

**MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN
CỦA SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* Ha et Grushv., 1985)
VỚI CÁC LOÀI TRONG CHI *PANAX***

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG TRANG, NGUYỄN GIANG SƠN

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

LÊ THANH SƠN

Viện Dược liệu, Bộ Y tế

PHAN KẾ LONG

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

Một số loài thuộc chi *Panax* L. (Araliaceae) được sử dụng làm dược liệu có giá trị cao như Nhân sâm (*Panax ginseng*), Tam thất (*Panax notoginseng*). Ở Việt Nam, có một số loài thuộc chi này như Sâm vĩ diệp (*Panax bipinnatifidus*), Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*) và Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*). Đặc biệt, Sâm ngọc linh đã được xác định là một cây thuốc quý của Việt Nam. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức và phá hủy vùng phân bố tự nhiên đã dẫn đến sự tuyệt chủng ngoài thiên nhiên của Sâm ngọc linh.

Để bổ sung cứ liệu khoa học cho việc xác định vị trí phân loại và mối quan hệ di truyền của Sâm ngọc linh với các loài khác trong chi *Panax*, chúng tôi đã tiến hành phân tích về tiến hóa của đoạn trình tự ADN thuộc gen ITS-rDNA của chúng, một vùng trình tự được xác định có khả năng bộc lộ quan hệ giữa các loài gần gũi về nguồn gốc tiến hóa. Kết quả nghiên cứu này sẽ góp phần phục vụ cho các hoạt động bảo tồn và phát triển nguồn tài nguyên di truyền các cây thuốc ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

02 mẫu Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) thu tại vườn sâm Tắc-nô, xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam kí hiệu SNL1, SNL2.

Bảng 1

Danh sách các trình tự sử dụng trong nghiên cứu

Tên khoa học	Mã hiệu Genbank	Tên khoa học	Mã hiệu Genbank
<i>Panax assamicus</i>	AY233321	<i>P. pseudoginseng</i> var. <i>angustifolius</i>	AY271915
<i>P. bipinnatifidus</i>	U41679	<i>P. pseudoginseng</i> var. <i>elegantior</i>	AY271917
<i>P. ginseng</i>	AY548192	<i>P. pseudoginseng</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	AY271913
<i>P. japonicas</i>	AY271918	<i>P. quinquefolius</i>	FJ606755
<i>P. japonicus</i> var. <i>angustifolius</i>	FJ872548	<i>P. shangianus</i>	AY233328
<i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	AY233323	<i>P. sinensis</i>	AY271920
<i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>	AH010327	<i>P. stipuleanatus</i>	AY271921
<i>P. major</i>	U41683	<i>P. trifolius</i>	HQ112445
<i>P. notoginseng</i>	AY271919	<i>P. variabilis</i>	AY271923
<i>P. omeiensis</i>	U41686	<i>P. wangianus</i>	U41690
<i>P. pseudoginseng</i>	AY233327	<i>Polyscias javanica</i>	DQ007383

Tách DNA tổng số bằng Dneasy plant mini kit (Qiagen, Đức). Nhân bản vùng gen ITS-rDNA (có chiều dài khoảng 700bp) bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi thiết kế trên cơ sở trình tự ITS-rDNA của các loài trong chi *Panax* đã được đăng kí trên Genbank có trình tự mồi xuôi: PaITS-F: 5'-CAC TGA ACC TTA TCA TTT AG AG -3', mồi ngược: PaITS-R: 5'-CTT ATT GAT ATG CTT AAA CTC AG -3'. Chu trình nhiệt của PCR: 96°C 2 phút; 35 chu kì gồm: 96°C 30 giây, 56°C 25 giây, 72°C 40 giây; 72°C 5 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức) và được giải trình tự trực tiếp với mồi PaITS-F, sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 và đọc kết quả bằng máy ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ).

Các trình tự DNA được phân tích, so sánh với các trình tự tương đồng của các loài thuộc chi *Panax* và trình tự của loài *Polyscias javanica* là tham chiếu ngoài nhóm (Bảng 1) sử dụng các phần mềm ClustalW, PAUP v4.0 và MrBayes v3.1.2.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Đã xác định được trình tự vùng ITS-rDNA đích của các mẫu nghiên cứu có chiều dài khoảng gần 600bp. Do trình tự nucleotide vùng ITS-rDNA của 2 mẫu *P. vietnamensis* hoàn toàn trùng khớp nên chúng tôi sử dụng kết quả của 1 mẫu cho các phân tích tiếp theo (trình tự của *P. vietnamensis* đã được đăng kí trên Genbank với mã hiệu JF772113).

