

**XÂY DỰNG CÂY PHÁT SINH CHŨNG LOẠI CỦA LOÀI TẢO
PSEUDONITZSCHIA SP.G3 ĐƯỢC PHÂN LẬP Ở THÀNH PHỐ HẢI PHÒNG DỰA
TRÊN TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CỦA ĐOẠN GIEN ITS1- 5,8 S-ITS2**

HOÀNG THỊ LAN ANH, ĐẶNG ĐIỂM HỒNG

Viện Công nghệ sinh học

CHU VĂN THUỘC

Viện Tài nguyên và Môi trường biển

Hiện nay, tảo độc đang là mối quan tâm hàng đầu của ngành nuôi trồng thủy hải sản bởi những thiệt hại do chúng gây ra ước tính lên tới hàng triệu đô la Mỹ mỗi năm [3]. Nhiều loài tảo đã được khẳng định là nguồn gốc sinh ra các độc tố đe dọa tàn phá khu hệ động thực vật và ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe của con người. Để giảm thiểu những tác hại do tảo độc gây ra, vấn đề giám sát cần được tiến hành thường xuyên và rộng khắp. Ở nước ta, việc nghiên cứu tảo độc mới được tiến hành một vài năm gần đây. Theo thống kê của Lasen và cs. (2004), trong số trên 70 loài tảo có khả năng gây độc được xác định phân bố ở các vùng ven biển Việt Nam, có 11 loài tảo silic thuộc chi *Pseudonitzschia* đã được mô tả, trong đó 2 loài *Pseudonitzschia pungens* và *P. calliantha* được xem là những loài chiếm ưu thế, có sự tích tụ tiềm tàng độc tố axit domoic gây hội chứng ngộ độc mất trí nhớ tạm thời (ASP-amnesic shellfish poisoning) trong các loài động vật thân mềm hai mảnh vỏ [7]. Chi *Pseudonitzschia* bắt đầu được quan tâm nhiều hơn kể từ khi phát hiện ra axit domoic do loài *P. multiseries* sinh ra làm 153 người trên đảo Hoàng tử Edward (Canada) bị ngộ độc và theo con số thống kê gần đây, đã phát hiện trên thế giới có 10 loài thuộc chi này có khả năng sinh ra axit domoic, gây ảnh hưởng tới hệ tiêu hóa, hệ thần kinh và có thể gây tử vong cho người [2, 4, 7]. Do vậy, việc phát hiện sự có mặt của các loài trong chi tảo này trong các thủy vực, để đưa ra các biện pháp nhằm giảm thiểu tác hại của chúng là rất quan trọng.

Hiện nay trên thế giới, trong phân loại tảo, các kỹ thuật sinh học phân tử như đọc và so

sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 đang được sử dụng rộng rãi trong việc nghiên cứu phát sinh chủng loại của tảo nói chung và của chi *Pseudonitzschia* nói riêng, bởi đây là vùng xảy ra nhiều biến đổi đặc trưng cho loài trong quá trình tiến hóa [1, 3, 5, 6, 8]. Với mẫu nghiên cứu là loài *Pseudonitzschia* sp.G3 được phân lập ở Đồ Sơn thuộc thành phố Hải Phòng, chúng tôi đã tiến hành định tên bằng phương pháp quan sát hình thái và phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2. Những kết quả thu được đã góp phần khẳng định vai trò của sinh học phân tử trong việc hỗ trợ phương pháp phân loại tảo truyền thống dựa vào hình thái.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Vật mẫu của loài tảo *Pseudonitzschia* sp.G3 do Viện Tài nguyên và Môi trường biển Hải Phòng phân lập và cung cấp, được nuôi cấy trên môi trường K có nồng độ muối 24‰, ở nhiệt độ 25°C để thu sinh khối cho bước tách chiết ADN.

- Trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của 12 loài thuộc chi *Pseudonitzschia* bao gồm: *Pseudonitzschia pungens* (Grunow ex P. T. Cleve) Hasle 1993 có số đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế là AY544769, *Pseudonitzschia* sp..Hobart5 (AY257851), *P. australis* Frenguelli (AY452528), *P. calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle 2003 (AY257857), *P. cf. australis* Frenguelli (AY559850), *P. cf. subpacific*a (Hasle) Hasle (AY257860), *P. cuspidata* (Hasle) Hasle

1993 (AY257853), *P. delicatissima* (P. T. Cleve) Heiden 1928 (AY257849), *P. fraudulenta* (P. T. Cleve) Hasle (AY257840), *P. galaxiae* Lundholm et Moestrup (AY257850), *P. micropora* Priisholm et Moestrup 2002 (AY257847) và *P. multiseriis* (Hasle) Hasle (AY257844) được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại.

- TOPO[®] Kit của hãng Invitrogen (Mỹ) dùng để tách dòng gen.

2. Phương pháp

- ADN tổng số của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 được tách chiết theo phương pháp của Y. K. Hong có cải tiến cho phù hợp với điều kiện của Việt Nam [5].

- Đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 được nhân bằng kỹ thuật PCR từ ADN tổng số với cặp mồi:

Pseu F: 5'-GGATCATTACCACACCGAT-CCAAG -3'.

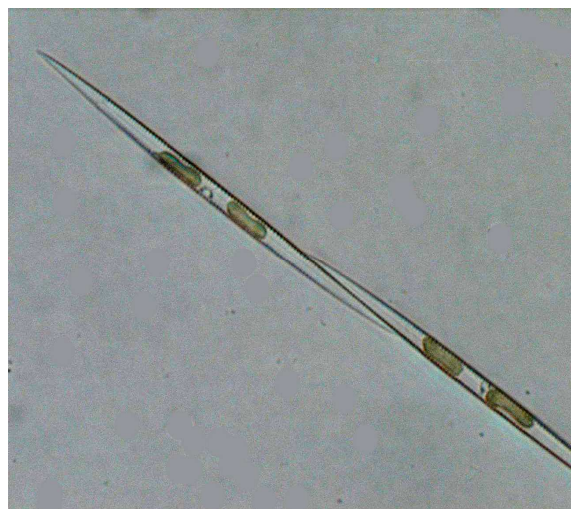
Pseu R: 5'-CGCAGATTCACATCCTGAG-CTAGT- 3'.

- Phản ứng PCR được thực hiện với 20 µl hỗn hợp phản ứng chứa 1 µl ADN khuôn; 2 µl đệm 10X; 1,5 µl dNTP với nồng độ 2,5 mM mỗi loại; 0,3 µl Taq polymeraza. Chu trình nhiệt được tiến hành như sau: 94°C-3 phút (94°C-30 giây, 55°C-1 phút, 72°C-1 phút), lặp lại 35 chu kỳ; 72°C-5 phút; giữ sản phẩm ở 4°C. Sau khi chạy điện di để kiểm tra trên gel agarosa 0,8%, sản phẩm PCR được gắn vào vectơ pCR[®]2.1 TOPO[®] và được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5αT1'; cuối cùng được nuôi trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung ampicilin, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranosit). ADN plasmit được tách chiết và kiểm tra sự có mặt của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 [9].

- Trình tự nucleotit ở mẫu nghiên cứu được thực hiện trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM^(R) 3100-Avant Genetic Analyzer (USA) của Viện Công nghệ sinh học. Dựa trên chương trình Clustal X Multiple Sequence Alignment Program (version 1.81, June 2000) và DNASTAR, chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 thu tại Đồ Sơn, với trình tự nucleotit của 12 loài *Pseudonitzschia* đã được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Mô tả hình thái của loài tảo *Pseudonitzschia* sp.G3 được phân lập tại Hải Phòng

