

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu nằm trong hoạt động xây dựng Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017, thuộc Tiểu dự án FIRST-AGI “Nâng cao năng lực nghiên cứu, làm chủ công nghệ genom học (Genomics-assisted breeding - GAB) và công nghệ chọn giống ứng dụng chỉ thị phân tử (Marker-assisted backcrossing - MABC) để chọn tạo các giống lúa kháng đa yếu tố ứng phó với biến đổi khí hậu”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Khoa học và Công nghệ, 1986. Tiêu chuẩn Việt Nam về Hạt giống lúa nước - Phương pháp thử: TCVN 1700:1976.

Bùi Hữu Điển, 2018. Lấy mẫu cho phân tích thử nghiệm. *Tạp chí Thử nghiệm Ngày nay*, 12: 52-54.

Helliwell, E. E., Yang, Y., 2013. Molecular strategies to improve rice disease resistance. *Methods Mol Biol*, 956: 285-309.

Honsa, J. D., McIntyre, D. A., 2003. ISO 17025: Practical benefits of implementing a quality system. *J AOAC Int*, 86(5): 1038-1044.

Semagn, K., 2014. Leaf tissue sampling and DNA extraction protocols. In: Besse P (ed) *Molecular plant taxonomy: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ: 53-67.

Yamamoto, S., Asakura, H., Machii, K., Igimi, S., 2010. Approval of ISO/IEC 17025 and quality control of laboratory testing. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 128: 78-80.

Establishment of rice sampling protocols with the ISO/IEC 17025: 2017 standard for the identification of locus for target genes

Chu Duc Ha, Nguyen Thi Minh Nguyet, Nguyen Thi Nhai, Nguyen Ba Ngoc, Khuat Thi Mai Luong, Pham Thi Ly Thu, Le Hung Linh

Abstract

ISO/IEC 17025 Standard (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) is considered as one of the most critical criteria for the international laboratory certification. In this study, the rice sampling protocols have been successfully established for the testing of the identification of target genes. Particularly, two methods in the field and laboratory have been classified. Among them, the steps of sample collecting and storage in the field were highly recommended as much care as the process of sample receiving, storage and preparation from the seed package in the laboratory. Our results could provide the rice sampling protocols according to the ISO/IEC 17025: 2017 standard, therefore, contribute to the establishment and operation of ISO/IEC 17025: 2017 certified laboratory of the molecular biology for the plant gene(s) detection.

Keywords: ISO, rice, test, protocol, sampling

Ngày nhận bài: 24/10/2018

Ngày phản biện: 29/10/2018

Người phản biện: TS. Huỳnh Văn Nghiệp

Ngày duyệt đăng: 15/11/2018

THIẾT KẾ VÀ XÂY DỰNG BỘ CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ KIỂM ĐỊNH VÀ NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis*)

Khuất Thị Mai Lương¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Chu Đức Hà¹, Trần Thị Hoa Mỹ¹, Đinh Văn Phê², Lê Hùng Linh¹

TÓM TẮT

Sử dụng chỉ thị phân tử phục vụ kiểm định và phân tích di truyền các loài sâm, đặc biệt là sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) là một trong những vấn đề được quan tâm hiện nay. Trong nghiên cứu này, các chỉ thị phân tử trình tự lặp đơn giản (SSR) phục vụ kiểm định và phân tích di truyền kiểu gen sâm Ngọc Linh đã được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu tham chiếu hệ gen nhân và lục lạp của sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng*). Kết quả đã thiết kế được 600 chỉ thị phân tử, 200 chỉ thị thiết kế từ trình tự SSR có độ lặp cao được chọn lọc để chạy khảo sát. Trong đó, ba motif lặp, bao gồm -AT-, -AA- và -TT- được đánh giá là các trình tự lặp phổ biến nhất được thiết kế cho các chỉ thị SSR. Kết quả điện di cho thấy, 134 chỉ thị SSR có khả năng khuếch đại đoạn trình tự mục tiêu của *P. ginseng* và *P. vietnamensis* với kích thước băng từ 100 ÷ 300 bp như thiết kế. Kết quả của nghiên cứu này sẽ cung cấp những thông tin cơ bản về các chỉ thị phân tử phục vụ công tác kiểm định và phân tích di truyền các loài sâm Việt trong đó có sâm Ngọc Linh.

