

Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu

Phạm Quang Tuyền^{1*}, Nguyễn Minh Đức², Khương Thị Bích², Nguyễn Thái Dương², Nguyễn Trường Khoa²,
Bùi Thanh Tân², Nguyễn Thị Hoài Anh¹, Trịnh Ngọc Bon¹, Trần Thị Kim Hương³, Trần Đăng Khánh², Khuất Hữu Trung²

¹Viện Nghiên cứu lâm sinh, Viện Khoa học lâm nghiệp Việt Nam

²Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

³Sở Khoa học và Công nghệ Lai Châu

Ngày nhận bài 4/12/2017; ngày chuyển phản biện 8/12/2017; ngày nhận phản biện 9/1/2018; ngày chấp nhận đăng 19/1/2018

Tóm tắt:

Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) là một loại dược liệu quý hiếm tại Việt Nam. Do bị khai thác quá mức, hiện nay sâm Lai Châu được liệt kê ở thứ hạng *Bị tuyệt chủng trầm trọng*. Chính vì thế, việc bảo tồn và phát triển loại dược liệu quý này không chỉ góp phần làm tăng số lượng của loài trong tự nhiên mà còn cần thiết để phát triển nguồn cây thuốc quý cung cấp cho nhu cầu của người dân. Đoạn trình tự gen ITS1-5.8S-ITS2 của 24 mẫu sâm Lai Châu thu thập tại Mường Tè, Lai Châu đã được giải trình tự để nghiên cứu sự đa dạng di truyền. Mức tương đồng di truyền của 24 mẫu sâm Lai Châu dao động trong khoảng 96,27 đến 100%. Dựa vào sự sai khác về trình tự gen ITS1-5.8S-ITS2 để nhận biết chính xác 24 nguồn gen của các mẫu sâm Lai Châu.

Từ khoá: Đa dạng di truyền, ITS (Internal Transcribed Spacer), *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, sâm Lai Châu.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Chi sâm *Panax* L. gồm 15 loài và dưới loài, hầu hết chúng là nguồn dược liệu cho y học cổ truyền như các loại Nhân sâm, Nhân sâm Hoa Kỳ, Tam thất, Nhân sâm Nhật Bản và sâm Ngọc Linh. Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có tên gọi khác là Tam thất hoang Mường Tè, Tam thất rừng, Tam thất đen. Năm 2013, loài cây này đã được công bố phát hiện tại Lai Châu và đăng trên các tạp chí khoa học quốc tế uy tín, đồng thời đăng ký mẫu ADN vào Genbank. Tính đến năm 2016, diện tích phân bố tự nhiên của sâm Lai Châu đã giảm đáng kể, chỉ còn lại rất ít (cây phân bố rải rác) trong rừng rậm nguyên sinh chưa bị tác động hoặc tác động nhẹ thuộc vùng núi cao xã Pa Vệ Sừ, Ka Lăng, Thum Lùm và Tá Bạ thuộc huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu. Hiện nay, do bị khai thác vô tội vạ, sâm Lai Châu được liệt kê ở thứ hạng *Bị tuyệt chủng trầm trọng* (CR) vì đáp ứng các tiêu chí A2a,c,d; B2b(ii,iii,v); C2a(i); E (tiêu chuẩn của Liên minh Quốc tế bảo tồn thiên nhiên và tài nguyên thiên nhiên IUCN) [1].

