

PHÂN BIỆT TAM THẮT HOANG (*Panax stipuleanatus*) VỚI TAM THẮT BẮC (*Panax notoginseng*) BẰNG CẶP PRIMER PCR CHUYÊN BIỆT

Huỳnh Nhật Tân, Nguyễn Minh Phương, Hồ Việt Thế*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: thehv@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 28/2/2021; Ngày chấp nhận đăng: 26/4/2021

TÓM TẮT

Tam thất (*Panax*) là một chi quý trong họ ngũ gia bì, hầu hết các loài trong chi này có giá trị kinh tế cao do dược tính của chúng đem lại cho người sử dụng. So với các loài khác, tam thất hoang và tam thất bắc còn chưa được nghiên cứu nhiều và việc phân loại chủ yếu dựa trên hình thái hoặc sinh hóa dẫn đến kết quả phân biệt thấp khi mẫu đã qua sơ chế hoặc trải qua điều kiện bảo quản không tốt. Nghiên cứu này tập trung vào việc thiết kế cặp primer chuyên biệt và xây dựng quy trình PCR để phân biệt tam thất hoang và tam thất bắc. Kết quả nghiên cứu đã thiết kế được một cặp primer chuyên biệt và quy trình PCR có khả năng phân biệt hai loại tam thất này trong mẫu thực tế. Kết quả cho thấy có thể ứng dụng kỹ thuật PCR trong việc nhận dạng và phân loại các loại dược liệu có nguồn gốc từ tam thất hoang và tam thất bắc.

Từ khóa: PCR, primer, tam thất bắc, tam thất hoang.

1. MỞ ĐẦU

Tam thất (*Panax*) là một loại cây dược liệu quý thuộc họ ngũ gia bì (Araliaceae), đây là loại cây chứa nhiều hợp chất có lợi cho sức khỏe như saponin, polyacetylen và các axit amin thiết yếu có tác dụng ức chế và tiêu diệt các tế bào khối u, có khả năng kháng khuẩn và tăng cường sức khỏe cho người sử dụng. Ngoài việc sử dụng làm thuốc điều trị các loại bệnh, hiện nay, tam thất còn được sử dụng như một loại nguyên liệu để chế biến thành các loại thực phẩm chức năng [1]. Ở nước ta, hiện tại có 4 loài phổ biến trong chi tam thất bao gồm sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*), sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus*), tam thất trồng hay còn gọi là tam thất bắc (*Panax notoginseng*) và tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*) [2].

Các loài tam thất được phân biệt dựa trên các đặc điểm hình thái thực vật như lá, cấu trúc thân hoặc hoa. Mặc dù phương pháp này đã được khẳng định về mặt kinh tế do tính dễ dàng và chi phí thấp, nhưng đây là phương pháp dễ bị sai sót do có nhiều sự tương đồng về các đặc điểm hình thái, ngoài ra sự thay đổi hình thái giữa các giai đoạn trưởng thành và cây non, và các yếu tố môi trường dẫn đến sự thiếu chính xác của phương pháp này [3]. Hơn nữa, nhiều sản phẩm tam thất thương mại ở dạng lát hoặc bột vì vậy để xác thực chúng bằng các phương pháp hình thái học và mô học rất khó nếu không muốn nói là không thể. Gần đây, một số nghiên cứu đề xuất sử dụng phương pháp sinh hóa để phân biệt các loại tam thất dựa vào thành phần hóa học và đặc tính dược liệu. Tuy nhiên, việc áp dụng phân tích hóa học có thể bị hạn chế vì số lượng và cấu hình của các hợp chất sâm dễ bị ảnh hưởng đáng kể bởi điều kiện sinh trưởng của cây cũng như điều kiện khác nhau khi bảo quản và lưu trữ mẫu, sự khác nhau về độ tươi, độ tuổi các mẫu và chế biến sau thu hoạch khác nhau [4]. Ngoài ra, phương pháp hóa học đòi hỏi một lượng lớn vật liệu để phân tích. Việc không thể

