

ĐỊNH LOẠI MỐI *Coptotermes* THU TẠI CHÙA LINH QUANG, HÀ ĐÔNG, HÀ NỘI DỰA TRÊN TRÌNH TỰ CÁC ĐOẠN DNA TRÊN GEN MÃ HÓA RNA RIBOSOME 16S TI THỂ

Nguyễn Thị Thảo¹, Đào Trọng Khoa², Lê Quỳnh Giang², Đỗ Thị Huyền²,
Nguyễn Thị Trung², Nguyễn Thúy Hiền³, Nguyễn Quốc Huy³, Trương Nam Hải^{2*}

¹Trường Đại học Vinh, Nghệ An

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *tnhai@ibt.ac.vn

³Viện Sinh thái và Bảo vệ Công trình

TÓM TẮT: Phương pháp PCR dựa trên hai cặp mồi đặc hiệu khuếch đại hai đoạn gen kích thước 151 bp và 428 bp nằm trong gen mã hóa rRNA 16S ti thể cho phép nhận dạng mối *Coptotermes formosanus* từ các loài mối thuộc giống *Coptotermes*. Theo phương pháp này, nếu sản phẩm PCR có hai đoạn DNA kích thước như trên được phát hiện trên gel agarose thì đó là loài *C. formosanus*. Trong công trình này, chúng tôi đã sử dụng chính hai cặp mồi này để định tên mối *Coptotermes* HN1 thu tại chùa Linh Quang bằng phương pháp PCR. Trên gel agarose, sản phẩm PCR thu được là 2 đoạn DNA có kích thước tương đương với kích thước 2 đoạn gen được khuếch đại từ *C. formosanus*. Tuy nhiên, kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gen ngắn có kích thước 160 bp và đoạn dài có kích thước 428 bp đều tương đồng cao (100% và 98%) so với gen tương ứng của loài mối *C. gestroi*. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa vào hai đoạn gen trên cùng với 40 gen tương ứng có mức độ tương đồng cao lấy từ Ngân hàng Gen. Kết quả, loài mối này nằm hoàn toàn trong nhánh của *C. gestroi* và nằm rất xa với nhánh phát sinh loài *C. formosanus*. Vì vậy, mối thu thập tại chùa Linh Quang, Hà Đông, Hà Nội được đặt tên là *C. gestroi* HN1.

Từ khóa: *Coptotermes*, gen mã hóa 16S rRNA, mối, PCR.

MỞ ĐẦU

Mối là nhóm côn trùng phân hủy lignocellulose hiệu quả [1], nhờ đó chúng đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy vật chất, cải thiện thành phần của đất và nguồn thức ăn cho các động vật khác [5]. Tuy nhiên, do kích thước quần thể lớn cùng với tập tính dinh dưỡng cũng như xây tổ, mối đã gây hại đáng kể cho các công trình kiến trúc và vật dụng gia đình. Theo Su (2000) [8] ước tính, hàng năm thế giới phải tiêu tốn hơn 20 tỷ USD để kiểm soát mối.

Nhóm mối rất đa dạng về các đặc điểm sinh học và sinh thái (kích thước quần thể, kích thước cũng như hình dạng tổ, loại thức ăn, hình thức phân đàn và tập tính sinh sản). Ngoài ra, ở mối, đặc điểm hình thái giữa các loài không rõ ràng, việc thu thập các đẳng cấp khác nhau (mối lính, mối thợ, mối chúa, mối vua, mối cánh) rất khó khăn, điều kiện sống đa dạng và thiếu các nghiên cứu có hệ thống dẫn đến việc phân loại chúng bằng các phương pháp truyền thống như dựa vào đặc điểm hình thái hay đặc điểm sinh

thái rất phức tạp, dễ nhầm lẫn và tính chính xác không cao. Những hạn chế này được khắc phục khi mối được phân loại bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tử [10].