	*	20	*	40	*
<i>P. vietnamensis</i>	:	GTCGAAACCTGCATAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTACAATACCGGGT	:	50	
<i>P. bipinnatifidus</i>	:T.....	:	50	
<i>P. stipuleanatus</i>	:C.....C.....	:	50	
<i>P. notoginseng</i>	:C.....A.....	:	50	
<i>P. ginseng</i>	:	:	50	
	60	*	80	*	100
<i>P. vietnamensis</i>	:	GAGGGACGAGGGGTGCGCAAGCTCCCAAGTTGCAAACCCATGGTCGGGG	:	100	
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	:	100	
<i>P. stipuleanatus</i>	:A.....A.....	:	100	
<i>P. notoginseng</i>	:T.....T.G.....	:	100	
<i>P. ginseng</i>	:	:	100	
	*	120	*	140	*
<i>P. vietnamensis</i>	:	ACCGCCCTTGGGTGGCTCTCGTCCGAACAACGACCCCCCGGCGCGGAATG	:	150	
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	...A.....	:	150	
<i>P. stipuleanatus</i>	:	..-A.....TTC.....	:	149	
<i>P. notoginseng</i>	:C.....	:	150	
<i>P. ginseng</i>	:	...A.....A.....C.....	:	150	
	160	*	180	*	200
<i>P. vietnamensis</i>	:	CGCCAAGGAAATCAAATTGAACTGCGCGTCCCCCGTTTGGCGGGCGG	:	200	
<i>P. bipinnatifidus</i>	:C.....A.....C.....G.....	:	200	
<i>P. stipuleanatus</i>	:C.....A.....T.....	:	199	
<i>P. notoginseng</i>	:A.....	:	200	
<i>P. ginseng</i>	:C.....A.....	:	200	
	*	220	*	240	*
<i>P. vietnamensis</i>	:	CGGAAGCGTCTTCTAGAACAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGG	:	250	
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	G.....TA.....G.....	:	250	
<i>P. stipuleanatus</i>	:	...G.....A.....	:	249	
<i>P. notoginseng</i>	:A.....	:	250	
<i>P. ginseng</i>	:A.....A.....	:	250	

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT LẦN THỨ 4

	260	*	280	*	300	
<i>P. vietnamensis</i>	:	CTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTG	:	300		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	:	300		
<i>P. stipuleanatus</i>	:	:	299		
<i>P. notoginseng</i>	:	:	300		
<i>P. ginseng</i>	:	:	300		
	*	320	*	340	*	
<i>P. vietnamensis</i>	:	CAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCC	:	350		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	G.....A.....--...A...-.....	:	345		
<i>P. stipuleanatus</i>	:	:	349		
<i>P. notoginseng</i>	:T.....	:	350		
<i>P. ginseng</i>	:	:	350		
	360	*	380	*	400	
<i>P. vietnamensis</i>	:	ATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACACATCGCGTCGCCCCC	:	400		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:-G...-.....T.....T..G.....C.....	:	393		
<i>P. stipuleanatus</i>	:G.....-	:	398		
<i>P. notoginseng</i>	:G.....	:	400		
<i>P. ginseng</i>	:G.....	:	400		
	*	420	*	440	*	
<i>P. vietnamensis</i>	:	AACTCATCACTCCCTCACGGGAGTCGAGGCGGAGGGGCGGATAATGGCCT	:	450		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	...C.....G.....-...	:	442		
<i>P. stipuleanatus</i>	:	...C.CG.....T.....T.....	:	448		
<i>P. notoginseng</i>	:	...C.....T.....G.....T.....	:	450		
<i>P. ginseng</i>	:	...C.....TG.....T.....	:	450		
	460	*	480	*	500	
<i>P. vietnamensis</i>	:	CCCGTGTCTCACCGCGCGGTTGGCCCAAATGCGAGTCCTTGGCGATGGAC	:	500		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:	:	492		
<i>P. stipuleanatus</i>	:C...	:	498		
<i>P. notoginseng</i>	:	:	500		
<i>P. ginseng</i>	:	:	500		
	*	520	*	540	*	
<i>P. vietnamensis</i>	:	GTCACGACAAGTGGTGGTTGTA AAAAGCCCTCTTCTCATGTCGTGCGGGG	:	550		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:T.	:	542		
<i>P. stipuleanatus</i>	:T.....T.	:	548		
<i>P. notoginseng</i>	:T.....T.	:	550		
<i>P. ginseng</i>	:T.	:	550		
	560	*	580	*		
<i>P. vietnamensis</i>	:	ACCCGTGCGCCAGCAAAGCTCTCATGACCCTGTTGCGCCA	:	590		
<i>P. bipinnatifidus</i>	:A.....G	:	582		
<i>P. stipuleanatus</i>	:A.G.....G	:	588		
<i>P. notoginseng</i>	:TG	:	590		
<i>P. ginseng</i>	:G	:	590		

