

# THỬ NGHIỆM

Số 25 Tháng 01/2020

ISSN 2588 - 1469

NGÀY NAY



**TẠP CHÍ CỦA HỘI CÁC PHÒNG THỬ NGHIỆM VIỆT NAM**

\*Web: [www.vinalab.org.vn](http://www.vinalab.org.vn)

\*Email: [tapchi@vinalab.org.vn](mailto:tapchi@vinalab.org.vn)



HAPPY NEW YEAR

**2020**

**TỔNG BIÊN TẬP**  
PGS. TS Hoàng Minh Lương

**PHÓ TỔNG BIÊN TẬP**  
Nguyễn Hữu Dũng

**TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ**  
Nguyễn Thị Mai Hương

**TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP**  
Đặng Thị Huệ

**HỘI ĐỒNG KHOA HỌC**  
GS.TS Chu Phạm Ngọc Sơn  
GS.TS Nguyễn Công Khanh  
GS.TSKH Phạm Luận  
PGS.TS Trần Chương Huyền  
PGS.TS Trịnh Văn Quý  
TS Tô Kim Anh  
TS Vũ Hồng Sơn  
KS. Nguyễn Thế Hùng

**BAN BIÊN TẬP**  
PGS.TS Tô Long Thành;  
Vũ Hải; Hoàng Nam; Đỗ Quyền

**THIẾT KẾ**  
Bùi Huệ

**TÒA SOẠN:**  
Tầng 4, Tòa nhà 130 Nguyễn Đức Cảnh,  
Phường Tương Mai, Quận Hoàng Mai,  
Tp.Hà Nội  
Điện thoại: 0246.683.9670  
Fax: 0243.634.3449  
Email: [thungiemngaynay@vinalab.org.vn](mailto:thungiemngaynay@vinalab.org.vn)  
hoặc [ad@vinalab.org.vn](mailto:ad@vinalab.org.vn)  
Website: <http://www.vinalab.org.vn>

**LIÊN HỆ QUẢNG CÁO &  
ĐẶT MUA AN PHẨM**  
Hotline: 0979 933 466

Giấy phép xuất bản số 293/GP-BTTTT cấp ngày  
23/6/2017 của Cục Báo chí, Bộ TT&TT  
Kỳ hạn xuất bản: 1 kỳ/1 tháng.  
Số lượng in: 1000 bản/kỳ

06

Hội Vinalab sẽ có một diện mạo mới

01

## NGHIÊN CỨU & TRAO ĐỔI

09

Nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nấm  
Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*)  
trên giả thể tổng hợp và giả thể nhộng  
tằm nguyên con

16

An toàn và quản lý chất lượng nhóm chất  
điều vị trong công nghiệp thực phẩm

27

Xác thực sâm Ngọc Linh dựa vào chỉ thị  
ADN trên hệ gen lặp thể

37

Nghiên cứu quy trình sản xuất giống và  
trồng thử nghiệm nấm rơm (*Volvariella  
volvacea*) trên phế phụ phẩm nấm bào  
ngư (*Pleurotus* sp.) tại Quảng Ngãi

44

Dinh dưỡng và axit amin cho lợn, gà

## AN TOÀN THỰC PHẨM

56

Quản lý phụ gia thực phẩm bằng các quy  
chuẩn kỹ thuật

58

Xu hướng mới phát triển sản phẩm thịt  
mất

## LABS

61

Các phương pháp thử nghiệm thực phẩm  
của FDA - Hoa Kỳ

## XÁC THỰC SÂM NGỌC LINH DỰA VÀO CHỈ THỊ ADN TRÊN HỆ GEN LẠP THỂ

Nguyễn Tường Vân<sup>1</sup>, Trần Mỹ Linh<sup>1</sup>, Nguyễn Chí Ma<sup>2</sup>, Lê Quang Trung<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học, <sup>2</sup>Viện Hóa sinh Biển, <sup>3</sup>Viện An toàn Thực phẩm,

Công ty CP Chứng nhận và Giám định VinaCert

### TÓM TẮT

Trong số các loài thuộc chi sâm (*Panax* L.) ở nước ta, bao gồm sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*), tam thất hoang lá xẻ (*P. bipinnatifidus*), tam thất hoang lá tròn (*P. stipuleanatus*)... Hiện nay, củ sâm Ngọc Linh có giá trị thương mại cao, tới hàng trăm triệu đồng/kg. Củ của 3 loài này rất khó phân biệt dựa vào các đặc điểm hình thái. Vì vậy củ sâm Ngọc Linh giả, củ sâm Ngọc Linh trộn lẫn củ tam thất hoang... có nguy cơ đang lưu hành trên thị trường nước ta. Xác thực chính xác sâm Ngọc Linh đóng vai trò quan trọng nhằm bảo vệ thương hiệu của sản phẩm được coi như "quốc bảo" này của Việt Nam. Trong ứng dụng này, 8 mẫu lá, mầm lá hoặc rễ từ 8 củ sâm Ngọc Linh của khách hàng (SP1-SP8) được thu thập để tách ADN tổng số, nhân bản, giải trình tự và phân tích đa hình trình tự ADN các đoạn gen *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể. Trong 8 mẫu, SP1, SP2, SP4, SP5, SP6, SP8) là sâm Ngọc Linh; còn SP3 và SP7 là tam thất hoang. Ngoài ra, trong 6 mẫu được xác định là sâm Ngọc Linh, SP4 là củ chấp của 2 đoạn, với một đoạn (SP4.1) là sâm Ngọc Linh và đoạn kia (SP4.2) là tam thất hoang. Trình tự đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* của các mẫu có mức tương đồng từ 99,8-100% khi so sánh với cùng đoạn trên hệ gen lập thể của sâm Ngọc Linh hoặc tam thất hoang. Các mẫu sâm Ngọc Linh có khoảng cách di truyền tin cậy so với các loài sâm khác trên cây chủng loại (giá trị bootstrap từ 60-100%). Trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* của sâm Ngọc Linh có 8 và 14 điểm đột biến đặc trưng, là các chỉ thị đặc hiệu để phân biệt với các loài khác trong chi sâm. Các chỉ thị này có thể áp dụng không chỉ để xác thực sâm Ngọc Linh mà còn một số loài khác thuộc chi sâm.

