



NHỮNG LƯU Ý KHI XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHO SẢN PHẨM SÂM DỰA TRÊN PHÂN TÍCH CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Chu Đức Hà¹, Khuất Thị Mai Lương², Lê Hùng Lĩnh², Trần Thị Thu Thủy³,
La Việt Hồng⁴, Đồng Huy Giới⁵, Đỗ Hữu Tài³

¹Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Di truyền Nông nghiệp

³Công ty Cổ phần Nông nghiệp Công nghệ cao Thái Minh

⁴Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

⁵Học viện Nông nghiệp Việt Nam

“

Sự đa dạng của các loài sâm ở Việt Nam cùng với tình trạng trà trộn sâm từ các nước trong khu vực gây khó khăn trong quản lý và bảo vệ nguồn tài nguyên sâm. Việc xây dựng tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) cho nhận dạng sâm là vô cùng cần thiết và cấp bách, nhằm đảm bảo chất lượng và an toàn của các sản phẩm sâm trên thị trường, giúp người tiêu dùng tránh được các sản phẩm kém chất lượng hoặc giả mạo. Để đạt được điều này, việc hiểu rõ về các thành tựu khoa học trong nhận diện các loài sâm trên thế giới và ở Việt Nam sẽ cung cấp những công cụ hữu hiệu và cơ sở lý luận để xây dựng TCVN.

”

Giới thiệu

Panax (Araliaceae) là chi có nhiều loài cây thảo được sử dụng nhiều trong y dược. Các loài được sử dụng phổ biến trong chi *Panax* bao gồm sâm Mỹ (*P. quinquefolius* L.), Hàn Quốc (*P. ginseng* Meyer), sâm Himalayan (*P. pseudoginseng* Wall.), sâm Việt Nam (*P. vietnamensis*)... [1]. Công tác chọn lọc và lai tạo giống đã giúp tạo ra những giống sâm mới có năng suất cao, khả năng chống chịu bệnh tốt và hàm lượng hoạt chất cao hơn, ví dụ các giống sâm Hàn Quốc như Chunpoong, Yunpoong, Gopoong... có chất lượng ginsenoside cao, khả năng chống chịu tốt [2].

Do sự khác nhau về hàm lượng ginsenoside giữa các giống sâm nên hiện tượng trà trộn và gắn nhãn giả mạo trở nên phổ biến, gây ra những lo ngại về chất lượng và tính an toàn của sản phẩm. Do đó, các phương pháp phân biệt hiệu quả các loài/giống sâm là cần thiết. Các phương pháp truyền thống để nhận dạng các loài/giống sâm dựa trên quan sát hình thái thường chịu ảnh

hưởng của yếu tố môi trường (đất đai, thổ nhưỡng, khí hậu) và hình thức canh tác, đồng thời các giống sâm thường rất giống nhau về hình thái (củ sâm khô, hạt sâm, cây giống). Để sàng lọc nhiều mẫu sâm, các phương pháp phân tích sử dụng chỉ thị phân tử (RFLP, AFLP, RAPD...) đã được áp dụng phổ biến để xem xét vật chất di truyền [gen tế bào chất (cpDNA, mtDNA) và gen nhân] trong các mẫu [3]. Việc hiểu rõ những ứng dụng của chỉ thị phân tử trong kiểm định sâm là dẫn liệu quan trọng cho Việt Nam trong việc xây dựng TCVN về phân biệt các loài/giống sâm trên thị trường.

Phân biệt các loài/giống sâm dựa trên DNA lục lạp

Việc sử dụng cpDNA để phân biệt các loài trong chi *Panax* đã chứng minh là một phương pháp hiệu quả và chính xác, do các loài này có sự tương đồng lớn về hình thái và di truyền. Trình tự cpDNA và 45S nrDNA của ít nhất 9 giống sâm trồng [như Chunpoong (KM088019), Yunpoong (KM088018), Cheongsun (KM067389), Gopoong (KM067387)...] và hai giống



Sự đa dạng về hình thái hạt của các loài sâm Việt Nam.

sâm địa phương [Jakyung (KM067386) và Hwangsook (KM067394)] đã được giải trình tự, cho phép phân tích và xác định loài/giống sâm. Vùng InDeL trên các đoạn trình tự lắp ngắn xác định từ việc đối chiếu trình tự cpDNA giữa các giống sâm cho phép thiết kế các chỉ thị SNP và dCAPS để phân biệt giữa các loài hoặc trong cùng loài.