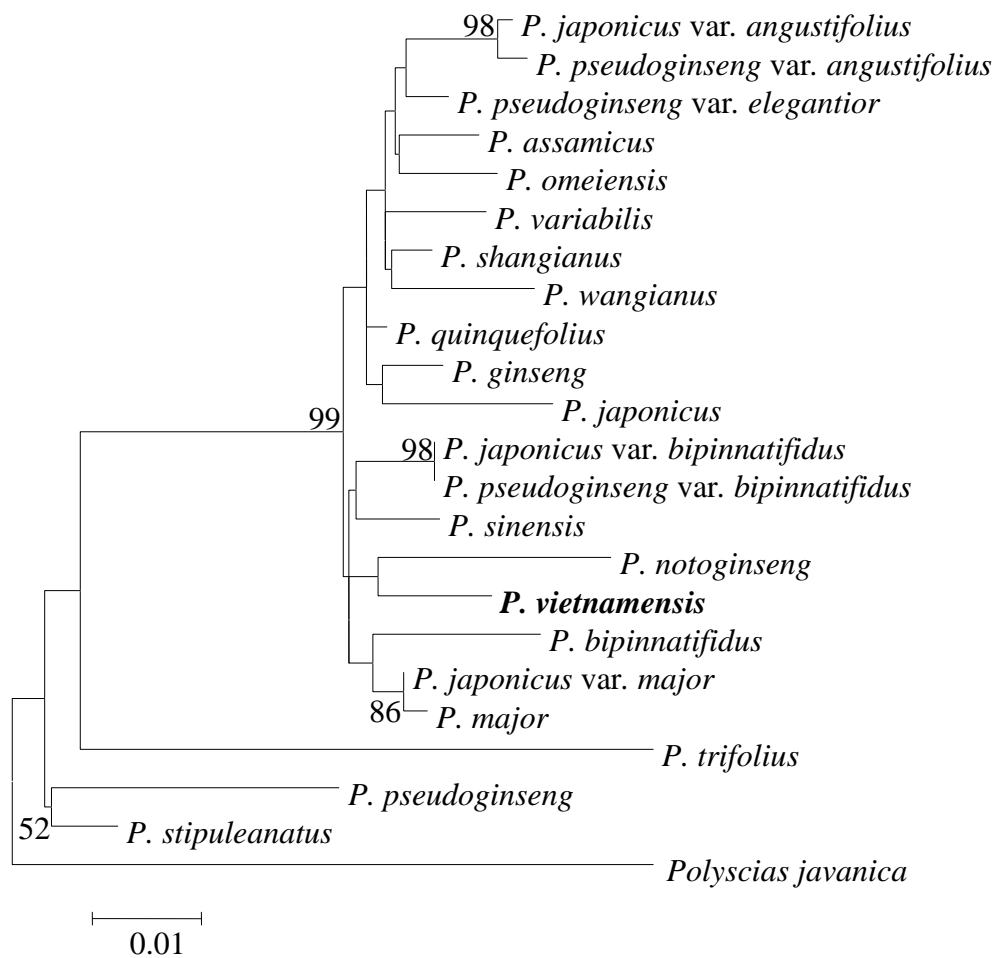
Hình 1: So sánh trình tự vùng ITS-rDNA của *P. vietnamensis* với các loài có quan hệ gần gũi thuộc chi *Panax*

Kết quả đối chiếu trình tự nucleotide vùng gen nghiên cứu (xem Hình 1, Bảng 2) cho thấy biến dị giữa *P. vietnamensis* và các loài được so sánh khá cao, chỉ số đa dạng nucleotide $\pi = 0.0436$. Trong số các loài thuộc chi *Panax* có trình tự tương đồng nhất trên Genbank, *P. vietnamensis* có ít nhất 14 nucleotide sai khác so với *P. ginseng* và nhiều nhất là 25 nucleotide (*P. stipuleanatus*) và đặc trưng bởi 6 nucleotide (autapomorphies).

