

ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ ĐỂ ĐỊNH DANH TUYẾN TRÙNG SỐNG TỰ DO, SÔNG SÀI GÒN

NGÔ XUÂN QUẢNG*, NGUYỄN ĐÌNH TỬ**

TÓM TẮT

Mẫu tuyến trùng sống tự do ở sông Sài Gòn bước đầu được áp dụng phương pháp sinh học phân tử cho việc xác định loài. Sau khi xác định hình thái của 18 mẫu cá thể tuyến trùng, phương pháp sử dụng sinh học phân tử được áp dụng bằng việc sử dụng mỗi JB3-JB5 và G18S4 - 4R. Kết quả nghiên cứu đã xác định được 14 loài tuyến trùng sống tự do của 9 giống thuộc 9 họ: Comesomatidae, Linhomoidae, Spharolaimidae, Desmodoridae, Xyalidae, Chromadoridae, Oxystominidae, Oncholaimidae và Ironidae. Kết quả nghiên cứu cho thấy mỗi JB3-JB5 và G18S4 - 4R trong phương pháp sinh học phân tử đối với tuyến trùng đạt tỉ lệ thành công rất cao.

Từ khóa: tuyến trùng, sinh học phân tử, định danh, sông Sài Gòn.

ABSTRACT

Applying molecular biology method to identify free-living nematode species in the Sai Gon river

The molecular biology method was initially applied to identify free-living nematode species in Sai Gon river. After identifying 18 nematode species by morphological characters, molecular methods were applied by using primer JB3-JB5 and G18S4 - 4R. Results of the study identified 14 species belonging to 9 genera, 9 families: Comesomatidae, Linhomoidae, Spharolaimidae, Desmodoridae, Xyalidae, Chromadoridae, Oxystominidae, Oncholaimidae and Ironidae. The results proved that primers JB3-JB5 and G18S4 - 4R in the molecular methods for free living nematode species identification prove highly efficient.

Keywords: free living nematode, molecular method, identification, Sai Gon river.

1. Mở đầu

Ngày nay, việc điều tra đa dạng sinh học của tuyến trùng sống tự do trong các hệ sinh thái không những được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh quan trực môi trường, mà còn làm sáng tỏ các mối quan hệ giữa dạng sinh học và chức năng của hệ sinh thái. Tuy nhiên, việc nghiên cứu về đa dạng sinh học của tuyến trùng biển vẫn còn gặp một số hạn chế, khó khăn nhất định (Derycke *et al.*, 2010). Cho đến nay, tại Việt Nam thì các nghiên cứu về tuyến trùng học nói chung và tuyến trùng biển nói riêng chủ yếu vẫn dựa vào phân tích về các đặc điểm hình thái học, những nghiên cứu

* TS, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;
Email: ngoxuanq@gmail.com

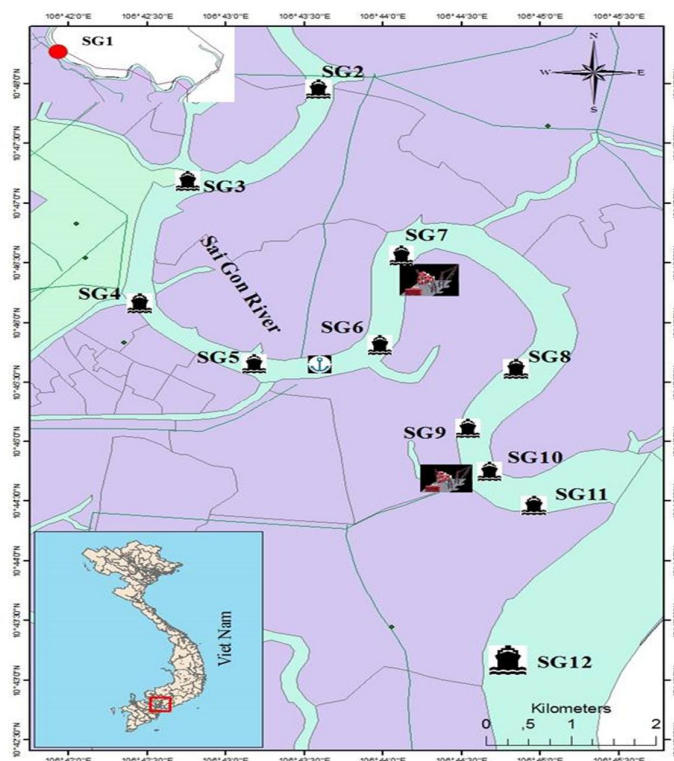
** TS, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