Tại nhiều nước trên thế giới, việc sử dụng các chỉ thị phân tử trong phân loại chi *Panax* đã được triển khai và đạt được nhiều kết quả mang tính ứng dụng cao. Shim và cs (2003) [2] tiến hành phân biệt *P. ginseng* (Hàn Quốc) với các taxon *Panax* khác gồm Nhân sâm SheoAn (Trung Quốc), *P. notoginseng* (Trung Quốc), *P. japonicus* (Nhật Bản) và hai loại Nhân sâm thuộc loài *P. quinquefolius* từ Mỹ và Canada

được thu thập từ 6 vùng khác nhau bằng kỹ thuật RAPD. Thuận và cs (2010) [3] cũng đã sử dụng kỹ thuật RFLP với các môi khuếch đại các vùng rADN 18S và ITS cũng như kỹ thuật Random Amplified Microsatellite (RAMS) xác định được 4 loài là *P. ginseng*, *P. quinquefolius*, *P. notoginseng* và *P. vietnamensis*. Gần đây, Lee và cs (2011) [4] đã phát triển một chỉ thị SCAR dẫn xuất từ ISSR để nhận dạng các chủng giống sâm *P. ginseng* nhằm phân biệt các chủng nông nghiệp có đặc tính tốt phục vụ cho chọn giống, kết quả này là công cụ chỉ thị ADN hữu ích để xác định Nhân sâm Hàn Quốc (đặc biệt là chủng Sunwon), quản lý hạt giống và các chương trình chọn giống được hỗ trợ bằng chỉ thị phân tử. Tại Việt Nam, trước đây cũng đã có nghiên cứu về sử dụng chỉ thị phân tử để phân tích mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm và tam thất thu thập tại Lai Châu của tác giả Phan Kế Long và cs (2014) [5]. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) tạo thành nhánh riêng biệt và có mối quan hệ gần gũi với *Panax zingiberensis*. và Tam thất trắng (*P. stipuleanatus*). Gần đây, Nguyen T.P. Trang và cs (2017) cũng ứng dụng ADN Barcoding để xác thực một số loài trong chi *Panax*, trong đó có sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu [6].

Trình tự ITS được sử dụng phổ biến cho các nghiên cứu phân tử ở thực vật nhằm xác định mối quan hệ giữa các loài gần gũi về nguồn gốc tiến hoá. Trong nghiên cứu này, chúng

*Tác giả liên hệ: Email: tuyen.phamsri@gmail.com

Genetic diversity of several ginseng plants collected in Lai Chau

Quang Tuyen Pham^{1*}, Minh Duc Nguyen², Thi Bich Khuong²,
Thai Duong Nguyen², Truong Khoa Nguyen²,
Thanh Tan Bui², Thi Hoai Anh Nguyen¹, Ngoc Bon Trinh¹,
Thi Kim Huong Tran³, Dang Khanh Tran², Huu Trung Khuat²

¹Silviculture Research Institute (SRI), VAFS

²Agricultural Genetics Institute, VAAS

³Department of Science and Technology Lai Chau

Received 4 December 2017; accepted 19 January 2018

Abstract:

Lai Chau Ginseng (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) is a medicinal plant which has recently been found in Lai Chau province, Vietnam. In this study, the internal transcribed spacer (ITS) markers were employed to investigate the genetic diversity and variability of 24 individual plants collected in Muong Te, Lai Chau. The ITS1-5.8S-ITS2 gene sequence of 24 samples of Lai Chau Ginseng was identified. The genetic similarities of them were ranged from 96.27 to 100%. This study may be useful information in quality control, propagation, cultivation and conservation of this medicinal plant.

Keywords: Genetic diversity, ITS, Lai Chau Ginseng, *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

Classification number: 3.4

tôi sử dụng trình tự ITS để đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm Lai Châu phục vụ cho công tác tuyển chọn, bảo tồn và phát triển nguồn gen quý.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là 24 mẫu giống sâm Lai Châu được thu thập ở các xã Pa Vệ Sừ và Thu Lũm thuộc huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu (bảng 1).

Hóa chất

Nghiên cứu sử dụng một số hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merck... như CTAB, Tris base, Boric acid, NaCl, dNTPs, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq Polymeraza, ethanol, 2-propanol, acetic acid glacial, phenol, chloroform, isoamylalcohol, agarose, các mồi ITS (bảng 2).

Bảng 1. Danh sách 24 mẫu giống sâm Lai Châu.

