

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

----o0o----

**NGUYỄN THỊ HỒNG MAI**

**ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN QUẦN THỂ SÂM NGỌC LINH**

**(*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ**

**Hà Nội - 2018**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

----o0o----

**NGUYỄN THỊ HỒNG MAI**

**ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN QUẦN THỂ SÂM NGỌC LINH**

*(Panax vietnamensis Ha & Grushv.)*

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

TS. Nguyễn Thị Phương Trang

**Hà Nội - 2018**

## LỜI CẢM ƠN

Luận văn được hoàn thành tại phòng Hệ thống học phân tử và Di truyền bảo tồn, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, dưới sự hướng dẫn khoa học và giúp đỡ tận tình của TS. Nguyễn Thị Phương Trang. Tác giả xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới sự hướng dẫn của cô.

Trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn này, tác giả đã nhận được sự quan tâm và giúp đỡ nhiệt tình về nhiều mặt của Ban lãnh đạo Viện ST & TNSV, cán bộ phụ trách đào tạo của Viện, của TS. Đặng Tất Thế, trưởng phòng Hệ thống học phân tử và Di truyền bảo tồn.

Chân thành cảm ơn các anh chị, bạn bè đồng nghiệp, ThS. Nguyễn Giang Sơn, TS. Hồ Thị Loan, TS. Phạm Thế Cường, ThS. Lê Thị Mai Linh đã luôn nhiệt tình giúp đỡ, quan tâm, chỉ bảo những bước đi ban đầu trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học.

Cuối cùng, tác giả cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới những người thân trong gia đình đã luôn bên cạnh động viên và giúp đỡ trong suốt quá trình hoàn thành luận văn.

Luận văn được hoàn thành từ nguồn kinh phí hỗ trợ từ đề tài hợp tác song phương của Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam do TS. Nguyễn Thị Phương Trang làm chủ nhiệm, mã số VAST.HTQT.Nga.10/15-16.

Tác giả xin chân thành cảm ơn!

*Hà Nội, ngày tháng năm 2018*

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài này là do chính tôi thực hiện, các số liệu thu thập và kết quả phân tích trong đề tài là trung thực, đề tài không trùng với bất kỳ đề tài nghiên cứu khoa học nào. Những thông tin tham khảo trong khóa luận đều được trích dẫn cụ thể nguồn sử dụng.

*Ngày      tháng      năm 2018*

Học viên thực hiện

*( Ký và ghi rõ họ tên)*

Nguyễn Thị Hồng Mai

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
LỜI CAM ĐOAN.....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT, KÝ HIỆU .....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
<b><i>1.1. Giới thiệu về chi Sâm (Panax L.) .....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>1.2. Tổng quan về sâm ngọc linh.....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>1.2.1. Đặc điểm hình thái .....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>1.2.2. Phân bố tự nhiên của cây sâm ngọc linh .....</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b><i>1.2.3. Tầm quan trọng, giá trị, thành phần hoá học của sâm ngọc linh.....</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b><i>1.2.4. Công trình nghiên cứu của loài sâm ngọc linh .....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>1.2.5. Hiện trạng của loài sâm ngọc linh ở Việt Nam.....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>1.3. Phương pháp luận và cách tiếp cận.....</i></b>	<b><i>10</i></b>
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, ĐỊA ĐIỂM, THỜI GIAN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>16</b>
<b><i>2.1. Đối tượng nghiên cứu .....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>2.3. Phương pháp nghiên cứu .....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>2.3.1. Tách chiết DNA tổng số .....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>2.3.2. Lựa chọn môi SSR.....</i></b>	<b><i>17</i></b>
<b><i>2.3.3. Phân tích số liệu SSR.....</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>2.3.4. Thiết kế môi đọc trình tự .....</i></b>	<b><i>19</i></b>
<b><i>2.3.5. PCR khuếch đại gen .....</i></b>	<b><i>20</i></b>
<b><i>2.3.6. Điện di trên gel agarose.....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b><i>2.3.7. Kiểm tra khả năng bắt cặp bằng BLAST .....</i></b>	<b><i>21</i></b>