này không những mất nhiều thời gian mà còn bị hạn chế bởi một số các đặc điểm đồng kiểu hình (phenotype) thường gặp trong các quần thể tuyến trùng. Trong nghiên cứu của Nguyễn Đình Tứ và cs. (2013), tác giả cũng đã công bố một số nghiên cứu về đặc điểm phân tử của vùng gen D2/D3 và ITS của 5 loài tuyến trùng biển thuộc họ Comesomatidae. Hơn thế nữa, gần đây các nghiên cứu về phân loại học và di truyền quần thể của tuyến trùng đã phác lộ ra khả năng sử dụng sinh học phân tử một cách dễ dàng thông qua phân tích trình tự cây chủng loại phát sinh (Derycke *et al.*, 2010) đối với nhiều loài tuyến trùng có chung nguồn gốc họ hàng.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Mẫu dùng cho việc phân tích sinh học phân tử được thu trong mùa mưa (tháng 9 năm 2015) tại 12 vị trí trên sông Sài Gòn được kí hiệu như sau: SG1 (Khu vực địa đạo Bến Đình, huyện Củ Chi), SG2 (Tân Cảng), SG3 (Nhà máy đóng tàu Ba Son), SG4 (Cảng Sài Gòn), SG5 (Cảng Tân Thuận Đông), SG6 (Cảng Bến Nghé), SG7 (Cảng Công ti Liên doanh phát triển Tiếp vận số 1), SG8 (Cảng ELF GAS Sài Gòn), SG9 (Cảng Biển Đông), SG10 (Cảng Nhà máy Tàu biển Sài Gòn), SG11 (Cảng Bông Sen), SG12 (cảng dầu thực vật) (Hình 1).



Hình 1. Bản đồ thu mẫu tuyến trùng sống tự do trên sông Sài Gòn

2.2. Phương pháp thu mẫu ngoài thực địa

Các mẫu tuyến trùng sau khi thu được gạn lọc tại chỗ và cố định trong dung dịch DESS (DMSO 20%, 0,25 M disodium EDTA, và làm bão hòa với saturated with NaCL, pH 8,0) (Yoder *et al.*, 2006). Mẫu sau đó được mang về phòng thí nghiệm để phục vụ cho các bước phân tích tiếp theo.

2.3. Phương pháp tiến hành trong phòng thí nghiệm

Phương pháp tách lọc sử dụng Ludox: tuyến trùng được tách ra khỏi trầm tích bằng dung dịch Ludox-TM50 (tỉ trọng 1,18) (Heip *et al.*, 1985), sau đó được rửa lại với nước và cố định lại trong dung dịch DESS.

Phương pháp phân tích các đặc điểm hình thái (vouchering): trong mỗi một mẫu thu được sau gạn lọc, từng cá thể tuyến trùng sẽ được gắp ra dưới kính lúp, rửa ba lần với nước cất để loại bỏ DESS, sau đó đặt lên một lam kính sạch với một giọt nước cất và đậy lại, quan sát dưới kính hiển vi để định loại, chụp hình, ghi nhận các kích thước số đo của cơ thể.

Các kỹ thuật sinh học phân tử áp dụng:

Lưu trữ: sau khi các đặc điểm hình thái và số đo được ghi nhận, từng cá thể tuyến trùng được chuyển vào các ống li tâm nhỏ chứa 20µl dung dịch đệm Worm Lysis Buffer (WLB) (50mM KCL; 10mM Tris pH 8,3; 2,5mM MgCl₂; 0,45% NP 40 (Tergitol Sigma); và 0,45% Tween 20) (William *et al.*, 1992). Các ống nhỏ chứa tuyến trùng này được cất giữ tại -20 °C.

Tách chiết ADN tổng số: để tách chiết ADN, sử dụng 1µl proteinase K (10mg/ml) thêm vào ống chứa tuyến trùng với dung dịch đệm, ủ một giờ tại 65°C rồi chuyển sang nhiệt độ 95 °C trong vòng 10 phút. Mẫu sau đó được đem đi li tâm 1 phút với tốc độ khoảng 14000 rpm.