xác định chính xác các mẫu vật, đặc biệt đối với các mẫu đã bị hư hỏng hoặc đã qua sơ chế và xử lý làm phát sinh những lo ngại về giá trị dược liệu của các sản phẩm của cây tam thất bởi vì việc sử dụng không đúng cách sẽ làm giảm hiệu quả hoặc gây hại cho sức khỏe người bệnh do sự biến đổi thành phần dược chất và ứng dụng giữa các loại tam thất khác nhau. Do đó, phát triển một phương pháp có độ chính xác cao để phân biệt 2 loài tam thất này là cần thiết.

Hiện nay, kỹ thuật khuếch đại DNA Polymerase Chain Reaction (PCR) để xác định và phân biệt các loài thực vật đã được sử dụng rộng rãi. Phương pháp này có nhiều ưu điểm so với các phương pháp truyền thống như độ lặp lại và độ ổn định cao, khả năng áp dụng cho bất kỳ giai đoạn phát triển nào của sinh vật. Từ năm 1992, kỹ thuật này đã được sử dụng để phân biệt DNA của thực vật và DNA của các loài nấm bệnh ký sinh [5]. Tiếp sau đó kỹ thuật này đã được ứng dụng vào phân biệt các loài sâm. Năm 1999, Ngan và cộng sự khuếch đại vùng ITS1-5,8S-ITS2 để phân biệt 6 loài sâm thuộc chi *Panax* bao gồm *P. ginseng*, *P. quinquefolius*, *P. notogineng*, *P. japonicus*, *P. trifolius* và *P. major*. Ngoài ra, nhóm tác giả này cũng sử dụng PCR để phân biệt 6 loài sâm này với 2 loại cây thường sử dụng để pha trộn hoặc làm giả sâm bao gồm *Mirabilis jalapa* và *Phytolacca acinosa* [4]. Năm 2005, nhóm nghiên cứu từ Hàn Quốc đã sử dụng PCR gradient để xác định sự tồn tại của các loài *Panax* trong 40 loại thuốc thảo dược [6], kết quả đã khuếch đại được *P. notoginseng* (sâm Trung Quốc), *P. japonicus* (sâm Nhật Bản) và *P. quinquefolius* (sâm Mỹ), cùng với *P. ginseng* (sâm Hàn Quốc). Ở Việt Nam, năm 2018 nhóm nghiên cứu từ Viện Di truyền Nông nghiệp kết hợp với Viện Khoa học và Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên đã thiết kế và xây dựng được bộ chỉ thị PCR nhằm nhận diện và nghiên cứu di truyền của sâm Ngọc Linh [7].

Trong khi sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis*) và sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus*) đã được nghiên cứu nhiều các mức độ về hình thái, sinh hóa đến sinh học phân tử, các nghiên cứu về tam thất hoang và tam thất trồng ở nước ta chưa được chú ý đúng mức. Các nghiên cứu về tam thất hoang và tam thất bắc ở nước ta chủ yếu về nhân giống nhanh bằng phương pháp nuôi cấy mô [8] và phân tích thành phần sinh hóa [2]. Ngoài ra, việc phân loại 2 loài tam thất này chỉ dừng lại ở phân biệt bằng giải phẫu hình thái [9]. Như vậy, việc thiết kế các cặp primer PCR chuyên biệt để phân biệt tam thất hoang và tam thất bắc là việc làm cần thiết, kết quả nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng trong công tác quản lý chất lượng dược phẩm cũng như làm cơ sở để phát triển các sản phẩm từ các loài tam thất này một cách bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu tam thất hoang được thu từ huyện Mộ Cang Chải, tỉnh Yên Bái và tam thất bắc được thu từ huyện Trà My, tỉnh Quảng Nam ở dạng mẫu khô, sau đó được định danh tại Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. Hồ Chí Minh và được sử dụng để chọn lọc các primer. Tổng cộng 5 mẫu tam thất gồm 2 mẫu tam thất hoang và 3 mẫu tam thất bắc thu thập từ Yên Bái và Quảng Nam được sử dụng để xác định tính chuẩn xác khả năng phân biệt do các cặp primer thiết kế trong nghiên cứu này.

