```

```

          *           200           *           220           *           240
Pa_HG1 : TCCCCCTCGTTTTGCGGGCGGGCGGAGGCGTCTTTCTAAAAACACAAACGACTCTCGGCAACG : 240
Pa_HG2 : ..... : 240
Pa_HG3 : ..... : 240
Pa_HG4 : ..... : 240
Pa_HG5 : ..... : 240
Pa_HG6 : ..... : 240
Pa_HG7 : ..... : 240
Pa_HG8 : ..... : 240
Pa_HG9 : ..... : 240
Pa_HG10 : ..... : 240

```

```

          *           260           *           280           *           300
Pa_HG1 : GATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTG : 300
Pa_HG2 : ..... : 300
Pa_HG3 : ..... : 300
Pa_HG4 : ..... : 300
Pa_HG5 : ..... : 300
Pa_HG6 : ..... : 300
Pa_HG7 : ..... : 300
Pa_HG8 : ..... : 300
Pa_HG9 : ..... : 300
Pa_HG10 : ..... : 300

```

```

          *           320           *           340           *           360
Pa_HG1 : CAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGGCCGA : 360
Pa_HG2 : ..... : 360
Pa_HG3 : ..... : 360
Pa_HG4 : ..... : 360
Pa_HG5 : ..... : 360
Pa_HG6 : ..... : 360
Pa_HG7 : ..... : 360
Pa_HG8 : ..... : 360
Pa_HG9 : ..... : 360
Pa_HG10 : ..... : 360

```

```

          *           380           *           400           *           420
Pa_HG1 : GGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCAACCCCGCACTCCCTCATGGG : 420
Pa_HG2 : ..... : 420
Pa_HG3 : ..... : 420
Pa_HG4 : ..... : 420
Pa_HG5 : ..... : 420
Pa_HG6 : ..... : 420
Pa_HG7 : ..... : 420
Pa_HG8 : ..... : 420
Pa_HG9 : ..... : 420
Pa_HG10 : ..... : 420

```

	*	440	*	460	*	480	
Pa_HG1	:	AGTCGAGGCGGAGGGGCGGATATTGGCCCTCCCGTGTCTCACCGCGCGGCTGGCCCAAATG	:	480			
Pa_HG2	:	:	480			
Pa_HG3	:	:	480			
Pa_HG4	:	:	480			
Pa_HG5	:	:	480			
Pa_HG6	:	:	480			
Pa_HG7	:	:	480			
Pa_HG8	:	:	480			
Pa_HG9	:	:	480			
Pa_HG10	:	:	480			
	*	500	*	520	*	540	
Pa_HG1	:	CGAGTCCTTGGCGACGGACGTCACGACTAGTGGTGGTTGTA AAAAGCCCTCTTCTCATGT	:	540			
Pa_HG2	:	:	540			
Pa_HG3	:	:	540			
Pa_HG4	:	:	540			
Pa_HG5	:	:	540			
Pa_HG6	:	:	540			
Pa_HG7	:	:	540			
Pa_HG8	:	:	540			
Pa_HG9	:	:	540			
Pa_HG10	:	:	540			
	*	560	*	580			
Pa_HG1	:	CGTGCGGTGACCCGTCGCCAACGAAAGCTCTCATGACCCTGTTGCGC	:	587			
Pa_HG2	:	:	587			
Pa_HG3	:	:	587			
Pa_HG4	:	:	587			
Pa_HG5	:	:	587			
Pa_HG6	:	:	587			
Pa_HG7	:	:	587			
Pa_HG8	:	:	587			
Pa_HG9	:	:	587			
Pa_HG10	:	:	587			

Hình 3.8. So sánh kết quả giải trình tự vùng gen ITS-rDNA của các mẫu nghiên cứu

3.1.2.4. Kết quả thu thập trình tự vùng gen ITS – rDNA của các loài trong chi *Panax* trên Genbank

Kết quả thu thập thông tin vùng ITS-rDNA của các loài theo Bảng 2.4 bao gồm 23 loài/ thứ Sâm và 01 loài ngoài nhóm, theo đó trình tự công bố trên Genbank cho từng loài dao động từ 500 đến 1900 bp.

Sau khi thu thập trình tự vùng gen ITS của các mẫu Sâm trên Genbank, chúng tôi nhận thấy rằng vùng gen ITS có mã số genbank KX768322 của mẫu *Sâm langbian* VTN520 giống hệt với vùng ITS của *Sâm ngọc linh P. vietnamensis* var. *vietnamensis* thu ở Trà Linh, Quảng Nam với mã số Genbank KJ418193. Theo công bố của Nông Văn Duy và cs. (2016) cho thấy thứ *P. vietnamensis* var. *langbianensis* khác với thứ *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* ở 05 nucleotide (vị trí 384, 465, 554, 590, 598) trên vùng gen ITS nghiên cứu khoảng 608 bp và đây là đặc điểm sinh học phân tử

quan trọng để phân biệt 02 thứ này [62]. Trên có sở đó, chúng tôi cho rằng mã số Genbank KX768322 không phải là trình tự của thứ *P. vietnamensis* var. *langbianensis* vì vậy chúng tôi đã tiến hành rà soát, phân tích lại trình tự vùng gen ITS đã công bố của Nông Văn Duy và cs (2016) và so sánh với số liệu theo Bảng 2.4 cụ thể như sau:

Bảng 3.2: Danh sách mã số Genbank của các thứ thuộc loài *P. vietnamensis* trong công bố của Nông Văn Duy và cs, 2016

TT	Mã số Genbank	Số hiệu mẫu	Tên thứ
1	KX768325	VTN994	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>vietnamensis</i>
2	KX768326	VTN990	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i>
3	KX768322	VTN520	<i>P. vietnamensis</i> var. <i>langbianensis</i>