Từ khóa: Chỉ thị phân tử, PCR, sâm Ngọc Linh, thiết kế

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS; ² Viện Khoa học kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên (WASI)

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, chi *Panax* được ghi nhận gồm 4 loài chính là sâm Vũ Diệp (*P. bipinnatifidus*), tam thất hoang (*P. stipuleanatus*), sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*) (Nguyễn Tập, 2005). Trong đó, sâm Ngọc Linh được xác định là cây thuốc quý về giá trị sử dụng cũng như giá trị nguồn gen. Phần thân rễ của cây sâm Ngọc Linh có chứa ít nhất 50 saponin có tác dụng dược lý quan trọng (Duc *et al.*, 1994). Đặc biệt, saponin tách chiết từ sâm Ngọc Linh đã được chứng minh có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch và ngăn ngừa ung thư (Chu Đức Hà và *ctv.*, 2018). Với tác dụng dược lý và giá trị kinh tế kinh tế cao như vậy, sâm Ngọc Linh hiện nay đã và đang bị làm giả mạo. Vì vậy, phân loại, kiểm định và nghiên cứu di truyền chi *Panax* nói chung và sâm Ngọc Linh nói riêng được xem là bài toán cấp thiết hiện nay.

Bên cạnh phương pháp xác định và đánh giá các loài thực vật bằng nhận dạng hình thái và phân tích hóa sinh, kỹ thuật chẩn đoán bằng chỉ thị phân tử được xem là một trong những cách tiếp cận hiện đại, nhanh chóng và chính xác nhất (Jo *et al.*, 2017). Trong đó, dựa trên sự phát triển của công nghệ giải trình tự thế hệ mới, thông tin di truyền (hệ gen nhân và hệ gen tế bào chất) của rất nhiều loài trong chi *Panax* đã được xác định một cách cụ thể. Đây được xem là một hệ tham chiếu rất quan trọng để thiết kế và xác định các chỉ thị phân tử đặc trưng nhằm phân loại và phân tích chính xác các loài sâm (Jo *et al.*, 2017).

Trong nghiên cứu này, các chỉ thị phân tử trình tự lặp đơn giản (Simple sequence repeat, SSR) sử dụng trong kiểm định sâm Ngọc Linh đã được thiết kế dựa trên hệ gen nhân và lục lạp tham chiếu của *P. ginseng* (Jayakodi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2012; Um *et al.*, 2016). Sau đó, khả năng bắt cặp để khuếch đại sản phẩm của các chỉ thị được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với mẫu *P. ginseng* và *P. vietnamensis*. Kết quả của nghiên cứu này là bước khởi đầu quan trọng trong việc thiết lập bộ chỉ thị nhằm kiểm định và phân tích di truyền của sâm Ngọc Linh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu lá của cây *P. vietnamensis* được thu thập tại vườn ươm của Trung tâm nghiên cứu và phát triển sâm Ngọc Linh thuộc Trung tâm Ươm tạo và Hỗ trợ doanh nghiệp KHCN, tỉnh Kon Tum và mẫu củ *P. ginseng* được thu thập tại cơ quan hợp tác về công nghệ nhân sâm Chungnam, Hàn Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết ADN

Tách chiết ADN tổng số được thực hiện theo phương pháp CTAB mô tả trong nghiên cứu gần đây (Li *et al.*, 2013). Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu ADN được kiểm tra bằng máy NanoDrop2000 (ThermoFisher, Hoa Kỳ).