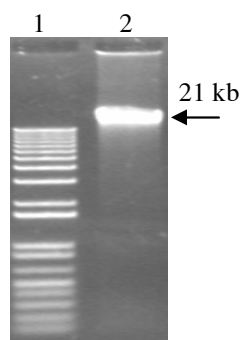


Hình 1. Chuỗi hai tế bào của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 dưới kính hiển vi quang học

Dưới kính hiển vi quang học, vỏ có cấu trúc đối xứng. Hai mép vỏ thuôn đều về hai đỉnh của tế bào, từ khoảng 1/4 chiều dài của tế bào; hai đỉnh của tế bào tròn. Chiều dài của mặt vỏ: $80 \pm 4,32$, chiều rộng $2 \pm 0,36$ µm. Trong chuỗi các tế bào gộp lên nhau một đoạn bằng 1/4 chiều dài của tế bào. Dựa trên các đặc điểm hình thái, mẫu *Pseudonitzschia* sp.G3 có thể là loài *P. pungens* [7].

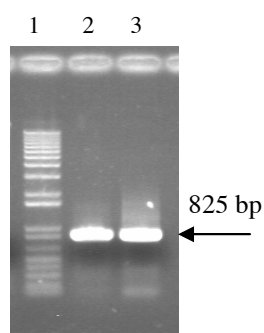
2. Nhân đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 từ ADN tổng số

ADN tổng số được tách chiết từ sinh khối của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 được đảm bảo độ tinh sạch và nồng độ cần thiết để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả được chỉ ra trên hình 2. Đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 được nhân lên bởi phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu được ký hiệu là Pseu F-Pseu R (cặp mồi này được thiết kế dựa trên trình tự nucleotit của các loài thuộc chi *Pseudonitzschia* đã công bố tại Ngân hàng gen quốc tế). Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR sẽ có kích thước khoảng 825 bp. Sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu với kích thước đúng như tính toán lý thuyết (hình 3).



Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra ADN của loài *Pseudonitzschia* sp.G3

Cột 1: thang chuẩn của ADN có kích thước 1 Kb. Cột 2: ADN tổng số của loài *Pseudonitzschia* sp.G3



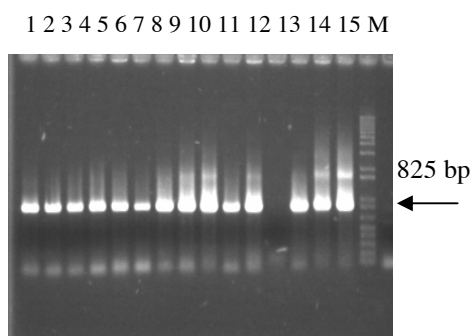
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Cột 1: thang chuẩn của ADN có kích thước 1 Kb. Cột 2, 3: sản phẩm PCR với cặp mồi Pseu F-Pseu R.

3. Tách dòng đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2

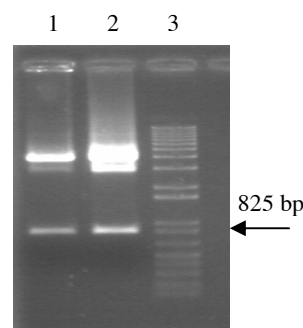
Sản phẩm PCR đặc hiệu được gắn vào vector tách dòng pCR[®]2.1 và biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α T1'. Những khuẩn lạc trắng mọc trên môi trường nuôi cấy có bổ sung ampicilin và X-gal được chọn làm ADN khuôn cho phản ứng PCR-checking với cặp mồi đặc hiệu Pseu F và Pseu R (hình 4). Sau phản ứng PCR-checking, các khuẩn lạc trắng được nghi ngờ có mang đoạn gen mong muốn, được nuôi cấy và tách chiết ADN plasmid. Các ADN plasmid được chọn và cắt kiểm tra bằng enzym cắt giới hạn *EcoRI*. Kết quả sau khi cắt thu được 2 băng: một băng có kích thước khoảng 3,9 kb (kích thước của vector gốc) và một băng có kích thước khoảng 825 bp đã chứng tỏ đoạn gen mong muốn đã được gắn thành công vào vector tách dòng pCR[®]2.1 (hình 5). Cuối cùng, các dòng plasmid tái tổ hợp được tách chiết và tinh sạch một lượng đủ lớn để dùng cho việc đọc trình tự nucleotit.

