

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----o0o-----

ĐỖ MINH THÀNH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA LOẠI
SÂM MỐI *PANAXSP.* THU Ở PHONG THỔ LAI CHÂU**

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Chuyên ngành: Hóa Sinh

Mã số: 60.42.30

LUẬN VĂN THẠC SỸ

Giáo viên hướng dẫn: TS. Phan Kế Long

Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam

MỞ ĐẦU

Nhân sâm được dùng trong y học phương Đông hàng ngàn năm nay. Người Trung Quốc đã sử dụng nhân sâm từ hàng ngàn năm trước như một thứ dược liệu vô cùng trân quý chỉ có các vua chúa và các quan lớn mới có loại thảo dược này. Tác dụng của nhân sâm được đề cập trong các trước tác của Shi You (khoảng những năm 48-33 TCN) hay Shanghan Lun (khoảng những năm 200 SCN).

Chi Nhân sâm (*Panax L.*) là một chi nhỏ trong họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*) gồm 15 loài [14], tất cả đều có giá trị làm thuốc, một số loài thuộc chi *Panax L. (Araliaceae)* được sử dụng làm giá trị cao như Nhân sâm (*Panax ginseng*), Tam thất (*Panax notoginseng*). Ở Việt Nam, có một số loài thuộc chi này như Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus*), Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*) và Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) [11]. Các loài *Panax bipinnatifidus* thường phân bố chủ yếu ở Trung Quốc, Ấn Độ và Nepal. Các loài này đang trong tình trạng nguy cấp, vốn hiếm gặp trong tự nhiên lại bị săn tìm ráo riết để thu hái nên đang bị đe dọa tuyệt chủng. Ở Việt Nam sâm Ngọc Linh đã được xác định là một cây thuốc quý do có chứa nhiều thành phần saponin, hàm lượng acid amin, các chất khoáng vi lượng trong củ, lá và rễ hơn hẳn những loại sâm khác [16]. Do vùng phân bố hạn chế và việc khai thác quá mức đã khiến sâm Ngọc Linh rơi vào nhóm đe dọa và loài này đã bị coi như tuyệt chủng ngoài tự nhiên và hiện chỉ còn tồn tại ở một số vườn trồng tại các khu bảo tồn tại một số vườn trồng tại các khu bảo tồn của tỉnh Quảng Nam và Kon Tum, vì vậy việc nghiên cứu bảo tồn loài sâm này hết sức cấp bách. Cho đến nay sâm Ngọc Linh vẫn được coi là loài đặc hữu hẹp, chỉ phân bố trên núi Ngọc Linh thuộc địa phận hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum với độ cao trên

1500m so với mặt biển [11], tuy nhiên Zhu và cộng sự [58] đã ghi nhận *Panax vietnamensis* có phân bố ở Vân Nam, Trung Quốc nên chúng tôi đặt khả năng loài này có thể phân bố ở các tỉnh vùng núi phía bắc của Việt Nam. Năm 2012, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã phê duyệt đề tài thuộc 7 hướng KHCN ưu tiên cấp Viện KHCNVN “Nghiên cứu phân loại, phân bố và thành phần hóa học của cây Sâm mọc ở Lai Châu” mã số VAST 04.07/12-13 do Tiến sĩ Phan Kế Long làm chủ nhiệm với mục đích xác định tên khoa học và phân bố của loài sâm mọc tự nhiên ở Lai Châu và thành phần hóa học chủ yếu của nó. Vì vậy chúng tôi sử dụng phương pháp phân tích di truyền để định loại các mẫu sâm này dựa trên cơ sở so sánh trình tự ITS – rDNA, là vùng gen mang nhiều biến dị có khả năng bộc lộ quan hệ giữa những loài có nguồn gốc tiến hóa gần gũi [56].

Trên cơ sở dự án trên, chúng tôi đã tiến hành Luận văn này được thực hiện trên cơ sở phân tích một số mẫu vật thu được trong đợt điều tra khảo sát ở huyện Phong Thổ tỉnh Lai Châu của dự án trên với với tiêu đề: **“Nghiên cứu đặc điểm di truyền của loại sâm mới *Panax* sp. ở huyện Phong Thổ tỉnh Lai Châu”**

Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm sâm *Panax* sp. (*Araliaceae*) ở huyện Phong Thổ tỉnh Lai Châu dựa trên cơ sở so sánh trình tự ITS – rDNA, là vùng gen mang nhiều biến dị có khả năng bộc lộ quan hệ giữa những loài có nguồn gốc tiến hóa gần gũi.

Nội dung nghiên cứu

- Thu thập mẫu Sâm mới *Panax* sp. từ huyện Phong Thổ tỉnh Lai Châu
- Tách DNA tổng số của các mẫu, nhân bản vùng gen ITS – rDNA.
- Giải trình tự gen ITS – rDNA.