STT	Ký hiệu ADN	Tên giống	Địa điểm thu thập
1	AS03	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
2	AS04	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
3	AS05	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
4	MX1	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
5	MX4	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
6	PT11	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
7	PT14	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
8	PT19	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
9	PT1	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
10	PT7	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
11	PT5	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
12	PX10	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
13	PX17	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
14	PX23	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
15	PX8	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
16	PX9	Sâm Lai Châu	Thu Lũm - Mường Tè
17	SLC10	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
18	SLC2	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
19	SLC3	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
20	SLC7	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
21	SLC9	Sâm Lai Châu	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
22	PTPX4	Sâm Lai Châu tím	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
23	PTPX3	Sâm Lai Châu tím	Pa Vệ Sừ - Mường Tè
24	PTPX2	Sâm Lai Châu tím	Pa Vệ Sừ - Mường Tè

Bảng 2. Danh sách các mồi ITS.

TT	Trình tự nucleotide
ITS1	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG
ITS8	CACGCTTCTCCAGACTACA

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn phương pháp sử dụng CTAB của J. Doyle và L. Doyle (1987) [7] có một số cải tiến nhỏ để tiến hành tách chiết ADN từ các mẫu nghiên cứu.

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích 20 µl: Đệm

chứa 2 mM MgCl₂, 0,25 mM mỗi loại dNTP, 1U Taq DNA polymerase (Thermo Scientific), 0,2 μM mỗi và khoảng 30 ng khuôn mẫu ADN và nước cất dùng cho PCR.

Chương trình chạy PCR: Các phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 35 chu kỳ [94°C (1 phút), 59°C (45s), 72°C (50s)] và kết thúc ở 72°C (5 phút). Sau khi hoàn thành chương trình chạy PCR, sản phẩm PCR được bổ sung 4 μl thuốc nhuộm rồi tiến hành điện di.

Phương pháp thổi gel theo kit Qiagen:

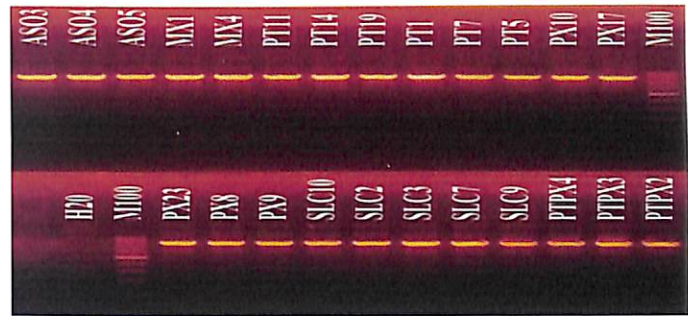
- Cắt lấy đoạn ADN mong muốn từ gel agarose, cho đoạn gel vừa cắt vào ống eppendorf 2 ml. Bổ sung buffer QG theo tỷ lệ 3:1.
- Ủ ở nhiệt độ 50°C trong khoảng 10 phút cho đến khi gel tan hoàn toàn.
- Cho dung dịch mẫu đã hoà tan ở trên vào cột QIAquick và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Bổ sung 500 μl buffer QG vào cột QIAquick và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút để loại hết agarose dư thừa.
- Bổ sung 750 μl buffer PE vào cột QIAquick, để cột thẳng đứng 5 phút sau đó ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Chuyển cột QIAquick sang ống microcentrifuge 1,5 ml sạch.
- Để hòa tan ADN, bổ sung 30 μl nước (pH = 7-8,5) vào giữa màng của cột QIAquick và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 1 phút, thu lượng ADN tinh sạch.