2.2.2. Phương pháp thiết kế chỉ thị phân tử

Thông tin về hệ gen nhân của *P. ginseng* (Jayakodi *et al.*, 2018) được khai thác trên các cơ sở dữ liệu chứa trình tự đơn lặp lại (microsatellite), trình tự Genome survey sequence (GSS), Expressed sequence tag (EST) và trình tự lục lạp trên NCBI (Wheeler *et al.*, 2008) được sử dụng làm hệ tham chiếu cho sâm Ngọc Linh. Các chỉ thị phân tử sau đó được thiết kế bằng chương trình Primer3 với các thông số mặc định (Rozen and Skaletsky, 2000). Trình tự mỗi xuôi và môi ngược được gửi sang công ty IDT (Integrated DNA Technologies, Hoa Kỳ) tổng hợp.

2.2.3. Kỹ thuật PCR và kiểm tra sản phẩm PCR bằng gel agarose

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy chu kỳ nhiệt Mastercycler Pro (Eppendorf, Đức). Tổng dung dịch phản ứng là 15 µl, bao gồm 50 ng ADN tổng số, 0,4 µM mỗi, 0,2 mM dNTP, 1X dịch đệm PCR chứa 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl và 1,5 mM MgCl₂, và 1,0 đơn vị Taq TaKaRa. Điều kiện phản ứng PCR được minh họa tại bảng 1. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 2,0% chứa ethidium bromide với thang ADN chuẩn 1 kb Plus (Thermo Scientific, Anh) ở hiệu điện thế 150V trong 90 phút trong dung dịch đệm Tris-boric acid-EDTA 0,5X (Morgante *et al.*, 1998).

Bảng 1. Điều kiện phản ứng PCR

STT	Giai đoạn phản ứng	Điều kiện phản ứng	35 chu kỳ
1	Khởi đầu	94°C - 5 phút	
2	Biến tính	94°C - 30 giây	
3	Gắn môi	(52 ÷ 60°C) - 45 giây	
4	Kéo dài	72°C - 2 phút	
5	Kết thúc kéo dài	72°C - 7 phút	
6	Bảo quản	4°C - ∞	

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Sinh học phân tử - Viện Di truyền Nông nghiệp từ tháng 5/2017 đến tháng 6/2018.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thiết kế chỉ thị phân tử cho phân tích *P. vietnamensis* dựa vào hệ gen tham chiếu của *P. ginseng*

Để thiết kế chỉ thị phân tử SSR cho kiểm định và phân tích di truyền sâm Ngọc Linh, dữ liệu từ *P. ginseng*, bao gồm ngân hàng microsatellite, GSS và EST (Wheeler *et al.*, 2008) và trình tự hệ gen lục

lạp được sử dụng làm hệ tham chiếu. Kết quả đã tìm kiếm được 935 đoạn lặp trên các trình tự gen của *P. ginseng*, từ đó thiết kế ra tổng số 600 chỉ thị phân tử SSR. Trong đó, 200 cặp mỗi được sử dụng chạy khảo sát bao gồm 43 chỉ thị dựa trên EST (đặt tên là PVE) (Bảng 2), 70 chỉ thị dựa trên GSS (đặt tên là PVG) (Hình 1A) và 40 chỉ thị dựa trên cơ sở dữ liệu microsatellite (đặt tên là PVM) (Hình 1B) và 47 chỉ thị dựa trên trình tự lục lạp.

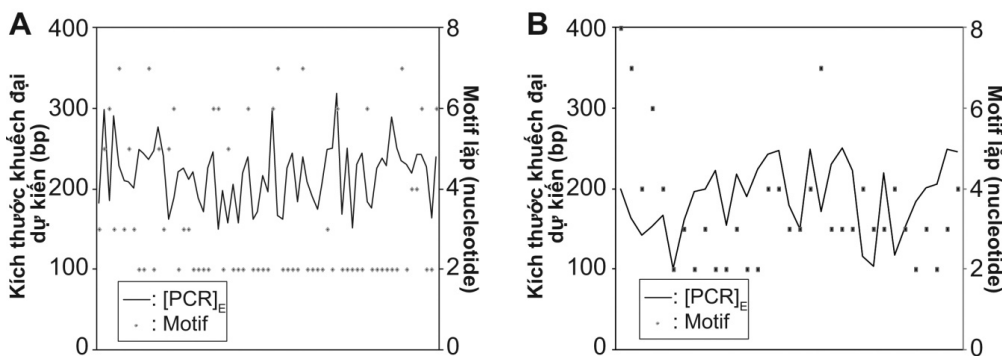
Bảng 2. Danh sách chỉ thị phân tử cho phân tích *P. vietnamensis* được thiết kế từ cơ sở dữ liệu EST của *P. ginseng*