Sáu vị trí SNP (phát hiện trên đoạn *rps16-trnUUG*, *rpoC2*, *rpoC1*...) và sáu vị trí InDel (phát hiện trên đoạn intron *rps16*, *rps16-trnUUG*, *trnUUC-trnGGU*...) đã được xác định trên cpDNA, đồng thời năm vị trí SNP (phát hiện trên đoạn 5,8S rRNA, 26S rRNA, vùng bản lề IGS) được xác định trên 45S nrDNA cho phép phân biệt giữa các giống sâm trồng cũng như so sánh với loài sâm Mỹ (KM088018). Tương tự, bộ chỉ thị gcpm1-gcpm14 đặc hiệu cho 14 vị trí InDeL (ở đoạn gen *ycf1* và *ycf2*, ở đoạn DNA liên gen nằm giữa *trnUUU-rps16*, *rps16-trnUUG*...) được thiết kế để phân biệt năm loài sâm (Hàn Quốc, Mỹ, Việt Nam, Trung Quốc và Nhật Bản). Theo đó, chỉ thị gcpm3, gcpm8 và gcpm10 cho phép nhận biết loài sâm Trung Quốc, trong khi chỉ thị gcpm6 và hai chỉ thị gcpm 9, gcpm14 cho phép nhận dạng loài sâm Nhật Bản và sâm Việt Nam (so với bốn loài sâm còn lại).

Chỉ thị dCAPS cũng là công cụ hữu ích trong phân biệt các loài sâm. Các chỉ thị này dựa trên vị trí SNP được xác định trong các vùng mã hóa của gen. Các SNP này tạo ra mẫu cắt khác biệt khi sử dụng enzyme cắt giới hạn, giúp xác định đặc trưng di truyền của từng loài. Để phân biệt loài sâm Hàn Quốc (giống Chunpoong), sâm Mỹ (KM088018), sâm Trung Quốc (KP036468), sâm Nhật Bản (KP036469), sâm Việt Nam (KP036470), *P. stipuleanatus* (KX247147) và sâm ba lá (KX247147), tập hợp 18 chỉ thị dCAPS (thiết kế dựa trên vị trí SNP giữa các cpDNA của bảy loài) đã được sử dụng để phân biệt. Theo đó, chỉ thị Pgdm1 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *rpl20*), Pgdm2 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *ndhK*) và Pgdm3 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *rps15*), sử dụng enzyme cắt giới hạn Cla1 và Sma1, có thể phân biệt sâm Hàn Quốc so với sáu loài còn lại, trong khi sâm Mỹ có thể được nhận dạng bằng bộ ba chỉ thị Pgdm4 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *rpoC1*), Pgdm5 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *ndhA*) và Pgdm6 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *ndhK*), với ba enzyme cắt giới hạn Sal1, Cha1 và Alu1. Chỉ thị Pndm7 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *rpoC1*), Pndm8 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *rpoC2*) và Pndm9 (đặc hiệu cho vị trí SNP trên gen *ndhK*), với enzyme cắt giới hạn Sal1 HindIII và Cla1 có thể phân biệt được sâm Trung Quốc so với sáu loài *Panax* khác. Chỉ thị Pjdm10 và Pjdm11, sử dụng enzyme cắt giới hạn Sal1 và Rsa1, phát hiện sâm Nhật Bản, và chỉ thị Pvdm12 và Pvdm13 cho phép phân biệt sâm Việt Nam...

Phân biệt các loài/giống sâm dựa trên DNA ty thể

Việc phân biệt các loài sâm sử dụng mtDNA đã chứng minh là một phương pháp hiệu quả và chính xác [4]. Các nghiên cứu đã xác định vị trí SNP đặc trưng trong đoạn intron 3 của gen *nad7* (mã hóa tiểu phần 7 của NADH dehydrogenase) được sử dụng để phân biệt sâm hoang dã tại Sikhote-Alin (Liên bang Nga) với bốn giống sâm trồng Trung Quốc (Damaya, Ermaya, Biantiao và Huangguo).

