

PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC LOÀI SÂM VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ GEN NHÂN

Lê Hùng Linh¹, Phạm Thu Nga¹, Lê Hà Minh¹, Khuất Thị Mai Lương¹

TÓM TẮT

Sử dụng chỉ thị phân tử gen nhân cho phân tích đa dạng di truyền, nhận dạng loài/giống sâm có ý nghĩa quan trọng trong công tác chọn lọc và phát triển giống sâm chất lượng cao. Trong nghiên cứu này, 17 chỉ thị phân tử gen nhân đã được thiết kế và sử dụng để phân tích di truyền kiểu gen 19 mẫu sâm Ngọc Linh thu thập tại Kon Tum và Quảng Nam, 03 mẫu sâm Lai Châu, 01 mẫu tam thất hoang và 01 mẫu sâm Vũ Diệp của Việt Nam. Kết quả cho thấy, các chỉ thị thể hiện sự đa hình cao và hệ số tương đồng di truyền của 24 mẫu sâm nghiên cứu dao động từ 48% đến 93%. Đặc biệt, kết quả chỉ ra rằng các mẫu sâm Ngọc Linh nghiên cứu không đồng nhất, rất đa dạng về kiểu gen.

Từ khóa: Sâm Việt Nam, đa dạng di truyền, chỉ thị phân tử

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một đất nước đa dạng về loài và về sự phân bố các cây dược liệu quý, trong đó có nhân sâm. Việc nghiên cứu di truyền và đánh giá đa dạng bằng chỉ thị phân tử gen nhân có ý nghĩa quan trọng trong công tác chọn lọc và phát triển nhân sâm. Chỉ thị phân tử là công cụ đắc lực, hiệu quả trong nghiên cứu di truyền, phân loại và chọn lọc giống. Thay vì sử dụng các phương pháp cũ dựa trên cơ sở đánh giá một loạt các tính trạng hình thái gặp phải nhiều hạn chế như: tính chủ quan khi phân tích tính trạng, ảnh hưởng của môi trường và kỹ thuật canh tác lên tính trạng, sự khác biệt không rõ ràng giữa các loài/giống có nguồn gốc gần nhau, sự biểu hiện một vài dấu hiệu chuẩn đoán chỉ xuất hiện ở một giai đoạn cụ thể... Tại Hàn Quốc, việc sử dụng các chỉ thị phân tử dựa trên trình tự gen nhân trong phân loại các loài thuộc chi *Panax* cũng như kiểm định giống sâm đã được triển khai nhiều và đạt được nhiều kết quả mang tính ứng dụng cao (Choi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Um *et al.*, 2016). Đây được xem là tiền đề quan trọng cho công tác chọn tạo giống sâm chất lượng cao tại Hàn Quốc.

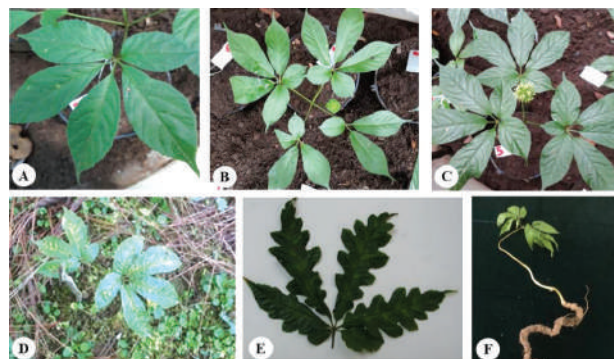
Ở nước ta, những công bố khoa học ở mức độ phân tử của các loài sâm Việt chủ yếu tập trung vào cơ sở trình tự nucleotide vùng trnK, 18S rRNA,

ITS-rADN và matK của lục lạp (Zhu *et al.*, 2003; Nguyễn Thị Phương Trang và *ctv.*, 2011; Nong Van Duy *et al.*, 2016; Phan Kế Long và *ctv.*, 2014b). Sử dụng hệ gen nhân để thiết kế chỉ thị phân tử sử dụng phân tích đa dạng di truyền các loài sâm Việt là hướng nghiên cứu mới tại Việt Nam. Nghiên cứu này có tính ứng dụng cao trong công tác nhận dạng, chọn lọc và phát triển các giống sâm có đặc tính tốt, chất lượng mang thương hiệu Việt. Trong nghiên cứu này, 17 chỉ thị phân tử được thiết kế, khảo sát khả năng khuếch đại và sử dụng để phân tích đa dạng di truyền các loài sâm Việt bao gồm sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* var. *vietnamensis*), sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), sâm Vũ Diệp (*Panax bipinatifidus*) và tam thất hoang (*Panax stipuleanatus*).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