70



Hình 4. Kết quả PCR-checking các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp

Cột 1-15: các dòng tế bào có mang đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2. Cột 16: thang chuẩn ADN có kích thước 1 kb



Hình 5. Kết quả cắt kiểm tra ADN plasmid tái tổ hợp bằng enzym *EcoRI*.

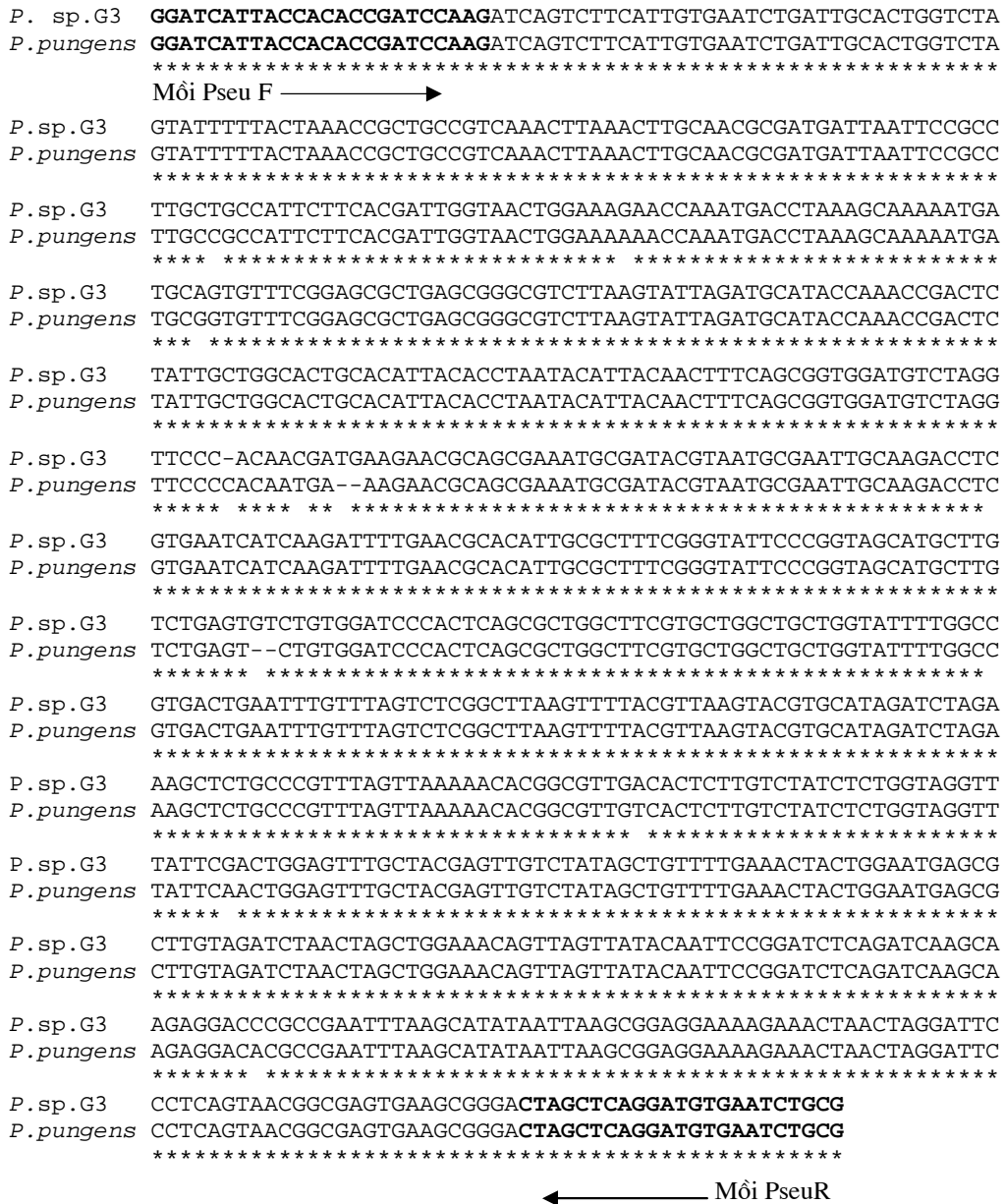
Cột 1-2: vector pCR^(R) đã gắn sản phẩm PCR của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2. Cột 3: thang chuẩn ADN có kích thước 1 kb