Trong số các giống sâm trồng Hàn Quốc, Chunpoong nổi bật với chất lượng vượt trội so với các giống khác, năng suất cao và khả năng chống bệnh thối rễ gỉ sắt. Để nhận biết giống Chunpoong, căn trình tự tương đồng của đoạn intron 4 của gen *nad7* giữa chín giống sâm trồng Hàn Quốc (Chunpoong, Yunpoong, Gopoong...) đã xác định được một vị trí SNP (nucleotide "C" được phát hiện ở giống sâm Chunpoong tại vị trí 1428 bp so với nucleotide "A" ở các giống sâm trồng còn lại). Tương



tự, giống Chunpoong cũng có thể được nhận dạng với các giống sâm Hàn Quốc khác bằng cách sử dụng các vị trí SNP phát hiện trong đoạn intron 1 và 2 của gen *cox2* (mã hóa tiểu phần 2 của cytochrome c oxidase).

Trong khi đó, các giống *P. ginseng* trồng tại Trung Quốc chủ yếu được phân biệt dựa trên hình thái. Giống Damaya có giá trị dược liệu và thương mại cao hơn, thường bị trộn lẫn với các giống khác vì mục đích thương mại. Để giải quyết vấn đề này, đoạn intron 2 của gen *cox2* của năm giống *P. ginseng* thuần hóa tại Jilin (Trung Quốc), bao gồm Damaya (KT345971), Ermaya (KT345972), Biantiao (KT345973), Changbo (KT345974) và Huangguo (KT345975) và loài sâm Trung Quốc (HM768738) đã được giải trình tự để tìm kiếm vị trí SNP. Kết quả đã xác định được một vị trí SNP (nucleotide “A” được phát hiện ở giống sâm Damaya tại vị trí 386 bp so với nucleotide “C” ở các giống sâm còn lại), từ đó cho phép nhận dạng giống sâm Damaya.

Phân biệt các loài/giống sâm dựa trên gen nhân

Việc phân biệt các loài/giống sâm dựa trên nDNA đã được triển khai hiệu quả thông qua các nghiên cứu gần đây. Ví dụ, giống sâm trồng Hàn Quốc K-1 nổi tiếng với hình dạng củ đẹp và khả năng chống bệnh hiệu quả, có thể được nhận dạng bằng cách khai thác dữ liệu từ 5 protein PR. Cụ thể, một vị trí SNP đã được phát hiện ở vị trí 289 (nucleotide “A” thay bằng “G”) trên gen *PR5* được sử dụng để thiết kế cặp mồi để phát hiện giống sâm K-1 (có kích thước băng điện di ~310 bp) so với các giống sâm Hàn Quốc khác và bốn giống sâm *P. ginseng* trồng tại Trung Quốc (đều có kích thước băng điện di ~577 bp).

Các nghiên cứu khác cũng đã sử dụng các vị trí SNP phát hiện ra ở một số gen chức năng để phân biệt các giống sâm. Ví dụ, căn trình tự tương đồng của gen *ARP* mã hóa protein ức chế auxin phân lập từ chín giống sâm Hàn Quốc phổ biến và loài sâm Mỹ đã xác định được vị trí SNP ở vị trí 425 (nucleotide “A” được phát hiện ở giống Chunpoong được thay thế bằng nucleotide “G” ở các loài/giống sâm còn lại). Kết quả của phản ứng PCR đa mồi cho thấy, giống sâm Chunpoong được đặc trưng bởi hai băng điện di có kích thước 200 và 600 bp, trong khi sản phẩm PCR từ DNA của loài sâm Mỹ thể hiện ở hai băng điện di có kích thước 400 và 600 bp, các giống sâm Hàn Quốc khác có một băng điện di với kích thước 600 bp.

Giá trị của chi *Panax* được quy định bởi hàm lượng của ginsenoside, chủ yếu là các saponin. Một số nghiên cứu đã chỉ ra gen *DS* mã hóa dammarenediol synthase

(enzyme tham gia chuyển đổi 2,3-oxidosqualene thành dammarenediol II, bước đầu tiên trong việc hình thành cấu trúc của ginsenoside). Hai vị trí SNP đã được phát hiện ra trên đoạn intron của gen *DS*, giúp phân biệt giữa loài sâm Hàn Quốc (tạo ra băng điện di có kích thước 571 bp) và sâm Mỹ (tạo ra băng điện di có kích thước 341 bp). Gen *DS* cũng được khai thác để ứng dụng kỹ thuật HRM (high resolution melt, là phương pháp xác định kiểu gen với độ phân giải cao, cho phép phân biệt các trình tự DNA chỉ khác nhau một vị trí SNP dựa vào kết quả phân tích nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm PCR) trong nhận dạng các mẫu lá từ cây sâm của Hàn Quốc, Mỹ, Trung Quốc và Nhật Bản, hạt của sâm ba lá, các sản phẩm thương mại (rễ khô, trà thảo mộc và thực phẩm bổ sung) [5, 6].