```

*           20           *           40           *           60
SNL       : GTCGAAACCTGCATAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTACAATACCGGGTGAGGGACGAG : 60
KX768322  : ..... : 60
KX768325  : ..... : 60
KX768326  : ..... : 60
SH        : ..... : 60
TD        : ..... : 60
MT        : ..... : 60

```

```

*           80           *           100          *           120
SNL       : GGGTGCGCAAGCTCCCCAAGTTGCAAACCCATGGTCGGGGACCGCCCTTGGGTGGCTCTC : 120
KX768322  : ..... : 120
KX768325  : ..... : 120
KX768326  : ..... : 120
SH        : ..... : 120
TD        : ..... : 120
MT        : ..... : 120

```

```

*           140          *           160          *           180
SNL       : GTCCGAACAACGACCCCCGCGCGGAATGCGCCAAGGAAATCAAACCTGAACTGCGCGCG : 180
KX768322  : ..... : 180
KX768325  : ..... : 180
KX768326  : ..... : 180
SH        : ..... : 180
TD        : ..... : 180
MT        : ..... : 180

```

```

*           200          *           220          *           240
SNL       : TCCCCCGGTTTGCGGGCGGCGGAAGCGTCTTTCTAAAACACAAAACGACTCTCGGCAACG : 240
KX768322  : ..... : 240
KX768325  : ..... : 240
KX768326  : .....G..... : 240
SH        : .....G..... : 240
TD        : .....G..... : 240
MT        : .....G..... : 240

```



```

          *           260           *           280           *           300
SNL      : GATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTG : 300
KX768322 : ..... : 300
KX768325 : ..... : 300
KX768326 : ..... : 300
SH       : ..... : 300
TD       : ..... : 300
MT       : ..... : 300

```

```

          *           320           *           340           *           360
SNL      : CAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGA : 360
KX768322 : ..... : 360
KX768325 : ..... : 360
KX768326 : ..... : 360
SH       : ..... : 360
TD       : ..... : 360
MT       : ..... : 360

```

```

          *           380           *           400           *           420
SNL      : GGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAAGGCATCGCGTCGCCCCCAACTCATCACTCCCTCACGG : 420
KX768322 : ..... : 420
KX768325 : ..... A ..... : 420
KX768326 : ..... A ..... : 420
SH       : ..... A ..... : 420
TD       : ..... A ..... : 420
MT       : ..... A ..... : 420

```

```

          *           440           *           460           *           480
SNL      : GAGTCGAGGCGGAGGGGCGGATAAATGGCCTCCCGTGTCTCACCCGCGCGTTGGCCCAAAT : 480
KX768322 : ..... : 480
KX768325 : ..... T ..... : 480
KX768326 : ..... T ..... : 480
SH       : ..... T ..... : 480
TD       : ..... T ..... : 480
MT       : ..... T ..... : 480

```

```

          *           500           *           520           *           540
SNL      : GCGAGTCCTTGGCGATGGACGTCACGACAAGTGGTGGTTGTAAAAAGCCCTCTTCTCATG : 540
KX768322 : ..... : 540
KX768325 : ..... : 540
KX768326 : ..... A ..... : 540
SH       : ..... A ..... : 540
TD       : ..... A ..... : 540
MT       : ..... : 540

```

```

          *           560           *           580           *           600
SNL      : TCGTGCGGTGACCCGTCGCCAGCAAAAGCTCTCATGACCCTGTTGCGCCGTCCTCGATGTC : 600
KX768322 : ..... : 600
KX768325 : ..... T ..... A ..... C ..... : 600
KX768326 : ..... A ..... A ..... C ..... : 600
SH       : ..... A ..... A ..... C ..... : 600
TD       : ..... A ..... A ..... C ..... : 600
MT       : ..... : 600

```

SNL	:	GCGCTCCG	:	608
KX768322	:	:	608
KX768325	:	:	608
KX768326	:	:	608
SH	:	:	608
TD	:	:	608
MT	:	:	608

Hình 3.9: Kết quả so sánh trình tự vùng gen ITS của các thứ thuộc loài *P. vietnamensis* trong công bố của Nông Văn Duy và cs. (2016) với các thứ thuộc loài *P. vietnamensis* đã công bố trên Genbank. SNL: Sâm ngọc linh mã số KJ418193; SH: Sâm lai châu vùng Sìn Hồ mã số KJ48184, TD: Sâm lai châu vùng Tam Đường mã số KJ418187; MT: Sâm lai châu vùng Mường Tè mã số KJ418191

Kết quả so sánh (Hình 3.9) cho thấy trình tự KX768322 (VTN520) được cho là trình tự vùng ITS của *Sâm langbian* (*P. vietnamensis* var. *langbianensis*) trong công bố của Nông Văn Duy và cs (2016) trùng khớp hoàn toàn với *Sâm ngọc linh P. vietnamesis* var. *vietnamesis* (KJ418193) thu thập ở vùng Trà Linh, Quảng Nam. Trong khi đó trình tự KX768325 (VTN994) được coi là *Sâm ngọc linh P. vietnamesis* var. *vietnamesis* trong công bố của Nông Văn Duy và cs (2016) lại sai khác với trình tự *Sâm ngọc linh P. vietnamensis* var. *vietnamensis* (KJ418193) ở 05 vị trí nucleotide đúng với mô tả về sai khác giữa *Sâm langbian* và *Sâm ngọc linh* trên vùng gen ITS. So sánh này cũng cho thấy trình tự KX768329 của mẫu VTN990 được coi là mẫu *Sâm lai châu P. vietnamesis* var. *fuscidiscus* trong nghiên cứu của Nông Văn Duy và cs (2016) thu thập được ở huyện Phong Thổ (Lai Châu) hoàn toàn trùng khớp với mẫu *Sâm lai châu P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* thu thập ở Sìn Hồ và Tam Đường. Điều này hợp lý vì các huyện Phong Thổ, Tam Đường và Sìn Hồ đều nằm trên dãy núi Pu Xam Cáp (Lai Châu).

Qua các so sánh ở trên, chúng tôi cho rằng trình tự KX768325 mới đúng là trình tự của *Sâm langbian* vì vậy chúng tôi sử dụng trình tự KX768325 là *Panax vietnamensis langbianensis* cho các nghiên cứu tiếp theo. Sự sai khác này có thể do nhầm lẫn trong quá trình gửi trình tự lên Genbank của nhóm tác giả Nông Văn Duy và cs.

3.1.2.5. Kết quả phân tích, so sánh trình tự của các mẫu nghiên cứu với các loài trong chi *Panax*

Phân tích về mối quan hệ họ hàng của các mẫu nghiên cứu với các loài/ thứ thuộc chi *Panax*. Kết quả cho thấy giá trị bootstrap là 87% so với loài *P. stipuleanatus*

Kết quả trên cho thấy, *P. vietnamensis* var. *langbianensis* cùng nhánh với *Sâm ngọc linh* *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* và có mối quan hệ gần gũi với thứ *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*. Các mẫu nghiên cứu chung nhánh với *P. stipuleanatus*.

Như vậy, các mẫu *Sâm* thu thập được ở Hà Giang được xác định có mối quan hệ di truyền gần gũi với loài *P. stipuleanatus*, chúng tôi tiếp tục tiến hành so sánh chi tiết trình tự vùng gen ITS – rDNA của các mẫu nghiên cứu với loài gần gũi.