4. So sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các loài *Pseudonitzschia*

Sau khi xác định được trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Pseudonitzschia* sp.G3, chúng tôi đã tiến hành so sánh trình tự thu được với trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của 12 loài *Pseudonitzschia* đã được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế với sự hỗ trợ của phần mềm DNASTAR và Clustal X nhằm định tên mẫu vật này. Trên hình 6, chúng tôi đưa ra kết quả so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 với trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *P. pungens* (kết quả so sánh với 11 loài *Pseudonitzschia* khác không chỉ ra ở đây). Tỷ lệ phần trăm tương đồng của từng cặp trình tự nucleotit của các loài

Pseudonitzschia được thống kê dưới dạng ma trận tại bảng 1. Kết quả ở bảng 1 cho thấy độ tương đồng của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các loài thuộc chi *Pseudonitzschia* nằm trong

khoảng 53,1-99,6% và loài *Pseudonitzschia* sp.G3 có độ tương đồng cao nhất (98,8%) với loài *P. pungens* (AY544769) và thấp nhất với loài *P. calliantha* (AY257857) (53,1%).



Hình 6. Kết quả so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 với trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *P. pungens* có mã số là AY544769 tại Ngân hàng gen quốc tế

Như vậy, có thể thấy 11 sự sai khác trong trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 so với loài *P. pungens* như sau: C125T (đột biến thay thế C bằng T tại vị trí

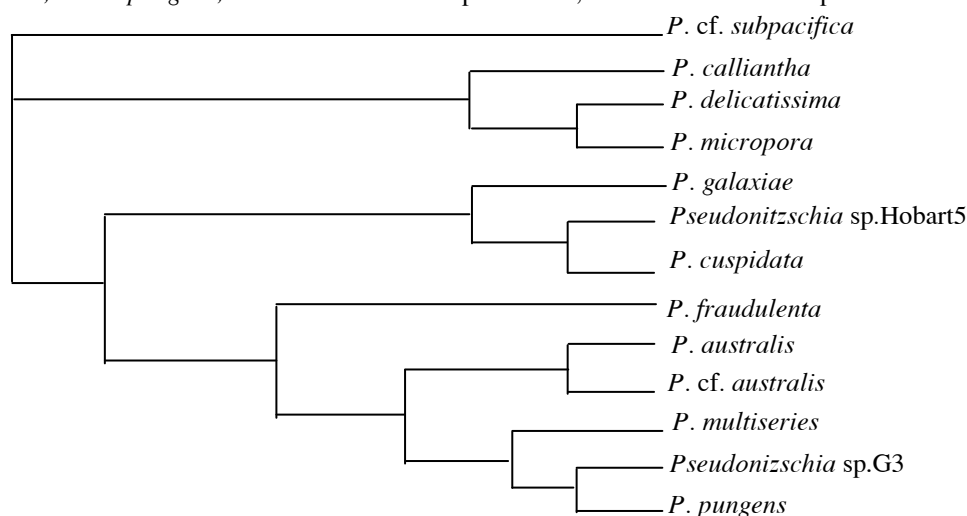
nucleotit thứ 125), A154G, G184A, C306Del (đột biến mất C ở vị trí 306); đột biến thêm nucleotit T, G, G, T ở vị trí 314, 315, 428, 429, tương ứng; T575A; A606G và A728C.