**Từ khóa:** Xác thực, sâm Ngọc Linh, chỉ thị phân tử *trnC-rps16* và *trnE-trnM*, hệ gen lập thể.

### ABSTRACT

In Vietnam, among *Panax* species, including *Panax vietnamensis*, *P. bipinnatifidus*, *P. stipuleanatus*..., roots of *P. vietnamensis* have been recently listed as high as 100 millions VND/kg. It is not easy to differentiate roots of these three species with morphological characters. Counterfeit roots of *P. vietnamensis* and roots of this species mixed with those of *P. bipinnatifidus* and *P. stipuleanatus* have been traded and consumed rampantly on the market. Precise and accurate authenticity of *P. vietnamensis* plays an important role in order to protect this "National treasure" product of Vietnam. In this study, 8 samples (SP1-SP8) from 8 roots of *P. vietnamensis* provided by customers were collected for total DNA extracting, *trnC-rps16* and *trnE-trnM* fragments amplifying with PCR and sequencing. The samples were authenticated based on nucleotide sequence polymorphism of the 2 fragments on *P. vietnamensis* chloroplast genomes. Of 8 samples, SP1, SP2, SP4, SP5, SP6, SP8 were determined to be *P. vietnamensis*, while SP3 and SP7 were either *P. bipinnatifidus* or *P. stipuleanatus*. Among the 6 *P. vietnamensis* samples, tube of SP4 was mixed with 2 pieces (SP4.1, SP4.2), of which SP4.1 was re-tested to be *P. vietnamensis* and SP4.2 to be either *P. bipinnatifidus* or *P. stipuleanatus*. High homology level (99,8-100%) was found when aligned the *trnC-*

---

*rps16* and *trnE-trnM* sequences of the samples with the same regions on chloroplast sequences of either *P. vietnamensis*, *P. bipinnatifidus* or *P. stipuleanatus*. *P. vietnamensis* samples were significantly different from other *Panax* species on phylogenetic trees with bootstrap values from 60-100%. Along *trnC-rps16* and *trnE-trnM* regions of *P. vietnamensis*, there were 8 and 14 SNPs, respectively, which were species-specific and could help to distinguish this species from others in the *Panax* genus. These markers could be applied not only to authenticate *P. vietnamensis* but also some other *Panax* species.

**Keywords:** Authenticity, *Panax vietnamensis*, *trnC-rps16* and *trnE-trnM* markers, plastid genome.

## 1. MỞ ĐẦU

Các loài trong chi sâm (*Panax* L.) thuộc họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*), phân bố chủ yếu ở Châu Á, Bắc Mỹ và được gọi theo nguồn gốc như sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng* C.A.Mey), sâm Mỹ (*P. quinquefolius* L.)... Ở Việt Nam, một số loài thuộc chi sâm đã được xác định như tam thất hoang lá tròn (*Panax stipuleanatus* Tsai & Feng, 1975), tam thất hoang lá xẻ (*Panax bipinnatifidum* Sem. 1868), tam thất bắc (*P. notoginseng* (Burk.) Chow & Huang 1975), sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. 1985)... (Nguyễn Văn Đạt và CS., 2017). Vai trò y học và giá trị thương mại của các loại sâm tùy thuộc vào hàm lượng và thành phần các chất thuộc nhóm saponin có trong củ (rễ) sâm (Yuan et al., 2010; Yang et al., 2016). Trong các loại sâm, sâm Ngọc Linh có giá trị hàng trăm triệu đồng/kg. Có thể dựa vào đặc điểm hình thái của cả cây sâm để phân biệt sâm Ngọc Linh với một số loài khác thuộc chi sâm. Nhưng thực tế, ngoài thị trường chủ yếu bán sản phẩm là củ sâm. Trong khi củ sâm Ngọc Linh tươi, khô về hình thái rất giống với củ của một số loài khác như tam thất lá xẻ, tam thất lá tròn... nên người tiêu dùng rất khó phân biệt. Vì lợi nhuận, gian lận thương mại bằng cách trộn lẫn củ của loài sâm có hình thái tương tự với củ sâm Ngọc Linh có nguy cơ đang xảy ra trên thị trường của nước ta.

Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng các chỉ thị hóa học là hàm lượng hoặc thành phần đặc thù một số chất thuộc nhóm saponin hoặc các chất đồng vị bền có trong sâm để xác thực và truy xuất nguồn gốc các loài sâm (Yuan et al., 2010; Yang et al., 2016; Kim et al., 2015; Chung et al., 2017). Tuy nhiên, bên cạnh các yêu cầu về thiết bị và hóa chất đắt tiền, đòi hỏi lượng mẫu lớn cũng là hạn chế để áp dụng 2 loại chỉ thị này, đặc biệt với sâm Ngọc Linh. 100 gam mẫu củ có thể phải chi phí tới hàng chục triệu đồng. Đồng thời, khách hàng không muốn cắt củ sâm của mình để đi xác thực. Để thay thế, đã có nhiều nghiên cứu dựa vào đa hình trình tự ADN trên vùng/đoạn gen của các loài trong chi sâm nhằm đưa quan hệ chủng loại, xác định mức tương đồng cũng như sai khác di truyền giữa chúng, làm cơ sở để xác định các chỉ thị phân tử định loại. Mỗi loại chỉ thị ADN thường chỉ phù hợp với từng loại/nhóm nền mẫu. Với các loài trong chi sâm có bộ nhiễm sắc thể tứ bội, việc áp dụng các chỉ thị từ gen trong nhân tế bào như 18S, ITS, 28S rRNA hoặc các gen đích có thể xác định được ở mức loài, nhưng không thể hiện chính xác được quan hệ tiến hóa của các loài trên cây chủng loại cũng như khó xác định các đột biến điểm đặc trưng (SNPs) là các chỉ thị phân tử cho từng loài (Choi và Wen 2000; Wen et al., 2001; Shi et al., 2015; Lê Thanh Hương và CS., 2017). Vì vậy, các chỉ thị xác định trên hệ gen lập thể có thể là lựa chọn thay thế để xác thực chính xác các loài sâm, trong đó có sâm Ngọc Linh. Nghiên cứu gần đây của Manzanilla et al. (2018) đã chỉ ra rằng, vùng *trnC-rps16* và vùng *trnE-trnM* có đa hình trình tự ADN cao nhất (22,98-24,05%) trên trình tự hệ gen lập thể của 7 loài trong chi sâm và có thể sử dụng làm chỉ thị để xác thực loài.

Trong ứng dụng này, 8 củ sâm Ngọc Linh của khách hàng được xác thực dựa vào phân tích so sánh đa hình trình tự ADN đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* của các mẫu với cùng đoạn trong hệ gen lập thể trên

---

ngân hàng gen của sâm Ngọc Linh và các loài khác trong chi sâm theo các chỉ tiêu: 1) quan hệ chủng loại và khoảng cách di truyền tin cậy của mẫu với các loài sâm khác; 2) mức tương đồng về trình tự ADN giữa các mẫu với sâm ngọc Linh và tam thất hoang, và 3) chỉ thị phân tử là các SNPs trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể để xác thực sâm Ngọc Linh. Đây là nghiên cứu đầu tiên áp dụng chỉ thị phân tử trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể để xác thực sản phẩm củ sâm Ngọc Linh lưu thông trên thị trường nước ta. Kết quả nghiên cứu nhằm góp phần bảo vệ quyền lợi của khách hàng cũng như bảo vệ thương hiệu của sản phẩm được coi như “quốc bảo” này của Việt Nam.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Để xác thực sâm Ngọc Linh, 8 mẫu lá/mầm lá/rễ (3-5gam/mẫu) thu từ 8 củ sâm Ngọc Linh do khách hàng cung cấp đầu năm 2019 được ký hiệu từ SP1 đến SP8 và SP4.1 và SP4.2 ký hiệu cho mẫu sâm SP4 có củ được chấp từ 2 đoạn. Ký hiệu các mẫu sâm, danh sách và mã truy cập các đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* trong hệ gen của 8 loài thuộc chi sâm tham khảo trong nghiên cứu này được thể hiện ở Hình 1A, 1B.

ADN tổng số của các mẫu sâm được tách bằng Qiagen Dneasy plant extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhân bản và giải trình tự đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* sử dụng các cặp mồi nhân và các phương pháp theo Manzanilla et al. (2018). Trong đó, các cặp mồi để nhân đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* gồm *TrnC-rps16F*: 5'-GCAAATGACAAGTCCAAGGC-3' và *TrnC-rps16R*: 5'-GCTATTACTC TAGATTGTAT-3' và cặp mồi nhân đoạn *trnE-trnM* gồm *trnE-trnMF*: 5'-TGAATCATTC ATTAGATTTCG C-3' và *trnE-trnMR*: 5'-GTATAGTAGT TTAGTGAATA G-3'. Các phản ứng PCR được chuẩn bị theo PCR Core kit with Taq DNA polymerase (Sigma). Các đoạn gen được nhân bản với 30 chu trình nhiệt, mỗi chu trình gồm: 1 phút ở 92°C, 40 giây ở 53°C cho đoạn *trnC-rps16*, 55°C cho đoạn *trnE-trnM* và 1 phút ở 72°C. Các thí nghiệm trên được tiến hành tại Phòng thí nghiệm PLAN và APNA của Trường Đại học VUB, Vương quốc Bỉ năm 2019. Sản phẩm PCR của cả 2 đoạn gen của 8 mẫu được gửi cho Công ty Macrogen Inc. (Korea) để giải trình tự ADN. Khoảng cách di truyền tin cậy giữa các loài trong chi sâm dựa vào giá trị bootstrap (%) trên cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Neighbor Joining trong phần mềm Mega 3.1 (Kumar et al., 2004). Sai khác di truyền (0,000-1,000) giữa các mẫu trong loài và giữa các loài được xác định trên phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon BioSoft). Mức tương đồng (%) về trình tự ADN trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể của các mẫu so sánh với cùng đoạn trên hệ gen lập thể của Sâm Ngọc Linh đã công bố trên Ngân hàng Gen được xác định trên phần mềm DNAMAN4.15 (Lynnon BioSoft). Chỉ thị phân tử để xác thực sâm Ngọc Linh là các SNPs trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể của loài này sau khi so sánh với cùng đoạn trên hệ gen lập thể của các loài khác trong chi sâm trên phần mềm Mega 3.1 (Kumar et al., 2004).