```

          *           20           *           40           *           60
P.stipulea : GTCGAAACCTGCACAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTACAACACCCGGGTGAGGGACGAA : 60
P.stipuTD  : ..... : 60
Pa_HG1    : ..... : 60
Pa_HG2    : ..... : 60
Pa_HG3    : ..... : 60
Pa_HG4    : ..... : 60
Pa_HG5    : ..... : 60
Pa_HG6    : ..... : 60
Pa_HG7    : ..... : 60
Pa_HG8    : ..... : 60
Pa_HG9    : ..... : 60
Pa_HG10   : ..... : 60

```

```

          *           80           *           100          *           120
P.stipulea : GGGTGC GCAAGCTCCCCAAGTTACAAACCCATGGTGGGGGAC - ACCCTTGGGTGTTCCCTC : 119
P.stipuTD  : ..... T ..... : 120
Pa_HG1    : ..... T ..... : 120
Pa_HG2    : ..... T ..... : 120
Pa_HG3    : ..... T ..... : 120
Pa_HG4    : ..... T ..... : 120
Pa_HG5    : ..... T ..... : 120
Pa_HG6    : ..... T ..... : 120
Pa_HG7    : ..... T ..... : 120
Pa_HG8    : ..... T ..... : 120
Pa_HG9    : ..... T ..... : 120
Pa_HG10   : ..... T ..... : 120

```

```

          *           140          *           160          *           180
P.stipulea : GTCCGAACAACGACCCCCCGCGCGGAATGCGCCAAGGAAATCAAAC TGAAC TGCACGCG : 179
P.stipuTD  : ..... : 180
Pa_HG1    : ..... : 180
Pa_HG2    : ..... : 180
Pa_HG3    : ..... : 180
Pa_HG4    : ..... : 180
Pa_HG5    : ..... : 180
Pa_HG6    : ..... : 180
Pa_HG7    : ..... : 180
Pa_HG8    : ..... : 180
Pa_HG9    : ..... : 180
Pa_HG10   : ..... : 180

```

```

                *           200           *           220           *           240
P.stipulea : TCCCCCTCGTTTTGCGGGCGGGGAGGCGTCTTTCTAAAAACACAAACGACTCTCGGCAACG : 239
P.stipuTD  : ..... : 240
Pa_HG1    : ..... : 240
Pa_HG2    : ..... : 240
Pa_HG3    : ..... : 240
Pa_HG4    : ..... : 240
Pa_HG5    : ..... : 240
Pa_HG6    : ..... : 240
Pa_HG7    : ..... : 240
Pa_HG8    : ..... : 240
Pa_HG9    : ..... : 240
Pa_HG10   : ..... : 240

```

```

                *           260           *           280           *           300
P.stipulea : GATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTGGTGTGAATTG : 299
P.stipuTD  : ..... : 300
Pa_HG1    : ..... : 300
Pa_HG2    : ..... : 300
Pa_HG3    : ..... : 300
Pa_HG4    : ..... : 300
Pa_HG5    : ..... : 300
Pa_HG6    : ..... : 300
Pa_HG7    : ..... : 300
Pa_HG8    : ..... : 300
Pa_HG9    : ..... : 300
Pa_HG10   : ..... : 300

```

```

                *           320           *           340           *           360
P.stipulea : CAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGA : 359
P.stipuTD  : ..... : 360
Pa_HG1    : ..... : 360
Pa_HG2    : ..... : 360
Pa_HG3    : ..... : 360
Pa_HG4    : ..... : 360
Pa_HG5    : ..... : 360
Pa_HG6    : ..... : 360
Pa_HG7    : ..... : 360
Pa_HG8    : ..... : 360
Pa_HG9    : ..... : 360
Pa_HG10   : ..... : 360

```