STT	Tên chỉ thị	Kiểu lặp	[PCR] _E	STT	Tên chỉ thị	Kiểu lặp	[PCR] _E	STT	Tên chỉ thị	Kiểu lặp	[PCR] _E
1	PVE01	(TTA) ₇	288	16	PVE17	(TA) ₃₁	182	31	PVE32	(CACTG) ₅	199
2	PVE02	(CCT) ₉	169	17	PVE18	(AAACAG) ₄	202	32	PVE33	(GCCCT) ₃	173
3	PVE03	(TTTGT) ₃	240	18	PVE19	(AT) ₃₂	191	33	PVE34	(TCAGCA) ₃	182
4	PVE04	(AATTTA) ₃	240	19	PVE20	(AT) ₂₁	212	34	PVE35	(GAG) ₇	160
5	PVE05	(GGGGA) ₃	250	20	PVE21	(TCTCAAC) ₄	171	35	PVE36	(TC) ₂₀	246
6	PVE07	(TTA) ₉	245	21	PVE22	(AT) ₂₂	218	36	PVE37	(GGTGAG) ₅	199
7	PVE08	(TCTAAA) ₅	154	22	PVE23	(AT) ₂₀	298	37	PVE38	(TC) ₁₀	189
8	PVE09	(AG) ₁₄	151	23	PVE24	(AT) ₂₁	209	38	PVE39	(CCATCT) ₅	150
9	PVE10	(TATG) ₆	231	24	PVE25	(AT) ₂₈	196	39	PVE40	(AT) ₁₂	200
10	PVE11	(AT) ₁₂	200	25	PVE26	(AAG) ₇	235	40	PVE41	(TA) ₁₄	217
11	PVE12	(TA) ₂₉	159	26	PVE27	(TAT) ₆	186	41	PVE42	(TGATGC) ₃	249
12	PVE13	(CAAAAT) ₅	179	27	PVE28	(AAAAAT) ₄	207	42	PVE43	(AT) ₁₅	166
13	PVE14	(AT) ₃₀	224	28	PVE29	(TA) ₁₁	235	43	PVE44	(GAG) ₈	159
14	PVE15	(AT) ₁₅	238	29	PVE30	(TGTTCA) ₃	214				
15	PVE16	(AT) ₂₂	237	30	PVE31	(GAAAGA) ₄	246				

Ghi chú: [PCR]_E: kích thước dự kiến.

Kết quả thu được cho thấy, 60,5% PVE được thiết kế dựa trên kiểu lặp 2 nucleotide (19 chỉ thị) và 3 nucleotide (7 chỉ thị) với độ lặp cao (Bảng 2). Tương tự, 57,1% PVG, tương ứng 40 chỉ thị, được thiết lập từ kiểu lặp 2 nucleotide, 11,3% PVG (8 chỉ thị) được xác định từ kiểu lặp 3 nucleotide và 31,6% PVG (22

chỉ thị) được thu thập từ kiểu lặp 4 nucleotide trở lên (Hình 1A). Trong khi đó, 40 chỉ thị PVM được thiết kế dựa trên kiểu lặp 3 nucleotide (16 chỉ thị, chiếm 40%), kiểu lặp đa nucleotide (14 chỉ thị, chiếm 35%) và motif lặp 2 nucleotide (10 chỉ thị, chiếm 25%) (Hình 1B).