2.2. Thiết kế primer PCR

Các từ khóa “*Panax stipuleanatus* chloroplast complete genome” và “*Panax notoginseng* chloroplast, complete genome” được sử dụng để tìm kiếm các trình tự gen lục lạp của tam thất hoang và tam thất bắc. Các trình tự ở định dạng FASTA được so sánh bằng

phần mềm Bioedit với các thông số mặc định. Vùng khác biệt giữa tam thất bắc và tam thất hoang được sử dụng để thiết kế primer bằng phần mềm Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) với các thông số mặc định. Trình tự primer được gửi tổng hợp tại Công ty Sinh hóa Phù Sa (Số 503 đường 30/04, phường Hưng Lợi, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ) và sử dụng cho các phản ứng PCR.

2.3. Tách chiết DNA

DNA từ các mẫu tam thất được tách theo phương pháp cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) [10] có bổ sung thêm PVP 1%. Chất lượng DNA được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE 1X và nhuộm với Gelred (Biotium, Mỹ), sau đó được quan sát bằng máy đọc gel Quantum-ST4 3000 (Montreal - Biotech, Canada), nồng độ DNA sau đó được xác định bằng máy quang phổ (Optima SP 3000 nano UV-VIS, Nhật Bản).

2.4. Phản ứng PCR và giải trình tự DNA

Vùng DNA mục tiêu được tổng hợp có thành phần của phản ứng PCR như sau: 7,5 μ L 2X Mytaq Red Mix (Bioline, Anh), 20 ng DNA, 0,2 μ M primer (NT_F 5' ACAATTCTCTGCCCTAATCTTTT 3' và NT_R 5' GGGCCATCATTGACTAGCAT 3'), và nước khử ion để cho thể tích cuối cùng ở 15 μ L. Điều kiện phản ứng PCR như sau: biến tính ban đầu ở 94 °C trong 2 phút; sau đó 35 chu kỳ 30 giây ở 94 °C, 30 giây ở 53 °C, 45 giây ở 72 °C, và cuối cùng là 5 phút ở 72 °C để hoàn thành phản ứng. Tất cả các phản ứng đều được thực hiện trong máy luân nhiệt SureCycler 8800 (Agilent, Mỹ). Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 2% và so sánh với thang chuẩn 100 bp và 1000 bp (Bioline, UK). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng cách sử dụng ISOLATE II PCR và Gel Kit (Bioline, UK) và được giải trình tự trên máy phân tích DNA ABI 3100 (Applied Biosystems, Mỹ).

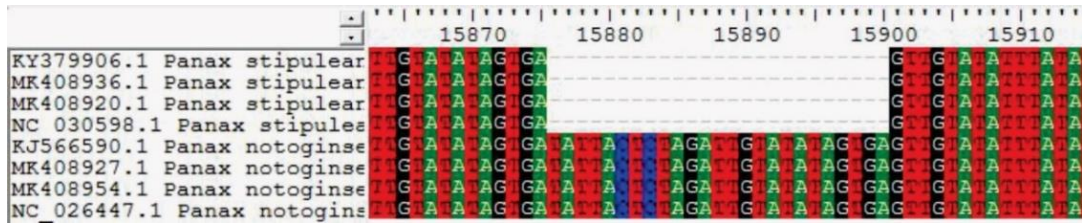
2.5. Phân tích kết quả

Các tín hiệu trình tự DNA được kiểm tra bằng phần mềm FinchTV (Digital World Biology Products, Mỹ), chỉ những vùng có chỉ số PHRED cao hơn 20 mới được sử dụng cho phân tích. Các trình tự DNA được sử dụng để định danh loài bằng công cụ BLAST theo chương trình BLASTN (Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, Mỹ) bằng các thông số mặc định của chương trình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thiết kế primer