```

                *           380           *           400           *           420
P.stipulea : GGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCAACCCCGCACTCCCTCATGGG : 419
P.stipuTD  : ..... : 420
Pa_HG1    : ..... : 420
Pa_HG2    : ..... : 420
Pa_HG3    : ..... : 420
Pa_HG4    : ..... : 420
Pa_HG5    : ..... : 420
Pa_HG6    : ..... : 420
Pa_HG7    : ..... : 420
Pa_HG8    : ..... : 420
Pa_HG9    : ..... : 420
Pa_HG10   : ..... : 420

```

	*	440	*	460	*	480	
P.stipulea	:	AGTCGAGGCGGAGGGGGCGGATATTGGCCTCCCCTGTCTCACCGCGCGG	:	TGGCCCAAATG	:	479	
P.stipuTD	:	:	:	480	
Pa_HG1	:	:	:	480	
Pa_HG2	:	:	:	480	
Pa_HG3	:	:	:	480	
Pa_HG4	:	:	:	480	
Pa_HG5	:	:	:	480	
Pa_HG6	:	:	:	480	
Pa_HG7	:	:	:	480	
Pa_HG8	:	:	:	480	
Pa_HG9	:	:	:	480	
Pa_HG10	:	:	:	480	
	*	500	*	520	*	540	
P.stipulea	:	CGAGTCCTTGGCGACGGACGTCACGACTAGTGGTGGTTGTAAAAAGCCCTCTTCTCATGT	:		:	539	
P.stipuTD	:	:	:	540	
Pa_HG1	:	:	:	540	
Pa_HG2	:	:	:	540	
Pa_HG3	:	:	:	540	
Pa_HG4	:	:	:	540	
Pa_HG5	:	:	:	540	
Pa_HG6	:	:	:	540	
Pa_HG7	:	:	:	540	
Pa_HG8	:	:	:	540	
Pa_HG9	:	:	:	540	
Pa_HG10	:	:	:	540	
	*	560	*	580			
P.stipulea	:	CGTGCGGTGACCCGTCGCCAACGAAAGCTCTCATGACCCTGTTGCGC	:		:	586	
P.stipuTD	:	:	:	587	
Pa_HG1	:	:	:	587	
Pa_HG2	:	:	:	587	
Pa_HG3	:	:	:	587	
Pa_HG4	:	:	:	587	
Pa_HG5	:	:	:	587	
Pa_HG6	:	:	:	587	
Pa_HG7	:	:	:	587	
Pa_HG8	:	:	:	587	
Pa_HG9	:	:	:	587	
Pa_HG10	:	:	:	587	

Hình 3.11. So sánh trình tự vùng gen ITS-rDNA của các mẫu nghiên cứu với loài gần gũi P. stipuTD: *P. stipuleanatus* Tam Đường. P. stipulea: *P. stipuleanatus*

Kết quả cho thấy các mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này có trình tự vùng gen ITS-rDNA hoàn toàn trùng khớp với loài *P. stipuleanatus* ở huyện Tam Đường tỉnh Lai Châu (Hình 3.11).

Các mẫu nghiên cứu khác với *P. stipuleanatus* mã số Genbank AY271921 ở 02 nucleotide ở vị trí số 103 và 469.

3.2. THẢO LUẬN

Hà Giang nằm ở khu vực Đông Bắc Việt Nam, thuộc tiểu vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, có mùa đông lạnh, mưa vào mùa hè, cùng với địa hình khá đa dạng, tạo nên nguồn tài nguyên động, thực vật phong phú và độc đáo, trong đó có nhiều loài

dược liệu quý. Có hơn hai mươi cộng đồng các dân tộc khác nhau, cùng sinh sống tại địa bàn tỉnh Hà Giang, bởi vậy nguồn tri thức về các phương pháp sử dụng cây dược liệu nói chung và cây thuốc nói riêng là vô cùng phong phú. Những cuộc điều tra về cây dược liệu ở tỉnh Hà Giang những năm trước đây đã có nhiều kết quả, nhưng vẫn còn đó những mặt hạn chế, và những thiếu sót nhất định. Do vậy chưa có được đầy đủ về nguồn cây dược liệu trên toàn tỉnh Hà Giang.

Những hạn chế về phân loại theo hình thái: Thứ nhất, sự biến đổi về kiểu hình và tính biến dị di truyền dẫn đến nhận diện không chính xác. Thứ hai, cách tiếp cận với một số kiểu hình không phải đặc trưng của loài, không phổ biến. Thứ ba, hình thái có ý nghĩa ở một số giai đoạn hoặc chu kỳ cụ thể, nhiều cá thể bị biến đổi hình thái theo thời gian. Và cuối cùng là việc đánh giá chính xác cần yêu cầu chuyên môn cao trong lĩnh vực, có kinh nghiệm lâu năm để có thể xác định một cách chính xác đối tượng. Những hạn chế dựa trên phân loại hình thái này báo hiệu một hệ quả tất yếu đó là cần một phương pháp tiếp cận mới trong phân loại thực vật [76]

Sự phổ biến của việc sử dụng mã vạch ITS trong giám định mẫu thực vật đã được ứng dụng một cách rộng rãi và phổ biến, trong một nghiên cứu năm 2003 của Álvarez, có 244 bài báo đã được công bố, trong đó có đến 66% các bài có đề cập đến dữ liệu trình tự ITS, đặc biệt hơn đó là 34% bài báo chỉ sử dụng ITS. Lý do chỉ ra mức độ phổ biến của việc sử dụng này đó là: độ phổ biến của mỗi ITS, cấu trúc tạo bản sao dễ khuếch đại, kích thước vừa phải (khoảng 500-700bp ở thực vật) cần thiết cho các khuếch đại ngắn [77].

Tác giả Yao và cs. trong năm 2010, đã nghiên cứu sử dụng vùng gen ITS2 làm mã vạch DNA trong định loại Thực vật và Động vật. Dựa trên phân tích 50.790 trình tự ITS2 của Thực vật và 12.221 trình tự của Động vật, các dữ liệu đều được công bố công khai. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, mã vạch ITS2 là mã vạch hiệu quả trong việc nhận dạng các loài thực vật. Đối với thực vật, chiều dài trình tự ITS2 từ thực vật hai lá mầm, rêu được phân bố trong khoảng từ 100 đến 700 bp, và chiều dài của trình tự ITS2 là thực vật một lá mầm, thực vật hạt trần và dương xỉ được phân bố trong khoảng từ 100 đến 400 bp. Chiều dài trung bình của trình tự ITS2 đối với thực vật hai lá mầm, thực vật một lá mầm, thực vật hạt trần, dương xỉ và rêu lần lượt là 221, 236, 240, 224, và 260 bp. Nghiên cứu này dẫn đến kết luận việc sử dụng locus ITS2 trong định loại các loài thực vật là khả thi và hiệu quả.[78].

