

## 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

Phan Kế Long<sup>1</sup>, Vũ Đình Duy<sup>1</sup>, Phan Kế Lộc<sup>3</sup>, Nguyễn Giang Sơn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Phương Trang<sup>2</sup>, Lê Thị Mai Linh<sup>1</sup>, Lê Thanh Sơn<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

<sup>4</sup>Viện Dược Liệu – Bộ Y tế

Ngày nhận bài: 07.3.2014

Ngày nhận đăng: 19.5.2014

### TÓM TẮT

Các loại sâm thu ở Lai Châu bao gồm sâm *Lai Châu* (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và *Tam thất trắng* (*Panax stipuleanatus*) đã được nghiên cứu mối quan hệ di truyền trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng *matK* và ITS-rDNA. Đã xác định được sâm *Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có chiều dài vùng *matK* là 1485 nucleotide và khác với sâm *Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) 02 nucleotide. Chiều dài vùng ITS-rDNA của sâm *Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) 588 nucleotide và khác với sâm *Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) từ 04 nucleotide (các mẫu thu ở Bản Giang (huyện Tam Đường) và Nậm Tăm (huyện Sìn Hồ) đến 05 nucleotide (các mẫu thu ở Ka Lăng (huyện Mường Tè)). Các mẫu sâm *Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) thu ở Ka Lăng khác với các mẫu thu ở Bản Giang và Nậm Tăm 01 nucleotide đặc trưng cho vùng địa lý (autapomorphis). Kết quả phân tích mối quan hệ họ hàng trên cơ sở trình tự nucleotide vùng *matK* và ITS-rDNA bằng phương pháp Maximum Parsimony (MP) và Maximum Likelihood (ML) cho thấy, 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*. *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) thu được ở Lai Châu khác với sâm *Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) 26 nucleotide trên vùng gen *matK*, 25 nucleotide trên vùng ITS-rDNA và khác với sâm *Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) 28 nucleotide trên vùng gen *matK*, 22 nucleotide trên vùng gen ITS-rDNA. Các mẫu *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) này khác với các quần thể *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) khác trên thế giới ở 01 nucleotide đặc trưng vùng địa lý (autapomorphis) và chúng có quan hệ gần gũi với *Panax pseudoginseng*.

**Từ khóa:** *matK*, ITS-rDNA, sâm *Lai Châu*, sâm *Ngọc Linh*, *Panax*, *P. vietnamensis* var. *vietnamensis*, *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*, *P. stipuleanatus*, *Tam thất trắng*

### MỞ ĐẦU

Chi sâm *Panax* L. thuộc họ Ngũ gia bì (Araliaceae) gồm có 6-8 loài, trong đó ở Bắc Mỹ chỉ có 1 loài, 5-7 loài còn lại tập trung ở Đông Á (kể cả Himalaya); riêng Trung Quốc có 6 loài mọc tự nhiên (Mabberley, 2008, Xiang, Lowry, 2007). Tất cả các loài sâm đều dùng làm thuốc, một số có giá trị rất cao như *Nhân sâm*, *sâm Mỹ* (Heywood, 1993, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập, 2003, Mabberley, 2008, Nguyễn Tập, 2005, Xiang, Lowry, 2007). Ở Việt Nam đã biết 3 loài (Ha, Grushv, 1985, Phạm Hoàng Hộ, 2000), còn nếu tính cả taxon các dưới loài và thứ thì lên đến 15 (Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập, 2003). Cả 3 loài sâm đã biết đều được liệt kê trong Sách đỏ

Việt Nam- Phần II- Thực vật ở thứ hạng Rất nguy cấp (CR) hay Nguy cấp (EN), cũng như đều được xếp vào nhóm IA- Những thực vật bị nghiêm cấm khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại (Nghị định 32/2006/NĐ-CP, 2006) do từng bị săn lùng ráo riết để khai thác đến cạn kiệt, thậm chí có khi đã bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên (EW). Do đó chúng cần được ưu tiên bảo tồn ở mức cao nhất.

Cho đến gần đây, loại sâm *Lai Châu*, một cây thuốc mới, ít được biết đến ở Việt Nam đã được Phan Kế Long *et al.*, (2013) xác định gần nhất với thứ sâm *Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai), một thứ mới cho khoa học của loài sâm *Việt* (*P. vietnamensis* Ha & Grushv). Sâm *Lai Châu* hiện 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 IUCN, 2010).