Từ ngân hàng gen NBCI, đã thu được lần lượt 7 và 14 trình tự đầy đủ của trình tự gen lục lạp của tam thất hoang và tam thất bắc. Trong nghiên cứu này, chỉ 4 trình tự tam thất hoang (KY379906.1; MK408936.1; MK408920.1; và N_030598.1) và 4 trình tự tam thất bắc (KJ566590.1; MK408927.1; KM408954.1; và NC_026447.1) được sử dụng để so sánh, kết quả cho thấy có sự bảo tồn cao trong các trình tự gen lục lạp của cả hai loại tam thất. Qua phân tích cho thấy có nhiều vùng khác biệt rõ ràng giữa 2 loài, đặc biệt vùng DNA từ 15.875 đến 15.900 bp có sự khác biệt nhiều nhất. Các trình tự gen lục lạp của tam thất hoang hoàn toàn không có 25 nucleotide với trình tự TATTACTCTAGATTGTATATAGTGA như ở tam thất bắc (Hình 1). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây của Kim và cộng sự khi thực hiện nghiên cứu so sánh 11 trình tự gen lục lạp của sâm Hàn Quốc, kết quả cho thấy các biến động xảy ra nhiều ở các vùng gen *ycf1*, *rps16-trnUUG* và *rpl32-trnUAG* [11].



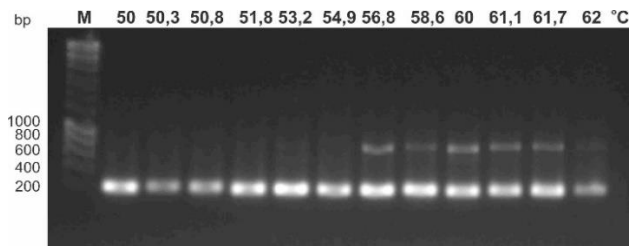
Hình 1. Kết quả phân tích trình tự của tam thất hoang và tam thất bắc bằng phần mềm Bioedit.

Từ kết quả so sánh, khoảng 200 nucleotide vùng lân cận trước và sau vùng trình tự biến động TATTACTCTAGATTGTATATAGTGA được sử dụng để thiết kế primer bằng phần mềm Primer3plus. Kết quả thu được cặp primer có trình tự như ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự cặp primer thiết kế để phân biệt tam thất hoang và tam thất bắc

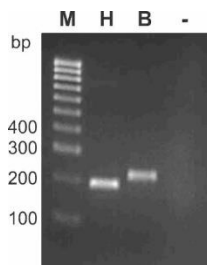
Tên primer	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR theo lý thuyết (bp)	
		Tam thất hoang	Tam thất bắc
NT- F	ACAATTCTCTGCCCTAATCTTTTT	190	215
NT- R	GGCCATCATTGACTAGCAT		

Thực hiện các phản ứng PCR với nhiệt độ bắt cặp của cặp primer này từ 50 °C đến 62 °C đối với DNA của tam thất hoang. Kết quả ở Hình 2 cho thấy, kích thước sản phẩm PCR nằm trong khoảng 200 bp và phù hợp với kích thước lý thuyết của primer thiết kế được. Ở các giá trị nhiệt độ bắt cặp đều cho sản phẩm rõ, tuy nhiên, ở nhiệt độ bắt cặp cao hơn 56,8 °C có sự xuất hiện của một sản phẩm PCR ở kích thước khoảng 600 bp, đây là kết quả không mong đợi. Từ kết quả trên, nhiệt độ bắt cặp của primer ở 53 °C được sử dụng cho các phản ứng PCR tiếp theo.



Hình 2. Kết quả PCR với nhiệt độ bắt cặp của primer khác nhau (M: thang chuẩn 1000 bp (Bioline, UK)).