2.3.8. <i>Độc trình tự gen</i> .....	21
2.3.9. <i>Xây dựng cây phát sinh chủng loại</i> .....	21
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	23
3.1. <i>Kết quả tách chiết DNA tổng số</i> .....	23
3.2. <i>Lựa chọn môi SSR</i> .....	23
3.3. <i>Kết quả phân tích SSR – đặc điểm di truyền quần thể sâm ngọc linh</i> ....	25
3.4. <i>Kết quả khuếch đại gen từ các cặp môi đặc hiệu</i> .....	30
3.5. <i>Kết quả phân tích trình tự gen – đặc điểm phân tử của các vùng gen rbcL, rpoB, ITS và 18S của loài sâm ngọc linh.</i> .....	32
3.6. <i>Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền của sâm ngọc linh với một số loài trong chi Panax trên cơ sở phân tích trình tự hai vùng gen rbcL, ITS - sơ đồ mối quan hệ di truyền của chúng</i> .....	47
3.7. <i>Kết quả so sánh khả năng phân loại sâm ngọc linh đối với các loài chi Panax khác của ba vùng gen nghiên cứu.</i> .....	50
3.8. <i>Kết quả đăng ký mã số các vùng gen nghiên cứu trên ngân hàng gen</i> ..	55
<b>KẾT LUẬN</b> .....	56
<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	57
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN CỦA TÁC GIẢ.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	59
PHỤ LỤC .....	65

## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT, KÝ HIỆU

AFLP	Đa hình độ dài các đoạn DNA nhân chọn lọc (Amplified Fragment Length Polymorphism)
bp	base pair
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBOL	Consortium for the Barcode of Life
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
ME	Phương pháp Minimum Evolution Method
MP	Phương pháp Maximum Parsimony Method
NJ	Phương pháp Neighbor Joining
PCR	Phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	Đa hình các đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Đa hình độ dài các đoạn DNA giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SSR	Trình tự lặp đơn giản (Simple Sequence Repeats)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Analysis
VQG	Vườn Quốc Gia

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Trình tự 11 cặp mồi SSR dùng cho phân tích đa dạng di truyền .....	17
Bảng 2.2. Bảng trình tự 5 cặp mồi dùng trong khuếch đại và đọc trình tự gen.	20
Bảng 2.3: Danh sách các loài/thứ trên Genbank sử dụng trong nghiên cứu. ....	22
Bảng 3.1: Thông số đa dạng di truyền loài sâm ngọc linh dựa trên phân tích 4 chỉ thị SSR.....	26
Bảng 3.2. Kết quả so sánh các Nu sai khác trên vùng gen <i>rbcL</i> (gồm <i>rbcLa</i> và <i>rbcLc</i> ) giữa sâm ngọc linh và các loài khác thuộc chi <i>Panax</i> . ....	37
Bảng 3.3. Khoảng cách di truyền gen <i>rbcL</i> giữa loài sâm ngọc linh (phía trên bên trái) và số lượng nucleotide sai khác (phía dưới bên phải) so sánh với 9 loài /thứ có quan hệ gần gũi thuộc chi <i>Panax</i> .....	44
Bảng 3.4. Khoảng cách di truyền gen <i>rpoB</i> giữa loài sâm ngọc linh ( phía trên bên trái) và số lượng nucleotide sai khác (phía dưới bên phải) so sánh với 9 loài /thứ có quan hệ gần gũi thuộc chi <i>Panax</i> .....	44
Bảng 3.5. Khoảng cách di truyền vùng gen ITS giữa loài sâm ngọc linh .....	45
(phía trên bên trái) và số lượng nucleotide sai khác (phía dưới bên phải) so sánh với 9 loài /thứ có quan hệ gần gũi thuộc chi <i>Panax</i> .....	45
Bảng 3.6. Khoảng cách di truyền mồi 18S giữa loài sâm ngọc linh (phía trên bên trái) và số lượng nucleotide sai khác (phía dưới bên phải) so sánh với 9 loài /thứ có quan hệ gần gũi thuộc chi <i>Panax</i> .....	46