Phương pháp giải trình tự: Sản phẩm PCR vùng ITS sau khi tinh sạch được đọc trình tự tại Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả giải trình tự được so sánh với các trình tự tương đồng trên NCBI. Sau đó các trình tự được tập hợp lại và phân tích bằng chương trình MEGA v6.0 và CLC v8.02 để tạo cây phát sinh loài.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân tích các sản phẩm khuếch đại

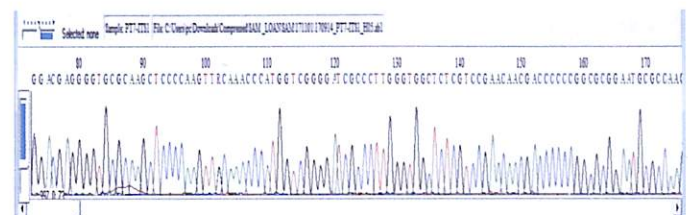
Sau khi thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại với cặp mồi ITS1/ITS8 và được điện di trên gel agarose 1,5% cho băng đơn hình với kích thước khoảng 750 bp (hình 1). Sau khi khuếch đại sản phẩm PCR, chúng tôi tiến hành thổi gel bằng việc sử dụng cột QIAquick Spin Columns (USA) nhằm thu được sản phẩm PCR đặc hiệu.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS8 trên 24 mẫu sâm Lai Châu với thang chuẩn Marker 100 bp và mẫu đối chứng trắng (H₂O).

Kết quả giải trình tự vùng ITS-rADN của các mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu

Kích thước đoạn trình tự của các mẫu sâm Lai Châu: Sản phẩm PCR với cặp mồi ITS1/ITS8 (ITS1: G G A A G G A G A A G T C G T A A C A A G G / ITS 8 : C A C G C T T C T C C A G A C T A C A) sau khi tinh sạch được phân tích trực tiếp trên máy giải trình tự ABI PRISM 3100 DNA Analyzer (Applied Biotech) và phần mềm MEGA v6.0, kết quả cho ra giản đồ có các đỉnh (peak) với 4 màu sắc khác nhau tương ứng với 4 loại nucleotide và biểu thị dãy trình tự các nucleotide (hình 2). Kết quả đã thu được 24 đoạn trình tự ITS của 24 mẫu sâm Lai Châu với số nucleotide khác nhau trên từng mẫu giống.



Hình 2. Một đoạn giản đồ có các đỉnh với 4 màu sắc khác nhau tương ứng với 4 loại nucleotide của mẫu sâm Lai Châu PT7.

Vào năm 2012-2013, nhóm nghiên cứu của Phan Kế Long và cs đã tiến hành thu thập mẫu, giải trình tự *P. vietnamensis* tại Kon Tum và một taxon *Panax* tại Lai Châu, công bố trình tự vùng gen *matK* và ITS-rDNA (ITS1-5,8S và một phần ITS2) của taxon này lên Genbank và xác định đây là taxon *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* Komatsu, Zhu & Cai (<http://www.vast.ac.vn>). Trình tự ITS-rDNA mà các tác giả công bố là trình tự vùng ITS1-5,8S và một phần ITS2 có kích thước 588 bp.

Kết quả phân tích vùng ITS-rADN cho thấy, trình tự các nucleotide giữa các mẫu sâm Lai Châu có sự khác biệt nhau. Cụ thể, các mẫu giống nghiên cứu có tỷ lệ Guanin và Cytosine cao hơn tỷ lệ Adenine và Thymine, hay nói cách