- Phân tích số liệu: so sánh, phân tích các trình tự DNA của các mẫu thu được và so sánh với *Panax vietnamsis* ở Quảng Nam, và các loài trong chi *Panax*

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Các nghiên cứu về chi sâm *Panax* và Sâm Ngọc Linh

1.1.1. Giới thiệu về chi sâm *Panax*

Chi Nhân sâm (*Panax* L.) là một chi nhỏ trong họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*). Toàn bộ chi Sâm (*Panax* L.) trên thế giới hiện đã biết chắc chắn có 11 loài và 1 dưới loài (thứ -var.). Sự phân bố của chi *Panax* L. trên thế giới cho thấy chúng chỉ xuất hiện ở Bắc bán cầu, kéo dài từ vùng rừng núi giáp bờ biển phía Đông của Bắc Mỹ bao gồm Bắc Hoa Kỳ và Tây-Nam Canada (có 2 loài *P. quinquefolius* và *P. trifoliatum*) [12, 42, 43]. Vùng Đông Bắc Á (gồm Viễn Đông Nga, Đông Bắc Trung Quốc, bán đảo Triều Tiên và Nhật Bản) có 2 loài là *P. ginseng* và *P. japonica*. Trung tâm phân bố của chi *Panax* L. có thể từ vùng Tây- Nam của Trung Quốc lan toả xuống phía Bắc của Việt Nam. Thực chất khu vực này gồm 2 tỉnh biên giới kề nhau là Vân Nam (Trung Quốc) và Lào Cai (Việt Nam), ở đây đang có tới 7 loài và dưới loài (thứ) mọc hoàn toàn tự nhiên, 2 loài trồng là *P. notoginseng* (nhập từ Bắc Mỹ) và *P. pseudoginseng* (không tìm thấy trong hoang dại, nhưng giả thiết có nguồn gốc từ vùng cận Himalaya hoặc là kết quả của lai tự nhiên giữa 2 loài gần gũi nào đó). Đây có thể coi là trung tâm phân bố của chi Sâm (*Panax* L.) của thế giới. Ở Bắc Mỹ hiện có 3 loài (*P. notoginseng*; *P. quinquefolius* và *P. trifoliatum*). Giới hạn cuối cùng về phía Nam của chi *Panax* L. là loài Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*) ở Miền Trung của Việt Nam, tại 14°15' vĩ độ Bắc.



Hình 1.1: Nhân sâm Việt Nam – *Panax vietnamensis*

1.1.2. Hiện trạng của loài Sâm Việt Nam hiện nay

Ở Việt nam cho đến thời điểm hiện nay, chi *Panax* có chắc chắn 5 loài, trong đó có 2 loài nhập trồng là Tam thất (*P. notoginseng*) và Nhân sâm (*P. ginseng*) [12]. Ba loài mọc tự nhiên và đang là đối tượng bảo tồn là Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem.), Tam thất hoang (*P. stipuleanatus* Tsai et Feng) và đặc biệt là Sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài đặc hữu hẹp của miền trung Việt Nam, có phân bố tự nhiên ở các huyện Tu Mơ Rông, huyện Đăk Glei (tỉnh Kon Tum), Huyện

Nam Trà My, huyện Phước Sơn (tỉnh Quảng Nam), trên vùng núi Ngọc Linh, độ cao trên 1500m. Tuy nhiên hiện tại loài này đã trở nên cực hiếm ngoài tự nhiên, do tình trạng khai thác kiệt quệ trong nhiều năm cộng với việc đốt nương làm rẫy nên diện tích rừng tự nhiên cũng bị thu hẹp. Hiện tại, sâm Ngọc Linh đã được đưa vào danh lục đỏ của IUCN (2003) và danh sách các loài hạn chế khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại (nghị định 32/2006/NĐ-CP ngày 31.03.2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp quý hiếm). Hiện nay sâm Ngọc Linh chỉ còn tập trung tại 2 điểm bảo tồn là Chốt Sâm (xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum) và Trạm Dược Liệu Trà Linh (xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam) với tổng diện tích trồng khoảng 10 hecta.

1.1.3. Tầm quan trọng và giá trị của cây Sâm

1.1.3.1. Tầm quan trọng và giá trị của cây Sâm trên Thế giới

Về mặt kinh tế, doanh thu hàng năm từ sâm vào khoảng 98 triệu USD và tăng trưởng ở mức 26%/năm [57]. Tập đoàn Sâm Hàn Quốc (KGC) đã có kinh nghiệm sản xuất hồng sâm hơn 100 năm, tính riêng năm 2004 doanh thu từ các sản phẩm nhân sâm đã mang về cho tập đoàn khoảng 305 tỷ Won (\$290 triệu USD), trong đó 70% là mỹ phẩm. Cùng năm đó, xuất khẩu sản phẩm từ nhân sâm đạt 55 triệu USD, thị trường chủ yếu là Hồng Kông và Trung Quốc đại lục (27 triệu USD) [35]. Virginia và Tây Virginia là nơi xuất khẩu sâm lớn nhất của Mỹ, chiếm khoảng 18% trong tổng số 27200 kg sản lượng sâm hàng năm của toàn quốc. Trong 3 năm (2004-2006) ngành nông nghiệp Mỹ chứng nhận việc xuất khẩu hàng năm tương ứng đạt 1800 kg, 2270 kg và 1633 kg đem lại gần 1 triệu USD [35].