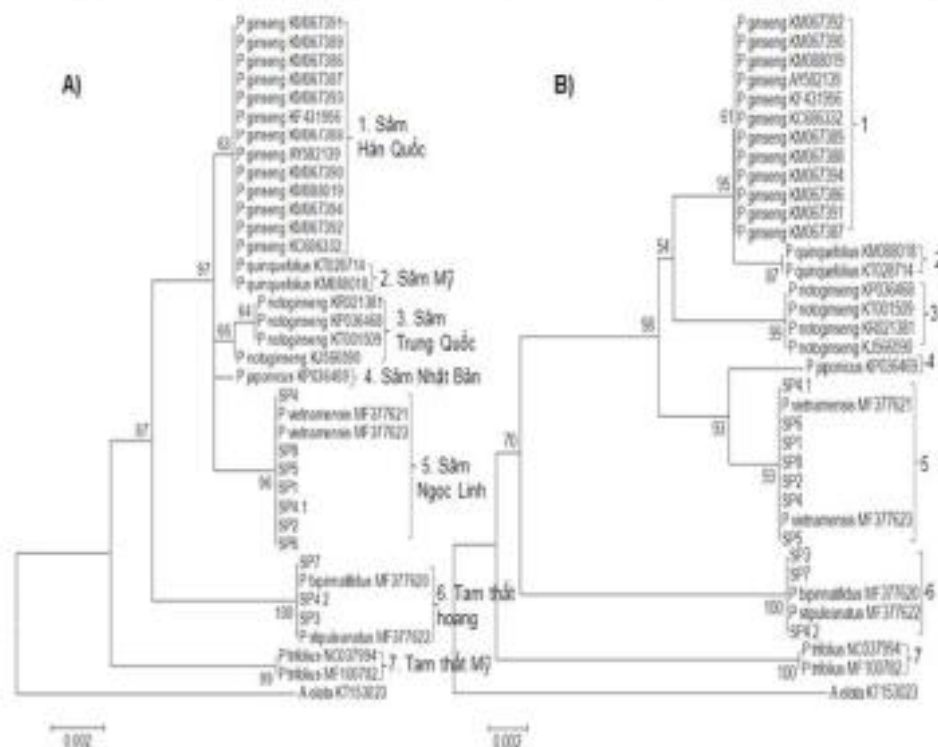
## III. KẾT QUẢ

### 3.1. Phân tích quan hệ chủng loại của các mẫu

Các đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể của 8 mẫu sâm, sau khi giải trình tự, so sánh và xác định các vùng đa hình với cùng đoạn tham khảo của 8 loài trong chi sâm trên ngân hàng gen, có chiều dài khoảng 1400bp và 1000bp. Đa hình trình tự ADN của 2 đoạn đều nhóm các mẫu nghiên cứu và tham khảo theo từng loài/cặp loài trên cây phát sinh chủng loại, theo thứ tự từ tam thất Mỹ, tam thất hoang, sâm Ngọc Linh, sâm Nhật Bản, sâm Trung quốc, sâm Mỹ đến sâm Hàn Quốc với khoảng cách di truyền tin cậy từ 60-100% (Hình 1A, B). Các mẫu SP1, SP2, SP4, SP4.1, SP5, SP6, SP8 cùng nhánh với sâm Ngọc Linh, còn các mẫu SP3, SP4.2 và SP7 lại cùng nhánh với tam thất hoang với khoảng cách di truyền với các nhánh khác từ 93-100%. Đa hình trình tự của cả 2 đoạn lập thể đều không tách chủng loại được 2 loài tam thất hoang. Còn với cặp loài sâm Mỹ và sâm Hàn quốc, *trnE-trnM* đã tách chúng thành 2 nhánh cây với khoảng cách di truyền với các



nhánh khác từ 61-87% (Hình 1B), trong khi đoạn trnC-rps16 không đủ mức đa hình để tách 2 loài này trên cây chủng loại (Hình 1A), cho thấy trnE-trnM có mức đa hình trình tự ADN cao hơn của đoạn trnC-rps16.



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại dựa vào đa hình trình tự ADN của đoạn trnC-rps16 lập thể (A) và đoạn trnE-trnM lập thể (B) của mẫu nghiên cứu và một số loài trong chi sâm.

SP1-SP8, SP4.1-SP4.2: các mẫu sâm trong nghiên cứu này; P.: *Panax* L., chi sâm. KM067391, MF100782...: mã truy cập đoạn trnC-rps16 và trnE-trnM lập thể của các loài sâm trên ngân hàng gen. Các số 61-100: giá trị bootstrap (%) là khoảng cách di truyền giữa các nhánh cây. A. elata: nhóm ngoại, loài *Aralia elata* trong họ Ngũ gia bì (*Araliaceae*).

### 3.2. Mức tương đồng và sai khác di truyền của các mẫu sâm

Kết quả phân tích mức tương đồng về trình tự ADN và sai khác di truyền khi so sánh đoạn trnC-rps16 và đoạn trnE-trnM lập thể giữa các mẫu nghiên cứu với cùng đoạn trên hệ gen lập thể của sâm Ngọc Linh và tam thất hoang (Bảng 1 và 2) cho thấy các mẫu SP1, SP2, SP4, SP4.1, SP5, SP6, SP8 là sâm Ngọc Linh và các mẫu SP3, SP4.2, SP7 là tam thất hoang.