Trong một nghiên cứu năm 2010, tác giả Shillin Chen cùng cs đã sử dụng các vùng gen như *matK*, *rcbL*, ITS và ITS2 trong việc định loại hơn 6600 mẫu thực vật thuộc 4800 loài từ 753 chi riêng biệt. Khả năng xác thực loài thu được như sau, khi

sử dụng phương pháp BLAST1 xác định danh tính của mẫu, ITS2 đã xác định đúng 92.7% và 99.8% mẫu ở cấp độ loài và chi, trong đó tỷ lệ thành công của *psbA-trnH* thấp hơn nhiều (chỉ đạt 67.6% và 72.8%) ở cấp độ loài khi sử dụng cùng phương pháp BLAST1. Do đó có thể kết luận trong các mã vạch DNA được sử dụng ở trong nghiên cứu này, vùng gen ITS2 vẫn cho kết quả cao và đáng tin cậy nhất trong các mã vạch DNA được sử dụng. [79]

Năm 2011, tác giả Zuo và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu trên 95 mẫu nhân Sâm, sử dụng các mã vạch DNA đó là *matK*, *psbK -I*, *psbM-treD*, *rps16*, *nad1*, và ITS để xác định các loài và chi của các mẫu Sâm trên. Kết quả thu được, ITS hoạt động rất tốt trong việc xác định loài và chi. Việc ứng dụng mã vạch DNA trong định danh loài nên được thực hiện theo quy mô rộng, phạm vi các loại cây và mã vạch mới được đề xuất và phân tích, bởi tính phù hợp của nó trong ứng dụng khoa học. Việc xác định được các loài thuộc có giá trị như Sâm (*Panax*) có giá trị thực tiễn rất lớn.

Cùng năm 2011, tác giả Phan Kế Long và cs. đã tiến hành thu thập các mẫu Sâm trên địa bàn các huyện Mường Tè, Tam Đường và Sin Hồ, thuộc tỉnh Lai Châu. Đây là những địa điểm mà loài Sâm lai châu vẫn còn trong tự nhiên. Số lượng cá thể nghiên cứu lên đến 17 loài, được thu thập ở các địa điểm trên. Kết quả thu được là giải mã thành công 1485 nucleotide vùng gen *matK*, và 588 nucleotide vùng ITS-rDNA, gồm 2 loại là Sâm lai châu và Tam thất trắng. Các loài này có cùng nguồn gốc và có quan hệ gần gũi. Đến năm 2014, tác giả tiếp tục nghiên cứu các mẫu thuộc chi *Panax* ở khu vực núi Phu Xai Lai Leng, số lượng mẫu vật thu được là 7 mẫu dùng cho nghiên cứu lần này, đặc điểm hình thái tương tự loài *P. pseudoginseng*, *P. bipinnatifidus* và *P. stipuleanatus*. Dựa vào đặc điểm hình thái, có thể chia làm hai loại, đó là nhóm có lá chét chia đôi, và nhóm có lá chét không chia đôi. Dù khác biệt hình thái, nhưng sau khi kết hợp kỹ thuật phân tử thì trình tự gen vùng ITS của các mẫu này là giống nhau. Do đó kết luận đưa ra là chúng nên được xếp vào đơn vị dưới loài.

Năm 2013, tác giả Pang cùng cs đã tiến hành phân loại các cây dược liệu, nhằm xác định chính xác tên và đảm bảo tính ứng dụng và sự an toàn trong sử dụng. Tổng cộng 4385 mẫu của 2431 loài và các họ hàng gần hoặc hợp chất có thành phần của chúng. Đầu tiên nghiên cứu chỉ ra việc phân biệt 61 loại thảo mộc, ITS2 đã xác định chính xác 100% các loài này. Đối với dữ liệu tiếp theo, bao gồm 51 loại thảo mộc và 2382 loài có họ hàng, ITS2 có thể phân biệt được chính xác 48 loại thảo mộc với các loài có họ hàng với chúng. Đối với tập dữ liệu thứ ba bao gồm 34 loại thảo mộc à 111 chất có thành phần của chúng, ITS2 có thể phân biệt thành công tất cả các loại thảo mộc và hợp chất pha tạp của chúng. Do đó kết luận, vùng gen ITS2 là một

vùng quan trọng để xác thực các nguyên liệu thảo dược trong nghiên cứu về định danh các loài thực vật, trong việc sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử nói chung và sử dụng mã vạch DNA phân biệt các loại thảo dược nói riêng. [80]

Trong một nghiên cứu năm 2016, để xác định chất lượng loài Sâm *Panax notoginseng* và thứ *Panax vietnamensis* var. *fuscidius* thông qua việc sử dụng mã vạch DNA tích hợp với công cụ sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tác giả dựa trên trình tự ITS2 để phân biệt *P. notoginseng* với *P. vietnamensis* var. *fuscidicus* với nhau. Xác định được thành phần Notoginsenoside R1 và ginsenosides (Rb1, Rg1, Re, Rd, Rc và Rb2) được phân tích trong rễ, sợi thân, lá và hoa của *P. notoginseng* và *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* bằng phương pháp HPLC. Đặc điểm hình thái của hai loài này có độ tương đồng cao, rất khó để phân biệt như: là cây thân thảo, sống lâu năm, cao từ 20-60cm, gốc thịt có tơ, từ 3-6 lá, mọc thẳng đứng, lá chét hình trứng, gốc có cuống lá không có lá kèm hoặc phần phụ giống lá kèm, mép lá có răng cưa, và cụm hoa đơn ở tán đầu. Do đặc điểm hình thái giống nhau, việc phân biệt hai loài là rất khó khăn, trong việc sử dụng áp dụng cho ngành nghiên cứu và sản xuất thuốc thảo dược, do đó sử dụng phương pháp phân loại dựa trên vùng gen ITS2 cho kết quả nhanh và tiện lợi, có thể dễ dàng phân biệt được 2 loài này với nhau. Kết quả từ HPLC cho thấy thành phần hóa học của rễ là tương tự nhau, nhưng thành phần và hàm lượng notoginsenoside R1 và ginsenoside trong hoa, lá và thân, sợi lại khác nhau, do vậy, kết quả này có thể kết luận tác dụng dược lý có thể khác nhau giữa *P. notoginseng* và *P.vietnamensis* var. *fuscidicus* [81].