Cho đến nay, kỹ thuật giải trình tự gen với đặc tính ổn định, có độ chính xác đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phân loại, đa dạng di truyền và phát sinh hệ thống của một số loài thực vật. Chẳng hạn Phan Kế Long và đồng tác giả (2009) đã sử dụng đoạn gen ITS-rDNA khi phân tích mối quan hệ di truyền của các loài Lan hải hay một phần đoạn gen ITS1-rDNA để nghiên cứu mối quan hệ phát sinh của *Bách xanh đá vôi* (*Calocedrus rupestris*) và *Bách xanh đá khác* (*C. macrolepis*) (Phan Kế Long *et al.*, 2011). Sau khi nghiên cứu các vùng gen *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS của 6286 cá thể thực vật thuộc 1757 loài, 141 chi, 75 họ, 42 bộ nhóm nghiên cứu mã vạch thực vật của Trung Quốc đã đi đến kết luận là cặp chi thị *matK* + ITS có khả năng phân loại cao nhất, đến 75.3% số loài (China Plant BOL Group, 2011). Riêng về Sâm thì Zuo *et al.* (2011) sau khi nghiên cứu các vùng gen *atpF-atpH*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *psbM-trnD*, *matK*, *rps16*, *rpoB*, *rpoC1*, *rbcl*, ITS và *nad1* của 33 quần thể *P. bipinnatifidus*, 5 quần thể *P. japonicus*, 2 quần thể *P. stipuleanatus*, 2 quần thể *P. trifolius* và các quần thể của *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. pseudoginseng*, *P. quinquefolius* đã chỉ ra rằng vùng gen ITS có mức độ đa dạng di truyền cao nhất, có khả năng phân biệt loài đến 87.5% và dưới loài đến 84.21%. Nguyễn Thị Phương

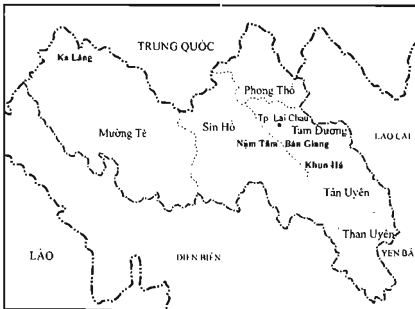
Trang *et al.*, (2011) đã phân tích mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) với các loài trong chi *Panax* dựa trên kết quả phân tích thông tin di truyền đoạn gen ITS-rDNA. Kết quả cho thấy sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) có mối quan hệ gần gũi với loài *P. notoginseng* và chúng khác nhau ở 18 nucleotide. (Zhu *et al.*, 2003) trên cơ sở phân tích dữ liệu gen *trnK* và 18S-rRNA cho thấy hai thứ của loài sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv): thứ sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. var. *vietnamensis*) và thứ sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai) có mối quan hệ gần gũi và chung nhánh với *P. zingiberensis* có nguồn gốc ở Vân Nam (Trung Quốc).

Mục tiêu của nghiên cứu này là nghiên cứu mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* và ITS-rDNA đồng thời xây dựng mối quan hệ di truyền giữa một số loài trong chi *Panax* ở Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Địa điểm nghiên cứu

Thu thập mẫu nghiên cứu được tiến hành tại các huyện Mường Tè, Tam Đường và Sơn Hồ thuộc tỉnh Lai Châu (Hình 1). Đây là những khu vực còn tồn tại trong tự nhiên loài sâm Lai Châu cần nghiên cứu.



Hình 1. Sơ đồ vị trí các điểm thu mẫu Sâm ở Lai Châu

**Vật liệu nghiên cứu**

Tổng số 17 cá thể của 2 loại Sâm ở Lai Châu bao gồm sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và Sâm thất trắng (*P. stipuleanatus*) được chúng tôi thu thập ngẫu nhiên (Bảng 1). Tại hiện trường mẫu thu được ghi số hiệu kèm theo lý lịch như địa điểm, tọa độ và độ cao so với mặt biển, đá gốc và chất đất, thảm thực vật tự nhiên và hiện trạng tác động của con người, một

số đặc điểm sinh học và thu mẫu làm tiêu bản thực vật. Mẫu thu để nghiên cứu DNA mang cùng số hiệu với mẫu tiêu bản, được bảo quản trong silicagel, sau đó chuyển về phòng Phân loại thực nghiệm và Đa dạng nguồn gen và giữ trong tủ lạnh sâu, âm 30°C cho đến khi mẫu được lấy ra để phân tích DNA. Mẫu tiêu bản thu thập được sử dụng để nghiên cứu xác định tên, sau đó được lưu giữ tại Phòng Sinh học, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