Trình tự nucleotide của gen RNA ribosome 16S đã được chứng minh là công cụ phân tử để định loại chính xác và hiệu quả các loài sinh vật, đặc biệt là côn trùng và vi sinh vật. Vì vậy, trong những năm gần đây, kỹ thuật này đã được sử dụng rộng rãi để định loại các loài như muỗi [6], mối [4, 10], ruồi [3] và vi sinh vật [4]. Các gen ty thể là những gen khá bền vững và có kích thước nhỏ thuận tiện cho việc phân lập, giải trình tự và phân tích, vì vậy, chúng là những chỉ thị được sử dụng rộng rãi nhất trong định loại phân tử [7]. Kỹ thuật PCR dễ dàng tách các đơn vị phân loại (taxon) có quan hệ gần gũi nhờ các chi thị là DNA ti thể đặc hiệu và đã được sử dụng phổ biến trong phân tích hệ thống phân loại và phát sinh loài [7]. Các gen mã hóa rRNA (như 12S và 16S), tRNA và các gen mã hóa (như cytochrome oxidase - COI I và II) là

những chỉ thị DNA ty thể đầu tiên được sử dụng để xác định các loài thuộc giống *Reticulitermes* [10]. Trong đó, gen rRNA 16S đã được chứng minh là chỉ thị DNA ti thể chính xác và không tổn kém cho việc phân loại mối [10].

Szalanski et al. (2004) [9] đã xây dựng phương pháp PCR dựa trên hai cặp mồi đặc hiệu khuếch đại hai đoạn DNA trong gen mã hóa rRNA 16S để định tên mối thuộc giống *Coptotermes*. Theo nhóm tác giả, nếu sử dụng hai cặp mồi này, bằng kỹ thuật PCR loài *C. formosanus* có thể được xác định dựa trên kích thước sản phẩm tạo thành. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng các cặp mồi của nhóm Szalanski et al. (2004) [9] để định loại mối thuộc giống *Coptotermes*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mối thợ được thu thập tại chùa Linh Quang, làng Văn Quán, Hà Đông, Hà Nội và được xác định thuộc giống *Coptotermes* theo hình thái, tập tính tại Viện Sinh thái và Bảo vệ công trình và được gọi là *Coptotermes* HN1. Vector tách dòng pJET1.2/blunt được mua từ hãng Fermentas (Hoa Kỳ). Chủng *E. coli* DH10B (kiểu gen: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ) của Invitrogen (Hoa Kỳ) được dùng làm chủng tách dòng gen. 2 cặp mồi dùng để định loại mối có trình tự như sau: LR-J-13007: 5'-TTACGCTGTTATCCCTAA-3', LR-N-13398: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'; FST-F: 5'-TAAACAAACAACAACAACAACAAC-3', FST-R: 5'-ATG GCTTGACGAGGCACAA-3'. Cặp mồi thứ nhất được thiết kế dành riêng để khuếch đại đặc hiệu đoạn DNA kích thước 428 bp nằm trên gen mã hóa rRNA 16S của các loài thuộc giống mối *Coptotermes* [7]; cặp thứ hai được Szalanski et al. (2004) [9] thiết kế để khuếch đại đặc hiệu đoạn DNA kích thước 151 bp nằm trên gen mã hóa RNA ribosome 16S của loài mối *C. formosanus*.

Tách chiết DNA tổng số của mối

Dùng 0,15 g đầu mối cho vào 1 ml đệm tách chiết (10% sucrose, 1% CTAB, 1,5 M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 100 mM EDTA pH 8) và 0,34 g hạt thủy tinh, ủ 30 phút ở 30°C, lắc 250

vòng/phút. Hỗn hợp được bổ sung 3,5 μl protease K 20 mg/ml, ủ 60 phút ở 50°C, lắc 250 vòng/phút. Sau khi nghiền đầu mối bằng chày nghiền mẫu, hỗn hợp được bổ sung 133,5 μl SDS 20% và ủ 20 phút ở 60°C, lắc 250 vòng/phút. Dịch được hút ra và bổ sung vào 1 lần thể tích đệm ly giải - ATL, ủ 10 phút ở 70°C. Bổ sung 1 lần thể tích 100% ethanol, đảo đều và đưa lên cột QIAquick Spin (Qiagen). Ly tâm 11.000 vòng trong 1 phút để thu cạn. Rửa cột 2 lần bằng đệm AW₁. Rửa cột 2 lần bằng đệm AW₂. Bổ sung 200 μl dH₂O vô trùng rồi ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút và thu dịch.

Khuếch đại đoạn DNA mong muốn bằng kỹ thuật PCR

Mẫu PCR được tiến hành trong tổng thể tích 25 μl bao gồm các thành phần: 13,5 μl dd H₂O, 2,5 μl Thermo Pol Buffer 10X (Biolabs), 1 μl MgSO₄ 25 mM, 1 μl dNTP 2 mM, 2 μl mồi xuôi 10 pmol, 2 μl mồi ngược 10 pmol, 17,2 ng/2 μl khuôn và 0,25 μl enzyme Vent DNA polymerase 2 u/μl (Biolabs). Chương trình PCR được thực hiện ở 6 bước (bước 1: 94°C, 2 phút; bước 2: 94°C, 1 phút; bước 3: 54-57°C, 1 phút; bước 4: 72°C, 1 phút; bước 5: 72°C, 6 phút; bước 6: 4°C, 60 phút; bước 2, 3 và 4 lặp lại 40 chu kỳ). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick Gel Extraction kit và giải trình tự.

Giải trình tự, phân tích trình tự và xây dựng cây phát sinh loài

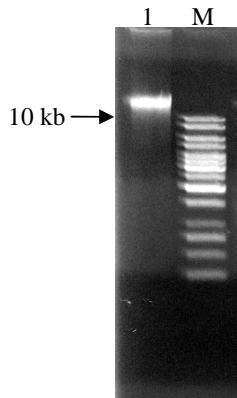
Đoạn DNA được tinh sạch và giải trình tự trên máy giải trình tự tự động AB 3100 (AIBiotech, Hoa Kỳ).

Trình tự nucleotide được xử lý bằng chương trình FastPCR; sắp xếp, so sánh trình tự gen nghiên cứu với các trình tự gen tương ứng của Ngân hàng Gen thông qua chương trình BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sau đó, các gen đại diện có tỷ lệ tương đồng cao và đại diện cho các vùng địa lý khác nhau sẽ được lựa chọn để xây dựng cây phát sinh loài.

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA5. Khoảng cách tiến hóa được tính theo phương pháp 2 tham số của Kimura (Kimura's 2-parameter model).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách DNA tổng số của mối



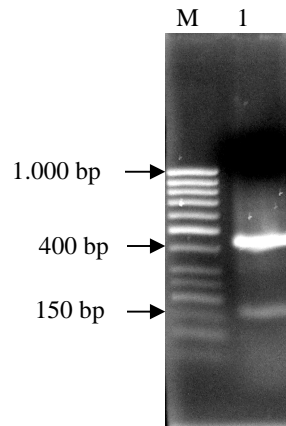
Hình 1. Điện di đồ DNA genome của mối trên gel agarose 0,8%
M: Thang chuẩn 1 kb (Fermentas); 1: genome chưa được tinh sạch.

Với quy trình tách chiết đã mô tả ở phần phương pháp, DNA genome của mối đã được tách chiết thành công, có kích thước cao hơn 10 kb của thang chuẩn (hình 1). DNA genome này được sử dụng trực tiếp cho phản ứng PCR bằng 2 cặp mồi LR-J-13007 và LR-N-13398; Mr16SR và Mr16SF.

PCR khuếch đại đoạn DNA của gen RNA ribosome 16S ti thể mối

Cặp mồi đặc hiệu LR-J-13007 và LR-N-13398 được tối ưu nhiệt độ bắt cặp giữa mồi và khuôn từ 44°C đến 54°C với khoảng gradient nhiệt độ là 2°C. Tương tự, cặp mồi thứ hai FST-F và FST-R được tối ưu nhiệt độ bắt cặp từ 49°C đến 59°C với khoảng gradient nhiệt độ là

2°C. Kết quả là ở 54°C, cặp mồi thứ nhất đã khuếch đại hiệu quả đoạn DNA duy nhất đậm nét kích thước khoảng 0,45 kb và cặp mồi thứ hai cũng khuếch đại tốt nhất một băng DNA duy nhất đậm nét có kích thước khoảng 0,15 kb ở 57°C (hình 2). Hai đoạn DNA được khuếch đại này có kích thước tương tự 2 đoạn DNA được Szalanski et al. (2004) [9] khuếch đại từ khuôn là DNA genome của *C. formosanus*. Theo như đánh giá của Szalanski et al. (2004) [9], loài mối được chúng tôi nghiên cứu là *C. formosanus*. Để khẳng định điều này, chúng tôi đã tinh sạch và giải trình tự 2 đoạn DNA.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại đoạn DNA của gen RNA ribosome 16S ti thể mối bằng 2 cặp mồi LR-J-13007+LR-N-13398 và Mr16SR+ Mr16SF. M: Thang chuẩn 50 bp (Fermentas); 1: sản phẩm PCR

Phân tích trình tự sản phẩm PCR

1	TTACGCTGTTATCCCTAAGGTAATTTAGTCTTACAATCAAAATAAATGGATCAAATAATT	60
61	ATAAATCAATATAACCAAACTAAGAGGAGTTAAGTACATTCCTCCCATCACCCCAACAA	120
121	AACAAAAAGCCCACTCACCAAAAATAACAAACAACAAGTAAATAAACCAAATGTC	180
181	AAACTCTATAGGGTCTTCTCGTCCCACAAAAACATCTAAGAATTTTAACTCAAAGACCAA	240
241	ATTCAATAAAAACATTCAACACTAAGACAGCCCGTGCCTCGTCAAGCCATTCAATCCAGAT	300
301	CACAATTAAAACTACCGATTATGCTACCTTTGCACGGTCAAAATACCGCGGCCCTTCAA	359
360	ACACCAAATGTGACGGGCAGGCCATACTTCAAACTAACAAAGAAAGATGTTTTGATAA	419
420	ACAGGCGAA	428

Hình 3. Trình tự nucleotide của đoạn DNA khuếch đại bằng cặp mồi LR-J-13007 và LR-N-13398 có chiều dài 428 bp. Các trình tự nucleotide có gạch chân là trình tự của 2 đoạn mồi

1 AAACAAACAAACAACAACAACAACAACAAGTAAATAAACCAAATGTCAAACCTCTATA 60
 61 GGGTCTTCTCGTCCCACAAAAACATCTAAGAATTTTAACTCAAAGACCAAATTC AATAAA 120
 121 ACATTCAACACTAAGACAGCCTGTGCCTCGTCAAGCCATA 160

Hình 4. Trình tự nucleotide của đoạn DNA khuếch đại bằng cặp mồi FST-F và FST-R có chiều dài 160 bp. Các trình tự nucleotide có gạch chân là trình tự của 2 đoạn mồi

Bảng 1. Mức độ tương đồng trình tự nucleotide đoạn DNA của gen mã hoá RNA ribosome 16S ti thể của *Coptotermes* HN1 được khuếch đại từ cặp mồi LR-J-13007 và LR-N-13398 và 10 dạng mồi *Coptotermes gestroi* của Ngân hàng Gen thế giới

STT	Loài	Gen	Mã số	Kích thước gen	Tỷ lệ (%) nucleotide được so sánh	Tỷ lệ (%) nucleotide tương đồng	Vị trí địa lý
1	<i>C. gestroi</i>	<i>CgB1</i>	gb DQ00488.1	428	100	98	Thái Lan
2	<i>C. gestroi</i>	<i>CgS6</i>	gb DQ915942.1	431	100	98	Singapore
3	<i>C. gestroi</i>	<i>CgS7</i>	gb EF092285.1	431	100	98	Singapore
4	<i>C. gestroi</i>	<i>CgS3</i>	gb DQ004478.1	429	100	98	Singapore
5	<i>C. gestroi</i>	<i>CgS5</i>	gb DQ004480.1	429	100	98	Singapore
6	<i>C. gestroi</i>	<i>CgA2</i>	gb DQ004478.1	429	100	98	Australia
7	<i>C. gestroi</i>	<i>BAR2</i>	gb HQ231234.1	524	100	98	Italy
8	<i>C. gestroi</i>	<i>CgM2</i>	gb DQ004481.1	429	100	98	Malyasia
9	<i>C. gestroi</i>	<i>CgM3</i>	gb DQ004482.1	429	100	98	Malyasia
10	<i>C. gestroi</i>	<i>CgS2</i>	gb DQ004476.1	429	100	98	Singapore

Sản phẩm PCR của 2 cặp mồi trên đã được giải trình tự thành công trên máy AB 3100 (AIBiotech, Hoa Kỳ). Trình tự DNA được xử lý và phân tích bằng phần mềm FastPCR và Chromas Lite đã cho thấy đoạn DNA được khuếch đại bằng 2 cặp mồi có kích thước tương ứng là 428 bp (hình 3) và 160 bp (hình 4) gần với kích thước 428 bp và 151 bp đã được Szalanski et al. (2004) [9] công bố.

Khi so sánh trình tự đoạn 390 bp (là đoạn trình tự 428 bp nghiên cứu đã được loại bỏ 2 trình tự của 2 đoạn mồi) với 100 gen tương đồng nhất trên Ngân hàng Gen NCBI, chúng tôi thấy rằng đoạn DNA nghiên cứu tương đồng cao nhất (98%) với gen mã hóa rRNA 16 của các loài *C. gestroi* (bảng 1). Mức độ tương đồng với 50 gen mã hóa rRNA 16S của *C. formosanus* chỉ đạt trong khoảng 93-94%. Để thể hiện rõ mối quan hệ giữa giống mồi *Coptotermes* và các loài thuộc giống này, cây phát sinh loài được thiết lập bằng phần mềm MEGA5 (hình 5) dựa vào trình tự đoạn 390 bp cùng với 40 trình tự gen tương đồng (từ 92-98%) mã hoá RNA ribosome 16S của các loài mồi thuộc giống mồi bậc thấp *Coptotermes* và 1 trình tự gen mã hóa RNA ribosome 16S của mồi

bậc cao *Macrotermes herus* lấy từ Ngân hàng Gen. Kết quả cho thấy, loài mồi thu tại Văn Quán, Hà Nội nằm hoàn toàn trong nhánh tiến hóa của *C. gestroi* và nằm rất xa nhánh *C. formosanus*. Đồng thời, loài mồi bậc cao *Macrotermes herus* nằm riêng rẽ một nhánh so với tất các các loài mồi bậc thấp thuộc giống *Coptotermes*. Điều này chứng tỏ cây phân loại vừa được xây dựng đáng tin cậy.

Cặp mồi FST-F và FST-R đã khuếch đại đoạn gen kích thước 151 bp từ hệ gen của *C. formosanus* nhưng lại khuếch đại đoạn gen có kích thước 160 bp từ hệ gen của *Coptotermes* HN1. Hai đoạn gen này có kích thước hơn kém nhau 9 nucleotide và sự chênh lệch này thấp và khó phát hiện được trên điện di đồ. Hơn nữa, vùng trình tự không tương đồng lại là vùng trình tự nằm ở đầu 5' của mồi xuôi FST-F và một nucleotide ở tận cùng đầu 3' của mồi ngược FST-R. Điều này chứng tỏ, mặc dù mồi không hoàn toàn đặc hiệu cho gen từ *Coptotermes* HN1, nhưng với mức độ tương đồng nhất định, với nhiệt độ gắn mồi thích hợp, đoạn gen đích cũng được khuếch đại lên.

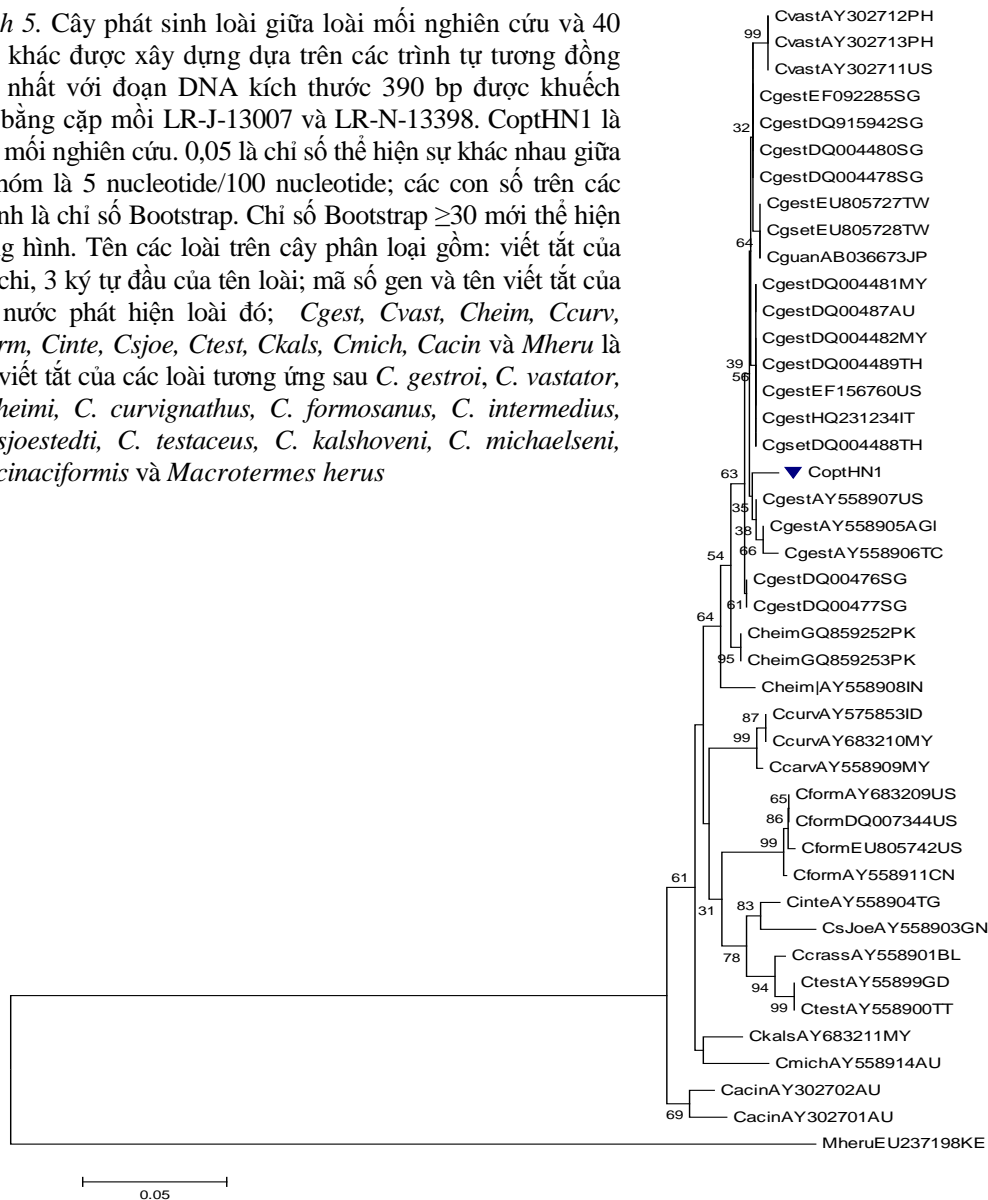
Phân tích vùng 160 bp của gen rRNA 16s

cho thấy, trình tự 126 bp ở bên trong (đã loại bỏ trình tự môi) tương đồng từ 99-100% với các vùng tương ứng của *C. gestroi* (mã số của các gen trên ngân hàng gen FJ376672, HQ231234, JX128688, JX128689, KC887123) và chỉ tương đồng 95-96% các vùng tương ứng của *C. formosanus* (mã số các gen trên ngân hàng gen là EU805741, EU805742, JN615270, KC887106) (hình 6). Kết quả này phù hợp với

kết quả khi so sánh và xây dựng cây phát sinh loài trình tự 390 bp với các trình tự tương ứng khác trên ngân hàng gen quốc tế.

Như vậy, qua phân tích cây phân loại được xây dựng dựa trên trình tự 390 bp và phân tích trình tự nucleotide trình tự 126 bp, chúng tôi có thể kết luận rằng, loài mối *Coptotermes* HN1 mà chúng tôi nghiên cứu là loài *C. gestroi* và được đặt tên là *C. gestroi* HN1.

Hình 5. Cây phát sinh loài giữa loài mối nghiên cứu và 40 loài khác được xây dựng dựa trên các trình tự tương đồng cao nhất với đoạn DNA kích thước 390 bp được khuếch đại bằng cặp mồi LR-J-13007 và LR-N-13398. *CoptHN1* là loài mối nghiên cứu. 0,05 là chỉ số thể hiện sự khác nhau giữa 2 nhóm là 5 nucleotide/100 nucleotide; các con số trên các nhánh là chỉ số Bootstrap. Chỉ số Bootstrap ≥ 30 mới thể hiện trong hình. Tên các loài trên cây phân loại gồm: viết tắt của tên chi, 3 ký tự đầu của tên loài; mã số gen và tên viết tắt của đất nước phát hiện loài đó; *Cgest*, *Cvast*, *Cheim*, *Ccurv*, *Cform*, *Cinte*, *Csjoe*, *Ctest*, *Ckals*, *Cmich*, *Cacin* và *Mheru* là tên viết tắt của các loài tương ứng sau *C. gestroi*, *C. vastator*, *C. heimi*, *C. curvignathus*, *C. formosanus*, *C. intermedius*, *C. sjoestedti*, *C. testaceus*, *C. kalshoveni*, *C. michaelsoni*, *C. acinaciformis* và *Macrotermes herus*



	*	20	*	40	*	60	
CVanQuanVN	:	:	:	: 65
CgestFJ376672MY	:	:	:	: 65
CgestHQ231234IT	:	:	:	: 65
CgestJX128688CN	:	:	:	: 65
CgestJX128689TW	:	:	:	: 65
CgestKC887123CN	:	:	:	: 65
CformEU805741TW	:AC.....	:	:	: 65
CformEU805742US	:AC.....	:T.....	:	: 65
CformJN615270UK	:AC.....	:T.....	:	: 65
CformKC887106CN	:AC.....	:T.....	:	: 65
AAACAAACAaCaAA aA AAATAAACCAAAATGT AAACCTCTATAGGGTCTTCTCGTCCACAAA							
	*	80	*	100	*	120	
CVanQuanVN	:	:	:	: 126
CgestFJ376672MY	:	:	:	: 126
CgestHQ231234IT	:	:	:	: 126
CgestJX128688CN	:	:	:	: 126
CgestJX128689TW	:	:	:	: 126
CgestKC887123CN	:	:	:	: 126
CformEU805741TW	:A.....	:T.....	:	: 126
CformEU805742US	:A.....	:T.....	:	: 125
CformJN615270UK	:A.....	:T.....	:	: 125
CformKC887106CN	:A.....	:T.....	:	: 125
AACATcTAAGAATTTTAACTCAAA ACCAAATTCAATAAAAcaATTCAaCA TAAGACAGC							

Hình 6. Sự sắp xếp 126 cặp nucleotide của rRNA16S từ *Coptotermes* ở Văn Quán tương ứng với 18 trình tự được lấy từ Ngân hàng Gen bằng phần mềm GeneDoc. Vùng dấu chấm thể hiện trình tự tương đồng. Tên của mỗi trình tự bao gồm: viết tắt của tên loài Cgest và Cform tương ứng C. gestroi và C. formosanus, mã số trên Ngân hàng Gen và viết tắt của đất nước đã phát hiện ra loài đó

KẾT LUẬN

Dựa trên trình tự các đoạn DNA của gen mã hóa rARN 16S ti thể được khuếch đại bằng hai cặp mồi LR-J-13007; LR-N-13398 và Mr16SR; Mr16SF [9], mẫu mồi thu được tại chùa Linh Quang, Văn Quán, Hà Nội đã được định danh là loài *C. gestroi* và được đặt tên là *C. gestroi* HN1. Trong công trình này, chúng tôi cho rằng phương pháp có thể sử dụng để định loại mỗi *C. formosanus* cần được nghiên cứu thêm.

Lời cảm ơn: Chúng tôi gửi lời cảm ơn tới PGS. TS Lê Thanh Hòa (Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam) đã giúp đỡ trong nghiên cứu. Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và đề tài Nghị định thư với Nhật Bản: “Phân lập hệ gen mã hóa cho enzyme thủy phân lignocellulose từ khu hệ vi sinh ruột mối Việt Nam bằng kỹ thuật Metagenomics”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe T., Bignell D. E., Higashi M., 2000. Termites. Springer.

2. Harnpicharnchai P., Thongaram T., Sriprang R., Champreda V., Tanapongpipat S., Eurwilaichitr L. 2007. An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified troughing method. Lett. Appl. Microbiol., 45: 387-391.

3. Li X., Cai J., Guo Y., Wu K., Wang J., Liu Q., Wang X., Chang Y., Yang L., Lan L., Zhong M., Wang X., Song C., Liu Y., Li J., Dai Z., 2010. The availability of 16S rRNA for the identification of forensically important flies (Diptera: Muscidae) in China. Trop. Biomed., 27: 155-166.

4. Phạm Ngọc Long, Nguyễn Văn Bắc, Đặng Thị Cẩm Hà, Nghiêm Ngọc Minh, 2009. Phân lập và định tên chủng vi khuẩn HR5.1 từ đất nhiễm chất diệt cỏ/dioxin xử lý bằng bioreaction hiếu khí. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 57: 41-45.

5. Sands W. A., 1972. Termites and Soils By K. E. Lee and T. G. Wood London: Academic Press (1971), Pp. 251, £4. Exp. Agr., 8: 281.

6. Shouche Y. S., Patole M. S., 2000. Sequence analysis of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene fragment from seven mosquito species. *J. Biosci.*, 25: 361-366.
7. Simon C., Storrs C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Ent. Soc. Am.*, 87: 651-701.
8. Su N., 2002. Novel technologies for subterranean termite control. *Sociobiol.*, 40: 95-101.
9. Szalanski A. L., Austin J. W., Scheffrahn R. H., Messenger M. T., 2004. Molecular diagnostics of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Florida Entomologist.*, 87: 145-151.
10. Wang C., Zhou X., Li S., Schwinghammer M., Scharf M. E., Buczkowski G., Bennett G. W., 2009. Survey and Identification of Termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in Indiana. *Ann. Ent. Soc. Am.*, 102: 1029-1036.

**IDENTIFICATION OF TERMITE *Coptotermes* SPECIES
COLLECTED FROM LINH QUANG PAGODA, HA DONG, HANOI BASED
ON DNA SEQUENCES OF THE FRAGMENTS IN THE MITOCHONDRIAL
16S rRNA GENE**

**Nguyen Thi Thao¹, Dao Trong Khoa², Le Quynh Giang², Do Thi Huyen²,
Nguyen Thi Trung², Nguyen Thi Thu Hien³, Nguyen Quoc Huy³, Truong Nam Hai²**

¹Vinh University, Nghe An

²Institute of Biotechnology, VAST

³Institute of Ecology and Works Protection

SUMMARY

In 2004, Szalanski et al. developed PCR method based on 2 pairs of specific primers to amplify 2 DNA fragments of 428 bps and 151 bps located in the mitochondrial 16S rRNA for identifying *C. formosanus* from other *Coptotermes* species. According to the study, a *Coptotermes* species is *C. formosanus* if PCR products were composed of two DNA fragments of 428 bps and 151 bps observed in agarose gel. In this study, using the primers, 2 DNA fragments of 248 bps and 160 bps were amplified from genome of *Coptotermes* HN1 collected from Linh Quang pagoda. In agarose gel, these DNA fragments looked the same sizes with the DNA amplified from genome of *C. formosanus* by Szalanski et al. (2004). However, multialignment showed that the sequences were most homologous with the sequences of *C. gestroi*. Phylogenetic trees were built, based on 40 homologous genes (for each DNA fragment) in GenBank. *Coptotermes* HN1 belonged to *C. gestroi* branch, and was far to the branch of *C. formosanus* in the phylogenetic tree. So the *Coptotermes* HN1 collected from Linh Quang pagoda, Ha Dong, Hanoi was designated as *C. gestroi* HN1. From this study, the identification of *C. formosanus* by PCR developed by Szalanski et al. should have more consideration.

Keywords: *Coptotermes*, classification, 16S rRNA gene, termite, PCR.

Ngày nhận bài: 5-6-2013