19 mẫu sâm Ngọc Linh (ký hiệu NL1 - NL19) thu thập tại các vườn bảo tồn tại Quảng Nam và Kon Tum; 03 mẫu sâm Lai Châu (ký hiệu LC1 - LC3) thu thập tại Lai Châu; 01 mẫu sâm Vũ Diệp (ký hiệu VD), 01 mẫu tam thất hoang (ký hiệu TTH) thu thập tại Lào Cai và 01 mẫu sâm Hàn Quốc (*Panax ginseng*). Hình ảnh một số mẫu sâm sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Một số mẫu sâm sử dụng trong nghiên cứu: sâm Ngọc Linh (A, B, C), sâm Lai Châu (D), sâm Vũ Diệp (E) và tam thất hoang (F)

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS

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. 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 lặp đơn giản (microsatellite), trình tự Genome survey sequence (GSS), Expressed sequence tag (EST) trên NCBI (Wheeler *et al.*, 2008) được sử dụng làm hệ tham chiếu thiết kế chỉ thị phân tử. Các chỉ thị phân tử sau đó được thiết kế bằng chương trình Primer3 với các thông số mặc định (Rozen and Skaletsky, 2000).

2.2.3. Kỹ thuật PCR và điện di sản phẩm trên gel polyacrylamide

Phản ứng PCR được tiến hành trên máy chu kỳ nhiệt Mastercycler Pro (Eppendorf, Đức). Tổng thể tích 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 2,5% và polyacrylamide 6,0% chứa ethidium bromide với thang ADN chuẩn 1 kb Plus (Thermo Scientific, Anh) ở hiệu điện thế 100V trong 120 phút trong dung dịch đệm Tris-boric acid-EDTA 0,5X.

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 mồi	(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 - ∞	

2.2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Dựa vào kết quả điện di, các băng điện di được nhận diện và mã hóa dưới dạng nhị phân. Kết quả mã hóa được sử dụng để xây dựng sơ đồ quan hệ di truyền và phân tích hệ số tương đồng theo phương pháp UPGMA bằng phần mềm NTSYSpc 2.1.

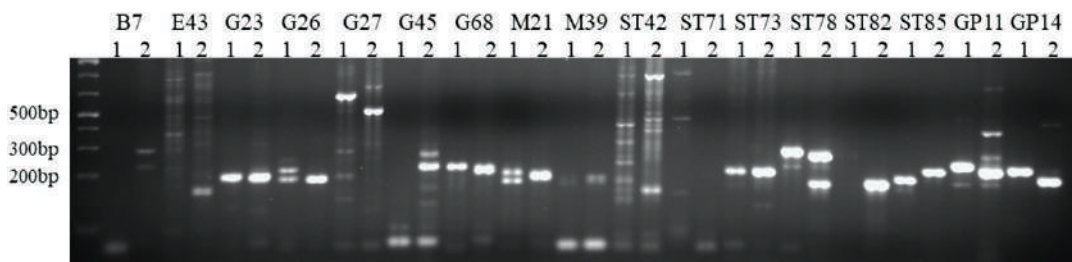
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Sinh học phân tử - Viện Di truyền Nông nghiệp từ tháng 01/2018 đến tháng 02/2019.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thiết kế chỉ thị phân tử gen nhân và khảo sát khả năng khuếch đại với ADN *P. ginseng* và *P. vietnamensis* var. *vietnamensis*

Kết quả khảo sát khả năng khuếch đại của chỉ thị phân tử thiết kế dựa trên hệ gen nhân cho thấy, tất cả 17 chỉ thị phân tử thiết kế có khả năng khuếch đại đoạn nhân ít nhất từ 1 trong 2 mẫu ADN sâm Hàn Quốc và sâm Ngọc Linh với băng vạch rõ ràng (Hình 2). Các chỉ thị tiếp đến sẽ được sử dụng trong nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền các loài sâm Việt Nam.