Hình 1. Thiết kế chỉ thị phân tử SSR từ cơ sở dữ liệu (A) GSS và (B) microsatellite

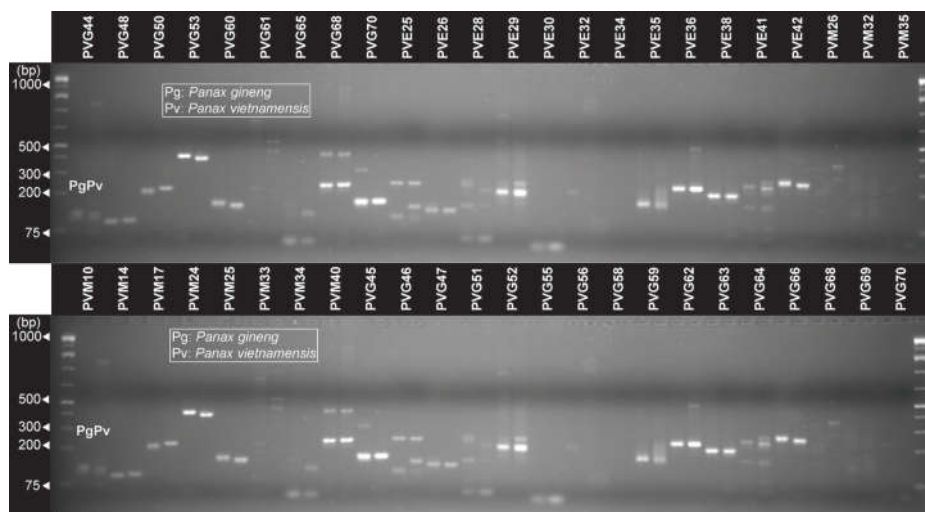
Kiểu lặp được xác định nhiều nhất là 2 nucleotide -AT- với số lần lặp lớn hơn 10 (Bảng 2, Hình 1) và dạng -AA- hoặc -TT- tồn tại trong kiểu lặp lớn hơn 4 nucleotide (Bảng 2, Hình 1). Các kiểu lặp này thường được lặp với tần suất rất cao, ví dụ như $(AT)_n$ với $n \geq 10$ ở các môi PVE (Bảng 2). Đây là các nucleotide lặp xuất hiện phổ biến nhất được ghi nhận ở hệ gen thực vật (Lagercrantz *et al.*, 1993). Nghiên cứu trước đây cũng cho thấy chỉ thị phân tử được thiết kế dựa trên những motif -AT-, -AA- hoặc -TT- thường được sử dụng để phân biệt quan hệ giữa các loài (Lagercrantz *et al.*, 1993).

3.2. Kết quả khảo sát khả năng phản ứng của chỉ thị phân tử thiết kế cho *P. vietnamensis*

Trong nghiên cứu này, bộ chỉ thị gồm 200 cặp môi SSR đã được thiết kế và tổng hợp. Nhiệt độ gắn mỗi của các chỉ thị dao động từ $52 \div 60^\circ\text{C}$ (Bảng 1). Kích thước dự kiến đoạn khuếch đại từ các môi PVE từ $150 \div 298$ bp (Bảng 2), trong khi mỗi PVG và PVM có thể nhận được các đoạn có kích thước

lần lượt từ $150 \div 319$ bp (Hình 1A) và $100 \div 250$ bp (Hình 1B). Tiếp theo, khả năng khuếch đại của chỉ thị SSR thiết kế dựa trên hệ gen *P. ginseng* phục vụ cho kiểm định và phân tích di truyền *P. vietnamensis* được kiểm tra thông qua phản ứng PCR và điện di trên gel agarose 2%.