Khuếch đại ADN bằng phản ứng trùng hợp Polimerase chain reaction (PCR): vùng I3-M11 của gen ti thể COI được khuếch đại bằng môi xuôi JB3 (5'-TTTTTGGGCA TCCTGAGGTTTAT-3') (Bowles *et al.*, 1992) và môi ngược JB5 (5'-AGCACCTAAACTT AAAACATAATGAAAATG-3') (Derycke *et al.*, 2005). Chu trình của phản ứng PCR bao gồm 5 phút biến tính ban đầu tại 94°C, theo sau là 35 chu kỳ bao gồm 30 giây biến tính tại 94°C, 30 giây bắt cặp tại 50°C và 30 giây kéo dài tại 72°C; cuối cùng là chu kỳ kéo dài cuối tại 72°C trong 10 phút. Vùng F04 900 bp của gen 18S ADNr được khuếch đại sử dụng môi xuôi G18S4 (5'-GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC-3') và môi ngược 4R (5'-GTATCTGATCGCKTCGAWC-3') (Creer *et al.*, 2010). Chu trình của phản ứng PCR bao gồm 5 phút biến tính ban đầu tại 94°C, theo sau là 39 chu kỳ bao gồm 30 giây biến tính tại 94°C, 30 giây bắt cặp tại 56°C và 60 giây kéo dài tại 72°C; cuối cùng là chu kỳ kéo dài cuối tại 72°C trong 10 phút.

Điện di trên gel Agarose: nạp sản phẩm PCR trên gel agarose 1% được nhuộm với 0,003% ethidium bromide. Kiểm tra sự thành công dựa trên các băng quan sát được (các băng ADN trong gel được quan sát trên máy soi gel bằng tia tử ngoại).

Giải trình tự: Tất cả các sản phẩm của phản ứng PCR được gửi đi và giải trình tự tại công ti MacroGen Inc.

Phương pháp kiểm soát chất lượng các chuỗi trình tự được giải: các chuỗi trình tự được kiểm tra lỗi bằng phần mềm DNASTAR Lasergene SeqMan Pro v7.1.0 và căn chỉnh trên phần mềm MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Để đảm bảo tất cả các chuỗi trình tự đều là của tuyến trùng, chúng sẽ được kiểm tra trên ngân hàng gen về trình tự tương đồng (các truy vấn có kết quả 99%-100%) trước khi cây phả hệ được xây dựng. Trong trường hợp các chuỗi trình tự của COI, việc dịch mã ra các amino acid giúp kiểm tra chất lượng của các chuỗi trình tự. Trong trường hợp các chuỗi trình tự của 18S ADNr, chương trình Gblocks được áp dụng để kiểm tra các vị trí “gap” (khoảng trống) của ADN.

Để xác nhận các chuỗi trình tự thu được, các cây phả hệ được xây dựng dựa trên phần mềm MEGA v6.0, sử dụng phương pháp Neighbour-joining tree (NJ) và mô hình khoảng cách so sánh từng đôi một (pairwise distance). Bootstrap 1000 được sử dụng để đánh giá độ tin cậy của sự phân nhánh trên các cây phả hệ NJ.

Khoảng cách di truyền cùng loài (intraspecific) và khác loài (interspecific) tính toán trên phần mềm Species Identifier of TaxonDNA v1.6.3. sử dụng mô hình khoảng cách so sánh từng đôi một.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm phân tử của các loài tuyến trùng

Trên cơ sở hình thái của 18 mẫu cá thể tuyến trùng thuộc 14 loài tuyến trùng biển của 9 giống nằm trong 9 họ: Comesomatidae, Linhomoidae, Spharolaimidae, Desmodoridae, Xyalidae, Chromadoridae, Oxystominidae, Oncholaimidae và Ironidae. Tỷ lệ khuếch đại và giải trình tự thành công của các loài được thể hiện trong Bảng 1.

Tỷ lệ thành công của việc khuếch đại ADN bằng phản ứng PCR đối với cặp mG18S4-4R đạt 20 mẫu (đạt 80%) và đối với cặp mồi JB3-JB5 là 13 (đạt tỷ lệ thành công là 52%). Tỷ lệ thành công của việc giải trình tự cho đoạn gen 18S là 14 mẫu (đạt tỷ lệ 70%) và đối với đoạn gen COI là 10 mẫu (đạt 77%).