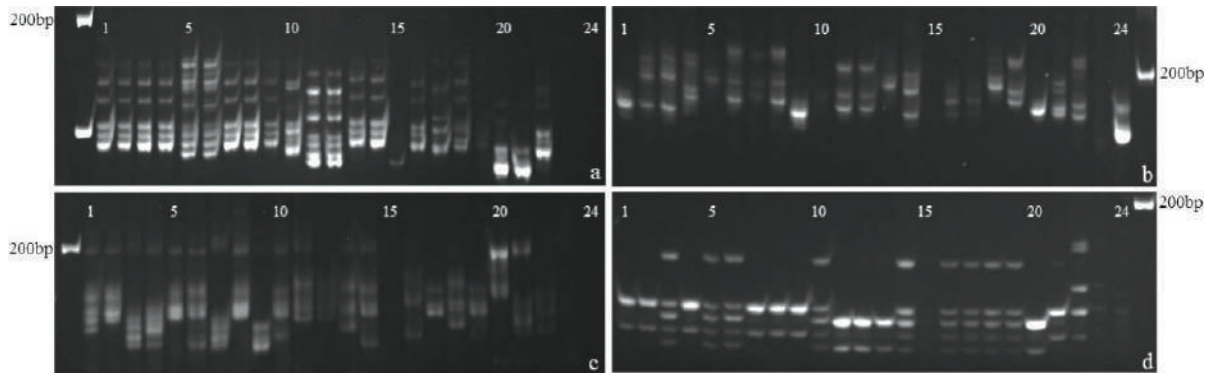


Hình 2. Kết quả khảo sát khả năng khuếch đại của chỉ thị phân tử thiết kế với mẫu sâm Hàn Quốc (1) và Ngọc Linh (2)

3.2. Kết quả phân tích di truyền 24 mẫu sâm Việt Nam sử dụng chỉ thị phân tử gen nhân

Kết quả điện di sản phẩm PCR với ADN của các mẫu sâm Việt Nam bằng các chỉ thị phân tử được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy các chỉ thị cho tỷ lệ đa hình cao, 13/17 chỉ thị đạt tỷ lệ đa hình 100%;

80 alen đa hình trên tổng số 89 alen, đạt 89,9%. Mỗi chỉ thị phân tử cho số lượng alen dao động từ 2 đến 10 alen, trong đó chỉ thị M21 cho nhiều alen nhất (10 alen), 3 chỉ thị cho 2 alen là Gcpm14, ST82, ST85. Trung bình số alen/locus đạt 5,24, trong đó trung bình số alen đa hình/locus đạt 4,71.



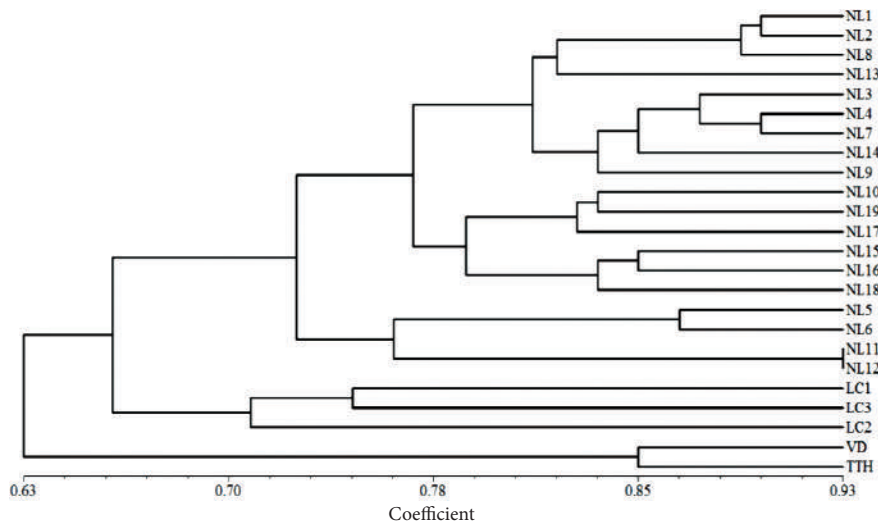
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm của các mẫu sâm Việt Nam bằng các chỉ thị M21 (a), M39 (b), E43 (c) và ST71 (d)

Ghi chú từ trái qua phải : sâm Ngọc Linh (thứ tự 1-19), sâm Lai Châu (20-22), sâm Vũ Diệp - 23 và mẫu tam thất hoang - 24, thang chuẩn 1kb.