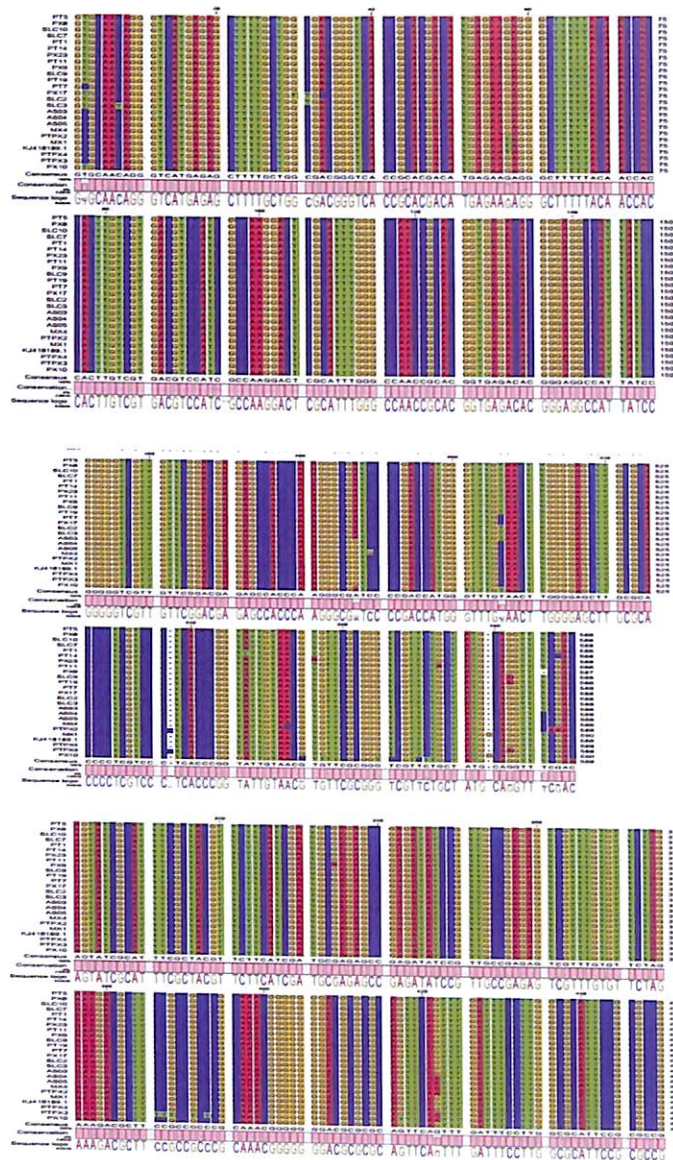
khác là đều có thành phần %GC cao hơn thành phần %AT. Mẫu AS03, AS04, AS05 đều có thành phần GC cao nhất (59,9%) và có thành phần TA (40,1%) thấp hơn. Tỷ lệ thành phần %GC trung bình ở cả 24 mẫu nghiên cứu là 59,3% và tỷ lệ thành phần %AT trung bình 40,7% (bảng 3).

Bảng 3. Thành phần bốn loại nucleotide của các mẫu giống nghiên cứu.

Mẫu giống	Tỷ lệ (%)						Tổng số nucleotide
	T(U)	C	A	G	GC	AT	
AS03	21,8	29,3	18,4	30,6	59,9	40,1	588
AS04	21,8	29,3	18,4	30,6	59,9	40,1	588
AS05	21,8	29,1	18,4	30,8	59,9	40,1	588
MX4	21,8	29,3	18,5	30,4	59,7	40,3	588
PT1	22,4	28,9	18,4	30,3	59,2	40,8	588
PT11	22,1	28,8	18,7	30,3	59,1	40,9	587
PT14	22,1	28,7	18,7	30,4	59,2	40,8	588
PT19	22,1	28,9	18,5	30,4	59,4	40,6	588
PT5	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
PT7	21,9	29,1	18,7	30,3	59,4	40,6	588
PTPX2	22,0	29,2	18,3	30,5	59,7	40,3	590
PTPX3	22,9	28,6	18,3	30,2	58,8	41,2	590
PTPX4	21,9	29,1	18,5	30,4	59,5	40,5	588
PX10	22,4	28,9	18,7	29,9	58,8	41,2	588
PX17	22,6	28,7	18,4	30,3	59,0	41,0	588
PX23	22,3	28,7	18,7	30,3	59,0	41,0	588
PX8	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
PX9	22,3	28,7	18,7	30,3	59,0	41,0	588
SLC10	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
SLC2	22,6	28,4	18,5	30,4	58,8	41,2	588
SLC3	22,6	28,4	18,5	30,4	58,8	41,2	588
SLC9	22,3	28,7	18,7	30,3	59,0	41,0	588
MX1	22,1	29,1	18,2	30,6	59,7	40,3	588
SLC7	22,3	28,7	18,5	30,4	59,2	40,8	588
KJ418189.1*	22,1	29,1	18,2	30,6	59,7	40,3	588
Trung bình	22,2	28,9	18,5	30,4	59,3	40,7	588,1

*: Trình tự tương ứng của sâm Lai Châu được lấy từ Genbank với mã truy cập là KJ418189.1.