So sánh trong loài loài, đoạn trnC-rps16 của các mẫu được xác nhận là sâm Ngọc Linh và tam thất hoang được so sánh lần lượt với cùng đoạn trên 2 trình tự của sâm Ngọc Linh (Pv21 và Pv23) và 2 trình



tự của tam thất hoàng (Pb20 và Ps22) trên ngân hàng gen đều có mức tương đồng là 100% và sai khác di truyền giữa các trình tự của từng nhóm loài là 0,000. So sánh khác loài, giữa các đoạn trnC-rps16 lặp thể của tam thất hoàng và sâm Ngọc Linh chỉ có mức tương đồng 99,0% và sai khác di truyền 0,01 (Bảng 1).

Bảng 1. Mức tương đồng về trình tự ADN trên đoạn trnC-rps16 lặp thể và sai khác di truyền giữa các mẫu nghiên cứu với cùng đoạn của sâm Ngọc Linh và tam thất hoàng trên ngân hàng gen.

| Sâm ngọc Linh                    |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Tam thất hoàng |       |       |       |       |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Pv23                             | SP1   | SP2   | SP4.1 | SP4   | SP5   | SP6   | SP7   | Pv21  |       | Pb20           | Pb22  | SP3   | SP4.2 | SP7   |
| Sai khác di truyền (0,000-1,000) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |
| Pb23                             | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP1                              | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP2                              | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP4.1                            | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP4                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP5                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP6                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| SP7                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,010 | 0,010          | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,010 |
| Pb20                             | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 100,0 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Pb22                             | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 100,0 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP3                              | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 100,0 | 100,0          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP4.2                            | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 100,0 | 100,0          | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP7                              | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 99,0  | 100,0 | 100,0          | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 |
| Mức tương đồng (%)               |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |

Chú thích: SP1-SP8, SP4.1-SP4.2 là trình tự ADN đoạn trnC-rps16 lặp thể của các mẫu sâm trong nghiên cứu này. Pv21 và Pv23, trình tự ADN đoạn trnC-rps16 lặp thể của loài sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) với mã truy cập MF377621 và MF377623 trên ngân hàng gen. Pb và Ps, trình tự ADN đoạn trnC-rps16 lặp thể của 2 loài tam thất hoàng (*P. bipinnatifidus* và *P. stipuleanatus*) với mã truy cập MF377620 và MF377622.

Bảng 2. Mức tương đồng về trình tự ADN trên đoạn trnE-trnM lặp thể và sai khác di truyền giữa các mẫu nghiên cứu với cùng đoạn của sâm Ngọc Linh và tam thất hoàng trên ngân hàng gen.

| Sâm ngọc Linh                    |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Tam thất hoàng |       |       |       |       |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Pv23                             | SP1   | SP2   | SP4.1 | SP4   | SP5   | SP6   | SP7   | Pv21  |       | Pb20           | Pb22  | SP3   | SP4.2 | SP7   |
| Sai khác di truyền (0,000-1,000) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |
| Pb23                             | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP1                              | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP2                              | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP4.1                            | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP4                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP5                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP6                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP7                              | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Pb20                             | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,8  | 0,000          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Pb22                             | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 100,0          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP3                              | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 94,8  | 100,0          | 100,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| SP4.2                            | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,8  | 100,0          | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 |
| SP7                              | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,7  | 94,8  | 100,0 | 100,0          | 100,0 | 100,0 | 0,000 | 0,000 |
| Mức tương đồng (%)               |       |       |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |

Chú thích: SP1-SP8, SP4.1-SP4.2 là trình tự ADN đoạn trnE-trnM lặp thể của các mẫu sâm trong nghiên cứu này. Các chú thích khác xem Bảng 1.

So với đoạn trnC-rps16, đoạn trnE-trnM có đa hình trình tự cao hơn (Bảng 2). Các mẫu được xác định là sâm Ngọc Linh có mức tương đồng 100% và sai khác di truyền 0,000 sau khi so sánh trình tự đoạn trnE-trnM với cùng đoạn trên trình tự tham khảo của Pv23, nhưng 2 chỉ tiêu này chỉ đạt 99,8% và 0,002 khi so sánh với trình tự của Pv21. Trong khi, các mẫu sâm được xác nhận là tam thất hoang đều có mức tương đồng 100% và sai khác di truyền là 0,000 khi so sánh với 2 trình tự của Pb20 và Ps22. Đặc biệt, giữa các đoạn trnE-trnM lặp thể của tam thất hoang và sâm Ngọc Linh có mức tương đồng thấp (94,4-94,7%) và sai khác di truyền cao (0,053-0,056), cho thấy tính đặc hiệu của các chỉ thị phân tử trên đoạn trnE-trnM cao hơn so với đoạn trnC-rps16.