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Hình ảnh cây sâm ngọc linh	4
Hình 1.2: Hình ảnh hạt sâm ngọc linh khi chín	4
Hình 2.1. Bản đồ địa điểm thu mẫu sâm ngọc linh	15
Hình 3.1: Kiểm tra DNA tổng số bằng điện di trên gel agarose 1%	22
Hình 3.2. Một số hình ảnh alen ghi nhận khi phân tích SSR của 4 mỗi PG - 29, PG - 668, PG -1419 và PG - 1481	23
Hình 3.3: Kiểm tra sản phẩm PCR gen ITS; <i>rpoB</i> ; 18S bằng điện di trên gel agarose 1%	30
Hình 3.4: Kiểm tra sản phẩm PCR gen <i>rbcLa</i> ; <i>rbcLc</i> bằng điện di trên gel agarose 1%.	30
Hình 3.5. Ví dụ về hình ảnh các peak trong giải trình tự	31
Hình 3.6. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen <i>rbcLa</i> với các loài <i>Panax</i> trên ngân hàng gen.	35
Hình 3.7. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen <i>rbcLc</i> với các loài <i>Panax</i> trên ngân hàng gen.	36
Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen <i>rpoB</i> với các loài <i>Panax</i> trên ngân hàng gen	39
Hình 3.9. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen ITS với các loài <i>Panax</i> trên ngân hàng gen	41
Hình 3.10: Sơ đồ hình cây (NJ) mối quan hệ di truyền của sâm ngọc linh với 9 loài khác trong chi <i>Panax</i> dựa trên phân tích trình tự vùng gen ITS và <i>rbcL</i>	48
Hình 3.11. Thứ tự ghép nối các đoạn gen nghiên cứu	50
Hình 3.12. Kết quả so sánh phân loại chín loài chi <i>Panax</i> dựa trên so sánh từng vùng gen ( <i>rpoB</i> , <i>rbcL</i> , ITS) và sự kết hợp của chúng.	53
Hình 3.13. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của chín loài thuộc chi <i>Panax</i> phân tích dựa trên sự kết hợp trình tự gen <i>rbcL</i> và ITS.	54

## MỞ ĐẦU

Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv.) đã được xác định là một cây thuốc quý về giá trị sử dụng cũng như giá trị nguồn gen, được xếp vào một trong bốn cây sâm quý nhất trên thế giới do có chứa nhiều thành phần saponin, hàm lượng acid amin, các chất khoáng vi lượng hơn hẳn những loài sâm khác. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức và phá hủy vùng phân bố tự nhiên đã dẫn đến sự tuyệt chủng ngoài tự nhiên của sâm ngọc linh. Hiện loài này chỉ còn tồn tại ở một số vườn trồng tại các khu bảo tồn của tỉnh Quảng Nam và Kon Tum. Sâm ngọc linh đã được đưa vào sách đỏ Việt Nam, danh lục của IUCN và Nghị định 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ. Ngành Y tế đã hướng chọn sâm ngọc linh làm cây thuốc xây dựng sản phẩm quốc gia về dược liệu. Ngày 18/7/2012, chính phủ đã có Quyết định số 936/QĐ-TT phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển kinh tế - xã hội vùng Tây Nguyên đến năm 2020, trong đó phát triển cây sâm ngọc linh trở thành cây đặc sản quốc gia. Những nghiên cứu về di truyền quần thể giúp các nhà khoa học và các nhà chiến lược có cái nhìn tổng thể về thực trạng di truyền của các quần thể sâm ngọc linh, từ đó có những chiến lược hợp lý trong việc bảo tồn và phát triển bền vững loài sâm quý hiếm này của Việt Nam. Các nghiên cứu ở cấp độ phân tử còn giúp xác định được những sai khác về mặt di truyền của loài sâm ngọc linh so với các loài *Panax* khác, làm cơ sở cho việc phân loại và giám định các mẫu sâm ngọc linh.

Xuất phát từ tình hình thực tế này, luận văn tập trung nghiên cứu đặc điểm di truyền của hai quần thể sâm ngọc linh thu tại Quảng Nam và Kon Tum, đồng thời kiểm tra sự sai khác di truyền của bốn vùng gen gồm hai vùng gen nhân: 18S, ITS và hai vùng gen lục lạp: *rbcL* và *rpoB* của mẫu sâm ngọc linh, so sánh với một số loài *Panax* khác.

### **Mục tiêu cụ thể:**

- Xác định đặc điểm di truyền quần thể của hai quần thể sâm ngọc linh thu tại tỉnh Quảng Nam và Kon Tum.
- Đánh giá mối quan hệ di truyền của sâm ngọc linh với một số loài *Panax*