Kết quả khảo sát cho thấy 145 trên tổng số 200 chỉ thị SSR, chiếm tỉ lệ 72,5%, có khả năng khuếch đại đoạn nhân từ cả 2 mẫu ADN *P. ginseng* và *P. vietnamensis*. Cụ thể, 30 chỉ thị PVM (trên tổng số 40), 51 chỉ thị PVG (trên tổng số 70) và 34 chỉ thị PVE (trên tổng số 43) và 30 chỉ thị lục lặp (trên tổng số 47) (Hình 2). Có thể nhận thấy rằng, hầu hết các chỉ thị SSR được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu microsatellite và EST đều có khả năng khuếch đại đoạn trình tự của *P. vietnamensis* rất cao, so với chỉ thị SSR được xây dựng từ GSS và hệ gen lục lặp. Bên cạnh đó, sản phẩm được nhân lên từ 134 trên tổng số 145 (92,4%) chỉ thị SSR có kích thước như dự kiến. Phần lớn sản phẩm PCR có kích thước từ $100 \div 300$ bp (Hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di 48 chỉ thị phân tử trên gel agarose 2% với thang ADN chuẩn.
Pg: ADN tách chiết từ củ *P. ginseng*; Pv: ADN tách chiết từ mẫu lá *P. vietnamensis*

Những kết quả này cho thấy hệ gen nhân của *P. vietnamensis* tương đối tương đồng so với loài tham chiếu *P. ginseng*. Nghiên cứu ứng dụng trình tự microsatellite và EST trên hệ gen nhân của *P. ginseng* để thiết kế chỉ thị phân tử phục vụ kiểm định và phân tích di truyền *P. vietnamensis* là hướng đi mới và có khả thi. Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm sàng lọc những chỉ thị cho kết quả đa hình giữa *P. ginseng* và *P. vietnamensis* nhằm để xuất bộ chỉ thị cho kiểm định và phân tích di truyền các loài sâm Việt.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã thiết kế và chạy khảo sát được 200 chỉ thị phân tử SSR có độ lặp cao cho *P. vietnamensis*. Trong đó, 43 chỉ thị PVE được thiết kế từ cơ sở dữ liệu EST, 70 chỉ thị PVG và 40 chỉ thị PVM lần lượt được xây dựng từ dữ liệu GSS và microsatellite từ hệ gen nhân tham chiếu của *P. ginseng* và 47 chỉ thị dựa trên hệ gen lục lặp. Dạng -AT-, -AA- và -TT- được xác định là các kiểu lặp phổ biến nhất được thiết kế cho các chỉ thị SSR.

Kiểm chứng bằng kỹ thuật PCR cho thấy 134 trên tổng số 145 chỉ thị SSR có khả năng khuếch đại đoạn ADN của *P. ginseng* và *P. vietnamensis* với kích thước băng từ 100÷300 bp như thiết kế. Hầu hết các chỉ thị kiểm chứng đều là chỉ thị PVM và PVE được xây dựng trên cơ sở dữ liệu microsatellite và EST.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm tiến hành định danh phân tử và bước đầu phân loại sâm Ngọc Linh bằng chỉ thị SSR.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ từ đề tài “Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị phân tử phục vụ giám định, khai thác và phát triển sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*)” (mã số: ĐTDL.CN-29/16) thuộc Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chu Đức Hà, Lê Hùng Linh, Nguyễn Văn Kết, Lê Tiến Dũng, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Dương Tấn Nhật, 2018. Sâm Ngọc Linh: Cây dược liệu quý mang thương hiệu quốc gia. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 1(706): 32-35.
- Nguyễn Tập, 2005. Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam. *Tạp chí Dược liệu*, 10(3): 71-76.
- Duc, N. M., Kasai, R., Ohtani, K., Aiko, I., Nguyen, T. N., Yamasaki, K. and Tanaka, O., 1994. Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. collected in Central Vietnam. III. *Chem Pharm Bull*, 42(3): 634-640.
- Jayakodi, M., Choi, B.-S., Lee, S.-C., Kim, N.-H., Park, J. Y., Jang, W., Lakshmanan, M., Mohan, S. V. G., Lee, D.-Y., Yang, T.-J., 2018. Ginseng Genome Database: An open-access platform for genomics of *Panax ginseng*. *BMC Plant Biol*, 18(1): 62.

