

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ ADN MÃ VẠCH ITS2 TRONG XÁC ĐỊNH LOÀI TAM THẤT HOANG (*Panax stipuleanatus* Tsai et Feng) TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH TUYỀN QUANG

Trần Thị Thu Hà^{1*}, Nguyễn Tiến Dũng¹,
Dương Thị Nhung¹, Đỗ Hoàng Chung¹, Đặng Thanh Thủy¹

¹Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên

* Email: ha.tran2007@gmail.com

TÓM TẮT

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* Tsai et Feng) là loài dược liệu quý phân bố tự nhiên ở một số khu vực miền núi phía Bắc nằm trong danh mục loài nguy cấp, quý, hiếm có nguy cơ tuyệt chủng. Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị ADN mã vạch ITS2 để xác định loài từ 10 mẫu thu thập tại các khu vực tự nhiên tỉnh Tuyền Quang (các xã: Tùng Vài, Nậm Dịch, Nậm Dẩn). ADN tổng số được tách chiết từ mẫu lá non bằng phương pháp CTAB; vùng ITS2 được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu ITS2-F/ITS4-R, giải trình tự và đối sánh trên ngân hàng gen NCBI. Kết quả cho thấy, vùng gen ITS2 khuếch đại thành công (~480 bp) và các trình tự có độ tương đồng > 99% so với trình tự gen tham chiếu của loài tam thất *P. stipuleanatus* (MK408811.1, MK408807.1, MK408781.1). Phân tích quan hệ di truyền bằng phương pháp Neighbor-Joining sử dụng phần mềm MEGA11 xác nhận các mẫu Tam thất hoang ở tỉnh Tuyền Quang nằm cùng nhánh phân loại với loài *P. stipuleanatus*, khoảng cách di truyền rất thấp (0,00 - 0,003) và tách biệt rõ với các loài *Panax* khác (*P. vietnamensis*, *P. ginseng*, *P. quinquefolius*). Kết quả khẳng định, ITS2 là chỉ thị hiệu quả để định danh chính xác Tam thất hoang, góp phần hỗ trợ nghiên cứu phân loại, kiểm định nguồn giống và bảo tồn loài tại Việt Nam.

Từ khóa: *Panax stipuleanatus* Tsai et Feng, ADN mã vạch, ITS2, định danh loài, Tuyền Quang.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* Tsai et Feng), một loài cây có giá trị dược liệu quý, thuộc họ ngũ gia bì (Araliaceae) và là một trong 3 loài Sâm có giá trị của Việt Nam [1]. Tam thất hoang có tác dụng bổ dưỡng, cầm máu, giảm đau, chống sung viêm, hỗ trợ hệ miễn dịch và điều trị một số bệnh tim mạch [2]. Thành phần hóa học chính trong Tam thất hoang là saponin [3]. Trong đó, hai loại saponin chính là triterpenoid saponins (SP-R1 và SP-R2) có khả năng làm giảm đáng kể tính thấm của mạch máu, phù tai, phù chân và sự hình thành u hạt ở các mô hình viêm [4].

Ở Việt Nam, Tam thất hoang phân bố tự nhiên chủ yếu tại các vùng núi cao phía Bắc, ghi nhận ở khu vực Hoàng Liên Sơn (tỉnh Lào Cai) và các tỉnh vùng Tây Bắc như: Lai Châu, Sơn La và Yên Bái

trước đây [5]. Tuy nhiên, do khai thác quá mức, thu hẹp sinh cảnh và suy thoái môi trường sống, quần thể ngoài tự nhiên của loài đang suy giảm mạnh, làm gia tăng nguy cơ cạn kiệt nguồn gen. Đáng chú ý, *P. stipuleanatus* đã được đưa vào Danh mục loài nguy cấp, quý, hiếm theo quy định của Chính phủ. Vì vậy, xây dựng cơ sở khoa học cho bảo tồn và phát triển bền vững nguồn dược liệu này là yêu cầu cấp thiết, trong đó định danh loài chính xác là bước nền tảng cho điều tra phân bố, đánh giá nguồn gen, xây dựng vùng bảo tồn và quản lý khai thác hợp lý.