Bảng 2

Khoảng cách di truyền (phía trên bên phải) và số lượng nucleotide sai khác (phía dưới bên trái) giữa trình tự ITS-rDNA của *P. vietnamensis* với các loài có quan hệ gần gũi thuộc chi *Panax*

TT	Loài	1	2	3	4	5
1	<i>P. vietnamensis</i>	-	0.042	0.049	0.026	0.034
2	<i>P. bipinnatifidus</i>	22	-	0.062	0.034	0.051
3	<i>P. stipuleanatus</i>	25	31	-	0.042	0.053
4	<i>P. ginseng</i>	14	18	22	-	0.034
5	<i>P. notoginseng</i>	18	26	27	18	-



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood, số ở các góc các nhánh là giá trị bootstrap

Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood được thể hiện trên Hình 2, sử dụng mô hình Kimura 2 tham số với phân phối Gamma là thích hợp nhất (BIC = 3980.908; AICc = 3645.719; -lnL = 1777.697; γ -Shape = 0.36; R = 2.08), phân tích bootstrap với 1000 lần lấy lại mẫu.

Cây phát sinh cho thấy loài *P. vietnamensis* có tổ tiên chung và quan hệ khá gần gũi với một số loài trong chi *Panax* như *P. notoginseng*, *P. sinensis*, *P. bipinnatifidus*. Gốc phát sinh chung hình thành nên nhóm các đơn vị phân loại này được ủng hộ mạnh mẽ với giá trị bootstrap lên tới 99%. Trong khi đó những phân nhánh xa hơn tới từng đơn vị phân loại là chưa chắc chắn với giá trị bootstrap thấp. Cây phát sinh cũng chỉ ra một số loài khác trong chi *Panax* có sự khác biệt di truyền lớn với *P. vietnamensis* và phân rẽ từ rất sớm như *P. trifolius*, *P. stipuleanatus*.

III. KẾT LUẬN

Đã tiến hành giải trình tự ADN thuộc vùng ITS-rDNA của loài Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) với chiều dài gần 600 bp. So sánh, đối chiếu vùng trình tự này với trình tự tương đồng của các loài trong chi *Panax* cho thấy vùng trình tự nghiên cứu mang nhiều thông tin về quá trình tiến hóa của chi *Panax*.

Đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại của giữa các loài trong chi *Panax*, thể hiện *P. vietnamensis* được hình thành từ tổ tiên chung gần gũi với phần lớn các loài trong chi *Panax* và đã tách ra từ khá sớm với một vài loài trong chi này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ha, T.D., Grushvitzky, I.V.**, 1985: *Tạp chí Thực vật*, 70: 518-522.
2. **Lê Thanh Sơn, Nguyễn Tập**, 2006: *Tạp chí Dược liệu*, 11(4): 145-147.
3. **Nguyễn Tập**, 2005: *Tạp chí Dược liệu*, 10(3): 71-76.
4. **Nguyễn Thị Thu Hương**, 2003. Hội thảo Bảo tồn và Phát triển cây sâm Việt Nam, Tam Kỳ: 76-90.
5. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P.** MrBayes 3, 2003: *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
6. **Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** Clustal W., 1994: *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
7. **Wen, L. and Zimmer, E.A.**, 1996: *Mol. Phylogen. Evol.*, 6: 166 – 177.
8. **Zhu, S., H. Fushimi, Cai, S.Q., Chen, H.B. and Komatsu, K.**, 2003: *J. Jpn. Bot.*, 78: 86-94.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thiện với sự trợ giúp một phần kinh phí từ đề tài 106.06.16.09, Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ (Nafosted).

GENETIC RELATIONSHIPS OF NGOC LINH GINSENG (*PANAX VIETNAMENSIS* Ha et Grushv., 1985) TO OTHER SPECIES OF THE GENUS *PANAX* (ARALIACEAE)

NGUYEN THI PHUONG TRANG, NGUYEN GIANG SON,
LE THANH SON, PHAN KE LONG

SUMMARY

Ngoc linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., 1985) is a precious medicinal plant of Vietnam and is attracting much interest. This study explores genetics relationships of *P. vietnamensis* and others species belonging genus *Panax* by comparing ITS-rDNA sequences. ITS-rDNA sequence of Ngoc linh ginseng was deposited in Genbank with accession number JF772113. Results showed *P. vietnamensis* has closely relationship with major species group but it has been separated from others for a long time, hence a number of substitution nucleotides was recorded.