Trong những nghiên cứu năm 2022, đối với việc sử dụng mã vạch ITS-rDNA xác định loài Sâm mọc tự nhiên ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam, với số lượng là 30 mẫu từ các địa phương khác nhau ở các tỉnh như Tuyên Quang, Hà Giang, Cao Bằng và Yên Bái, kết quả thu được như sau: Các mẫu Sâm từ Tuyên Quang, Cao Bằng có quan hệ gần gũi với loài *P. notoginseng* với giá trị bootstrap là 63%, trong khi các mẫu Sâm thu được từ tỉnh Hà giang và Yên Bái thì giá trị tương đồng di truyền cao hơn khoảng 84% với loài *P. stipuleanatus*.

Các loài thuộc chi *Panax* L. đều trong tình trạng Cực kỳ nguy cấp (CR), trong Nghị định 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 có đề cập đến việc bảo vệ các loài này. Hiện nay, chưa có được đầy đủ thông tin về cây dược liệu trên toàn tỉnh Hà Giang. Các phương pháp định loại truyền thống đang gặp phải một số khó khăn trong các điều kiện gây ảnh hưởng đến hình thái bên ngoài của thực vật. Do đó, các nghiên cứu trên chỉ ra việc áp dụng các phương pháp sinh học phân tử, trong đó việc ứng dụng vùng gen ITS trong định loại các loài/ thứ trong chi *Panax* là phương pháp phù hợp, phổ biến và đang được quan tâm hiện nay. Vì vậy, việc xác định tình trạng bảo tồn và

thu thập thêm các mẫu khác thuộc chi *Panax* tại tỉnh Hà Giang phục vụ công tác nghiên cứu, bảo tồn, xác định giá trị và phát triển bền vững có giá trị thực tiễn. Từ đó, phát triển kinh tế địa phương dựa trên giá trị của nguồn dược liệu quý hiếm này tại Hà Giang là việc làm cần thiết lúc này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

- Mười mẫu trong luận văn được xác định có trình tự vùng gen ITS-rDNA hoàn toàn trùng khớp với nhau và trùng khớp với loài *P. stipuleanatus* thu thập ở huyện Tam Đường, tỉnh Lai Châu có mã số Genbank là KJ418196.
- Các mẫu nghiên cứu có trình tự vùng gen ITS-rDNA khác với loài *P. stipuleanatus* mã số Genbank AY271921 ở 02 vị trí 103 và 469.
- Các mẫu nghiên cứu được xác định là loài *Panax stipuleanatus* H.T. Tsai et K.M. Feng.
- Trình tự vùng ITS có mã số Genbank là KX768325 đã được xác định chính xác là của *Sâm langbian P. vietnamensis* var. *langbianensis*.

2. KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục thực hiện các nghiên cứu về hình thái và sinh học phân tử, đối với các mẫu thu thập thêm của chi *Panax* giúp cho việc khai thác, sử dụng nguồn tài nguyên một cách hợp lý, hiệu quả ở tỉnh Hà Giang.
- Kiến nghị nhóm tác giả của bài báo “A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence” đăng trên tạp chí *Phytotaxa* 277 (1): 047-058 liên hệ với Genbank để điều chỉnh mã số vùng gen ITS của *Sâm langbian P. vietnamensis* var. *langbianensis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hu SY., 1977, A contribution to our knowledge of ginseng. *Am J Chin Med* 5: 23.
2. Yun TK, 2001, Panax ginseng--a non-organ-specific cancer preventive. *Lancet Oncol*, 2:49–55.
3. Nguyễn Bá, 2007, *Thực vật học*, NXB Giáo dục, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) và nhiều người khác, 1996, *Sách đỏ Việt nam*, phần (II), NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 29-31, 204-208.
5. Lê Thanh Sơn và Nguyễn Tập, 2006, Những đặc điểm sinh thái cơ bản của Sâm ngọc linh, *Tạp chí Dược liệu*, 11(4), tr. 145-147.
6. Nguyen Minh Duc, Ryoji Kasai, Kazuhiro Ohtani, Aiko Ito, Yamasaki K, Osamu Tanaka, 1994, Saponins from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* HA et GRUSHV. *Collected in Central Vietnam*. II
7. Yamasaki K., 2011, Bioactive saponins in Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, *Pharmaceutical Biology Volume 38*.
8. Chính phủ nước CHXHCNVN và dự án của Quỹ Môi trường toàn cầu VIE/91/G31, 1995, *Kế hoạch hành động đa dạng sinh học của Việt nam*
9. Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) , 2003, 2006, *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, tập 2, 3. NXB. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Hà Nội.
10. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2004 và 2013), *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*; NXB. KH & KT, Hà Nội; T.I & T.II (2004), T.III (2013).
11. Võ Văn Chi (2011 & 2012), *Từ Điển Cây thuốc Việt Nam*; NXB. Y học, TP. Hồ Chí Minh.
12. Phạm Thanh Huyền, Nguyễn Quỳnh Nga, Phan Văn Trường, Hoàng Văn Toán, Nguyễn Xuân Nam, Nguyễn Văn Dân, Phạm Thị Ngọc, 2016, Kết quả điều tra nguồn tài nguyên cây thuốc của tỉnh Hà Giang. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược* 32 (2), 73-81.
13. Yang DY, Fushimi H, Cai SQ, Komatsu K, 2004, *Molecular analysis of Rheum species used as Rhei Rhizoma based on the chloroplast matK gene sequence and its application for identification*. *Biol Pharm Bull* 27:375–383