Trên thực tế, định danh theo hình thái (lá, hoa, quả...) thường gặp khó khăn do mức độ tương đồng cao giữa các loài trong chi *Panax* [6] và do đặc điểm hình thái có thể biến thiên theo điều kiện sinh thái, giai đoạn sinh trưởng [7]. Do đó, các phương pháp phân tử, đặc biệt là ADN mã

vạch, ngày càng được sử dụng để tăng độ tin cậy và tính lặp lại trong xác định loài [8]. Vùng ITS2 được đề xuất như một mã vạch ADN phổ quát, hiệu quả cho thực vật và được liệu, đồng thời đã được ứng dụng rộng rãi trong phân biệt các loài *Panax* [9].

Tại Việt Nam, các nghiên cứu gần đây cũng đã chứng minh ITS/ITS-rDNA hữu ích trong nhận diện và làm rõ quan hệ di truyền giữa các mẫu *Panax* thu thập ở nhiều tỉnh miền núi phía Bắc, góp phần giảm nhầm lẫn trong phân loại và hỗ trợ cập nhật phân bố [10]. Trên cơ sở đó, việc giải mã trình tự ITS2 cho các mẫu Tam thất hoang thu

thập tại địa bàn nghiên cứu sẽ góp phần chuẩn hóa định danh, bổ sung dữ liệu mã vạch ADN, phục vụ nghiên cứu phân loại, nhân giống, sử dụng hợp lý và bảo tồn nguồn gen Tam thất hoang ở Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Tổng số 10 mẫu Tam thất hoang sử dụng trong nghiên cứu được thu thập ở một số xã thuộc tỉnh Tuyên Quang. Mẫu lá non được cắt khỏi cây cho vào túi nilon, đánh mã số và bảo quản trong tủ đá chuyên dụng đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân tích (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các mẫu Tam thất hoang được thu thập nghiên cứu

Mẫu số	Ký hiệu mẫu nguồn gen	Địa điểm thu thập
1	Q1	Độ cao: 1.170 m, toạ độ: X-434277, Y:2556854 (xã Tùng Vài, tỉnh Tuyên Quang)
2	Q2	Độ cao: 1.180 m, toạ độ: X-434279, Y-2556860 (xã Tùng Vài, tỉnh Tuyên Quang)
3	Q3	Độ cao: 1.178 m, toạ độ: X-434278, Y-2556855 (xã Tùng Vài, tỉnh Tuyên Quang)
4	H1	Độ cao: 1.180 m, toạ độ: X-434212, Y-2502861 (xã Nậm Dịch, tỉnh Tuyên Quang)
5	H2	Độ cao: 1.163 m, toạ độ X-434214, Y-2502687 (xã Nậm Dịch, tỉnh Tuyên Quang)
6	H3	Độ cao: 1.180 m, toạ độ: X-434214, Y-2502687 (xã Nậm Dịch, tỉnh Tuyên Quang)
7	H4	Độ cao: 1.183 m, toạ độ: X-434219, Y-2502680 (xã Nậm Dịch, tỉnh Tuyên Quang)
8	H5	Độ cao: 1.178 m, toạ độ X-434214, Y-2502688 (xã Nậm Dịch, tỉnh Tuyên Quang)
9	H6	Độ cao: 1.175 m, toạ độ: X-434219, Y-2502680 (xã Nậm Dịch - tỉnh Tuyên Quang)
10	XM	Độ cao: 1.173 m, toạ độ: X-1043058, Y-223520 (xã Nám Dẩn, tỉnh Tuyên Quang)



a) Xã Tùng Vài b) Xã Nậm Dịch c) Xã Nấm Dẩn
Hình 1. Tam thất Hoang phân bố tự nhiên ở khu vực nghiên cứu của tỉnh Tuyên Quang

Bảng 2. Danh sách mồi và trình tự sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Mục đích
ITS2-F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	Khuếch đại vùng gen ITS2
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Mồi khuếch đại vùng gen ITS2 được tổng hợp theo công bố của Cheng và cs (2016) [11] có trình tự như trình bày ở bảng 2.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết ADN tổng số: Mẫu lá của cây Tam thất hoang được tách chiết theo phương pháp CTAB của Stefanova và cs (2013) [12] có cải tiến cho phù hợp với đối tượng thí nghiệm: Mẫu lá được cắt nhỏ (0,2 mg) đưa vào ống tube 2 ml và nghiền bằng máy Plant tissueLyzer (QIAGEN) trong thời gian 30 giây, bổ sung 700 µl dung dịch CTAB và ủ 30 phút ở nhiệt độ 65°C. Tiếp đến, bổ sung 700 µl dung dịch 24: 1 (chloroform:isoamyl) và ly tâm 15 phút ở tốc độ 12.000 vòng/phút. Chuyển 500 µl pha nổi sang ống tube 1,5 ml và bổ sung 200 µl isopropanol để tủa ADN ở - 20°C trong thời gian 60 phút. Ly tâm 10 phút ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu ADN. Tủa ADN được rửa 2 lần bằng cồn 70% và làm khô trong tủ hút chân không. Sau cùng, hòa tan ADN bằng 50 µl nước cất khử ion. Chất lượng ADN tổng số được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ kế sử dụng máy đo NanoDrop One (Thermo Firsher Scientific, Mỹ) dựa trên bước sóng A260/A280.