Kết quả xây dựng mối liên hệ tiến hóa giữa các mẫu sâm Việt Nam bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 được thể hiện qua sơ đồ quan hệ di truyền (hình 4) và ma trận hệ số tương đồng di truyền của 24 mẫu sâm Việt (Bảng 3). Kết quả từ sơ đồ quan hệ di truyền cho thấy, 24 mẫu sâm nghiên cứu chia thành 2 nhánh ở mức tương đồng 63%. Nhánh 1 gồm mẫu sâm Vũ Diệp và tam thất hoang. Nhánh 2 gồm mẫu sâm Lai Châu và sâm Ngọc Linh, điều này thể hiện sâm Lai Châu và sâm Ngọc Linh có quan hệ họ hàng gần gũi. Kết quả nghiên cứu này trùng với kết quả của Zhu và cộng tác viên (2003), Nguyễn Thị Phương Trang và cộng tác viên (2011) và Nong Van Duy và cộng tác viên (2016) khi nghiên cứu dựa trên cơ sở trình tự nucleotide vùng trnK, 18S rRNA và ITS-rADN. Ba tác giả này chỉ ra rằng, các mẫu sâm Vũ Diệp, tam thất hoang thuộc nhánh riêng biệt so với sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu. Kết quả nghiên cứu của Phan Kế Long và cộng tác viên (2014a) ghi nhận hai thứ sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*)

và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) của loài sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) có quan hệ chị em và ở nhánh riêng biệt so với các mẫu tam thất hoang.

Kết quả ở hình 4 cho thấy, ở mức tương đồng 66% các mẫu sâm Lai Châu và sâm Ngọc Linh tách thành hai phân nhánh. Kết quả này khác với kết quả mẫu sâm Ngọc Linh và sâm Lai Châu có quan hệ gần gũi với bootstrap 74% của Zhu và cộng tác viên (2003) khi tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền các mẫu sâm Việt Nam dựa trên trình tự trnK và 18S rRNA. Kết quả nghiên cứu của Phan Kế Long và cộng tác viên (2014a) khi phân tích mối quan hệ họ hàng các mẫu sâm thuộc chi *Panax* trên cơ sở trình tự nucleotide vùng matK và ITS-rADN ghi nhận, hai thứ sâm Lai Châu (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*) và sâm Ngọc Linh (*P. vietnamensis* var. *vietnamensis*) của loài sâm Việt (*P. vietnamensis* Ha & Grushv.) có quan hệ chị em với bootstrap 88% và 81%.



Hình 4. Sơ đồ thể hiện mối liên hệ tiến hóa giữa các mẫu sâm Việt Nam

Kết quả hệ số tương đồng theo từng cặp mẫu ở bảng 3 cho thấy, mức độ tương đồng của mẫu tam thất hoang với sâm Vũ Diệp lên tới 85% và với các mẫu còn lại chỉ dao động từ 51% đến 72%, điều này cho thấy mối quan hệ họ hàng gần gũi của hai loài sâm này. Ba mẫu sâm Lai Châu có mức độ tương đồng từ 69 - 75%. Mẫu sâm LC2 và LC3 có mức độ tương đồng cao nhất với mẫu NL9 lần lượt đạt 75 và 78%. Mẫu sâm LC1 có hệ số tương đồng cao nhất với mẫu LC3, NL13 và NL15 (75%). Mức tương đồng của mẫu LC3 với mẫu NL12 thấp nhất, đạt 48%.

Phân tích kết quả ở bảng 3 cho thấy, các mẫu sâm Ngọc Linh thu thập không đồng nhất, đa dạng về kiểu gen, hệ số tương đồng của 19 mẫu sâm Ngọc

Linh dao động từ 61 - 93%. 2 mẫu NL11 và NL12 ở có quan hệ gần gũi với nhau nhất với hệ số tương đồng lên đến 93%, các cặp mẫu NL1 và NL2, NL2 và NL8, NL4 và NL7, NL7 và NL9 đều có hệ số tương đồng 90%. Hệ số tương đồng thấp nhất được ghi nhận giữa mẫu NL12 và NL9 (61%), sau đó là mẫu NL12 và NL7 (63%). Đây là nghiên cứu đầu tiên trong nước sử dụng chỉ thị phân tử trên gen nhân để phân tích đa dạng di truyền các mẫu sâm Ngọc Linh. Trong quá trình thu thập cũng như kết quả nghiên cứu đánh giá đặc điểm hình thái học chính các mẫu sâm Ngọc Linh cho thấy, các mẫu sâm rất đa dạng về hình thái, cụ thể hình dạng lá, màu sắc thân, cường độ tím trên thân...