Kết quả PCR cho 2 mẫu tam thất bắc và tam thất hoang đã định danh được thể hiện ở Hình 3. Kết quả cho thấy có thể phân biệt giữa 2 loài tam thất. Sản phẩm PCR của tam thất hoang nhỏ hơn vạch 200 bp của thang chuẩn, trong khi đó sản phẩm PCR mẫu tam thất bắc có kích thước lớn hơn.



Hình 3. Kết quả PCR phân biệt tam thất hoang (H) và tam thất bắc (B) (- đối chứng âm không DNA, M: thang chuẩn 100 bp (Bioline, UK)).

Phân biệt tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*) với tam thất bắc (*Panax notoginseng*)....

Hai sản phẩm PCR ở Hình 3 được thu hồi và giải trình tự, kết quả thu được như sau:

>TTH (tam thất hoang)

TCCAAATGTAATGTATATTTATATTTTCCTAATTCTATTTTTTTGAGCCGCGCA
TACGTTTCCTTGGGCTAAGCCAAAAAAGAATCTTTCGAAAAGTCAATGCT
AGTCAATGATGGCCCAGG

>TTB (tam thất bắc)

GTAAATAGTGGATATTACTCCTAGAATTGTATATAGTGAGTTGTATATTTAT
ATTTTCCTAAATTCTATTTTTTTGGGCCGCGCATACGTTTCCTTGGGCTAAGCCAA
AAAAAGAATCTTTCGAAAAGTCAATGCTAGTCAATGATGGCCCAA

Kết quả so sánh đoạn DNA được tổng hợp của mẫu tam thất hoang với các trình tự trong ngân hàng gen (NCBI) cho độ tương đồng 100% (Hình 4), và đây là trình tự trong lục lạp của tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*). Ngoài ra, chỉ số E ở giá trị rất thấp ($3e^{-49}$) thể hiện độ tin cậy của kết quả BLAST [12].

Description	Scientific Name	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Panax stipuleanatus isolate JYH-2016437 chloroplast_complete genome	Panax stipuleanatus	3e-49	100.00%	MK408965.1
<input type="checkbox"/> Panax stipuleanatus isolate JYH-2016435 chloroplast_complete genome	Panax stipuleanatus	3e-49	100.00%	MK408936.1
<input type="checkbox"/> Panax stipuleanatus isolate JYH-2016466 chloroplast_complete genome	Panax stipuleanatus	3e-49	100.00%	MK408920.1
<input type="checkbox"/> Panax stipuleanatus chloroplast_complete genome	Panax stipuleanatus	3e-49	100.00%	KY379906.1
<input type="checkbox"/> Panax stipuleanatus chloroplast_complete genome	Panax stipuleanatus	3e-49	100.00%	MF377622.1
<input type="checkbox"/> Panax stipuleanatus chloroplast_complete genome	Panax stipuleanatus	3e-49	100.00%	KX247147.1

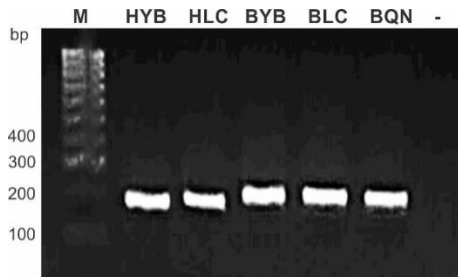
Hình 4. Kết quả BLAST trình sản phẩm PCR của tam thất hoang so với ngân hàng gen.

Với trình tự của tam thất bắc, kết quả cũng cho thấy trình tự của sản phẩm PCR thu được là từ vùng gen lục lạp của tam thất bắc (*Panax notoginseng*) với độ tương đồng 95,48% và giá trị E ở $3e^{-60}$.