Khuếch đại gen: Phản ứng PCR khuếch đại vùng gen được thực hiện trên máy PCR (Mastercycler Nexus, Đức) sử dụng cặp mồi ITS2

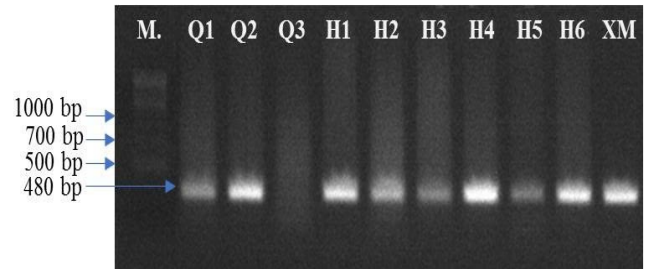
ở bảng 2 theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Thị Dung và cs (2024) [13]. Phản ứng được thực hiện ở thể tích 20 µl, gồm các thành phần: 10 µl Vazyme Master mix, 1 µl mồi xuôi, 1 µl mồi ngược, 0,5 µl ADN và 7,5 µl nước khử ion. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: Biến tính ở 95°C trong 4 phút, tiếp sau là 32 chu kỳ: 94°C/1 phút, 56°C/1 phút, 72°C/1 phút và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 7 phút. Sau khi kết thúc phản ứng, sản phẩm PCR sẽ được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và được tinh sạch bằng bộ kit PCR purification của hãng Solgen, Hàn Quốc.

Phương pháp định danh loài dựa trên vùng gen ITS2 và xây dựng cây phát sinh chủng loại: Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gửi đi giải trình tự tại Công ty Apical Scientific. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit, loại bỏ vùng tín hiệu xấu ở hai đầu và so sánh với trình tự loài trên ngân hàng gen NCBI (ngân hàng cơ sở dữ liệu sinh học của Mỹ). Loài được xác định dựa trên mức độ tương đồng cao nhất với các loài được công bố. Cây phân loại được xây dựng dựa trên phần mềm MEGA11 theo phương pháp Maximum-Likelihood với giá trị Bootstrap 1.000 [13]. Giá trị Bootstrap được phân loại theo Kress và cs (2002) [15], hệ số cao (> 85%), trung bình (70 - 85%), thấp (50 - 69%), yếu (< 50%).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khuếch đại vùng gen ITS2

ADN tổng số của 10 mẫu Tam thất hoang (Bảng 1) được sử dụng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại vùng gen ITS2 với cặp mồi đặc hiệu ITS2/ITS4. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, vùng gen ITS2 được khuếch đại thành công với kích thước tương ứng xấp xỉ 480 bp (Hình 1), tương đương với kích thước lý thuyết. Sản phẩm PCR vùng gen ITS2 được tinh sạch và giải trình tự để xác định tên loài.



Hình 2. Kết quả khuếch đại vùng gen ITS2 bằng PCR ở 10 mẫu nghiên cứu

3.2. Kết quả xác định loài

Kết quả định danh các mẫu Tam thất hoang thu thập dựa trên vùng gen ITS2 được tổng hợp ở bảng 3.

Trình tự ITS2 được xử lý loại bỏ các tín hiệu không tốt ở hai đầu và tiến hành kiểm tra. Kết quả đối sánh BLASTn trình tự vùng gen ITS2 của các mẫu Tam thất hoang với dữ liệu đã công bố trên ngân hàng gen NCBI cho thấy, tất cả các mẫu đều có độ bao phủ truy vấn 99 - 100% và tỷ lệ tương đồng 99,15 - 99,43% với các trình tự tham chiếu của loài *Panax stipuleanatus*, gồm các mã số: MK408811.1, MK408807.1, MK408781.1, JX680330.1, AY271921.1, MF091695.1 (Bảng 3). Như vậy, các mẫu thu thập tại các xã Tùng Vài, Nậm Dịch và Nậm Dẩn có trình tự ITS2 phù hợp với loài Tam thất hoang *P. stipuleanatus*. Trình tự ITS2 đại diện của các mẫu theo khu vực nghiên cứu đã được đăng ký trên ngân hàng gen với các mã số PP038232.1, PP038233.1 và PP038234.1.