14. Peter M. Hollingsworth, Sean W. Graham, Damon P. Little, 2011, Choosing and Using a Plant DNA Barcode
15. Zuo Y., Chen Z., Kondo K., Funamoto T., Wen J. & Zhou S' , 2011, DNA barcoding of *Panax* species. *Planta Med* 77: 182-187.
16. Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough T.G, Savolainen V, 2008, DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*;105:2923–2928.

17. Xiang Q., P. P. Lowry, 2007, Flora China, 13, pp.1-548. *Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis.*
18. 2005, Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 10(3), tr. 71 – 76.
19. Linnaeus C., 1735, *Systema naturae*, pp. 8-13, Leyden.
20. Wen-zhi Yang , Ying Hu , Wan-ying Wu , Min Ye, De an Guo, 2014, Saponins in the genus *Panax* L. (Araliaceae): A systematic review of their chemical diversity, *Phytochemistry*, Volume 106, Pages 7-24
21. Linnaeus C., 1753, *Species plantarum*, Laurentius Salvius, pp.133- 134, 202, 273, 1058.
22. Hsu HY., 1982, Treating Cancer With Chinese Herbs. Long Beach, Calif: *Oriental Healing Arts Institute.*
23. Lian-Wen Qui, Chong-Zhi Wang, Chun-Su Yuan, 2011, *Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity*, Volume 72, Issue 8, Pages 689-699
24. Lu Liu , Fu-Rong Xu , Yuan Zhong Wang, 2020, Traditional uses, chemical diversity and biological activities of *Panax* L. (Araliaceae): A review, *Journal of Ethnopharmacology* , Volume 263, 112792
25. <https://powo.science.kew.org>
26. <https://powo.science.kew.org>
27. <https://powo.science.kew.org>
28. <https://powo.science.kew.org>
29. <https://powo.science.kew.org>
30. <https://www.gbif.org>
31. <https://powo.science.kew.org>
32. <https://powo.science.kew.org>
33. <https://powo.science.kew.org>
34. <https://www.gbif.org>
35. <https://www.gbif.org>
36. <https://powo.science.kew.org>
37. Phan Ke Long, Le Thanh Son, Phan Ke Loc, Vu Dinh Duy and Pham Van The, 2013. Lai Chau ginseng *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai. I. morphology, ecology, distribution and conservation status”, Báo cáo khoa học hội thảo VAST - KAST lần thứ II về đa dạng sinh học và các chất có hoạt tính sinh học, tr. 65 - 73. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
38. <https://powo.science.kew.org>

39. <https://powo.science.kew.org>
40. <https://powo.science.kew.org>
41. <https://powo.science.kew.org>
42. <https://www.gbif.org>
43. Wang, H., Wang J and Li, J., 2016, A simple real-time polymerase chain reaction (PCR)-based assay for authentication of the Chinese *Panax* ginseng cultivar Damaya from a local ginseng population.
44. Mahady G.B., Gyllenhaal C, Fong H.H.S and Farnsworth N.R., 2000, *Ginseng: a review of safety and efficacy*, Nutr Clin Care, 3(2), pp.90-101
45. Choi, H. I., Kim, N. H., Kim, J. H., Choi, B. S., Ahn, I. O., Lee, J. S., & Yang, T. J., 2011, Development of reproducible EST-derived SSR markers and assessment of genetic diversity in *Panax* ginseng cultivars and related species, *Journal of Ginseng Research*, 35(4), pp.399.
46. Peiran Liao , Pengfei Liu , Yaolong Wang , Chunmei Huang , Lei Lan , Ye Yan g , Xiuming Cui, 2018, Stereoscopic cultivation of *Panax notoginseng*: A new approach to overcome the continuous cropping obstacle, *Industrial Crops and Products*, Volume 126, Pages 38-47.
47. Grushvitzky, I. V., Tikhomirov, V. N., Aksenov, E. S. & Shibakina, G. V, 1969, Succulent fruit with carpophore inspecies of the genus *Stilbocarpa* Decne et Planch. (Araliaceae), Bull. Moscow Soc. Natur., Biol, 74, pp. 64–76.
48. Due N. M., Nham N. T. nogn.,1993, Saponin from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, collected in central Vietnam, I, *Chemical phrm. Bull.*, 42, pp. 2010-2014.
49. Due N. M., Kasai R. et al., 1994, Saponin from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv, collected in central Vietnam, II, *Chemical pharm. Bull.*, 42, pp. 115-122.
50. Due N. M., Kasai R. et al.,1997, Saponin composition of Vietnamese Ginseng and its significance from phamacognostical points of view, Proceeding of the First Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, *Pharmacy in Harmony*, Bangkok, Thailan, pp. 273-283.
51. Phạm Hoàng Hộ, 1970, *Cây cỏ Miền nam Việt Nam*, Nxb Bộ Văn hóa giáo dục và thanh niên trung tâm học liệu, 1, tr.989.
52. Võ Văn Chi và cs, 1973, *Cây cỏ thường thấy ở Việt Nam*, Nxb Khoa học kĩ thuật, Hà Nội, 3, tr. 109.
53. Phạm Hoàng Hộ, 1993, *Cây cỏ Miền Nam Việt Nam*, Nxb Trẻ, Hà Nội, 2(2), tr. 640-641.

54. H.T. Dung, I.V. Grushvitzky, 1985, *A new species of the genus Panax (Araliaceae) from Vietnam*, *Botanicheskii zhurnal*, 70, pp.518- 522.