Bảng 1. Bảng mã AND, tỉ lệ khuếch đại và giải trình tự thành công của các loài tuyến trùng

Họ tuyến trùng	Tên loài	gen 18S	gen COI	Mã ADN
Comesomatidae	1. <i>Sabatieria</i> sp.	x		9Q
Linhomoidae	2. <i>Terschellingia</i> elegan		x	21Q
	3. <i>Terschellingia</i> sp.	x		10Q
	4. <i>Terschellingia</i> sp.	x		16Q
Sphaerolaimidae	5. <i>Parasphaerolaimus</i> sp.1	x	x	4Q
	6. <i>Parasphaerolaimus</i> sp.1	x	x	19Q
	7. <i>Parasphaerolaimus</i> sp.2	x	x	5Q
	8. <i>Sphaerotheristus</i> sp.	x	x	22Q
	9. <i>Sphaerotheristus</i> sp.		x	8Q
	10. <i>Sphaerolaimus maeoticus</i>		x	18Q
Desmodoridae	11. <i>Desmodora</i> sp.	x		6Q
Xyalidae	12. <i>Daptonema</i> sp1.	x		1Q
	13. <i>Daptonema</i> sp2.	x		3Q
Chromadoridae	14. <i>Spilophorella</i> sp1	x	x	2Q
	15. <i>Spilophorella</i> sp2	x	x	20Q
Oxystominidae	16. <i>Halalaimus</i> sp.	x		11Q
Oncholaimidae	17. <i>Viscosia</i> sp		x	15Q
Ironidae	18. <i>Trissonchulus</i> sp.	x		7Q

3.2. Khoảng cách di truyền và những sai khác của gen 18S ADNr và đoạn gen I3-M11 của COI

Chiều dài đoạn gen 18S của các loài trong mẫu nghiên cứu dao động từ 625 (*Halalaimus*_sp_11Q) đến 768 Nucleotit (*Daptonema*_sp1_1Q, *Parasphaerolaimus*_sp1_4Q...). Trong 4 loại Nucleotit thì Nucleotit loại T, C và A chiếm tỉ lệ cao hơn loại Nucleotit G (Bảng 2).

Đối với đoạn gen COI thì chiều dài đoạn gen này ngắn hơn so với đoạn gen 18S, chúng dao động từ 208 (*Sphaerolaimus_maeoticus*_18Q) đến 399 nucleotit (*Viscosia*_sp_15Q). Cũng tương tự như đoạn gen 18S, tỉ lệ các 3 loại Nucleotit là T, C và A cao hơn so với loại Nucleotit G (Bảng 3).