Bảng 1

Bảng thống kê tỷ lệ phần trăm tương đồng (ma trận tam giác trên) và khoảng cách di truyền (ma trận tam giác dưới) của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 giữa các loài trong chi *Pseudonitzschia*

		Tỷ lệ phần trăm tương đồng														
Khoảng cách di truyền		1	2	3	4	5	6	7	8	8	10	11	12	13		
		1		79,5	99,6	76,3	77,4	80,5	80,3	77,9	84,8	81,0	77,7	76,6	79,1	1
		2	29,1		79,0	76,8	74,0	82,7	74,3	81,0	84,8	74,5	52,3	74,1	53,1	2
		3	0,1	29,2		76,8	77,7	81,2	81,1	78,4	85,2	81,4	78,0	76,6	79,4	3
		4	33,4	30,9	33,5		74,2	81,6	76,2	79,2	83,5	75,8	73,4	73,7	74,0	4
		5	28,7	33,8	28,8	35,6		84,3	76,7	82,5	74,6	61,3	75,0	95,1	60,9	5
		6	22,7	22,4	22,8	30,6	25,4		82,3	84,2	94,0	76,6	75,1	82,3	76,5	6
		7	29,5	29,2	29,6	31,0	32,4	26,2		81,0	86,1	80,3	74,9	76,7	63,7	7
		8	29,4	32,8	29,5	29,8	18,3	21,5	27,8		85,5	75,8	72,5	80,4	73,7	8
		9	22,0	19,8	22,1	27,9	23,5	7,6	23,9	19,5		77,8	76,0	71,2	77,3	9
		10	24,4	33,7	24,5	36,4	33,1	30,4	29,4	34,0	28,8		82,4	61,3	83,2	10
		11	22,4	36,4	22,5	36,0	30,4	32,7	32,6	33,6	29,6	16,4		73,4	98,8	11
		12	30,6	36,1	30,9	36,7	3,6	27,6	34,5	21,4	26,3	35,5	33,3		73,9	12
		13	21,4	34,7	21,6	35,0	28,8	31,1	31,4	32,2	28,0	15,8	1,0	31,9		13
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

Ghi chú: các loài được đánh số theo thứ tự: 1. *P. australis*; 2. *P. calliantha*; 3. *P. cf. australis*; 4. *P. cf. subpacificae*; 5. *P. cuspidata*; 6. *P. delicatissima*; 7. *P. fraudulentata*; 8. *P. galaxiae*; 9. *P. micropora*; 10. *P. multiseriis*; 11. *P. pungens*; 12. *Pseudonitzschia* sp. Hobart5; 13. *Pseudonitzschia* sp. G3.



Hình 7. Cây phát sinh chủng loại của 13 loài *Pseudonitzschia* dựa trên việc so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2

Dựa vào khoảng cách di truyền và tỷ lệ % tương đồng trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các loài *Pseudonitzschia* và bằng chương trình DNASTAR, chúng tôi đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 13 loài *Pseudonitzschia*. Cây phát sinh chủng loại được chỉ ra trên hình 7 cho thấy 13 loài trong chi *Pseudonitzschia* đã chia thành 3 nhóm chính: nhóm 1 có một loài là *P. cf. subpacificae*; nhóm 2 có 3 loài gồm: *P. calliantha*, *P. delicatissima*

và *P. micropora*; nhóm 3 chia thành hai nhóm nhỏ, bao gồm các loài: *P. galaxiae*, *Pseudonitzschia* sp. Hobart5, *P. cuspidata*, *P. fraudulentata*, *P. australis*, *P. cf. australis*, *P. multiseriis*, *P. pungens* và *Pseudonitzschia* sp. G3; trong đó, loài *Pseudonitzschia* sp. G3 có mối quan hệ di truyền rất gần gũi với loài *P. pungens*. Trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 thu được của loài *Pseudonitzschia*

sp.G3 đã được đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế với số đăng ký được cấp là DQ166533.