**Bảng 1.** Các dẫn liệu về số hiệu mẫu Sâm thu được ở Lai Châu sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Số hiệu	Huyện	Xã	Tọa độ địa lý		Độ cao (m)	Mã số Genbank	
							matK	ITS
1	LTS 007	Mường Tè	Ka Lăng	22°37'77" N	102°28'18" E	1615	KJ418203	KJ418191
2	LTS 008	Mường Tè	Ka Lăng	22°37'77" N	102°28'18" E	1615	KJ418207	KJ418189
3	LTS 012	Mường Tè	Ka Lăng	22°37'74" N	102°28'26" E	1660	KJ418199	KJ418190
4	LTS 016	Mường Tè	Ka Lăng	22°37'81" N	102°28'27" E	1667	KJ418210	KJ418192
5	LTS 019	Mường Tè	Ka Lăng	22°37'81" N	102°28'27" E	1667	KJ418200	KJ418188
6	P 11169	Tam Đường	Khun Há	22°14'23" N	103°33'41" E	1800	KJ418213	KJ418196
7	P 11171	Tam Đường	Khun Há	22°14'23" N	103°33'41" E	1800	KJ418212	KJ418187
8	P 11172	Tam Đường	Khun Há	22°14'23" N	103°33'41" E	1800	KJ418214	KJ418197
9	P 11173	Tam Đường	Khun Há	22°14'23" N	103°33'41" E	1800	KJ418215	KJ418198
10	VDD024	Tam Đường	Bản Giang	22°17'44" N	103°29'59" E	1476	KJ418201	KJ418183
11	VDD033	Tam Đường	Bản Giang	22°17'44" N	103°29'59" E	1476	KJ418209	KJ418191
12	LTS12_02	Sin Hồ	Nậm Tăm	22°17'20" N	103°29'25" E	1500	KJ418202	KJ418186
13	LTS12_04	Sin Hồ	Nậm Tăm	22°17'20" N	103°29'25" E	1500	KJ418208	KJ418184
14	LTS12_05	Sin Hồ	Nậm Tăm	22°17'20" N	103°29'25" E	1500	KJ418211	KJ418182
15	SNL1	Nam Trà My	Trà Linh	15°02'55" N	108°00'19" E	1600	KJ418206	KJ418193
16	SNL2	Nam Trà My	Trà Linh	15°02'55" N	108°00'19" E	1600	KJ418205	KJ418194
17	SNL3	Nam Trà My	Trà Linh	15°02'55" N	108°00'19" E	1600	KJ418204	KJ418195

**Phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử trong phòng thí nghiệm**

**Tách chiết DNA tổng số**

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

**Nhân bản DNA**

Nhân bản vùng *matK* và ITS-rDNA bằng kỹ

thuật PCR với cặp mồi thiết kế trên cơ sở trình tự *matK* và ITS-rDNA của các loài trong chi *Panax* trên Genbank (Bảng 2);

**Cặp mồi giải mã trình tự vùng ITS-rDNA**

Mồi xuôi: PaITSF 5'-CAC TGA ACC TTA TCA TTT AG AG -3'

Mồi ngược: PaITSR 5'-CTT ATT GAT ATG CTT AAA CTC AG-3'

Cặp môi giới mã trình tự vùng gen *matK*:

Mỗi xuôi: kFa 5'-TTT GAC TGT ATC GCA  
CTA TG-3'

Mỗi ngược: kRb 5'-ATT TAC ACG GAT TCC  
TAA CG-3'

Chu trình phản ứng PCR: 96°C 2 phút; 35 chu kỳ  
gồm: 96°C 30 giây, 56°C 25 giây, 72°C 40 giây;  
72°C 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel  
agarose 1,5% và tinh sạch bằng Qiaquick gel  
extraction kit (Qiagen, Đức). Sản phẩm này được sử  
dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp

với môi đã thiết kế, sử dụng BigDye terminator  
cyclor v3 I và đọc kết quả trên hệ thống ABI 3100  
Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).  
Kết quả giải mã trình tự được gửi lên Genbank.