Kết quả so sánh trình tự nucleotid vùng ITS-rADN của các mẫu sâm Lai Châu: Trình tự đoạn ITS-rADN của 24 mẫu sâm Lai Châu sau khi đã xác định được đem so sánh với nhau. Phép so sánh giống hàng được thực hiện bằng phần mềm Megav6.0 và CLC v8.02. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Kết quả giống hàng, giống cột 24 trình tự ITS-rADN của sâm Lai Châu.

Kết quả hình 3 cho thấy, sự khác biệt giữa các trình tự chủ yếu là các vị trí đa hình đơn (SNP), trong đó 1 nucleotide bị thay thế bởi một nucleotide khác, bên cạnh đó cũng có rất nhiều khoảng trống giữa các trình tự. Điều này có thể là do hệ quả sự biến động theo hướng mất và tăng thêm (deletion và insertion) một hay một số nucleotide trong trình tự vùng ITS-rADN của các mẫu sâm Lai Châu khảo sát. 24 mẫu sâm Lai Châu được nghiên cứu có sự khác biệt rất ít về trình tự vùng ITS-rADN, sự biến động trình tự giữa các mẫu thể hiện rõ nhất ở khoảng 200 nucleotide đầu và 200 nucleotide cuối. Do vậy dẫn đến sự khác biệt về trình tự đoạn ADN thu được.

Thực hiện so sánh từng cặp bằng công cụ BLAST thu được hệ số tương đồng trình tự vùng ITS-rADN giữa 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu. Kết quả ma trận nhận dạng trình tự được thể hiện ở bảng 4.

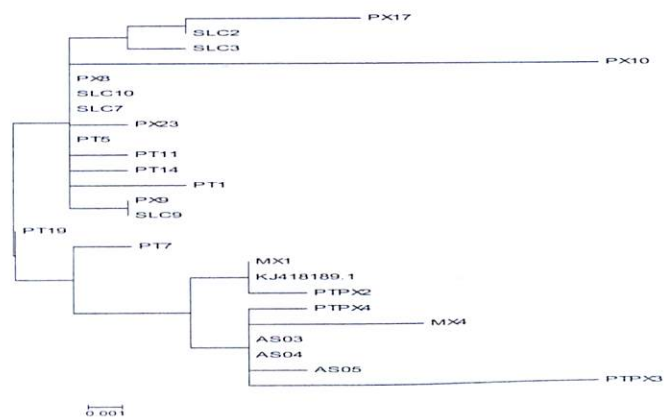
Bảng 4. Hệ số tương đồng và khoảng cách di truyền trình tự vùng ITS-rADN giữa 24 mẫu sâm Lai Châu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
PT5	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT8	2	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC10	3	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC7	4	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT1	5	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT14	6	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT11	7	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT8	8	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT5	9	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC10	10	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC7	11	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT19	12	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT7	13	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT17	14	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SLC10	15	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT1	16	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AS3	17	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AS4	18	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AS5	19	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PT19	20	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00	0,00
PT7	21	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00	0,00
PT17	22	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00	0,00
PT19	23	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1	0,00
PT7	24	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	1
PT19	25	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Kết quả bảng 4 cho thấy, có sự tương đồng cao giữa 24 trình tự của 24 mẫu sâm Lai Châu, hệ số tương đồng cao nhất là 100%, còn hệ số thấp nhất là 96,27%; khoảng cách di truyền gần nhất là 0,00 và xa nhất là 0,03.