### 3.3. Xác định chỉ thị xác thực sâm Ngọc Linh

Trong 8 loài thuộc chi sâm, loài sâm Nhật Bản chỉ có 1 trình tự nên không đưa vào so sánh để xác định chỉ thị. Bảy loài còn lại được tách biệt thành 6 nhánh trên cây chủng loại với khoảng cách di truyền tin cậy (Hình 1A, B) là do đa hình trình tự ADN của các đoạn trnC-rps16, đoạn trnE-trnM lặp thể với 44 và 86 đột biến điểm đặc trưng (SNPs) (Hình 2, 3). Đây là những chỉ thị phân tử để xác thực ở mức loài/cấp loài nghiên cứu trong chi sâm.

|                             |            |             |               |              |       |
|-----------------------------|------------|-------------|---------------|--------------|-------|
|                             | 1          | 1111111112  | 222222223     | 333333334    | 4444  |
|                             | 1234567890 | 1234567890  | 1234567890    | 1234567890   | 1234  |
| #F_ginseng_KM047388         | TT-----CT  | AGC-AG----  | GGGTAATA      | GCA-CTTCTT   | GTCT  |
| #F_ginseng_KM047387         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047391         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KF431956         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KY552139         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047390         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047393         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KC684332         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047386         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM088019         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047394         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047392         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_ginseng_KM047389         | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_quinquefolius_KT028714   | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_quinquefolius_KM088018   | .....      | .....       | .....         | .....        | ..... |
| #F_notoginseng_KJ564590     | ..ATATTT.. | .....       | ..C..         | ..G.....     | ..... |
| #F_notoginseng_KH021881     | ..ATATTTA. | .....       | ..C..         | ..G.....     | ..... |
| #F_notoginseng_KT001509     | ..ATATTTA. | .....       | ..C..         | ..G.....     | ..... |
| #F_notoginseng_KP034468     | ..ATATTTA. | .....       | ..C..         | ..G.....     | ..... |
| #SP8                        | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP1                        | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP2                        | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP6                        | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP4                        | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP4.1                      | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP5                        | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #F_vietnamensis_MF377623    | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #F_vietnamensis_MF377621    | .....      | ..TTAA      | A..TA..G..C.. | .....        | ..... |
| #SP3                        | AA-----    | GA.A.-----  | ...C.A.CA     | A..C....C... | A     |
| #F_atipuleanatus_MF377622   | AA-----    | GA.A.-----  | ...C.A.CA     | A..C....C... | A     |
| #SP7                        | AA-----    | GA.A.-----  | ...C.A.CA     | A..C....C... | A     |
| #SP4.2                      | AA-----    | GA.A.-----  | ...C.A.CA     | A..C....C... | A     |
| #F_bispinnatifidus_MF377620 | AA-----    | GA.A.-----  | ...C.A.CA     | A..C....C... | A     |
| #F_telifolius_KC037994      | .....      | ..TACC----- | ..T....CCA    | ..T.CA---CC  | C-TA  |
| #F_telifolius_MF100762      | .....      | ..TACC----- | ..T....CCA    | ..T.CA---CC  | C-TA  |
|                             | 66333333   | 44T T5555   | 55555555      | 673 T T T T  | 7     |

Hình 2. Phân tích đột biến điểm dựa vào đa hình trình tự đoạn trnC-rps16 lặp thể của sâm Ngọc Linh và một số loài thuộc chi sâm.





xác thực (SP1, SP2, SP4.1, SP5, SP6, SP8); 11 cho Sâm Trung Quốc; 1 cho Sâm Mỹ và 9 cho cặp loài sâm Hàn Quốc và Sâm Mỹ. Như vậy, 2 nhóm chỉ thị trên có thể xác thực 3 loài trong chi sâm gồm Tam thất Mỹ, sâm Ngọc Linh, Sâm Trung Quốc và 2 cặp loài gồm tam thất lá tròn và tam thất lá xẻ cũng như cặp sâm Hàn Quốc và Sâm Mỹ. Tuy nhiên, cả hai đều không đủ mức đa hình để phân biệt được 2 cặp loài này.