#### Phân tích số liệu

Các trình tự DNA được so sánh, phân tích với  
các loài/thứ thuộc chi *Panax* và 01 loài ngoài nhóm  
(Bảng 2) sử dụng các phần mềm ClustalX. Xây dựng  
cây phát sinh hệ thống bằng phần mềm PAUP v4.0  
theo phương pháp Maximum parsimony và  
Maximum likelihood.

**Bảng 2.** Danh sách các loài/thứ trên Genbank sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên loài/thứ	matK	ITS	TT	Tên loài/thứ	matK	ITS
1	<i>Panax ginseng</i>	AB087999	U41680	14	<i>Panax pseudoginseng</i> var <i>himalaicus</i>	AB088011	
			U41681			AB088012	
2	<i>Panax quinquefolius</i>	AB088001	U41688			AB088013	
			U41689			AB088014	
3	<i>Panax japonicus</i> JP	AB088000	U41702	15	<i>Panax essamicus</i>		AY233322
			AF263373	16	<i>Panax infolius</i>		U41698
4	<i>Panax japonicus</i> CN	AB088006		17	<i>Panax wangianus</i>		U41690
5	<i>Panax japonicus</i> var. <i>major</i>	AB088008	U41683	18	<i>Panax sinensis</i>		AY271920
6	<i>Panax japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	AB088009	U41679	19	<i>Panax omeiensis</i>		U41692
7	<i>Panax japonicus</i> var <i>angustifolius</i>	AB088007	AY271915				U41686
8	<i>Panax japonicus</i> var <i>bipinnatifidus</i>	AB088010	HQ112421	20	<i>Panax shangianus</i>		AY233328
9	<i>Panax notoginseng</i>	AB088002	U41685	21	<i>Panax stipuleanatus</i>	JX680328	HQ112444
10	<i>Panax zingiberensis</i>	AB088005	U41699			AB088015	HQ112441
11	<i>Panax vietnamensis</i>	AB088003					AY271921
12	<i>Panax vietnamensis</i> var <i>fuscidiscus</i>	AB088004					AY271922
13	<i>Panax pseudoginseng</i>	AB088016	U41693	22	<i>Eleutherococcus</i> <i>senticosus</i>	AB088017	AB570259
			U41694				

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK*

Sau khi chỉnh sửa và loại bỏ tất cả các vị trí  
trống vùng gen *matK* của các mẫu sâm thu được ở  
Lai Châu và các mẫu của thứ chuẩn của loài *sâm*  
*Việt* (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) có tên *sâm*

*Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. var.  
*vietnamensis*) thu ở Quảng Nam có chiều dài  
1485bp. Các mẫu sâm thu được ở Lai Châu  
(LTS007, LTS008, LTS012, LTS016, LTS019,  
P11171, VDD024, VDD033, LTS12\_02, LTS12\_04,  
LTS12\_05) có trình tự nucleotide tương đồng 100%  
với thứ *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu,  
S. Zhu & S.Q. Cai, 2003 (AB088004) lần đầu tiên

phát hiện được ở đông nam tỉnh Vân Nam (Trung Quốc). Và chúng tôi đề nghị gọi những mẫu tương đồng đã thu được ở một số khu vực của Lai Châu và có thể ở cả một số điểm cực bắc Việt Nam là *sâm Lai Châu*. Trái lại trình tự nucleotide của các mẫu sâm này khác với thứ chuẩn *sâm Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* Ha et Grushv. var. *vietnamensis*) (AB088003, SNL1, SNL2, SNL3) 02 nucleotide ở