Cây phân loại trình tự ITS-rADN của 24 mẫu sâm Lai Châu

Sau khi xác định được trình tự nucleotide vùng ITS-rADN tiến hành dựng cây phân loại. Kết quả thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Cây phân loại 24 mẫu sâm Lai Châu dựa trên so sánh trình tự ITS-rADN.

Kết quả nghiên cứu mối quan hệ họ hàng của các mẫu sâm thu được ở Lai Châu với các loài/thứ trong cùng chi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rADN (hình 4) bằng phương pháp Maximum Likelihood đều cho thấy, các mẫu sâm thu ở Lai Châu nằm trong hai nhóm. Nhóm 1, gồm 10 trình tự vùng ITS-rADN của các mẫu: PT19, PT7, MX1, PTPX2, PTPX4, MX4, AS03,

AS04, AS05, PTPX3 và trình tự sâm Lai Châu được lấy từ Genbank với mã truy cập là KJ418189.1 cũng thuộc nhóm này. Nhóm 2, gồm trình tự vùng ITS-rADN của 14 mẫu còn lại: PX17, SLC2, SLC3, PX10, PX8, SLC10, SLC7, PX23, PT5, PT11, PT14, PT1, PX9 và SLC9.

Kết quả nghiên cứu đã xác định được trình tự nucleotide vùng ITS-rADN của 24 mẫu sâm Lai Châu. Kích thước vùng ITS dao động từ 587 đến 590 bp và tỷ lệ % (G+C) dao động từ 58,8 đến 59,9%, trung bình là 59,3%. Với kết quả thu được như vậy thì 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu có kết quả tương tự như kích thước và tỷ lệ thành phần (G+C) vùng ITS của nhiều loài thực vật hạt kín đã được công bố. Việc xác định trình tự và sử dụng trình tự nucleotide đoạn ITS-rADN để so sánh nhằm tìm ra mối quan hệ tiến hóa giữa các loài hoặc sự đa dạng di truyền của các cá thể trong cùng một loài đã được sử dụng phổ biến từ lâu trên thế giới.

Kết luận

Kết quả phân tích về quan hệ phát sinh giữa 24 mẫu sâm Lai Châu nghiên cứu và taxon cùng chi với đối tượng nghiên cứu có quan hệ với *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*, trên vùng bảo tồn ITS1-5,8S rDNA-ITS2 hay vùng gen ITS-rADN. Mức tương đồng di truyền của 24 mẫu này dao động trong khoảng 96,27 đến 100%.

Sau khi xác định được các mẫu sâm Lai Châu *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* thu thập tại Mường Tè, việc sử dụng trình tự vùng ITS1-5,8S rDNA-ITS2 cho phép phân biệt các sự khác biệt được khảo sát và cũng thể hiện rõ mối quan hệ phát sinh giữa taxon này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] <https://www.iucn.org/>.
 [2] Y.H. Shim, et al. (2003), "Molecular Differentiation of Panax Species by RAPD Analysis", *Archives of Pharmacol Research*, **26**(8), pp.601-605.
 [3] Nguyễn Thanh Thuận, Vũ Thanh Thảo, Nguyễn Văn Thanh, Trần Cát Đông (2010), "Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xác định một số loài sâm thuộc chi Panax", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, **14**(1), tr.129-133.
 [4] J.W. Lee, et al. (2011), "Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (*Panax ginseng* C.A. Meyer)", *Journal of Ginseng Research*, **35**(1), pp.52-59.
 [5] Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh, Lê Thanh Sơn (2014), "Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng Matk và ITS-rADN", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **12**(2), tr.327-337.
 [6] Nguyen T.P. Trang, Nguyen T.H. Mai, Yuri N. Zhuravlev (2017), "Application of DNA Barcoding to Authentic *Panax Vietnamensis*", *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, **29**(1), pp.60-67.
 [7] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1987), "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochemical Bulletin*, **19**, pp.11-15.