Bảng 3. Ma trận hệ số tương đồng phân tích mối quan hệ di truyền của 24 mẫu sâm Việt

	NL1	NL2	NL3	NL4	NL5	NL6	NL7	NL8	NL9	NL10	NL11	NL12	NL13	NL14	NL15	NL16	NL17	NL18	NL19	LC1	LC2	LC3	VD	TTH
NL1	1,00																							
NL2	0,90	1,00																						
NL3	0,79	0,81	1,00																					
NL4	0,82	0,81	0,88	1,00																				
NL5	0,76	0,84	0,76	0,70	1,00																			
NL6	0,75	0,73	0,78	0,75	0,87	1,00																		
NL7	0,84	0,79	0,87	0,90	0,69	0,73	1,00																	
NL8	0,88	0,90	0,82	0,88	0,79	0,84	0,87	1,00																
NL9	0,85	0,78	0,79	0,82	0,70	0,66	0,90	0,82	1,00															
NL10	0,81	0,82	0,78	0,72	0,87	0,76	0,73	0,78	0,78	1,00														
NL11	0,75	0,70	0,69	0,69	0,78	0,76	0,67	0,75	0,66	0,70	1,00													
NL12	0,70	0,69	0,67	0,64	0,76	0,75	0,63	0,70	0,61	0,66	0,93	1,00												
NL13	0,84	0,79	0,78	0,78	0,78	0,73	0,79	0,84	0,81	0,79	0,79	0,72	1,00											
NL14	0,81	0,76	0,87	0,84	0,78	0,79	0,85	0,84	0,84	0,82	0,76	0,69	0,82	1,00										
NL15	0,72	0,70	0,75	0,72	0,75	0,70	0,76	0,75	0,78	0,76	0,73	0,69	0,79	0,79	1,00									
NL16	0,75	0,73	0,78	0,75	0,75	0,73	0,79	0,78	0,81	0,76	0,64	0,60	0,76	0,82	0,85	1,00								
NL17	0,75	0,73	0,69	0,69	0,78	0,73	0,70	0,78	0,75	0,82	0,76	0,72	0,79	0,76	0,82	0,79	1,00							
NL18	0,79	0,78	0,82	0,76	0,79	0,72	0,81	0,79	0,82	0,75	0,69	0,67	0,84	0,81	0,84	0,84	0,84	1,00						
NL19	0,76	0,75	0,76	0,76	0,79	0,75	0,75	0,79	0,76	0,84	0,78	0,79	0,78	0,84	0,78	0,81	0,84	0,79	1,00					
LC1	0,73	0,72	0,64	0,64	0,67	0,63	0,66	0,70	0,70	0,69	0,69	0,61	0,75	0,69	0,75	0,69	0,72	0,70	0,67	1,00				
LC2	0,72	0,70	0,72	0,66	0,66	0,58	0,67	0,66	0,75	0,67	0,55	0,60	0,64	0,67	0,67	0,64	0,64	0,72	0,69	0,69	1,00			
LC3	0,66	0,61	0,60	0,63	0,52	0,52	0,70	0,63	0,78	0,64	0,52	0,48	0,67	0,64	0,67	0,67	0,64	0,66	0,63	0,75	0,73	1,00		
VD	0,67	0,66	0,58	0,64	0,61	0,54	0,66	0,64	0,70	0,63	0,54	0,58	0,63	0,60	0,72	0,63	0,66	0,67	0,67	0,70	0,69	0,66	1,00	
TTH	0,67	0,66	0,58	0,61	0,55	0,51	0,66	0,64	0,67	0,60	0,57	0,52	0,63	0,60	0,72	0,60	0,63	0,64	0,58	0,67	0,60	0,60	0,85	1,00