III. KẾT LUẬN

1. Việc phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 đã cho thấy loài này có quan hệ di truyền gần gũi với loài *Pseudonitzschia pungens* (AY544769) với độ tương đồng đạt đến 98,8%. Kết quả thu được cùng với kết quả trong nghiên cứu về đặc điểm hình thái đã cho phép chúng tôi kết luận loài *Pseudonitzschia* sp.G3 được thu tại Đồ Sơn, thành phố Hải Phòng có thể là loài *P. pungens*.

2. Trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Pseudonitzschia* sp.G3 đã được đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế với số đăng ký là DQ166533.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Bách và cs., 2003: Tạp chí Sinh học, 25(3): 1-4. Hà Nội.

2. Bates S. S., 2000: J. Phycol., 36: 978- 985.
3. Cagelost G. A. et al., 1997: Applied and Environmental Microbiology, 63(12): 4859-4865.
4. Fehling J. et al., 2004: J. Phycol., 40: 622-630.
5. Đặng Diễm Hồng và cs., 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 913-916. Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ 2 nghiên cứu cơ bản trong Sinh học, Nông nghiệp, Y học. Huế.
6. Đặng Diễm Hồng và cs., 2002: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 40(số đặc biệt): 161-167.
7. J. Lasen and N. L. Nguyen, 2004: Opera Botanica 140.
8. Nina Lundholm N. et al., 2003: Phycol., 39: 797-813.
9. Sambrook J. and Russell D. W., 2001: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

CONSTRUCTION OF THE PHYLOGENETIC TREE OF *PSEUDONITZSCHIA* SP.G3 ISOLATED FROM HAIPHONG CITY BASING ON THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE ITS1-5.8S-ITS2 GENE FRAGMENT

HOANG THI LAN ANH, DANG DIEM HONG, CHU VAN THUOC

SUMMARY

Some species belonging to the marine diatom genus *Pseudonitzschia* were recognized to have capacity to produce domoic acid which caused amnesic shellfish poisoning (ASP). According to the traditional classification, researchers have relied on the morphological characters to identify the species of the genus *Pseudonitzschia*. In addition, the morphological study of the species belonging to the genus *Pseudonitzschia* were supported by phylogenetic analyses of the nuclear- encoded internal transcribed spacer 1-5.8S and the internal transcribed 2 rDNA (ITS1-5.8S-ITS2). In this study, the length of the ITS1-5.8S-ITS2 gene fragment of *Pseudonitzschia* sp.G3 was estimated about 825 bp. After, this fragment was amplified from *Pseudonitzschia* sp.G3 by using genomic DNA; the PCR products have been cloned into the pCR[®]2.1 vector and the recombinant plasmids were transformed into the *E. coli* strain DH5 α T1'. The result of the cloning was confirmed by PCR checking method and the restriction analysis by *EcoRI* enzyme. By comparing the *Pseudonitzschia* sp.G3 nucleotide sequence with the published nucleotide sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 gene fragments of *Pseudonitzschia* species in Gene Bank and constructing the phylogenetic tree, the phylogenetic relationships between *Pseudonitzschia* sp.G3 and 12 other *Pseudonitzschia* species were established. Our results indicated that *Pseudonitzschia* sp.G3 collected in Haiphong city had close phylogenetic relationship with *Pseudonitzschia pungens* (with accession number AY544769) with homological coefficient of 98.8%. The obtained results in this paper allowed us to conclude that may be the studied *Pseudonitzschia* sp.G3 species was *Pseudonitzschia pungens*.

Ngày nhận bài: 30-8-2005