1.1.3.2. Tầm quan trọng và giá trị của cây Sâm ở Việt Nam

Tất cả những loài thuộc chi *Panax* đều có giá trị làm thuốc, một số loài của chi này đã trở thành những cây thuốc nổi tiếng, không chỉ trong phạm vi của nền y học cổ truyền phương Đông mà trên toàn thế giới như Nhân sâm (*Panax ginseng*); Giả nhân sâm (*P. pseudoginseng*); Tây dương sâm (*P. quiquefolius*); Tam thất (*P. notoginseng*) [5,17] và sâm Ngọc Linh

(*P. vietnamensis* Ha et Grushv.). Ở Việt Nam, ngay từ những năm kháng chiến chống Pháp (1952 - 1953) nhiều cán bộ cách mạng hoạt động nằm vùng ở Quảng Nam đã được đồng bào chỉ cho cây thuốc như một thứ thần dược để phòng thân những khi đau yếu, dùng để chữa cho người đau ốm nặng, người bị rắn cắn và các bệnh thông thường như đau bụng, cầm máu vết thương.

Theo quan điểm hoá phân loại và dược lý học, những công trình nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới đã chia 12 loài thuộc chi *Panax* thành 2 nhóm chính:

- Nhóm 1 gồm các loài có giá trị, hiện đã được phát triển trồng trọt gồm: Nhân sâm (*Panax ginseng*), sâm Mỹ (*P. quinquefolius*) và Tam thất (*P. notoginseng*), có bộ phận dưới mặt đất là một rễ củ dạng cà rốt phát triển và chứa các saponin có khung thuộc nhóm dammaran.
- Nhóm 2 gồm các loài mọc hoang như *P. japonicus*, *P. zingiberensis*, *P. stipuleanatus* với bộ phận thân rễ dưới đất rất phát triển theo hướng nằm ngang, chứa saponin có khung cấu tạo thuộc nhóm olean.

Tuy nhiên, hàm lượng saponin của sâm Ngọc Linh so với các loài *Panax* trồng trọt thuộc nhóm 1 lại cao hơn rất nhiều.

Từ năm 1985 đến năm 2000, thông qua sự hợp tác quốc tế hiệu quả, đặc biệt với các nhà khoa học Ba Lan, Nhật Bản đã cho thấy sâm Ngọc Linh có 52 hợp chất saponin, trong đó có 24 saponin đã được xác định là có cấu trúc hoàn toàn mới, lần đầu tiên được công bố. Khi so sánh với nhóm sâm trồng có giá trị trên thế giới như Nhân sâm (*Panax ginseng*), Sâm Mỹ (*P. quinquefolius*) và Tam thất (*P. notoginseng*) thì thành phần saponin của sâm Ngọc Linh rất giống với 3 loài nói trên, nhưng hàm lượng lại cao hơn nhiều. Điều này càng khẳng định Sâm ngọc linh là một loài độc đáo về thành phần hoá học [7].

1.2. Sâm Ngọc Linh

1.2.1. Đặc điểm phân loại

Sâm Ngọc Linh là một loại cây thân thảo, sống nhiều năm, cao đến 1m. Thân rễ mập có đường kính 3,5cm, không có rễ phụ dày dự trữ, đôi khi ở một số cây phần cuối thân rễ có củ gần hình cầu, đường kính đến 5cm.

Đốt trên cùng của thân rễ tồn tại 1-4 thân. Thân nhẵn cao 40-80 cm, rỗng, có 3 mặt hơi tròn có những rãnh nhỏ theo chiều dọc. Lá mọc vòng, thường có 4 (ít khi 3, 5, 6). Lá kép chân vịt có 5 (ít khi 6, 7) lá chét, lá dài 7- 12cm (ít khi 15 cm). Lá chét trên cùng hình trứng ngược hoặc hình mũi mác, dài 8- 14 cm, rộng 3- 5 cm, đầu lá thường nhọn đột ngột, mũi nhọn kéo 1,5- 2 cm, góc lá hình nêm, mép lá có răng cưa nhỏ đều, gân bên 19 (ít khi 8- 11) cặp dọc theo gân chính và gân bên ở mặt trên của lá chét có nhiều lông cứng dạng gai dài đến 3 mm, mặt dưới ít hơn. Cụm hoa dài 25 cm, gấp 1,5- 2 lần chiều dài của cuống lá, thường mang tán đơn độc ở tận cùng, đôi khi có thêm 1- 4 tán phụ hoặc một hoa đơn độc. Tán hoa chính đường kính 2,5- 4 cm, có 50- 120 hoa. Hoa màu vàng lục nhạt, đường kính hoa nở 3- 4 mm. Bầu 1 ô, 1 vòi (chiếm 80%) đôi khi có 2 ô, 2 vòi (chiếm 20%). Quả khi chín màu đỏ, thường có một chấm đen ở trên đỉnh quả. Quả 1 hạt hình thân, quả 2 hạt hình cầu hơi dẹt dài 7- 10 mm rộng 4- 6 mm (Hình 1.2) [1].