Một số nghiên cứu về sâm ở Việt Nam

Tại Việt Nam, các cá thể sâm phát hiện trong tự nhiên (hoang dã hoặc được di thực) được ghi nhận bao gồm *P. bipinnatifidus* Seem., *P. stipuleanatus* H.T. Tsai and K.M. Feng, *P. vietnamensis* Ha and Grushv., sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* K. Komatsu, S. Zhu and S.Q. Cai) và sâm Langbiang (*P. vietnamensis* var. *langbianensis* Duy, V.T. Tran and L.N. Trieu). Loài *P. pseudoginseng* Wall được nhập khẩu để trồng tại các tỉnh Lào Cai, Hà Giang và Cao Bằng, trong khi sâm Hàn Quốc được trồng tại tỉnh Lào Cai và Hà Nội (mô hình sâm rau). Như vậy, lịch sử của các loài sâm ở Việt Nam cho thấy mức độ phức tạp với sự tồn tại của các quần thể hoang dã và việc duy trì, phục tráng trong các khu vực vườn ươm và phát triển cây nuôi cấy mô (hình 1). Để làm rõ về sự khác biệt về mặt di truyền giữa các quần thể này, một nghiên cứu đã thu thập các cá thể sâm Ngọc Linh tại 18 xã thuộc năm huyện của hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum để phân tích các chỉ thị SNP [1]. Kết quả phân tích 1181 vị trí SNP cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về mặt di truyền giữa các cá thể trong tự nhiên và cá thể được chăm sóc [1]. Khác với các loài/giống sâm khác trên thế giới (quần thể được chăm sóc trong vườn ươm có hình thái khác biệt rõ rệt so với cá thể tự nhiên do phương thức canh tác và tính chất đất khác nhau), quá trình thuần hóa và di thực của các loài sâm Việt Nam diễn ra ngắn, đồng thời phương thức trồng sâm dưới tán rừng hiện nay vẫn mô phỏng tương tự như trong tự nhiên nên không có quá nhiều sự khác biệt về hình thái và nền di truyền [1].

Tiếp theo, đối chiếu với 57 dữ liệu hệ gen lạp thể trong họ Araliaceae, hệ gen lạp thể của bốn mẫu tươi thuộc loài *P. bipinnatifidus*, *P. stipuleanatus* và



P. vietnamensis thu thập tại các địa phương ở Việt Nam cho thấy cây tiền hóa có thể được chia thành hai nhánh, một nhánh bao gồm hai chi *Aralia* (với hai loài *A. elata* và *A. undulata*) và *Panax*; nhánh thứ hai gồm các chi *Schefflera*, *Fatsia*, *Eleutherococcus*, *Kalopanax*, *Metapanax*, *Brassaiopsis* và *Dendropanax* [7]. Kết quả kiểm định đã chứng minh bộ chỉ thị SNP, bao gồm *trnC-rps16*, *trnE-trnM* và *psbM-trnD* cho phép phân biệt sâm Hàn Quốc, sâm Mỹ và sâm Việt Nam [7].

Thay lời kết

Sự có mặt của đa dạng các loài sâm ở Việt Nam cùng với sự trà trộn sâm từ Trung Quốc và Lào vào Việt Nam đã gây ra nhiều khó khăn và nhập nhằng trong việc quản lý và bảo vệ nguồn tài nguyên sâm quý giá. Tình trạng này không chỉ làm giảm giá trị dược liệu của sâm Việt Nam mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến uy tín của ngành công nghiệp sâm trong nước. Để đối phó với vấn đề này, cần có một chiến lược toàn diện bao gồm việc áp dụng các biện pháp kiểm soát chất lượng nghiêm ngặt, phát triển hệ thống phân biệt và truy xuất nguồn gốc rõ ràng:

Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô để tách dòng tế bào và tạo ra các dòng/giống sâm là một bước quan trọng trong khởi tạo nguồn vật liệu thuần chủng để lai tạo

giống sâm mới. Trên thực tế, các cá thể sâm Ngọc Linh nói riêng và sâm Việt Nam nói chung thể hiện mức độ đa dạng về hình thái và hàm lượng hoạt chất khi di thực đến các khu vực có đới độ cao tương đương hoặc ảnh hưởng rất lớn bởi phương thức chăm sóc. Do vậy, việc phát triển các dòng/giống để tạo thành tập đoàn sâm Việt Nam là rất quan trọng, nhằm tạo nguồn vật liệu cho công tác chọn tạo giống.

Các bộ chỉ thị phân tử, điển hình như SSR, có thể được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền giữa các dòng bố mẹ, cũng như xác định các locus gen kiểm soát tính trạng quý ở cá thể con lai [8]. Do đó, chọn giống sử dụng chỉ thị phân tử là nền tảng vững chắc cho việc nghiên cứu và phát triển ngành công nghiệp sâm ở Việt Nam.

Phương pháp phân tích mã vạch DNA có thể gặp hạn chế khi phân tích các sản phẩm thương mại từ sâm do DNA bị phân hủy và không thể khuếch đại các mã vạch thông thường (>500 bp) [6]. Do vậy, kỹ thuật real-time PCR kết hợp với phân tích HRM được khuyến cáo để phân biệt sâm Hàn Quốc, sâm Mỹ, sâm Nhật, sâm Trung Quốc và sâm ba lá [5]. Đồng thời, phát triển chip vi lưu (microfluidic chip) trong phát hiện nhanh các loài sâm cũng đã được báo cáo gần đây [9]. Đây là cơ sở quan trọng để tiến hành đánh giá các sản phẩm từ sâm của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H.T.T. Le, L.N. Nguyen, H.L.B. Pham, et al. (2022), "Target capture reveals the complex origin of Vietnamese ginseng", *Front. Plant Sci.*, **13**, DOI: 10.3389/fpls.2022.814178.
- [2] Z. Yang, Y.T. Lo, Z. Quan, et al. (2023), "Application of a modified tetra-primer ARMS-PCR assay for rapid *Panax* species identity authentication in ginseng products", *Sci. Rep.*, **13**(1), DOI: 10.1038/s41598-023-39940-7.
- [3] Z. Ying, M. Awais, R. Akter, et al. (2022), "Discrimination of *Panax ginseng* from counterfeits using single nucleotide polymorphism: A focused review", *Front. Plant Sci.*, **13**, DOI: 10.3389/fpls.2022.903306.
- [4] S. Liu, Y. Jiang, Y. Wang, et al. (2023), "Genetic and molecular dissection of ginseng (*Panax ginseng* Mey.) germplasm using high-density genic SNP markers, secondary metabolites, and gene expressions", *Front. Plant Sci.*, **14**, DOI: 10.3389/fpls.2023.1165349.
- [5] L. Grazina, J.S. Amaral, J. Costa, et al. (2021), "Towards authentication of Korean ginseng-containing foods: Differentiation of five *Panax* species by a novel diagnostic tool", *LWT*, **151**, DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112211.
- [6] M.C. Ichim, H.J.D. Boer (2020), "A review of authenticity and authentication of commercial ginseng herbal medicines and food supplements", *Front. Pharmacol.*, **11**, DOI: 10.3389/fphar.2020.612071.
- [7] V. Manzanilla, A. Kool, L.N. Nhat, et al. (2018), "Phylogenomics and barcoding of *Panax*: Toward the identification of ginseng species", *BMC Evol. Biol.*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12862-018-1160-y.
- [8] F. Xu, A.K. Valappil, R. Mathiyalagan, et al. (2023), "In vitro cultivation and ginsenosides accumulation in *Panax ginseng*: A review", *Plant*, **12**(17), DOI: 10.3390/plants12173165.
- [9] C. Oberc, A. Sedighi, P.C.H. Li (2022), "The genetic authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* based on using single nucleotide polymorphism (SNP) conducted in a nucleic acid test chip", *Anal. Bioanal. Chem.*, **414**(13), pp.3987-3998, DOI: 10.1007/s00216-022-04044-0.