Bảng 3. Kết quả đối sánh trình tự vùng gen ITS2 của mẫu Tam thất hoang với trình tự gen công bố trên ngân hàng gen NCBI

Ký hiệu mẫu	Loài khớp (top hit)	Độ bao phủ truy vấn (Query cover, %)	Tỷ lệ tương đồng (Per. Ident) (%)	Mã số truy cập (Accession - top hit)	Các hit ITS2 cùng loài (mã số truy cập)
Q1	<i>Panax stipuleanatus</i>	99	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
Q2	<i>Panax stipuleanatus</i>	99	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
Q3	<i>Panax stipuleanatus</i>	99	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
H1	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
H2	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
H3	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1

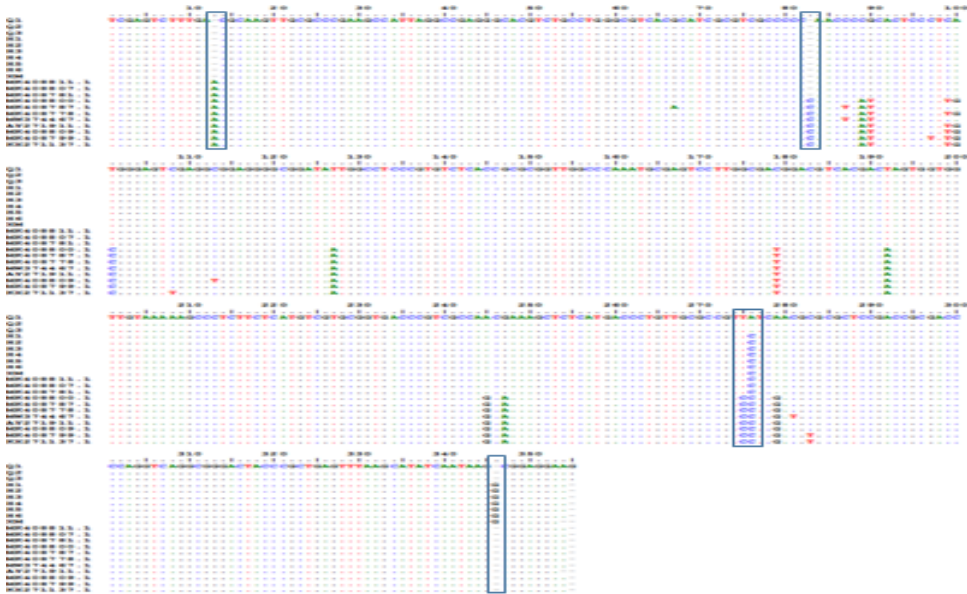
H4	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
H5	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
H6	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1
XM	<i>Panax stipuleanatus</i>	100	99,43	MK408811.1	MK408807.1; MK408781.1; JX680330.1; AY271921.1; MF091695.1

Chú thích: Kết quả BLASTn trên ngân hàng gen NCBI. Độ bao phủ truy vấn là tỷ lệ chiều dài trình tự mẫu tham gia căn chỉnh; tỷ lệ tương đồng là tỷ lệ nucleotide trùng nhau trong vùng được căn chỉnh; top hit là kết quả xếp hạng cao nhất theo điểm căn chỉnh/E-value.

3.3. Mối quan hệ di truyền giữa các xuất xứ Tam thất hoang dựa trên vùng gen ITS2

So sánh trình tự vùng gen ITS2 giữa các xuất xứ Tam thất hoang thu tại tỉnh Tuyên Quang với loài *Panax stipuleanatus* mã số MK408811.1, MK408807.1, MK408781.1 cho thấy, ở vị trí thứ 13 bị mất 1 nucleotide (A). Tại vị trí thứ 276, các mẫu thu tại xã Tùng Vài (Q1, Q2, Q3) là A, các mẫu thu