Hình 1.2. Sâm Ngọc Linh

Mọc dưới tán rừng ẩm, nhiều mùn, thích hợp với nhiệt độ ban ngày từ 20°C-25°C, ban đêm 15°C-18°C, sâm Ngọc Linh có thể sống rất lâu, thậm chí trên 100 năm, sinh trưởng khá chậm. Bộ phận dùng làm thuốc chủ yếu là thân rễ, củ và ngoài ra cũng có thể dùng lá và rễ con. Vào đầu tháng 1 hàng năm, sâm xuất hiện chồi mới sau mùa ngủ đông, thân khí sinh lớn dần lên thành cây sâm trưởng thành có 1 tán hoa. Từ tháng 4 đến tháng 6, cây nở hoa và kết quả. Tháng 7 bắt đầu có quả chín và kéo dài đến tháng 9. Cuối tháng 10, phần thân khí sinh tàn lụi dần, lá rụng, để lại một vết sẹo ở đầu củ sâm và cây bắt đầu giai đoạn ngủ đông hết tháng 12. Chính căn cứ vào vết sẹo trên đầu củ mỗi mùa đông đến mà người ta có thể nhận biết cây sâm bao nhiêu tuổi, phải ít nhất 3 năm tuổi tức trên củ có một sẹo (sau 3 năm đầu sâm chỉ rụng một lá) mới có thể khai thác, khuyến cáo là trên 5 năm tuổi. Mùa đông cũng là mùa thu hoạch tốt nhất phần thân rễ của sâm [62].

1.2.2. Đặc điểm phân bố

Cây sâm được phát hiện ở độ cao từ 1.200m trở lên (có tài liệu cho biết cao độ tìm thấy sâm Ngọc Linh là khoảng 1.500m), đạt mật độ cao nhất ở khoảng từ 1.700-2.000m dưới tán rừng già, và cho tới nay chỉ có hai tỉnh Kon Tum và Quảng Nam là có cây sâm này. Sâm mọc tập trung dưới chân núi Ngọc Linh, một ngọn núi cao 2.578m với lớp đất vàng đỏ trên đá granit dày trên 50cm, có độ mùn cao, tối xốp và rừng nguyên sinh còn rộng, nên được gọi là sâm Ngọc Linh, tuy những nghiên cứu thực địa mới nhất cho thấy sâm còn mọc cả ở núi Ngọc Lum Heo thuộc xã Phước Lộc, huyện Phước Sơn, tỉnh Quảng Nam, đỉnh núi Ngọc Am thuộc Quảng Nam, Đắc Glây thuộc Kontum, núi Langbian ở Lạc Dương tỉnh Lâm Đồng cũng rất có thể có loại sâm này [62].

1.2.3. Thành phần hóa học

Từ 1974 đến 1990. Nguyễn Thời Nhâm và cộng sự đã nghiên cứu nhân sâm Việt Nam, so sánh với nhân sâm Triều Tiên (*Panax ginseng*), nhân sâm Nhật Bản (*Panax japonicus*) và nhân sâm Hoa Kỳ (*Panax quinquefolium*) [1]. Kết quả có thể tóm tắt như sau:

Bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKIM) đã phát hiện trong *Panax vietnamensis* (PV) 15 vết saponin có giá trị R_f và màu sắc tương ứng với 12 hợp chất saponin của *Panax ginseng*. Chi tiết hơn nữa trong PV có hàm lượng cao chất saponin kiểu damarane (7,58%), trong đó saponin thuộc diol và triol có tỷ lệ 3,32% và một lượng nhỏ saponin của axit oleanolic. Do đặc điểm này, Tanaka xếp nhân sâm Việt Nam vào nhóm B- (Trước đây chỉ có nhân sâm triều Tiên và nhân sâm Hoa Kỳ được xếp vào nhóm này) [1]. Điều này trái lại với qui luật chung là thông thường các cây nhân sâm cho thân rễ phát triển thì thường chứa lượng saponin của axit oleanolic và lượng nhóm saponin damarane.