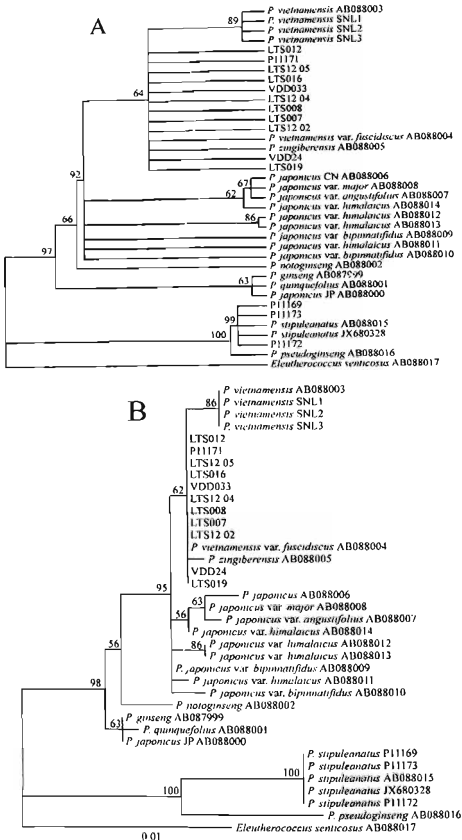
các vị trí 100 và 1040 (Hình 2). Kết quả này cũng tương tự với nguyên cứu của Zhu và đồng tác giả (2003) cho thấy giữa thứ chuẩn *sâm Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. var. *vietnamensis*) và thứ *sâm Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có sai khác ở 02 nucleotide trên vùng gen *matK*. Các mẫu này khác với *P. zingiberensis* C.Y. Wu & K.M. Feng ở 01 nucleotide (Hình 2).

\*\*\*\*\*

```

AB088003 : .G.....G.....
SNL3      : .G.....G.....
SNL2      : .G.....G.....
SNL1      : .G.....G.....
AB088004 : .....
LTS012    : .....
LTS019    : .....
VDD24     : .....
LTS12_02  : .....
LTS007    : .....
LTS008    : .....
LTS12_04  : .....
VDD033    : .....
LTS016    : .....
LTS12_05  : .....
P11171    : .....
AB088005 : .....C.....
P11169    : C.TCTTAAAT..A.TT..TT.ACTC.AA.TTA.CC.
P11172    : C.TCTTAAAT..A.TT..TT.ACTC.AA.TTA.CC.
P11173    : C.TCCTAAAT..A.TT..TT.ACTC.AA.TTA.CC.
JX680328  : C.TCTTAAAT..A.TT..TT.ACTC.AA.TTA.CC.
AB088015  : C.TCTTAAAT..A.TT..TT.ACTC.AA.TTA.CC.
    
```

**Hình 2.** Các nucleotide sai khác trên vùng gen *matK* giữa các mẫu sâm thu ở Lai Châu và các loài/thứ có quan hệ gần gũi. AB088003: *Panax vietnamensis* var. *vietnamensis* Sâm ngọc linh; AB088004: *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* Sâm lai châu; AB088005: *Panax zingiberensis*; JX680328, AB088015: *Panax stipuleanatus* Tam thất trắng.



Hình 3. Mối quan hệ họ hàng của các mẫu sấm thú ở Lai Châu với các loài/thứ trong cùng chi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* bằng phương pháp Maximum Parsimony (A) và Maximum Likelihood (B). *Eleutherococcus senticosus* (AB088017) là loài ngoài nhóm.

Các mẫu P11169, P11172, P11173 thu ở Khun Há (Tam Đường) có trình tự nucleotide trên vùng gen *matK* hoàn toàn tương đồng với loài *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus* C.T. Tsai & K.M. Feng) (AB088015, JX680328) (Hình 2). Các mẫu này sai khác với thứ *sâm Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) ở 25 nucleotide; khác với thứ chuẩn *sâm Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) ở 28 nucleotide và khác với *sâm lông chim* (trước đây thường gọi là *sâm vũ diệp*) (*P. japonicus* var. *bipinnatifidus* (Seem.) C.Y. Wu & K.M. Feng) ở 25 nucleotide (AB088009) và 27 nucleotide (AB088010).

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 *matK* (Hình 3) bằng phương pháp Maximum Parsimony và Maximum