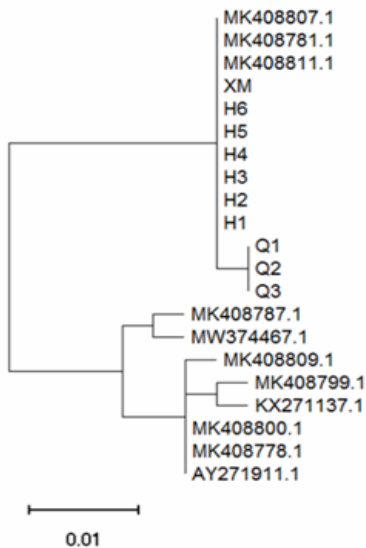
tại xã Nậm Dịch và Nậm Dẩn là C, vị trí 347 mẫu Tam thất trong xã Nậm Dịch và Nậm Dẩn thêm nucleotide G (Hình 2). Dựa trên sự khác biệt nucleotide tại các vị trí này, có thể thiết kế chỉ thị DCAP - PCR để phát hiện đa hình các biến thể nucleotide (SNP) đặc trưng để phân biệt các xuất xứ Tam thất hoang trong nghiên cứu.



Hình 3. Kết quả đối sánh trình tự gen ITS2 của Tam thất hoang tại tỉnh Tuyên Quang với một số loài tam thất thuộc chi *Panax* trên ngân hàng gen NCBI

Kết quả xây dựng cây phát sinh di truyền cho thấy, các mẫu Tam thất hoang ở tỉnh Tuyên Quang có mối quan hệ gần gũi và nằm cùng nhánh với loài *Panax stipuleanatus* mã số MK408811.1, MK408807.1, MK408781.1, khác xa so với loài *Panax zingiberensis* (MK408787.1), *Panax vietnamensis* (MW374467.1), *Panax wangianus* (MK408809.1), *Panax quinquefolius* (MK408799.1), *Panax ginseng*

(KX271137.1), *Panax pseudoginseng* (AY271911.1), *Panax japonicus* (MK408800.1), *Panax* sp. (MK408778.1) (Hình 3).



Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh chủng loại của các mẫu nghiên cứu so với trình tự tham chiếu ngân hàng gen NCBI của một số loài thuộc chi *Panax*.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã ứng dụng thành công chỉ thị ADN mã vạch ITS2 để định danh 10 mẫu Tam thất hoang thu thập tại tỉnh Tuyên Quang là *Panax stipuleanatus* Tsai et Feng. Vùng gen ITS2 được khuếch đại và giải trình tự có kích thước khoảng 480 bp, tỷ lệ tương đồng > 99% với các trình tự tham chiếu của loài *P. stipuleanatus* trên ngân hàng gen NCBI (MK408811.1, MK408807.1, MK408781.1). Phân tích phát sinh chủng loại bằng Neighbor-Joining cho thấy, các mẫu Tam thất hoang ở tỉnh Tuyên Quang nằm cùng nhánh với *P. stipuleanatus*, có khoảng cách di truyền rất thấp (0,00 - 0,003) và phân biệt rõ với các loài *Panax* khác. Kết quả khẳng định ITS2 là chỉ thị tin cậy cho định danh Tam thất hoang, góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu mã vạch ADN và hỗ trợ nghiên cứu phân loại, quản lý nguồn giống và bảo tồn nguồn gen loài tại Việt Nam. Để đánh giá sự sai khác di truyền giữa các mẫu Tam thất hoang, cần sử dụng các chỉ thị ADN khác như SNP, SSR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Tập (2005). Các loài thuộc chi *Panax* L. ở Việt Nam. *Tạp chí Dược học*, 10(3), 71 - 76.

2. Đỗ Tất Lợi (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Y học, Hà Nội.

3. Dong, T. T. X., Cui, X. M., Song, Z. H., Zhao, K. J., Ji, Z. N., Lo, C. K., Tsim, K. W. K. (2003). Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: Regional and seasonal variations in its active constituents. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4617.

4. Shu P P, Li L X, He Q M, Pan J, Li X L, Zhu M, Yang Y, Qu Y. (2021), Identification and quantification of oleanane triterpenoid saponins and potential analgesic and anti-inflammatory activities from the roots and rhizomes of *Panax stipuleanatus*. *J Ginseng Res*, 45(2), 305 - 315. DOI: 10.1016/j.jgr.2020.05.002.

5. Tran Thi Viet Thanh, Trinh Ngoc Bon, Do Van Truong, Pham Quang Tuyen, Hua Van Luong, Pham Van The, Phan Ke Long (2022). Identification of *Panax* spp. in the Northern Vietnam based on ITS-rDNA sequence analysis. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(4), 633 - 641. DOI: 10.15625/1811 - 4989/17138.