Bảng 2. Thành phần nucleotit và chiều dài gen 18S ADNr của các loài tuyến trùng

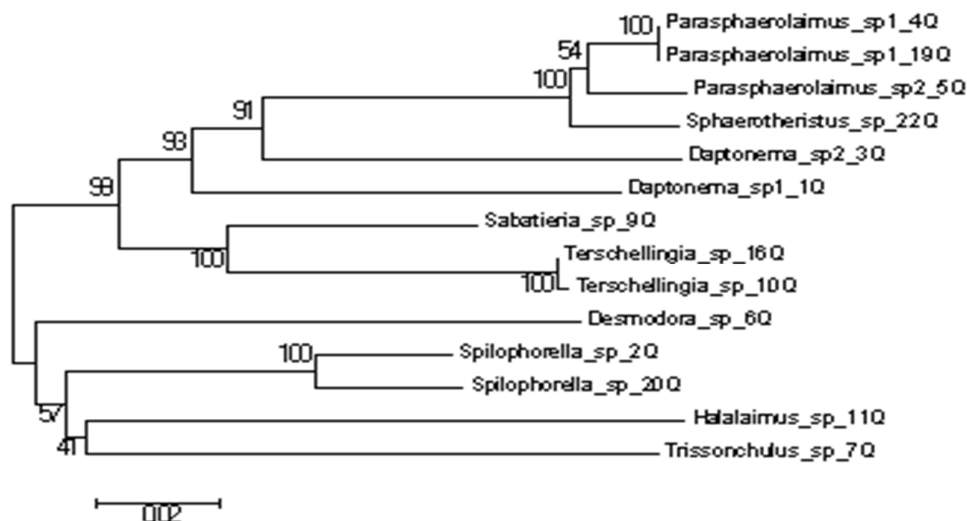
Tên loài	Tỉ lệ % các loại Nucleotit				Số Nucleotit
	T(U)	C	A	G	
<i>Desmodora_sp_6Q</i>	27,4	26,1	27,9	18,6	767,0
<i>Daptonema_sp1_1Q</i>	26,6	27,0	25,9	20,6	768,0
<i>Daptonema_sp2_3Q</i>	26,3	25,9	27,5	20,4	765,0
<i>Spilophorella_sp1_2Q</i>	27,0	26,6	26,2	20,3	764,0
<i>Halalaimus_sp_11Q</i>	26,1	27,7	27,2	19,0	625,0
<i>Parasphaerolaimus_sp1_4Q</i>	25,8	26,7	25,7	21,9	768,0
<i>Parasphaerolaimus_sp1_19Q</i>	25,8	26,7	25,7	21,9	768,0
<i>Parasphaerolaimus_sp2_5Q</i>	26,3	26,4	25,9	21,4	768,0
<i>Spilophorella_sp2_20Q</i>	26,6	26,5	26,7	20,2	763,0
<i>Sabatieria_sp_9Q</i>	25,6	27,6	26,1	20,7	767,0
<i>Sphaerotheristus_sp_22Q</i>	26,6	26,4	25,4	21,6	768,0
<i>Trissonchulus_sp_7Q</i>	26,2	25,8	28,7	19,3	581,0
<i>Terschellingia_sp_16Q</i>	26,6	27,3	24,0	22,0	736,0
<i>Terschellingia_sp_10Q</i>	26,3	26,8	24,6	22,3	719,0
Trung bình	26,4	26,7	26,2	20,8	737,6

Bảng 3. Thành phần nucleotit và chiều dài gen đoạn gen COI của các loài tuyến trùng

Tên loài	Tỉ lệ % các loại Nucleotit				Số Nucleotit
	T(U)	C	A	G	
<i>Spilophorella_sp1_2Q</i>	42,8	10,6	28,9	17,7	339,0
<i>Parasphaerolaimus_sp1_4Q</i>	39,3	15,2	24,8	20,7	270,0
<i>Parasphaerolaimus_sp1_19Q</i>	38,5	14,1	26,3	21,2	312,0
<i>Parasphaerolaimus_sp2_5Q</i>	37,7	10,6	30,8	20,9	292,0
<i>Spilophorella_sp2_20Q</i>	43,3	9,4	27,4	19,9	307,0
<i>Sphaerotheristus_sp_22Q</i>	40,1	11,1	27,3	21,5	289,0
<i>Sphaerotheristus_sp_8Q</i>	40,8	10,6	27,1	21,6	292,0
<i>Sphaerolaimus_maeoticus_18Q</i>	45,2	11,1	25,0	18,8	208,0
<i>Terschellingia_elegan_21Q</i>	42,6	12,9	21,0	23,5	319,0
<i>Viscosia_sp_15Q</i>	45,4	11,3	25,8	17,5	399,0
Trung bình	41,6	11,7	26,5	20,3	302,7

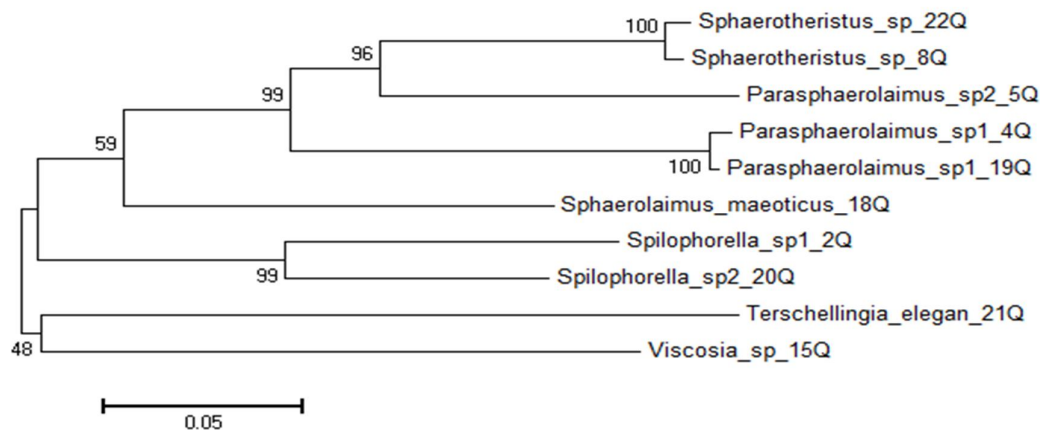
3.3. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của gen 18S ADNr và đoạn gen COI

Bằng phương pháp phân tích đoạn gen 18S và phân tích mối quan hệ di truyền của một số loài tuyến trùng tại sông Sài Gòn, chúng tôi thu được kết quả như sau: Các loài có đặc điểm hình thái khác nhau thì cho ra kết quả về di truyền là khác nhau, chúng tôi chưa tìm thấy loài đồng hình nào trong các mẫu nghiên cứu này (hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loài dựa trên gen 18S ADNr
(Phương pháp Bootstrap neighbor-joining với số lần lặp 1000)

Bằng phương pháp phân tích đoạn gen COI và phân tích mối quan hệ di truyền của một số loài tuyến trùng tại sông Sài Gòn, chúng tôi thu được kết quả như sau: Qua cây phát sinh chủng loại hình 3, có thể thấy rằng việc sử dụng phương pháp phân tử để đánh giá đa dạng sinh học quần xã tuyến trùng là một việc làm cần thiết, nó hỗ trợ cho những khó khăn trong việc định loại bằng hình thái.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loài dựa trên gen COI của các loài tuyến trùng
(Phương pháp Bootstrap neighbor-joining với số lần lặp 1000)

4. Kết luận

Việc sử dụng mỗi JB3-JB5 và G18S4 - 4R trong phương pháp sinh học phân tử đối với tuyến trùng đạt tỉ lệ thành công rất cao.

Chiều dài đoạn gen 18S của các loài trong mẫu nghiên cứu dao động từ 625 đến 768 Nucleotit. Đối với đoạn gen COI thì chiều dài đoạn gen này ngắn hơn so với đoạn gen 18S, chúng dao động từ 208 đến 399.

Trong 4 loại Nucleotit thì Nucleotit loại T, C và A chiếm tỉ lệ cao hơn loại Nucleotit G.

Ghi chú: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong Đề tài mã số 106-NN.06-2013.66.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bowles, J, Blair D & McManus, D.P. (1992), "Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing", *Mol Biochem Parasitol*, 54: 165-173.
2. Derycke, S., Fonseca, G., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M. & Moens, T. (2008), "Disentangling taxonomy within the *Rhabditis* (*Pellioditis*) *marina* (Nematoda, Rhabditidae) species complex using molecular and morphological tools", *Zoological Journal of the Linnean Society*, 152: 1-15.
3. Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T. & Moens, T. (2010), "Exploring the Use of Cytochrome Oxidase c Subunit 1 (COI) for DNA Barcoding of Free-Living Marine Nematodes", *PLoS One*. 5(10): e13716.
4. Derycke, S., Remerie, T., Vierstraete, A., Backeljau, T., Vanfleteren, J., Vincx, M. & Moens, T. (2005), "Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioditis marina*", *Marine Ecology Progress Series*, 300: 91-103.
5. Heip, C., Vincx, M. & Vranken, G. (1985), "The ecology of marine nematodes. Oceanography and Marine Biology", *Annual Review. London*, 23: 399-489.
6. Koichiro, T., Glen, S., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013), MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Mol Biol Evol.*, 30(12): 2725–2729.
7. Nguyen, D.T., Nguyen, T.H., Phan, K.L., Tchesunov, A. & Nguyen, V.T. (2013), "Supplement on molecular data for five free – living marine nematode species of the famili Comesomatidae Filipjev", 1918 (Nematoda: Chromadorada) from North Vietnam, *Journal of Biology*, 35(3): 265 - 273
8. Yoder, M., De Ley, I.T., King I. W., Mundo-Ocampo, M., Mann J., Blaxter M., Poiras L. & De Ley P. (2006), DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes, *Nematology*, 8:367- 376.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 22-7-2016; ngày phản biện đánh giá: 08-8-2016;
ngày chấp nhận đăng: 13-9-2016)