- Jo, I. H., Kim, Y. C., Kim, D. H., Kim, K. H., Hyun, T. K., Ryu, H., Bang, K. H., 2017. Applications of molecular markers in the discrimination of *Panax* species and Korean ginseng cultivars (*Panax ginseng*). *J Ginseng Res*, 41(4): 444-449.
- Kim, N. H.; Choi, H. I.; Ahn, I. O.; Yang, T. J., 2012. EST-SSR marker sets for practical authentication of all nine registered ginseng cultivars in Korea. *J Ginseng Res*, 36(3): 298-307.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L., 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acid Res*, 21(5): 1111-1115.
- Li, J., Wang, S., Jing, Y., Wang, L., Zhou, S., 2013. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction. *Chinese Bull Bot*, 48: 1-7.
- Morgante, M., Pfeiffer, A., Jurman, I., Paglia, G., Olivieri, A. M., 1998. PCR analysis of SSR polymorphisms in plants using agarose gels. In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds) *Molecular tools for screening biodiversity: Plants and animals*. Springer Netherlands, 206-207.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132: 365-386.
- Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Miller, V., Ostell, J., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., 2008. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue): D13-D21.
- Um Yurry, Jin M.L., Kim O.T., Kim Y.C., Kim S.C., Cha S.W., Chung K.W., 2016. Identification of Korean ginseng (*Panax ginseng*) cultivars using simple sequence repeat markers. *Plant Breed Biotech*, 4(1): 71-78.

Design and validation of the molecular markers for genetic analysis of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*)

Khuat Thi Mai Luong, Nguyen Thi Minh Nguyet, Chu Duc Ha, Tran Thi Hoa My, Dinh Van Phe, Le Hung Linh

Abstract

Genetic analysis of medical plants, especially of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*) is considered to be one of the most fascinating unsolved issues. In this study, a set of the simple sequence repeats (SSRs) molecular markers for *P. vietnamensis* was established based on the reference nuclear and chloroplast genome of the Korean ginseng (*P. ginseng*). As a result, a total of 200 SSRs (out of 600 designed markers) was used to amplify DNA of *P. vietnamensis* and *P. ginseng*. Among them, three di-nucleotide motifs, -AT-, -AA- and -TT- were identified to be the most common repeats in the design of SSR markers for *P. vietnamensis*. PCR-validation confirmed that 134 SSR markers were successfully amplified the approximately 100÷300-bp-sequences of both *P. ginseng* and *P. vietnamensis*. Our study would provide an initial background for the genetic analysis of the *Panax* species in Vietnam.

Keywords: Molecular marker, PCR, Vietnamese ginseng, design

Ngày nhận bài: 18/9/2018
Ngày phản biện: 28/9/2018

Người phản biện: Trần Thanh Mến
Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

NGHIÊN CỨU TÁC ĐỘNG CỦA NANO BẠC ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÁT SINH HÌNH THÁI TRONG NUÔI CẤY *IN VITRO* HOA ĐỒNG TIỀN

Bùi Thị Thu Hương¹, Đồng Huy Giới¹,
Trần Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Thị Ngọc Quỳnh¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích đánh giá tác động của nano bạc đến quá trình phát sinh hình thái của hoa đồng tiền nuôi cấy mô từ nguồn vật liệu là các mẫu lá *in vitro*. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng: (i) Môi trường thích hợp nhất cho việc tạo mô sẹo từ mẫu lá *in vitro* hoa Đồng tiền là môi trường MS có bổ sung 30 g/l saccharose; 6,5 g/l agar; 1,5 mg/l 2,4D; pH 5,7 và 10 ppm nano bạc, với tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất đạt 95,56%, mô sẹo mềm và có màu vàng sáng; (ii) Môi trường MS có bổ sung 0,7 mg/l BA; 0,1 mg/l IAA và 4 ppm nano bạc cho hiệu quả tái sinh chồi từ mô sẹo tốt nhất, tỉ lệ tái sinh chồi đạt 84,45%, số chồi trung bình đạt 3,29 chồi/mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy; (iii) Môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BAP; 0,1 mg/l α -NAA và 2 ppm nano bạc cho hiệu quả nhân nhanh chồi hoa Đồng tiền tốt nhất, hệ số nhân chồi đạt 8,22 lần, chiều cao chồi trung bình đạt 5,75 cm sau 6 tuần nuôi cấy; (iv) Chồi *in vitro* hoa Đồng tiền ra rễ hiệu quả nhất trong môi trường MS có bổ sung 50 g/l saccharose; 6,5 g/l agar; 1,0 mg/l α -NAA và 4 ppm nano bạc, tỉ lệ chồi ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình là 5,73 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình đạt 5,93 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: Hoa đồng tiền, lá *in vitro*, môi trường MS, nano bạc