#### **IV. THẢO LUẬN**

##### **4.1. Các chỉ thị phân tử để xác thực sâm Ngọc Linh**

Đa hình trình tự ADN của một số vùng trên hệ gen lập thể được ứng dụng rộng rãi để nghiên cứu chủng loại, định danh... các loài thực vật, do hệ gen này tiến hóa ổn định với số lượng các đột biến điểm đặc trưng (SNPs) cao (Nock et al., 2011). Đa hình trình tự 2 vùng gen của các mẫu trong nghiên cứu này đã phản ánh thứ tự chủng loại của các loài trong chi sâm, từ tam thất Mỹ, tiếp đến tam thất hoang và các loài sâm (Hình 1A, B). Kết quả này phù hợp với công bố của Manzanilla et al. (2018) cho rằng tam thất Mỹ (*P. trifolius*) là loài cổ trong chi sâm, tiếp đến là tam thất hoang như *P. bipinnatifidus*, *P. stipuleanatus*..., và các loài sâm như sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis*), sâm Trung Quốc (*P. notoginseng*), sâm Mỹ (*P. quinquefolius*), sâm Hàn Quốc (*P. ginseng*)... Các mẫu của từng loài được nhóm trong cây chủng loại thành từng nhánh cây riêng biệt với khoảng cách di truyền tin cậy (giá trị bootstrap từ 60-100%) đã phản ánh đa hình trình tự ADN cao của 2 vùng gen *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lập thể. Trong nghiên cứu này, 44 và 86 SNPs trên 2 vùng gen là các chỉ thị để phân biệt các loài trong chi sâm, bao gồm 8 SNPs trên vùng gen *trnC-rps16* và 14 SNPs trên vùng gen *trnE-trnM* là các chỉ thị để xác thực sâm Ngọc Linh (Hình 2 và 3). Các chỉ thị này đã chi tiết kết quả nghiên cứu, phân tích hệ gen lập thể của một số loài trong chi sâm của Manzanilla et al. (2018). Theo các tác giả này, trong các vùng trên hệ gen lập thể của các loài thuộc chi sâm, *trnC-rps16* và *trnE-trnM* có đa hình trình tự ADN cao nhất và có thể sử dụng làm chỉ thị hiệu quả để phân biệt các loài trong chi sâm, trong đó có sâm Ngọc Linh. Về kết quả phân tích mức tương đồng và sai khác di truyền dựa vào trình tự vùng gen *trnC-rps16* và *trnE-trnM*, hầu hết các mẫu được xác định là sâm Ngọc Linh hoặc tam thất hoang đều có mức tương đồng tới 100% và sai khác di truyền là 0,000 khi so sánh với trình tự tham khảo trên ngân hàng gen của sâm Ngọc Linh (Pv23) và tam thất hoang (Pb20 và Ps22) (Bảng 1 và 2), cho thấy các mẫu của từng loài có thể từ nguồn gốc cây bố mẹ vì có tương đồng di truyền 100% với Pv23 hoặc Pb20 và Ps22, và xa nguồn gốc với mẫu sâm Ngọc Linh tham khảo Pv21 (mức tương đồng chỉ có 99,8% và sai khác di truyền tới 0,002). Mức tương đồng giữa Pv23 và Pv21 chỉ có 99,8%, cho thấy có thể đây là 2 mẫu sâm từ 2 phân loài hoặc 2 dạng sinh thái khác nhau theo công bố gần đây của Nguyễn Tiến Đạt và CS. (2017). Theo các tác giả này, ở Việt Nam có tới 3 dạng sinh thái của sâm *Panax vietnamensis*, bao gồm sâm Ngọc Linh ở núi Ngọc Linh, Kon Tum, Quảng nam (*Panax vietnamensis* var. *vietnamensis*), sâm Lai Châu ở Lai Châu và Vân Nam (*P. v.* var. *fussidiscus*) và sâm Langbian ở núi Langbian, Lạc Dương, Lâm Đồng (*P. v.* var. *langbianensis*). Như vậy, các mẫu sâm Ngọc Linh xác thực trong nghiên cứu này có thể thuộc 1 trong 3 phân loài trên. Ngoài ra, sai khác di truyền từ 0,010-0,053 khi so sánh các đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* giữa sâm Ngọc Linh và tam thất hoang (Bảng 1 và 2) đã phản ánh kết quả phân tích đột biến điểm đặc trưng (8-14 SNPs) giữa 2 nhóm loài (Hình 2 và 3).

##### **4.2. Những ưu điểm và hạn chế của các chỉ thị xác thực sâm Ngọc Linh**

Áp dụng chỉ thị phân tử ADN để định danh loài, nói chung, có độ chính xác cao, tốn ít thời gian, chi phí thấp, với lượng mẫu nhỏ và từ hầu hết các bộ phận của nền mẫu (Teama, 2018). Trong đó lượng mẫu nhỏ là ưu điểm quan trọng trong việc xác thực sâm Ngọc Linh vì giá 100gam củ của loài này tới hàng chục triệu

đồng. Bên cạnh những ưu điểm, các chỉ thị phân tử nói chung, trong đó có 2 chỉ thị *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lặp thể trong nghiên cứu này đều có nhiều hạn chế. Yêu cầu về trình tự ADN của các vùng gen tương tự của các chủng loại cần định danh trên ngân hàng gen để tham chiếu có lẽ là hạn chế lớn nhất khi áp dụng các chỉ thị DNA cho mục đích này. Ngoài ra, việc xác định tính đặc hiệu của các chỉ thị đến mức loài, phân loài... tốn nhiều thời gian và chi phí. Trong nghiên cứu này, đa hình trình tự ADN của 2 chỉ thị trên không có các SNPs để tách chủng loại và phân biệt cặp loài tam thất hoang lá xẻ (*P. bipinnatifidus*) và tam thất hoang lá tròn (*P. stipuleanatus*) (Hình 1, 2, 3). Các chỉ thị phân tử để phân biệt các cặp loài trên có thể phải kết hợp nghiên cứu, xác định trên các vùng gen khác như 18S, ITS, 28S trên rRNA (Choi và Wen 2000; Wen et al., 2001) hoặc các gen đích (Shi et al., 2015). Ở mức dưới loài, chẳng hạn để xác thực 3 phân loài/3 dạng sinh thái của sâm Ngọc Linh ở 3 vùng địa lý khác nhau dọc nước ta (Nguyễn Văn Đạt và CS., 2017), cần phải thu mẫu đại diện của 3 phân loài và phân tích áp dụng để xác định tính đặc hiệu của 2 chỉ thị theo qui trình của nghiên cứu này. Hơn thế nữa, chất lượng của sâm lại tùy thuộc vào thành phần và hàm lượng các chất trong nhóm saponin (Komatsu et al., 2005; Yuan et al., 2010; Lee et al., 2015). Cũng theo các công bố này, các loài sâm khác nhau, thậm chí cùng loài sâm nhưng trồng ở các vùng địa lý khác nhau lại có các chỉ tiêu định lượng saponin không giống nhau. Vì vậy, hạn chế của chỉ thị phân tử nói chung, trong đó có 2 chỉ thị *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lặp thể chỉ có thể đặc hiệu về xác nhận các chỉ tiêu định tính như định danh loài và hầu như không thể xác thực về các chỉ tiêu định lượng. Với trường hợp để đánh giá các chỉ tiêu định lượng của sâm Ngọc Linh trồng ở các vùng khác nhau, hàm lượng cũng như thành phần các chất thuộc nhóm saponin hoặc các đồng vị bền trong các mẫu sâm là các chỉ thị hiệu quả có thể lựa chọn hiện nay (Yuan et al., 2010; Yang et al., 2016; Horacek et al. 2010; Kim et al., 2015 ; Chung et al., 2017). Tuy nhiên việc xác thực loài ứng dụng 2 chỉ thị này cũng đòi hỏi cơ sở dữ liệu và chi phí cao về hóa chất cũng như thiết bị. Vì vậy, tùy yêu cầu, nếu người tiêu dùng chỉ cần xác thực sản phẩm mình mua có phải là sâm Ngọc Linh hay không, các SNPs trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lặp thể của chúng là công cụ hiệu quả và kinh tế nhất như qui trình và kết quả của nghiên cứu này đã thể hiện.