55. Trần Đình Lý và cs, 1993, *1900 loài cây có ích ở Việt Nam*, Nxb Thế giới, tr. 32-33.
56. Đỗ Tất Lợi, 1995, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 376-379, 1004-1007.
57. Võ Văn Chi 1997, *Từ điển cây thuốc Việt nam*, Nxb Y học, Hà Nội, tr. 19-21, 64.
58. Lê Trần Đức, *Cây thuốc Việt Nam trồng hái chế biến trị bệnh ban đầu*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 1013-1026
59. Phạm Hoàng Hộ , 2000, *Cây cỏ Việt Nam*, tập 2, Nxb Tr , Tp. Hồ Chí Minh, tr.515-516.
60. Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh, Lê Thanh Sơn, 2014b, “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), tr.327-337.
61. Trần Ngọc Lân và cs, 2016, Kết quả nghiên cứu về loài Sâm Phuxailaileng ở vùng núi cao tỉnh Nghệ An, *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Nghệ An*, số 12/2016. Tr7-11
62. Nong Van Duy, Le Ngoc Trieu, Nguyen Duy Chinh, Van Tien Tran, 2016, A new variety of Panax (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence. *Phytotaxa* 277 (1), pp. 47-58
63. 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, tr.59-63.
64. 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 medica*, 69(07), pp.647-653.
65. Nguyễn Tập, Phạm Thanh Huyền, Lê Thanh Sơn, Ngô Đức Phương, Võ Văn Trại, Đinh Đoàn Long, Hoàng Thị Hòa, 2007, “Sử dụng chỉ thị ADN (RAPD - PCR) trong nghiên cứu đa dạng di truyền và góp phần phân loại một số loài cây thuốc định hướng công tác bảo tồn và tiêu chuẩn hóa dược liệu ở Việt Nam”. *Hội nghị Dược liệu toàn quốc lần thứ hai*, tr.288-301.
66. Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang Sơn, Phan Kế Long 2011, “Mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv., 1985) với các loài trong chi *Panax*”, *Hội thảo quốc gia về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 955-959.

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*, tr.44-51.
68. Vũ Huyền Trang, Hoàng Đăng Hiếu, Chu Hoàng Hà, 2013, “Nghiên cứu xây dựng mã vạch DNA cho việc phân loại nhận dạng cây sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.1100-1104.
69. Nguyen, B., Kim, K., Kim, Y. C., Lee, S. C., Shin, J. E., Lee, J. And Yang, T. J., 2015, The complete chloroplast genome sequence of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv (*Araliaceae*), *Mitochondrial DNA Part A*, 28(1), pp.85-86.
70. Trieu, L. N., Mien, N. T., Van Tien, T., Van Ket, N. and Van Duy, N., 2016, Genetic diversity of *Panax stipuleanatus* Tsai in North Vietnam detected by inter simple sequence repeat (ISSR) markers, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(3), pp.506-511.
71. Trang, N. T., Mai, N. T. And Zhuravlev, Y. N., 2017, Application of DNA barcoding to authentic *Panax vietnamensis*, *American Academic Scientific Research Journal for Engineering Technology and Sciences*, 29(1), pp.60-67.
72. 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 Công nghệ Việt Nam*, 60(2), tr.27-31.
73. V. Manzanilla, A. Kool, L. Nguyen Nhat, H. Nong Van, H. Le Thi Thu & H. J. de Boer, 2018, Phylogenomics, and barcoding of *Panax*: toward the identification of ginseng species, *BMC Evolutionary Biology*.
74. Vũ Đình Duy, Trần Thị Việt Thanh, Phan Kế Lộc, Nguyễn Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Hiên, Phan Kế Long, 2020, “Sử dụng vùng gen ITS-rDNA và Matk để xác định loài thuộc chi *Panax* ở vùng núi Phu Xai Leng, Kỳ Sơn, Nghệ An”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 18(1), tr.75-85.
75. Nguyễn Quang Thạch và Bùi Chí Bửu, 2021, *Giáo trình kỹ thuật di truyền nguyên lý và ứng dụng*, Nxb Học viện Nông nghiệp, Hà Nội.
76. Paul D. N. Hebert, Alina Cywinska, Shelley L. Ball and Jeremy R. deWaard, 2003, *Biological identifications through DNA barcodes*, The Royal Society.
77. Bruce G. Baldwin, 1993, *Molecular phylogenetics of calycadenia (compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and*

- morphological evolution reexamined*, American Journal of Botany 80(2): 222 - 238.
78. Hui Yao , Jingyuan Song , Chang Liu , Kun Luo, Jianping Han, Ying Li, Xiaohui Pang, Hongxi Xu, Yingjie Zhu , Peigen Xiao, Shilin Chen, 2010, Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals, *PLOS ONE*
 79. Shillin et al, 2010, Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species, *PLOS ONE*
 80. Pang et al., 2013, Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials, *Journal of Natural Medicines*, Volume 67, Issue 3, Pages 571-575
 81. Juan Yang , Lin-lin Dong , Guang-fei Wei, Hao-yu Hu, Guangwei Zhu, Jie Zhang, Shi-lin Chen, 2018, Identification and quality analysis of *Panax notoginseng* and *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* through integrated DNA barcoding and HPLC, *Chinese Herbal Medicines*, Volume 10, Issue 2, Pages 177-18