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết quả sử dụng chỉ thị phân tử gen nhân đã đánh giá được mức độ đa dạng và khoảng cách di truyền của các mẫu sâm nghiên cứu. Các chỉ thị thể hiện sự đa hình cao và hệ số tương đồng di truyền của 24 mẫu sâm nghiên cứu dao động từ 48% đến 93%. Kết quả từ sơ đồ quan hệ di truyền cho thấy, ở mức tương đồng 63%, các mẫu sâm chia thành 2 nhánh. Nhánh thứ 1 gồm mẫu tam thất hoang và sâm Vũ

Diệp với mức độ tương đồng đạt 85%. Các mẫu sâm Lai Châu và sâm Ngọc Linh thuộc cùng nhánh thứ 2, điều này thể hiện mối quan hệ họ hàng gần gũi. Tuy nhiên ở mức tương đồng 66% các mẫu sâm Lai Châu và sâm Ngọc Linh tách thành hai phân nhánh. Đặc biệt trong nghiên cứu này, sử dụng chỉ thị phân tử gen nhân đã đánh giá được mức độ đa dạng về kiểu gen và sự không đồng nhất về mặt di truyền các mẫu sâm Ngọc Linh thu thập.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phan Kế Long, Vũ Đình Duy, Phan Kế Lộc, Nguyễn Giang Sơn, Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thị Mai Linh, Lê Thanh Sơn**, 2014b. Mối quan hệ di truyền của các mẫu sâm thu ở Lai Châu trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng matK và ITS-rDNA. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(2): 327-337.
- Phan Kế Long, Trần Thị Việt Thanh, Nguyễn Thiên Tạo, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tư Lệnh, Nguyễn Tiến Lâm, Đặng Xuân Minh**, 2014a. Đặc điểm hình thái và phân tử của *Panax* sp. (Araliaceae) thu ở núi Phu Xai Lai Leng, tỉnh Nghệ An, Việt Nam. *Tạp chí Sinh học* 36(4): 494-499.
- Nguyễn Thị Phương Trang, Lê Thanh Sơn, Nguyễn Giang Sơn, Phan Kế Long**, 2011. Mối quan hệ di truyền của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha & Grushv., 1985) với các loài trong chi *Panax*. *Hội thảo Quốc gia về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 4*: 955-959.
- Choi H.I., Kim N.H., Kim J.H., Choi B.S., Ahn I.O., Lee J.S., and Yang T.J.**, 2011. Development of reproducible EST-derived SSR markers and assessment of genetic diversity in *Panax ginseng* cultivars and related species. *J. Ginseng Res.* 35: 399-412.
- 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.
- Kim N.H., Choi H.I., Ahn I.O. and Yang T.J.**, 2012. EST-SSR marker sets for practical authentication of all nine registered ginseng cultivars in Korea. *Journal of ginseng research*, 36(3): 298.
- Nong Van Duy, Le Ngoc Trieu, Nguyen Duy Chinh, Van Tien Tran**, 2016. A new variety of *Panax* (Araliaceae) from Lam Vien Plateau, Vietnam and its molecular evidence. *Phytotaxa* 277(1): 47-58.
- Rozen S., Skaletsky H.**, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132: 365-386.
- 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. *Biotech* 4(1): 71-78.
- 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.
- Zhu S, Fushimi H, Cai S, Komatsu K**, 2003. Phylogenetic relationship in the Genus *Panax*: inferred from Chloroplast trnK gene and nuclear 18S rRNA gene sequences. *Planta Med* 69: 647-653.

Genetic diversity of Vietnamese ginseng by molecular markers in nuclear genome

Le Hung Linh , Pham Thu Nga, Le Ha Minh, Khuat Thi Mai Luong

Abstract

Evaluation of genetic diversity by nuclear molecular markers is important in selection and development of high quality ginseng varieties. In this study, 17 molecular markers in nuclear genome were designed and used for analysis of genetic diversity of 24 Vietnamese ginseng samples belonging to *Panax* genus. As the results, molecular markers showed high polymorphism and genetic similarity coefficients between 24 samples of, varying from 48% to 93%. In particular, the results indicated that the samples *P. vietnamensis* var. *vietnamensis* were heterogeneous and diversified in genotype.

Keywords: Vietnamese ginseng, genetic diversity, molecular marker

Ngày nhận bài: 9/9/2019

Ngày phản biện: 9/10/2019

Người phản biện: TS. Lê Đức Thảo

Ngày duyệt đăng: 14/10/2019