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa Đồng tiền (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook. F) là một trong những loài hoa đẹp, có giá trị kinh tế cao, được trồng phổ biến ở Việt Nam và nhiều quốc gia trên thế giới, tuy nhiên hiện nay nguồn giống tốt cung cấp cho sản xuất còn thiếu, người trồng hoa thường phải mua giống không rõ nguồn gốc, có khi mua phải giống bị thoái hóa, giống bị nhiễm bệnh (Đỗ Năng Vịnh, 2003).

Phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật đã và đang được áp dụng khá phổ biến trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Một trong những ưu điểm nổi bật của nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô là hệ số nhân cao, trong một thời gian ngắn có thể tạo ra một số lượng lớn cây giống tương đối đồng nhất, cây giống sạch bệnh, giá thành thấp. Hiện nay đã có một số nghiên cứu thành công trong việc nhân giống hoa đồng tiền bằng nuôi cấy mô từ các nguồn vật liệu khác nhau như nụ hoa non, cuống lá, phiến lá (Bhavya Bhargava *et al.*, 2013; Shylaja *et al.*, 2014; Nguyễn Thị Mỹ Duyên và Trương Thị Hằng, 2014). Tuy nhiên một số nghiên cứu trên cho kết quả chưa thực sự tốt, bên cạnh đó việc sử dụng để hoa non làm nguyên liệu cho nuôi cấy mô sẽ làm thất thoát đi một số lượng lớn các bông hoa đẹp, vì vậy rất cần thiết tìm kiếm một loại vật liệu khác phù hợp hơn để thay thế.

Vật liệu nano nói chung và nano bạc nói riêng đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong đời sống những năm gần đây, tạo nên những bước đột phá trong nhiều lĩnh vực. Nano bạc đang được chú ý sử

dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật do đặc điểm kháng khuẩn tuyệt vời của nó, bên cạnh đó nano bạc còn có vai trò tích cực tới sự phát sinh hình thái của cây *in vitro* (Rostami and Shahsavar, 2009; Shokri *et al.*, 2015).

Xuất phát từ những lí do nêu trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm nhân giống hoa Đồng tiền bằng nuôi cấy mô từ nguồn vật liệu là lá *in vitro*, đồng thời bước đầu sử dụng nano bạc nhằm nâng cao hiệu quả của quá trình nuôi cấy.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chồi *in vitro* giống hoa Đồng tiền ĐTH125 có nguồn gốc từ Hà Lan. Dung dịch nano bạc với kích thước hạt dao động 15 - 20 nm được điều chế tại Bộ môn Sinh học, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam; môi trường MS (T. Murashige & F. Skoog, 1962) và một số loại hóa chất cần thiết khác sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện thí nghiệm

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH là 5,7 và được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1,1 atm trong 15 phút. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCB), mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 15 mẫu.

Điều kiện phòng nuôi: Nhiệt độ 25°C - 27°C; Cường độ ánh sáng: 2400 lux - 2600 lux; Độ ẩm: 70%; Thời gian chiếu sáng: 16 h chiếu sáng/ngày.

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam