

MỘT SỐ THÀNH TỰU BƯỚC ĐẦU ÁP DỤNG KỸ THUẬT PHÂN TỬ ĐỂ PHÂN LOẠI MỘT SỐ NHÓM ĐỘNG VẬT QUAN TRỌNG Ở VIỆT NAM

NGUYỄN NGỌC CHÂU, PHAN KẾ LONG,
TRINH QUANG PHÁP, ĐẶNG TẮT THỂ

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Mặc dù hình thái học đã, đang và vẫn tiếp tục đóng vai trò quan trọng trong phân loại học và vẫn là một trong những nguyên tắc cơ bản trong mọi cấp độ của phân loại học và trong nhiều trường hợp, phân tích hình thái vẫn giữ vai trò đặc lực trong việc cung cấp nhanh chóng các đặc điểm chẩn loại rõ ràng và chính xác đến loài. Tuy nhiên, trong một số trường hợp thì các đặc điểm hình thái học khó đưa ra kết luận chính xác về mặt phân loại. Hơn nữa, đặc điểm hình thái học hầu như không đáp ứng được yêu cầu chẩn loại ở mức độ dưới loài (phân loài) mà đòi hỏi các kỹ thuật phân loại mới là kỹ thuật phân tử, bao gồm: điện di prôtêin, kỹ thuật huyết thanh miễn dịch và các kỹ thuật phân tích DNA. Các chỉ thị phân tử đã trở thành công cụ đặc lực và rất có lợi cho định loại đến loài cũng như cho phép chẩn loại đến mức phân loài, quần thể thậm chí phân biệt ở mức độ cá thể. Sự phát triển nhanh chóng về mặt phương pháp luận đã cho phép triển khai các kỹ thuật phân tử cho việc chẩn loại và định loại tất cả các nhóm động vật. Các phân tử prôtêin và DNA là những công cụ đặc biệt có lợi cho định loại đến loài bởi vì so với phân loại hình thái, chúng ít bị chi phối hơn bởi các yếu tố môi trường và bản thân người nghiên cứu. Kết quả thu được cũng có thể dễ dàng so sánh và giải đoán hơn so với các đặc điểm hình thái phức tạp.

Hiện nay đã hình thành một xu hướng mới trong phân loại học khi đặc điểm di truyền được sử dụng phối hợp với các đặc điểm hình thái. Trong một số trường hợp, các kỹ thuật phân tử riêng biệt có giá trị khẳng định tuyệt đối và rất thích hợp cho công việc định loại thường qui. Do các ưu thế phân tích đặc điểm phân tử trong định loại mà sự áp dụng các kỹ thuật phân tử đã tăng lên một cách nhanh chóng.

Từ năm 2000 đến nay, một số nhóm nghiên cứu tại Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã áp dụng kỹ thuật phân tử để phân loại một số nhóm động vật ở Việt Nam. Đến nay đã có trên 40 công bố trong nước và quốc tế liên quan đến việc áp dụng kỹ thuật phân tử để phân loại động vật ở Việt Nam. Bài báo này sẽ tổng quan và cập nhật những thành tựu mới nhất về các kết quả áp dụng kỹ thuật phân tử để nghiên cứu phân loại một số nhóm động vật ở Việt Nam, đồng thời thảo luận xu hướng phát triển lĩnh vực này ở ta trong thời gian tới.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Các gen được sử dụng trong hệ thống học phân tử

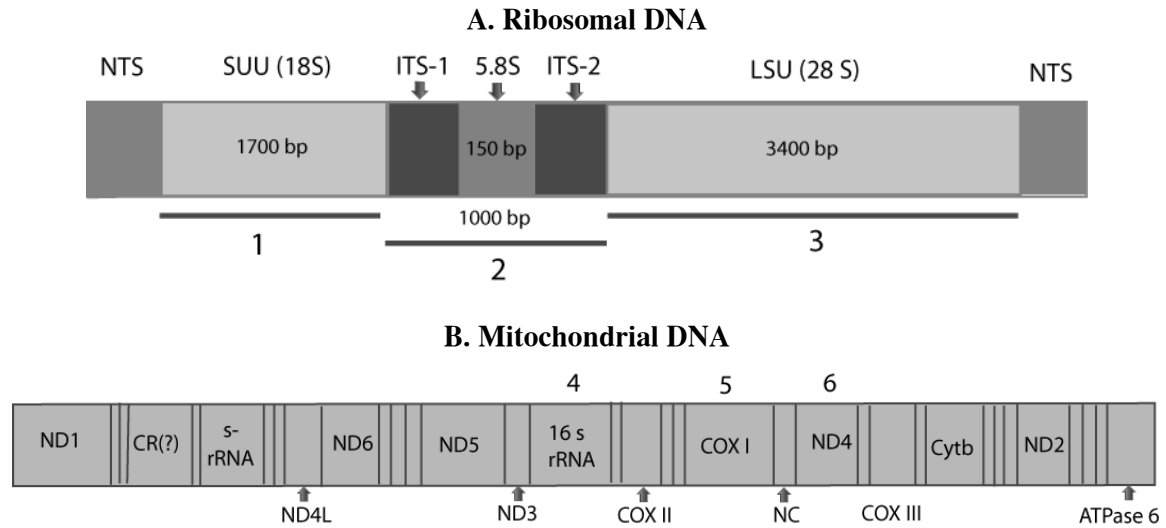
Các tế bào ở động vật đa bào Eukaryotic chứa 2 hệ gen khác nhau, nằm trong nhân và trong ty thể (mitochondria). Trong hệ thống phân loại phân tử, cơ sở số liệu phân tử được xác định từ cả 2 nguồn. Nhằm xác định quan hệ tiến hóa thực sự giữa các cơ thể (đơn vị phân loại), mà thực chất là các đoạn gen hoặc phân tử được lựa chọn cho nghiên cứu trình tự.

Gen RNA ribosom nhân

Các gen ribosom trong nhân, trong đó các gen mã hóa rRNA chiếm đến 2/3 toàn bộ khối lượng của ribosom đủ lớn mới phục vụ cho các phân tích. Các gen này được sắp xếp tuần tự và được tổ chức thành các nhóm trong một đơn vị gen nhỏ (18S) hoặc trong một đơn vị gen lớn (26-28S) và được tách biệt bằng một gen 5.8S nhỏ hơn. Ngoài những đoạn mã này các rRNA còn chứa các chuỗi đệm (đoạn chèn) bao gồm một đệm mã ngoài (ETS) và 2 đệm mã trong là ITS1 và ITS2. Các đơn vị này được tách biệt

bằng các đoạn liên kết trong (IGS) và được xem như các đệm không phiên mã (NTS) (hình 1A). Các gien 18S và 28S tiến hóa chậm và được sử dụng khi so sánh độ dài phân ly của các đơn vị phân loại. Trong khi các đoạn đệm ngoài và đệm trong có tỷ lệ tiến hóa cao hơn và được sử

dụng để tái cấu trúc các nhánh tiến hóa và so sánh hệ của các loài gần nhau hoặc các đơn vị dưới loài. Vùng ITS- rRNA được sử dụng phổ biến và rất thích hợp để phân tích đặc điểm phân tử của các nhóm sinh vật nhỏ như tuyến trùng và vi sinh vật khác.



Hình 1. Sơ đồ các vùng gien sử dụng cho nghiên cứu phân loại và quan hệ phát sinh

1. Dùng phân loại cấp bậc cao (họ); 2. Phân loại loài và dưới loài; 3. Phân loại loài;
- 4 và 5. Phân loại loài và dưới loài; 6. Phân loại dưới loài.

Mitochondrial DNA

Mitochondrial DNA (mtDNA) được sử dụng để kiểm tra cấu trúc và quan hệ tiến hóa các quần thể và giữa các nhóm sinh vật khác nhau. Hệ gien mitochondria của phần lớn sinh vật bao gồm 12 gien mã hóa prôtêin, 22 gien vận chuyển RNA (tRNA); và gien rRNA mã hóa SSU và LSU rRNAs. Ngoài ra, có một vùng không chứa mã gọi là vùng giàu AT (AT-rich region) hoặc vùng có hàm lượng cao các gốc adenine và thymine. Trong hệ gien mitochondria còn chứa một điểm khởi đầu cho sự nhân đoạn (mở chuỗi xoắn) và phiên mã. Các chuỗi mtDNA tích tụ các gốc thay thế nhiều hơn so với chuỗi ITS và có các gốc A + T giàu hơn (chiếm khoảng 75-80%). Mặc dù có tỷ lệ cao các gốc thay thế, mtDNA rất có ích cho các nghiên cứu phát sinh ở mức độ phân loại các taxon bậc thấp (phân loài, quần thể), nhưng không thích hợp trong việc hiệu đính thay thế vì sử dụng vùng này có thể sai về mặt phát sinh đối với cấp độ phân loại cao. Vì vậy, mtDNA được

sử dụng phổ biến để phân tích đặc điểm phân tử đối với các nhóm động vật có xương sống.

2. Các kỹ thuật phân tử đã được áp dụng

a. Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR)

Kỹ thuật PCR cho phép khuếch đại và nhận biết bất kỳ một đoạn phân tử DNA nào. Đây là kỹ thuật phân tích nhanh, đơn giản với giá rẻ để nhân đoạn (khuếch đại) phân tử DNA nhờ enzym xúc tác. Phương pháp này cần DNA khuôn chứa đoạn DNA cần khuếch đại để làm vật liệu ban đầu, 2 đoạn mỗi oligonucleotide (primer) gắn 2 đầu đoạn DNA cần khuếch đại, enzym DNA polymerase và 4 deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) được trộn trong một dung dịch đệm (buffer) chứa các ion magnesium ($MgCl_2$). Các DNA mục tiêu được khuếch đại bằng PCR có thể phục vụ cho các phân tích khác nhau tiếp theo như RFLP, dot blot hoặc sequencing. Ngoài ra, trong một số trường hợp đoạn DNA sau khi khuếch đại có thể

được sử dụng như những marker chuẩn loại cho các nhóm hoặc các loài sinh vật.

b. *Kỹ thuật phân tích đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn PCR (PCR-RFLP)*

Sự biến đổi trình tự trong các sản phẩm PCR có thể được xác định bằng các enzym giới hạn khác nhau và cắt thành các đoạn, các đoạn DNA này sẽ được tách biệt bằng điện di. Nếu có sự sai khác về trình tự các đoạn DNA tại các vùng nhận biết của enzym cắt giới hạn thì kết quả của enzym cắt sẽ tạo ra sản phẩm đa hình các đoạn cắt giới hạn (RFLP). Tùy từng nhóm đối tượng mà có thể sử dụng các mẫu PCR-RFLP tại vùng phiên mã ITS trong gen RNA ở ribosome (rRNA), ITS-rDNA hoặc mtDNA làm dấu hiệu tin cậy để phân biệt giữa các loài. Kỹ thuật này đã được áp dụng để phân tích đặc điểm phân tử một số loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng ở Việt Nam [23-30].

c. *Kỹ thuật giải trình tự DNA (Sequencing DNA)*

Quá trình xác định trật tự nucleotide dọc theo dải DNA gọi là giải trình tự. Hiện tại có 2 phương pháp khác nhau để tiến hành công việc này. Đó là phương pháp phân rã hóa học (Maxam-Cilbert) và phương pháp khác được sử dụng phổ biến hơn gọi là phương pháp kết thúc chuỗi (Sanger). Phương pháp giải trình tự kết thúc chuỗi gần giống với kỹ thuật PCR trong đó bao gồm quá trình tổng hợp một dải DNA mới bổ sung cho dải đơn làm khuôn có sẵn. Phản ứng trình tự bao gồm DNA khuôn, enzym DNA polymerase với đệm phản ứng, một môi và hỗn hợp của 4 deoxynucleotide (dNTP) và 4 dideoxynucleotide (ddNTP). Vì vậy, kết quả là tạo ra một bộ của các chuỗi nucleotide mới với chiều dài khác nhau. Các chuỗi này sau đó được tách rời bằng điện di. Nhờ một cảm biến ghi các màu huỳnh quang của mỗi dải và kết quả này được xử lý bằng chương trình computer có thể hiển thị trật tự các gốc nucleotide dưới dạng file sắc phổ. Kỹ thuật này được áp dụng phổ biến để phân tích đặc điểm phân tử tất cả các nhóm, loài động vật ở Việt Nam.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Mặc dù kỹ thuật phân tử mới được áp dụng cho phân loại học động vật ở Việt Nam, nhưng

với những ưu thế của chúng mà chỉ trong một thời gian ngắn đã có hơn 50 loài thuộc nhiều nhóm động vật khác nhau được phân tích đặc điểm phân tử (bảng 1). Những nghiên cứu phân loại học phân tử và kết quả nghiên cứu trong lĩnh vực này tập trung theo 4 hướng cơ bản sau: xác định loài mới cho khoa học, chuẩn xác hóa một số loài và phân loài, đánh giá đa dạng di truyền và quan hệ tiến hóa của các loài và phân loài động vật và phân tích, giám định vật mẫu phục vụ quản lý động vật theo công ước CITES ở Việt Nam.

1. Phân tích đặc điểm phân tử để xác định loài mới

Đây là một trong những thành tựu nổi bật của việc áp dụng các kỹ thuật DNA cho phân loại một số nhóm tuyến trùng quan trọng ở Việt Nam.

Trên cơ sở phân tích toàn bộ vùng phiên mã ITS-rDNA Nguyen và cs. [18] và Trinh và cs. [33] đã xác định 2 loài tuyến trùng mới thuộc giống *Radopholus* là *R. duriophilus* và *R. arabocoffeae* ký sinh gây hại ở cây sấu riêng và cà phê tỉnh Đắk Lắk. Kết quả phân tích này đã bổ sung 2 loài tuyến trùng quan trọng vào danh sách tuyến trùng ký sinh gây hại của giống *Radopholus*, ngoài loài đã biết là *R. similis*.

Gần đây Trinh et al. [34] đã phát hiện 1 giống mới cũng là phân họ tuyến trùng ký sinh thực vật mới là *Apratylenchinae* n. subfam., *Apratylenchus* n. gen. và 2 loài mới của giống này là *Apratylenchus vietnamensis* và *Apratylenchus binhii* từ các vùng cà phê Đắk Lắk và Quảng Trị. Việc mô tả giống mới và 2 loài mới được coi là một phát hiện quan trọng và là trường hợp khá hy hữu đối với khoa học tuyến trùng thực vật.

Trên cơ sở phân tích đặc điểm phân tử vùng ITS-rDNA, Phan et al., 2001a,b; 2003, 2005; 2006 [24-29] và Pham et al., 2000 [19] đã xác định 10 loài tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng mới cho khoa học. Trong số này có 9 loài mới giống *Steinernema* là: *S. tami*, *S. sangi*, *S. locim*, *S. thanhi*, *S. robustispiculum*, *S. sasonense*, *S. backanense*, *S. cumgarensense* và *S. eapokense*; 1 loài mới thuộc giống *Heterorhabditis* là *H. baujardi*. Ngoài ra 4 loài khác về đặc điểm phân tử cũng là loài mới cho

khoa học đang được nghiên cứu về đặc điểm hình thái và hình thái lượng để công bố chính thức.

Phân tích, đánh giá sai khác về đặc điểm phân tử của các loài sán lá phổi ở Việt Nam,

Phạm Ngọc Doanh và cs. [20-23] không những đã xác định 4 loài sán lá phổi ký sinh ở động vật Việt Nam, trong đó có một loài mới cho khoa học là *Paragonimus vietnamensis* sp.n. được mô tả từ động vật tỉnh Yên Bái.

Bảng 1

Danh sách các loài động vật được phân tích giám định phân tử DNA

| STT | Tên loài | Nhóm sinh vật | Nguồn công bố |
|-----|--|----------------------------|---------------|
| 1. | <i>Radopholus duriophilus</i> Nguyen et al., 2003 | Tuyến trùng thực vật | 15, 17 |
| 2. | <i>Radopholus arabocoffeae</i> Trinh et al., 2004 | Tuyến trùng thực vật | 16, 33 |
| 3. | <i>Apratylenchus vietnamensis</i> Trinh et al., 2008 | Tuyến trùng thực vật | 34 |
| 4. | <i>Apratylenchus binhi</i> Trinh et al., 2008 | Tuyến trùng thực vật | 34 |
| 5. | <i>Heterorhabditis indica</i> Poinar et al., 1992 | Tuyến trùng epn | 15, 27 |
| 6. | <i>Heterorhabditis baujardi</i> Phan et al., 2003 | Tuyến trùng epn | 15, 27 |
| 7. | <i>Steinernema tami</i> Pham et al., 2000 | Tuyến trùng epn | 15, 19 |
| 8. | <i>S. sangi</i> Phan et al., 2001 | Tuyến trùng epn | 15, 25 |
| 9. | <i>S. loci</i> Phan et al., 2001 | Tuyến trùng epn | 15, 26 |
| 10. | <i>S. thanhii</i> Phan et al., 2001 | Tuyến trùng epn | 15, 26 |
| 11. | <i>S. robustispiculum</i> Phan et al., 2005 | Tuyến trùng epn | 15, 27 |
| 12. | <i>S. sasonense</i> Phan et al., 2006 | Tuyến trùng epn | 15, 28 |
| 13. | <i>S. backanense</i> Phan et al., 2006 | Tuyến trùng epn | 15, 28 |
| 14. | <i>S. cumgareense</i> Phan et al., 2006 | Tuyến trùng epn | 15, 28 |
| 15. | <i>S. eapokense</i> Phan et al., 2006 | Tuyến trùng epn | 15, 28 |
| 16. | <i>Steinernema</i> sp1. | Tuyến trùng epn | 15 |
| 17. | <i>Steinernema</i> sp2. | Tuyến trùng epn | 15 |
| 18. | <i>Steinernema</i> sp3. | Tuyến trùng epn | 15 |
| 19. | <i>Steinernema</i> sp4. | Tuyến trùng epn | 15 |
| 20. | <i>F. gigantea</i> Cobbold 1856 | Sán lá gan lớn | 3, 4, 9 |
| 21. | <i>Paragonimus heterotremus</i> Chen et Hsia, 1964 | Sán lá phổi | 11, 12 |
| 22. | <i>Paragonimus proliferus</i> Hsia et Chen, 1964 | Sán lá phổi | 22 |
| 23. | <i>Paragonimus vietnamensis</i> Pham et al., 2008 | Sán lá phổi | 20 |
| 24. | <i>Paragonimus westermani</i> (Kerbert, 1878) | Sán lá phổi | 21 |
| 25. | <i>Pheretina aspergillum</i> (Perrier) | Giun đất | 32 |
| 26. | <i>Pheretina robusta</i> (Perrier) | Giun đất | 32 |
| 27. | <i>Rhinopithecus avunculus</i> Dollman, 1912 | Voọc mũi hếch | 7 |
| 28. | <i>Pygathrix nemaus nemaus</i> (Linnaeus, 1771) | Phân loài voọc vá chân đỏ | 6 |
| 29. | <i>P. nemaus cinerea</i> Nadler, 1997 | Phân loài voọc vá chân xám | 6 |
| 30. | <i>P. nigripes</i> (Milne-Edward, 1871) | Voọc vá chân đen | 6 |
| 31. | <i>Trachypithecus germaini</i> (Schlegel, 1876) | Voọc bạc | 5 |
| 32. | <i>T. barbei holotephreus</i> (Anderson, 1879) | Phân loài voọc xám | 5 |
| 33. | <i>T. hatinhensis</i> (Dao, 1970) | Voọc gáy trắng | 5 |

| | | | |
|-----|--|-------------------------|--------------|
| 34. | <i>T. delacouri</i> (Osgood, 1932) | Voọc mõng trắng | 5 |
| 35. | <i>T. francoisi francoisi</i> (Pousargues, 1898) | Phân loài voọc má trắng | 5 |
| 36. | <i>T. francoisi poliocephalus</i> (Trouessart, 1911) | Phân loài voọc đầu vàng | 5 |
| 37. | <i>T. barbei</i> subsp | Phân loài voọc xám | 5 |
| 38. | <i>Paguma larvata</i> (Smith, 1827) | Cầy vòi mốc | 2 |
| 39. | <i>Lepus sinensis</i> Gray, 1832 | Thỏ xám | 10 |
| 40. | <i>Tylototriton</i> sp. | Cá cóc | Chưa công bố |
| 41. | <i>Naja atra</i> Cantor, 1842 | Rắn hổ mang | 8, 13, 14 |
| 42. | <i>Naja siamensis</i> Lureti, 1768 | Rắn hổ mang Thái Lan | 8, 13, 14 |
| 43. | <i>Naja kaouthia</i> Lesson, 1831 | Rắn hổ mang một kính | 8, 13, 14 |
| 44. | <i>Manis</i> sp. | Tê tê | Chưa công bố |
| 45. | <i>Sus</i> sp. | Lợn rừng | Chưa công bố |
| 46. | <i>Sus</i> sp. (dom.) | Lợn nuôi | Chưa công bố |
| 47. | <i>Bos gaurus</i> Smith, 1827 | Bò tót | Chưa công bố |
| 48. | <i>Bos</i> sp. (dom.) | Bò nuôi | Chưa công bố |
| 49. | <i>Bubalus bubalis</i> Linnaeus, 1758 | Trâu rừng | Chưa công bố |
| 50. | <i>Capricornis sumatraensis</i> Bechstein, 1799 | Son dương | Chưa công bố |
| 51. | <i>Ceratotherium simum simum</i> (Burchell, 1987) | Tê giác trắng Nam Phi | Chưa công bố |
| 52. | <i>Ceratotherium simum</i> (Burchell, 1987) | Tê giác đen Nam Phi | Chưa công bố |
| 53. | <i>Aerodramus fuciphagus</i> (Thunberg, 1812) | Chim yến | 1 |

2. Xác định đặc điểm phân tử để tu chỉnh phân loại một số loài và phân loài động vật

Trên cơ sở phân tích đặc điểm phân tử DNA của sán lá gan lớn (giống *Fasciola*), ký sinh ở người và gia súc, Đặng Tất Thế và cs. [3, 4] đã xác định các dạng sán lá gan ở Việt Nam chỉ có một loài duy nhất là *F. gigantica* mà không có loài *F. hepatica* như các kết quả phân loại hình thái trước đây. Kết quả này tạo cơ sở để giải thích về bệnh học, dịch tễ cho bệnh sán lá gan lớn ở người, cũng như phát triển các chế phẩm chẩn đoán bệnh trên cơ sở miễn dịch học.

Trần Thị Thanh Bình và Đặng Tất Thế [31] đã dùng chỉ thị DNA để phân biệt hai loài giun đất *Pheretina aspergillum* và *Pheretina robusta*. Đây là những loài gây tranh cãi về mặt hình thái. Đặc điểm phân tử DNA cũng cho thấy sự sai khác di truyền khá lớn giữa các quần thể trong loài, nhất là loài *Pheretina aspergillum*.

Chỉ thị phân tử DNA cũng đã cho phép khẳng định các quần thể rắn hổ mang thuộc giống *Naja* ở nước ta gồm có 3 loài là *Naja atra*, *Naja siamensis* và *Naja kaouthia* [13, 14], chứ không phải chỉ có 1 loài như kết quả định loại hình thái. Kết quả phân tích phân tử này đã tạo cơ sở quan trọng cho việc chọn giống nuôi rắn và đặc biệt là cho việc tạo huyết thanh kháng nọc rắn đặc hiệu hơn.

Phân tích đặc điểm di truyền các đàn chim yến ở Bình Định và Khánh Hòa, Đặng Tất Thế và cs. [2] đã xác định nguồn gốc của chúng từ các quần thể chim yến nuôi tại các nước quanh khu vực di cư đến. Kết quả nghiên cứu này là rất hữu ích cho việc phát triển nghề nuôi chim yến mới được hình thành ở nước ta trong những năm gần đây, trong đó có việc xuất hiện nhiều đàn chim yến làm tổ trong đất liền ở các tỉnh phía Nam.

3. Quan hệ phả hệ và tiến hóa của một số nhóm loài động vật

Trên cơ sở phân tích trình tự vùng ITS-rDNA của 34 chủng *Steinernema* của Việt Nam và sử dụng trình tự của 48 chủng *Steinernema* khác trên thế giới, Nguyễn Ngọc Châu, Phan Kế Long [16] đã tạo dựng cây phát sinh *Steinernema*. Ngoài việc xác lập được 13 nhánh phân loại ứng với 13 loài mới, cây phát sinh cũng cho phép phân biệt 5 nhóm loài có quan hệ gần về mặt di truyền: i) nhóm “feltiae-kraussei-oregonense”; ii) nhóm “glaseri-arenarium-longicaudatum-karii”; iii) nhóm “carpocapsae-tami-scapterisci”; iv) nhóm “bicornutum-ceratophorum-riobrave” và v) nhóm “intermedium-affine”. Các nhóm này tương ứng với nhóm hình thái trên cơ sở chiều dài ấu trùng cảm nhiễm. Trong đó các loài phát hiện từ Việt Nam có mặt trong 3 nhóm đầu là các nhóm có đại diện phân bố ở vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Cũng tương tự, phân tích trình tự vùng ITS-rDNA của 16 chủng *Heterorhabditis* phân lập từ Việt Nam, Nguyễn Ngọc Châu, Phan Kế Long [16] tạo dựng cây phát sinh *Heterorhabditis* dạng topology. Cấu trúc cây phủ hệ dạng maximum likelihood cũng cho thấy loài mới *H. baujardi* cùng nhóm với các loài *H. indica* và *H. hawaiiensis* tạo thành nhánh loài nhiệt đới và cận nhiệt đới với tính tương đồng di truyền tương đối cao.

Nhóm sán là phổi (*Paragonimus* spp.) ở Việt Nam không chỉ được nghiên cứu toàn diện về đặc điểm hình thái và phân tử mà trên cơ sở phân tích đặc điểm phân tử Phạm và cs. [18-21] đã chỉ ra vị trí phân loại, quan hệ họ hàng và nguồn gốc phát sinh của các loài sán là phổi ở miền bắc Việt Nam so với các loài phân bố ở khu vực châu Á và thế giới.

Lần đầu tiên tiến hóa phân tử DNA hệ gen ty thể của 11 loài và phân loài thuộc 3 giống voọc ở Việt Nam là *Rhinopithecus*, *Pygathrix* và *Trachypithecus* thuộc phân họ voọc (Colobinae) đã được Đặng Tất Thế và cs. [5-7] nghiên cứu một cách có hệ thống và khá đầy đủ. Kết quả đã phân tích dấu hiệu phân tử của tất cả các đại diện phân bố ở Việt Nam so sánh với các loài và phân loài voọc khác ở Trung Quốc đã góp phần làm rõ nhiều vấn đề về vị trí phân loại và quan hệ phát sinh của nhóm thú linh trưởng quý hiếm này, nhưng còn nhiều bất đồng về phân loại học hình thái tồn tại trong một thời gian dài.

Một số động vật hoang dã quý hiếm khác như cây vòi mốc (*Paguma larvata*) và thỏ xám (*Lepus sinensis*) cũng đã được phân tích đặc điểm phân tử. Kết quả phân tích đã xác định đa dạng di truyền của các loài này ở Việt Nam.

4. Giám định một số động vật thuộc công ước CITES

Ngoài các nhóm, loài động vật được nghiên cứu về đặc điểm phân tử phục vụ cho mục đích khoa học, hàng loạt động vật quý hiếm thuộc danh sách cấm hoặc hạn chế săn bắn hoặc buôn bán theo công ước CITES cũng đã được giám định như tê tê (*Manis* sp.), lợn rừng (*Sus* sp.), bò tót (*Bos gaurus*), trâu rừng (*Bubalus bubalis*), sơn dương (*Capricornis sumatraensis*), tê giác trắng và tê giác đen nam phi (*Ceratotherium simum* subsp.). Đặc biệt, việc xử lý sừng tê giác châu Phi nhập khẩu rất phức tạp, vì chúng thuộc 2 phân loài thuộc 2 mức xử lý khác nhau, việc sử dụng chỉ thị DNA đã cho phép phân biệt được 2 phân loài.

5. Triển vọng áp dụng kỹ thuật phân tử để phân loại động vật ở Việt Nam

Mặc dù các kỹ thuật phân tử mới được áp dụng cho phân loại động vật ở Việt Nam, nhưng đã cho thấy đây là công cụ rất hiệu quả trong định loại cũng như nghiên cứu quan hệ chủng loại và phát sinh của các nhóm sinh vật, nhất là các sinh vật đặc hữu ở Việt Nam. Như đã giới thiệu ở trên, các kỹ thuật tiên tiến đang tiếp tục được phát triển nhanh chóng sẽ đóng vai trò chính trong việc xác lập hệ thống định loại các nhóm sinh vật.

Việc áp dụng kỹ thuật phân tử cho phân loại mặc dù đã rất phổ biến trên thế giới nhưng ở Việt Nam còn một số khó khăn do điều kiện trang thiết bị, vật liệu hóa chất sử dụng cho các kỹ thuật phân tử còn chưa sẵn có ở thị trường Việt Nam. Ngoài ra, hầu hết cán bộ nghiên cứu, phân loại động vật - mặc dù có kỹ năng phân loại hình thái tốt nhưng lại chưa được đào tạo kỹ năng phân loại phân tử. Các nghiên cứu áp dụng kỹ thuật mới này đòi hỏi thiết bị và kinh phí đầu tư cao hơn cũng hạn chế việc áp dụng kỹ thuật mới cho phân loại.

Hiện nay, nhiều công bố quốc tế về phân loại học, nhất là công bố loài mới, đối với một số nhóm động vật, ngoài mô tả hình thái, thì đặc

điểm phân tử được coi như yêu cầu bắt buộc để minh chứng sự xác thực của phân loại. Vì vậy, không thể tiếp cận với các công bố quốc tế về phân loại học nếu không tiếp cận và áp dụng kỹ thuật phân tử để phân loại. Do đó, trong tương lai gần, chắc chắn kỹ thuật phân tử sẽ trở thành phương tiện đắc lực và bắt buộc để nghiên cứu phân loại học cho hầu hết các nhóm động vật ở Việt Nam.

Kỹ thuật phân tử không chỉ phục vụ cho nghiên cứu phân loại học mà còn là công cụ giám định động vật phục vụ quản lý buôn bán động vật quý hiếm theo công ước CITES. Hiện nay, việc buôn bán bất hợp pháp các mẫu vật của động vật hoang dã quý hiếm là một thách thức lớn cho công tác giám định, vì thường khó định danh tiêu bản khi chúng chỉ là các bộ phận hoặc đã bị chế biến, không còn khả năng để định loại chính xác bằng phương pháp hình thái truyền thống. Chỉ thị phân tử DNA là một công cụ cho kết quả định danh rất chính xác với một phân rất nhỏ từ mẫu vật cần giám định, kể cả đã bị biến dạng hoàn toàn.

Trong những năm qua, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Cơ quan thẩm quyền CITES Việt Nam đã giám định nhiều mẫu vật động vật hoang dã quý hiếm thuộc diện cấm săn bắn, buôn bán, giúp các cơ quan chức năng có cơ sở khoa học để xử lý các vụ việc liên quan đến pháp luật. Việc giám định phân tử không những giúp các cơ quan chức năng ngăn chặn được buôn bán bất hợp pháp động vật hoang dã, mà còn góp phần tạo điều kiện cho doanh nghiệp phát triển kinh doanh hợp pháp động vật hoang dã được Nhà nước cho phép.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đặng Tất Thế, Lê Xuân Cảnh, Nguyễn Hồng Vân**, 2007: Báo cáo Hội thảo quốc gia lần thứ 2 về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội: 368-373.
2. **Đặng Tất Thế, Đỗ Anh Dũng, Lê Xuân Cảnh**, 2003: Tạp chí Công nghệ sinh học, 1: 189-195.
3. **Đặng Tất Thế, Lê Quang Hùng, Cao Văn Viên**, 2003: Tạp chí Nghiên cứu Y học, 23: 120-126.
4. **Đặng Tất Thế và cs.**, 2001: Thông tin Y học lâm sàng, 4: 77-83.
5. **Đặng Tất Thế, Lê Xuân Cảnh**, 2005: Tạp chí Sinh học, 27(4A): 63-70.
6. **Đặng Tất Thế, Lê Xuân Cảnh, Nông Văn Hải**, 2004: Tạp chí Công nghệ sinh học, 2: 25- 32.
7. **Đặng Tất Thế, Lê Xuân Cảnh, Nông Văn Hải**, 2004: Tạp chí Công nghệ sinh học, 2: 169-178.
8. **Đặng Tất Thế, Ngô Thị Kim, Lê Quang Thịnh**, 2004: Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 153-155.
9. **Dang Tat The, Yukifumi Nawa**, 2005: Federation of Asian Paratologist, 1: 57-61.
10. **Đỗ Anh Dũng, Đặng Tất Thế, Đặng Huy Huỳnh**, 2004: Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 343- 347.
11. **Le T. H. et al.**, 2002: Abst. of book of the 10th Inter. Congr on infection diseases, Singapore: 163.
12. **Lê Thanh Hòa và cs.**, 2003: Tạp chí Sinh học, 25(1): 39- 44.
13. **Lê Thanh Hoà và cs.**, 2001: Tạp chí Phòng chống sốt rét và các bệnh ký sinh trùng, 3: 73-79.
14. **Ngô Thị Kim, Đặng Tất Thế**, 2004: Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 447- 450.
15. **Ngô Thị Kim, Đặng Thị Thanh Hà, Đặng Tất Thế**, 2003: Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 934-936.
16. **Nguyễn Ngọc Châu, Phan Kế Long**, 2005, Tạp chí Sinh học, 27: 5-11.
17. **Nguyễn Ngọc Châu và cs.**, 2005: Báo cáo Hội thảo quốc gia lần thứ 1 về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội: 33-42.
18. **Nguyen N. C. et al.**, 2003: Nematology, 5: 549-558.

19. **Pham V. L. et al.**, 2000: Russian J. Nematology, 8: 33-43.
20. **Pham N. D. et al.**, 2007: Parasitology Research, 101: 1495-1501.
21. **Pham N. D. et al.**, 2007: Parasitology Research, 100: 1075-1082.
22. **Pham N. D. et al.**, 2008: Parasitology Research, 102: 677-683.
23. **Pham N. D. et al.**, 2009: Parasitology Research 104: 1149-55.
24. **Phan K. L. et al.**, 2000: Russian J. Nematology, 8: 33-43
25. **Phan K. L., Nguyen N. C., Moens M.**, 2001a: Nematology, 3: 503-514.
26. **Phan K. L., Nguyen N. C. & Moens M.**, 2001b: Russian J. Nematology, 9: 1-7.
27. **Phan K. L., Subbotin S. A., Nguyen N. C., Moens M.**, 2003: Nematology, 5: 367-382.
28. **Phan K. L., Spiridonov S. E., Subbotin S. A., Moens M.**, 2006: Russian J. Nematology, 14: 11-29.
29. **Phan L. K. et al.**, 2005: Systematic Parasitology, 60: 23-32.
30. **Phan Kế Long, Nguyễn Ngọc Châu, Maurice Moens**, 2007: Báo cáo Hội thảo quốc gia lần thứ 2 về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội: 168-173.
31. **Phan Kế Long, Nguyễn Ngọc Châu, Maurice Moens**, 2008: Tạp chí Sinh học, 30(3): 12-17.
32. **Trần Thị Thanh Bình, Đặng Tất Thế**, 2006: Tạp chí Khoa học, đại học Sư phạm Hà Nội, 4: 130-135.
33. **Trình Q. P. et al.**, 2004: Nematology, 6: 681-694.
34. **Trình Q. P. et al.**, 2009: Nematology, 11: 1-17.

PRELIMINARY ACHIEVEMENT OF MOLECULAR TAXONOMY OF SOME IMPORTANT ANIMAL GROUPS IN VIETNAM

NGUYEN NGOC CHAU, PHAN KE LONG,
TRINH QUANG PHAP, ĐANG TAT THE

SUMMARY

The molecular taxonomy in Vietnam has been started since year 2000. In the beginning stage a numerous molecular techniques such as PCR, PCR-RFLP, and sequencing has been applied for taxonomy of some important animals and plant in Vietnam.

To date the molecular characters of 51 indigenous animal species and subspecies has been characterized. Based on these molecular data some about twenty new species to science were revealed. Among them, four new species of plant parasitic nematodes (*Radopholus* spp. and *Apratylenchus* spp.), eleven new species of enthomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp.) and one species of pulmonary trematodes (*Paragonimus vietnamensis*).

The phylogenetic tree constructed from generic data has allowed to clarify some unclear and confusion situation on taxonomic of some species as well as subspecies of primates (*Rhinopithecus avunculus*, *Pygathrix nemaus* subspp., *P. nigripes*, *Trachypithecus germaini*, *T. barbei holotephreus*, *T. hatinhensis*, *T. delacouri*, *T. francoisi* subspp. and *T. barbei* subsp), swallow (*Aerodramus fuciphagus*), earth worm (*Pheretina* spp.), forest hare (*Lepus sinensis*), grey civet (*Paguma* spp.) and Indian cobra (*Naja* spp.).

The phylogenetic trees produced based on maximum parsimony and maximum likelihood analyses were allowed to clarify and revise with the interpretation of the taxonomic position and origin some indigenous plant parasitic and entomopathogenic nematodes in Vietnam.

In addition, the molecular techniques has also been assembled molecular proofs for preventing illegal trade of animals and plants belonging to CITES convention.

The paper also been affirmed the advantage of molecular techniques that are not only as useful tools for taxonomy but they are also very real measure for phylogenic inference. Subsequently, the necessary of molecular approach in taxonomy and phylogeny as well as biological conservation of animals and plants in Vietnam was discussed in the paper.

Ngày nhận bài: 12-11-2008