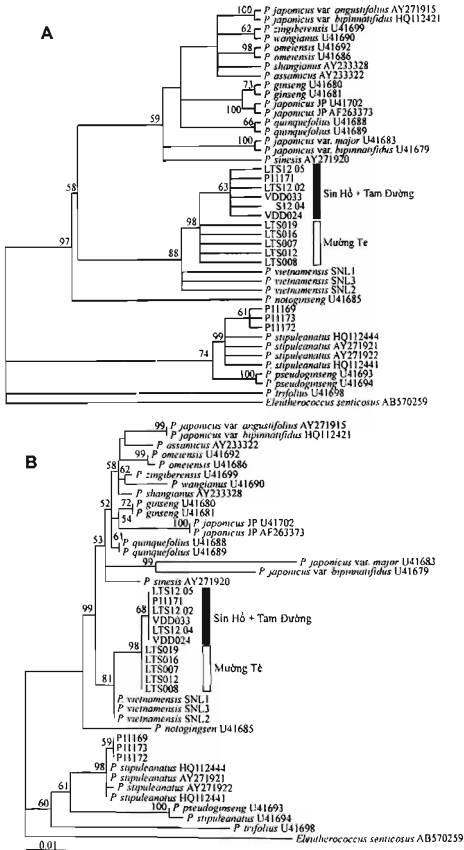
Likelihood đều cho thấy, các mẫu sâm thu ở Lai Châu nằm trong hai nhóm: nhóm 1 bao gồm 7 mẫu thu được ở Ka Lăng (Mường Tè) (LTS007, LTS008, LTS012, LTS016, LTS019), 3 mẫu thu ở Nậm Tăm (Sìn Hồ) (LTS12\_02, LTS12\_04, LTS12\_05), 2 mẫu thu ở Bản Giang (Tam Đường) (VDD024, VDD033) và 1 mẫu thu ở Khun Há (Tam Đường) (P11171) nằm chung nhánh với *sâm Lai Châu* (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và *P. zingiberensis* và có mối quan hệ gần gũi với thứ chuẩn của loài, thứ *sâm Ngọc Linh* (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) với bootstrap lần lượt là 64% và 62%.

Nhóm 2 gồm các mẫu P11169, P11172, P11173 thu ở Khun Há (Tam Đường) nằm chung nhánh với *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) (AB088015, JX680328) với bootstrap lần lượt là 99% và 100%.

\*\*\*\*\*

LTS12_05	.....G.....T.....
VDD024	.....G.....T.....
LTS12_04	.....G.....T.....
VDD033	.....G.....T.....
LTS12_02	.....T.....
P11171	.....G.....T.....
LTS019	.....G.....T.....G.
LTS008	.....T.....G.
LTS012	.....G.....T.....G.
LTS007	.....G.....T.....G.
LTS016	.....G.....T.....G.
SNL1	.....G.....C.G.
SNL2	.....G.....C.G.
SNL3	.....G.....C.G.
U41699	: .C...T.A...A...G.C...TG...-...CTG.
HQ112444	C.CAA.TATTC-ATG.G-CCG...TT...CTC..G
HQ112441	C.CAA.TATTC-ATG.G-CCG...TT...CTC..G
AY271922	: C.CAA.TATTC.ATG.G-CCGA..TT...CTC..G
P11169	C.CAA.TATTC.ATG.G-CCG...TT..CCTC..G
P11172	C.CAA.TATTC.ATG.G-CCG...TT..CCTC..G
P11173	C.CAA.TATTC.ATG.G-CCG...TT..CCTC..G
AY271921	C.CAA.-ATTC.ATG.G-CCG...TT...CTC..G

Hình 4. Các nucleotide sai khác trên vùng gen ITS-rDNA giữa các mẫu sâm thu ở Lai Châu và các loài/thứ có quan hệ gần gũi. U41699 *P. zingiberensis*; HQ112444, HQ112441, AY271922, AY271921: *P. stipuleanatus*



**Hình 5.** Mỗi quan hệ họ hàng của các mẫu sấm thu ở Lai Châu với các loài/thứ trong cùng chi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA bằng phương pháp Maximum Parsimony (A) và Maximum Likelihood (B). *Eleutherococcus senticosus* AB570259 là loài ngoài nhóm



## Phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA

Sau khi chỉnh sửa và loại bỏ tất cả các vị trí trống thì đa số các mẫu sâm thu được ở Lai Châu có chiều dài vùng gen ITS-rDNA là 588bp (ngoại trừ 3 mẫu thu ở Khun Há (Tam Đường) (P11169, P11172, P11173) có chiều dài vùng này là 587bp). Các mẫu thu ở Sin Hồ và Tam Đường (LTS12\_02, LTS12\_04, LTS12\_05, VDD033, VDD024, P11171) có trình tự nucleotide đồng nhất, khác với các mẫu thu ở Mường Tè (LTS007, LTS008, LTS012, LTS016, LTS019) ở 01 nucleotide và đây có thể là nucleotide đặc trưng cho vùng địa lý (autapomorphis); khác với thứ chuẩn của sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.); thứ sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) ở 05 nucleotide (Hình 4) và khác với sâm lông chim (*P. japonicus* var. *bipinnatifidus*) ở 18 nucleotide (HQ112421) và 29 nucleotide (U41679); các mẫu thu ở Mường Tè khác với thứ chuẩn sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) ở 04 nucleotide và khác với sâm lông chim (*P. japonicus* var. *bipinnatifidus*) ở 17 nucleotide (HQ112421) và 28 nucleotide (U41679).