#### V. KẾT LUẬN

Trong 8 củ sâm được xác thực dựa vào đa hình trình tự ADN trên đoạn 2 gen *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lặp thể, 5,5 củ là sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. 1985) và 2,5 củ là tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* Tsai & Feng, 1975 và *P. bipinnatifidum* Seem. 1868). Hai đoạn gen của các mẫu nghiên cứu có mức tương đồng về trình tự ADN với cùng đoạn trên hệ gen lặp thể của sâm Ngọc Linh và tam thất hoang từ 99,8-100%. Các mẫu có khoảng cách di truyền tin cậy với các loài khác trong chi sâm với giá trị bootstrap từ 60-100% trên cây chủng loại. Trên đoạn *trnC-rps16* và *trnE-trnM* lặp thể có 22 SNPs là các chỉ thị đặc hiệu để xác thực sâm Ngọc Linh và 17 SNPs để phân biệt tam thất hoang. Kết quả nghiên cứu không chỉ đưa ra các bằng chứng ở mức phân tử ADN để phân biệt củ sâm Ngọc Linh với củ của các loài tam thất hoang, mà còn là cơ sở để kết hợp với các chỉ thị khác nhằm xác thực đến mức phân loài hoặc dạng sinh thái khác nhau của sản phẩm "quốc bảo" này ở nước ta.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Choi H-K, Wen J 2000. A phylogenetic analysis of *Panax* (Araliaceae): integrating cpDNA restriction site and nuclear rDNA ITS sequence data. *PI Syst Evol.* 224(1):109-120
2. Chung IM, Lee TJ, Oh YT, Ghimire BK 1, In-Bae Jang IB, Kim SH. 2017. Ginseng authenticity testing by measuring carbon, nitrogen, and sulfur stable isotope compositions that differ based on cultivation land



- and organic fertilizer type. *J Ginseng Res* 41: 195-200
3. Horacek M, Min JS, Heo SC, Soja G. 2010. Discrimination between ginseng from Korea and China by light stable isotope analysis. *Anal Chim Acta*. 682: 77-81
4. Kim K, Song JH, Heo SC, Lee JH, Jung IW, Min JS. 2015. Discrimination of ginseng cultivation regions using light stable isotope analysis. *Forensic Science International*; 255:43-49.
5. Komatsu K, Tohda C, Zhu S. 2005. Ginseng drugs - Molecular and chemical characteristics and possibility as antidementia drugs. *Current Topics in Nutraceutical Research*.3 (1): 47-64.
6. Kumar, S., K. Tamura and M. Nei, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5: 150-163
7. Lee DG, Lee J, Yang S, Kim KT, Lee S. 2015. Identification of Dammarane-type Triterpenoid Saponins from the Root of *Panax ginseng*. *Natural Product Sciences*. 21(2): 111-121
8. Lê Thanh Hương, Nguyễn Nhật Linh, Bùi Mạnh Minh, Hà Hồng Hạnh, Huỳnh Thị Thu Huệ, Nông Văn Hải, Hà Văn Huân, Lê Thị Thu Hiền 2017. Ứng dụng mã vạch DNA hỗ trợ định loại loài một số mẫu sâm thuộc chi nhân sâm (*Panax L.*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(1): 63-72
9. Manzanilla V, Koola, Nguyen NL, Nong VH, Le TTH, de Boer HJ (2018). Phylogenomics and barcoding of *Panax*: toward the identification of ginseng species. *BMC Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1160-y>.
10. Nock CJ, Waters DL, Edwards MA, Bowen SG, Rice N, Cordeiro GM, Henry RJ 2011. Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification. *J. Plant Biotechnol.* 9 (3): 328-333
11. Nguyễn Văn Đạt, Trần Thị Phương Anh, Vũ Tiến Chính, Phan Kế Long, Hoàng Lê Tuấn Anh 2017. Chi sâm – *Panax L.* (họ Ngũ gia bì – *Araliaceae*) ở Việt Nam. *Tuyển tập Hội nghị KH toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 7*: 106-111
12. Shi F-X, Li M-R, Li Y-L, Jiang P, Zhang C, Pan Y-Z, Liu B, Xiao H-X, Li L-F. The impacts of polyploidy, geographic and ecological isolations on the diversification of *Panax* (*Araliaceae*). *BMC Plant Biol.* 15(1): 297
13. Teama S 2018. *DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine, Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. Yamin Liu, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.79517.
14. Wen J, Plunkett GM, Mitchell AD, Wagstaff SJ 2001. The evolution of *Araliaceae*: a phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Syst Bot.* 26(1):144-67
15. Yang W, Qiao X, Li K, Fan J, Bo T, Guo D-a, Ye M 2016. Identification and differentiation of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium*, and *Panax notoginseng* by monitoring multiple diagnostic chemical markers. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.005>
16. Yuan CS, Wang CZ, Wicks SM, Qi LW. 2010. Chemical and Pharmacological Studies of Saponins with a Focus on American Ginseng. *J. Ginseng Res.* 34 (3): 160-167