Description	Scientific Name	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Panax notoginseng isolate LCK-9 chloroplast_complete genome	Panax notoginseng	3e-60	95.48%	MK408955.1
<input checked="" type="checkbox"/> Panax notoginseng isolate LCK-10 chloroplast_complete genome	Panax notoginseng	3e-60	95.48%	MK408954.1
<input checked="" type="checkbox"/> Panax notoginseng isolate LCK-4 chloroplast_complete genome	Panax notoginseng	3e-60	95.48%	MK408946.1
<input checked="" type="checkbox"/> Panax notoginseng isolate LCK-2 chloroplast_complete genome	Panax notoginseng	3e-60	95.48%	MK408945.1
<input checked="" type="checkbox"/> Panax notoginseng isolate LCK-3 chloroplast_complete genome	Panax notoginseng	3e-60	95.48%	MK408937.1
<input checked="" type="checkbox"/> Panax notoginseng isolate LCK-7 chloroplast_complete genome	Panax notoginseng	3e-60	95.48%	MK408931.1

Hình 5. Kết quả BLAST trình sản phẩm PCR của tam thất bắc so với ngân hàng gen.

Cặp primer này tiếp tục được sử dụng để nhận diện một số mẫu tam thất thu được trên thị trường, kết quả thể hiện như ở Hình 6.



Hình 6. Kết quả PCR các mẫu tam thất thu được ngoài thị trường (M: thang chuẩn 100 bp; HYB: tam thất hoang thu từ Yên Bái; HLC: tam thất hoang thu từ Lào Cai; BYB: tam thất bắc thu từ Yên Bái; BLC: tam thất bắc thu từ Lào Cai; BQN: tam thất bắc thu từ Quảng Nam, -: đối chứng âm không chứa DNA).

Kết quả PCR của các mẫu tam thất thu được cho thấy có sự phân biệt về kích thước sản phẩm PCR khuếch đại như vậy có thể phân biệt tam thất hoang với tam thất bắc bằng primer đã thiết kế và điều kiện PCR đã xác định trong nghiên cứu này. Ngoài ra, các vạch khuếch đại này cũng được giải trình tự cho thấy các vạch thu được là hoàn toàn chính xác từ trình tự DNA mục tiêu. Từ năm 2011, một nhóm nghiên cứu từ Hàn Quốc đã sử dụng thành công kỹ thuật khuếch đại đa hình DNA (RAPD) và sau đó phát triển thành các chỉ thị chuyên biệt (SCAR) để phân biệt một số loài sâm Hàn Quốc và sâm Trung Quốc [13]. Tuy nhiên, theo chúng tôi, kỹ thuật dựa vào RAPD có nhiều nhược điểm do phụ thuộc vào sự may rủi trong quá trình khuếch đại của các primer ngẫu nhiên để có thể phát hiện được các vùng DNA khác nhau giữa các loài sâm. Ngoài ra, chi phí cho việc giải trình tự các đoạn DNA mục tiêu phục vụ cho thiết kế primer là rất cao và tốn nhiều thời gian. Do đó, nghiên cứu ứng dụng các trình tự DNA có sẵn trong ngân hàng gen sẽ giúp cho quá trình nghiên cứu được diễn ra nhanh hơn và có thể giảm được chi phí nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã thiết kế được cặp primer chuyên biệt và xây dựng được quy trình PCR phù hợp để phân biệt được loài tam thất hoang và tam thất bắc. Kết quả nghiên cứu có thể sử dụng cho công tác thẩm định nguồn dược liệu cũng như xác định sự lẫn tạp các sản phẩm có nguồn gốc từ tam thất hoang và tam thất bắc. Tuy nhiên, do nhiều yếu tố khách quan và chủ quan, nghiên cứu này mới tiến hành trên số lượng mẫu hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu tiếp theo cần mở rộng quy mô số lượng mẫu để có thể khẳng định chắc chắn hơn các kết quả thu được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Tài Lương - Thực phẩm chức năng: thức ăn của con người ở thế kỷ 21, Ứng dụng công nghệ sinh học tạo ra chế phẩm thực phẩm chức năng phục vụ sức khỏe cộng đồng, Tạp chí Sinh học **27** (4) (2005) 1-6.
2. Nguyễn Thị Thúy, Đào Thị Hồng Bích, Nguyễn Việt Anh, Vũ Đức Lợi, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Hữu Tùng - Nghiên cứu thành phần và điều chế Phytosome saponin toàn phần của củ cây tam thất (*Panax notoginseng*) trồng ở Tây Bắc Việt Nam, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y dược **32** (1) (2016) 18-24.
3. Ahmedand T.H.M., Mohamed Z.M.A. - Genetic diversity of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in Shendi area, Extensive Journal of Applied Sciences **3** (6) (2014) 219-224.
4. Ngan F., Shaw P., But P., Wang J. - Molecular authentication of *Panax* species, Phytochemistry **50** (1999) 787-791.
5. Cullings K.W. - Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolotinary studies, Molecular Ecology **1** (1992) 233-240.