Các mẫu thu ở Khun Há (Tam Đường) (P11169, P11172, P11173) có chiều dài vùng ITS-rDNA 587bp tương tự với loài *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) (AY271922) và hơn *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) (HQ112444, AY271921, HQ112441) 01 nucleotide (587bp vs. 586bp). Trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA của các mẫu này khác với trình tự nucleotide của *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) (HQ112444, AY271921, HQ112441) 01 nucleotide ở vị trí 470 và khác với *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) (AY271922) 02 nucleotide ở các vị trí 415 và 470 (Hình 4) và khác với sâm lông chim (*P. japonicus* var. *bipinnatifidus*) ở 29 nucleotide (HQ112421) và 40 nucleotide (U41679).

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-rDNA bằng phương pháp Maximum Parsimony và Maximum Likelihood (Hình 5) cho thấy các mẫu sâm thu ở Lai Châu phân chia thành 3 nhóm: nhóm 1 gồm các mẫu thu ở Sin Hồ và Tam Đường (LTS12\_02, LTS12\_04, LTS12\_05, VDD033, VDD024, P11171) nằm chung một nhánh (bootstrap 63% và 68%) và có mối quan hệ gần gũi với nhóm 2 gồm các mẫu thu ở Mường Tè (LTS007, LTS008, LTS012, LTS016, LTS019) với bootstrap 98% và chúng đều có mối quan hệ gần

gũi với loài sâm Việt (*P. vietnamensis*) với bootstrap 88% và 81%.

Các mẫu thu được ở Khun Há (Tam Đường) (P11169, P11172, P11173) tạo thành nhánh riêng (bootstrap 61% và 59%) và có quan hệ chị em với loài *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) (AY271922, HQ112444, AY271921, HQ112441) với bootstrap 99% và 98%.

## KẾT LUẬN

Đã giải mã được 1485 nucleotide vùng gen *matK* và 588 nucleotide vùng gen ITS-rDNA cho tổng số 17 cá thể của 2 loại Sâm ở Lai Châu bao gồm sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và *Tam thất trắng* (*P. stipuleanatus*) và các trình tự này đã được đăng ký trên GenBank.

Kết quả phân tích trình tự nucleotide vùng gen *matK* và ITS-rDNA chỉ ra các loài Sâm trong chi *Panax* có cùng nguồn gốc tiền hóa. Hai thứ sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. var. *vietnamensis*) của loài sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) có quan hệ chị em.

**Lời cảm ơn:** Công trình được đề tài "Nghiên cứu phân loại, phân bố và phân tích phân hóa học của cây sâm mọc tự nhiên ở Lai Châu" Mã số: VAST 04.07/12-13 cấp kinh phí.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa học và Công nghệ & Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007) *Sách đỏ Việt Nam - Phần II- Thực vật*. Nxb KHTN & Công nghệ, Hà Nội.
- China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM., Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that the internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS* 108: 19641-19646.
- Ha TD, Grushvitsky IV (1985) A new species of the genus *Panax* (Araliaceae) from Vietnam. *BorJ* (Leningrad): 519-522.
- Heywood VH (1993) *Flowering plants of the world Updated Edition*: 218. Oxford Univ. Press. New York.
- IUCN (2010) IUCN Red List of Threatened Species
- Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập (2006) Những đặc điểm sinh thái cơ bản của sâm Ngọc Linh. *Tap chí Dược liệu* (Hà Nội) 11: 145-147.

Mabberley DJ (2008) *The Plant-Book* 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge Univ. Press

Nghị định 32/2006/NĐ-CP ngày 31.03.2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp quý hiếm

Nguyễn Tập (2005) Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam. *Tạp chí Dược liệu* (Hà Nội) 10: 71-76.