6. Nguyễn Nghĩa Thìn (2007). *Sách Đỏ Việt Nam - Phần I: Thực vật*. Nxb Khoa học công nghệ, trang 590.

7. W. J. Kress, D. L. Erickson, F. A. Jones, N. G. Swenson, R. Perez, O. Sanjur, E. Bermingham (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18621 - 18626. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106>.

8. P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. de Waard (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313 - 321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

9. Zuo Y. et al. (2011). DNA barcoding of *Panax* species. *Planta Medica*. 77(2), 182 - 187. DOI:10.1055/s-0030-1250166.

10. Pham Thi Ngoc, Pham Thanh Huyen, Nguyen Quynh Nga, Phan Van Truong, Nguyen Minh Khoi, Dinh Doan Long (2020). A molecular phylogeny of *Panax* L. Genus (Araliaceae) based on

ITS-rDNA and matK support for identification of *Panax* species in Vietnam. *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, 36(2), 91 - 99, <https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4198>.

11. Cheng T, Xu C, Lei L, Li C, Zhang Y, Zhou S. (2016) Barcoding the kingdom plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Mol Ecol Resour*, 16(1): 138 - 149. DOI: 10.1111/1755-0998.12438.

12. P. Stefanova, M. Taseva, T. Georgieva, V. Gotcheva, A. Angelov (2013). A modified CTAB method for DNA extraction from Soybean and meat products", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(3), 3803 - 3810

13. N. T. Dung, T. T. T. Ha, N. D. Huy *et al.* (2024). Application of DNA barcode-ITS2 marker for identifying medicinal samples. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 66(1), 24 - 28. <https://doi.org/10.31276/VJST>.

14. K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 38(7), 3022 - 3027, Doi: 10.1093/molbev/msab120.

15. W.J. Kress, L. M. Prince, K. J. Williams (2002). The phylogeny and a new classification of the gingers: Evidence from molecular data. *Am. J. Bot.*, 89(11), 1682 - 1696. DOI: 10.3732/ajb.89.10.1682.

APPLICATION OF DNA BARCODE ITS2 FOR IDENTIFYING *Panax stipuleanatus* Tsai et Feng IN TUYEN QUANG PROVINCE

Tran Thi Thu Ha¹, Nguyen Tien Dung¹,

Duong Thi Nhung¹, Do Hoang Chung¹, Dang Thanh Thuy¹

¹ University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

Abstract

Panax stipuleanatus Tsai et Feng is a valuable medicinal plant naturally distributed in several mountainous regions of Northern Vietnam and is classified as a rare and endangered species due to overexploitation and habitat degradation. Accurate species identification is essential for effective conservation and sustainable use. In this study, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) DNA barcode was employed to authenticate *P. stipuleanatus* using ten samples collected from natural populations in Tuyen Quang province (Tung Vai, Nam Dich and Nam Dan). Total genomic DNA was extracted from young leaf tissues using the CTAB method. The ITS2 region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pair ITS2-F/ITS4-R, sequenced and compared with reference sequences retrieved from the GenBank database. Phylogenetic relationships were inferred using the Neighbor-Joining method implemented in MEGA11 software. The ITS2 region was successfully amplified in all samples, yielding fragments of approximately 480 bp. Sequence similarity analysis revealed more than 99% identity with reference sequences of *P. stipuleanatus* (GenBank accession numbers MK408811.1, MK408807.1, and MK408781.1). Phylogenetic analysis showed that all samples clustered clearly within the *P. stipuleanatus* clade, with very low genetic distances (0.00 - 0.003) and were clearly distinct from other *Panax* species, including *P. vietnamensis*, *P. ginseng* and *P. quinquefolius*. These findings demonstrate that ITS2 is a reliable and effective DNA barcode for accurate identification of *P. stipuleanatus*, providing important support for taxonomic studies, germplasm authentication and conservation of this endangered medicinal plant in Vietnam.

Keywords: *Panax stipuleanatus* Tsai et Feng, DNA barcoding, ITS2, species authentication, phylogenetic analysis, Tuyen Quang.

Ngày nhận bài: 31/8/2025

Ngày chuyển phản biện: 20/10/2025

Ngày thông qua phản biện: 30/12/2025

Ngày duyệt đăng: 5/01/2026