6. Shim Y.H., Park C.D., Kim D.H., Cho J.H., Cho M.H., Kim H.J. - Identification of *Panax* species in the herbal medicine preparations using gradient PCR method, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28** (2005) 671-676.
7. Khuất Thị Mai Lương, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Chu Đức Hà, Trần Thị Hoa Mỹ, Đinh Văn Phê, Lê Hùng Lĩnh - Thiết kế và xây dựng bộ chỉ thị phân tử phục vụ kiểm định và nghiên cứu di truyền sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*), *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* **11** (96) (2018) 50-54.
8. Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp - Tìm hiểu các biến đổi hình thái trong sự phát sinh rễ tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H. Tsai et KM Feng) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu định tính oleanolic acid trong rễ tạo thành, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **14** (2016) 49-54.
9. Nguyễn Thị Thúy, Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trương Thị Đẹp - Khảo sát sự phân bố ống tiết ở củ tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M. Feng) và tam thất trồng (*Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen) thuộc họ ngũ gia bì, *Y học Tp. Hồ Chí Minh* **23** (2) (2019) 287-294.
10. Li J., Wang S., Jing Y., Wang L., Zhou S. - A modified CTAB protocol for plant DNA extraction, *Chinese Bulletin of Botany* **48** (2013) 1-7.
11. Kim K., Lee S.C., Lee H.O., Joh H.J., Kim N.H., Park H.S., Yang T.J. - Comprehensive Survey of Genetic Diversity in Chloroplast Genomes and 45S nrDNAs within *Panax ginseng* Species, *PLoS ONE* **10** (6) (2015) e0117159.
12. Donko E.S., Dayie N.T.K.D., Adiku T.K. - Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA), *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis* **6** (1) (2014) 1-6.
13. Ahn C.H., Kim Y.S., Lim S., Yi J.S., Choi Y.E. - Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and RAPD-derived sequence characterized amplified regions (SCAR) marker development to identify Chinese and Korean ginseng, *Journal of Medicinal Plants Research* **5** (18) (2011) 4487-4492.

ABSTRACT

DESIGN PCR PRIMER FOR DISTINGUISHING BETWEEN *Panax stipuleanatus* AND *Panax notoginseng*

Huynh Nhat Tan, Nguyen Minh Phuong, Ho Viet The*
Ho Chi Minh University of Food Industry
*Email: thehv@hufi.edu.vn

Panax is a precious genus in the family of Araliaceae family, most species of this genus have high economic value due to their medicinal properties. Compared to other species, *Panax stipuleanatus* and *Panax notoginseng* have not been intensively studied. Furthermore, the identification of these species is mainly based on morphology and biochemistry leading to low differentiation results if the sample has been preliminary treated or undergoing poor preservation condition. This study focused on the design of a specific primer pair and the development of a PCR protocol to distinguish between *Panax stipuleanatus* and *Panax notoginseng*. The obtained primer and PCR protocol showed capacity to accurately distinguish these two *Panax* species. PCR products were then sequenced and compared with those on NCBI Genbank to confirm the accuracy developed PCR reactions. The results could be applicable in the identification and classification of medicinal materials derived from *Panax stipuleanatus* and *Panax notoginseng*.

Keywords: *Panax notoginseng*, *Panax stipuleanatus*, PCR, primer.