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

Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang Sơn, Phan Kế Long (2011b) Mối quan hệ di truyền của Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv., 1985) với các loài trong chi *Panax*. Trong *Hội thảo quốc gia về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4*: 955-959. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

Phạm Hoàng Hộ (2000) *Panax*: 515-516. Trong *Cây cỏ Việt Nam II* NXB Trẻ

Phan Kế Long, Hồ Thị Loan, Nguyễn Giang Sơn, Đặng Tài Thế (2009) Mối quan hệ di truyền của một số loài Lan hải thuộc chi *Paphiopedilum* ở Việt Nam. Trong *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 3*: 194-199. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

Phan Kế Long, Lê Thanh Sơn, Phan Kế Lộc, Vũ Đình Duy, Phạm Văn Thế (2013) *Lai Châu ginseng Panax*

*vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai 1. Morphology, Ecology, Distribution and Conservation Status. In *Proc. 2<sup>nd</sup> VAST-KAST Workshop on Biodiversity and Bio-Active Compounds*. 65-73.

Phan Kế Long, Nguyễn Thị Phương Trang, Leonid V. Averyanov, Phan Kế Lộc (2011) Molecular characterisation of *Calocedrus rupestris* Averyanov LV, Nguyễn HT and Phan LK. 2008 (Cupressaceae) based on ITS1 partial sequence. *Gen Molec Res* 10 (4): 3702-3711

Swofford DL (1998) PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. Sinauer, Sunderland, MA. 128 pp.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876-4882.

Xiang QB, Lowry II PP (2007) *Panax*: 489-491. In *Wu ZY, Raven. PH & Hong, DY (eds.) Flora of China 13*. Science Press (Beijing) & MBG Press (St. Louis).

Zhu S, Fushimi H, Cai S, Komatsu K (2003) Phylogenetic relationship in the Genus *Panax*: inferred from Chloroplast *trnK* gene and nuclear 18S rRNA gene sequences. *Planta Med* 69: 647-653.

Zuo Y, Chen Z, Kondo K, Funamoto T, Wen J, Zhou S (2011) DNA barcoding of *Panax* species. *Planta Med* 77: 182-187.

## PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE *PANAX* SAMPLES COLLECTED IN LAI CHAU PROVINCE BASED ON *matK* AND ITS-rDNA SEQUENCES

Phan Kế Long<sup>1\*</sup>, Vũ Đình Duy<sup>1</sup>, Phan Kế Lộc<sup>3</sup>, Nguyễn Giang Sơn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Phương Trang<sup>2</sup>, Lê Thị Mai Linh<sup>4</sup>, Lê Thanh Sơn<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology

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

<sup>4</sup>National Institute of Medicinal Material, Ministry of Health Portal

### SUMMARY

*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* and *P. stipuleanatus* samples collected from Lai Chau province were characterized using *matK* and ITS-rDNA sequence data. The *matK* gene of *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* is 1485 bp in length and differs from *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* 02 nucleotides. The ITS-rDNA regions of *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* are 588 bp in length and differ from *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* from 04 nucleotides (Ban Giang population (Tam Duong distr.) and Nam Tam population (Sun Ho distr.) to 05 nucleotides (Ka Lang population (Muong Te distr.)). The *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* populations in Ban Giang and Nam Tam can be distinguished from Ka Lang population by 01 autapomorphisms. In the phylogenetic trees based on *matK* and ITS-rDNA using MP and ML methods showed that *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* and *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* constituted a separate branch and have closely relationships with *P. zingiberensis*. *P. stipuleanatus* collected in Lai Chau province differs from *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* 26 nucleotides in *matK* gene, 25 nucleotides in ITS-rDNA regions and differs from *P. vietnamensis* var.

\* Author for correspondence: E-mail: [pklong@vnmn.vast.vn](mailto:pklong@vnmn.vast.vn)

*vietnamensis* 28 nucleotides in *matK* gene, 22 nucleotides in ITS-rDNA regions. The *P. stipuleanatus* population in Lai Chau, Vietnam differs from other *P. stipuleanatus* populations in the world by 01 autapomorphis and have closely relationship with *P. pseudoginseng*.

**Keywords:** *matK*, ITS-rDNA, *sam Lai Chau*, *sam Ngọc Linh*, *Panax*, *P. vietnamensis* var. *vietnamensis*, *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*, *P. stipuleanatus*, *Tam thất trắng*