

MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ CHỦNG *SENEDESMUS* PHÂN LẬP TỪ HỒ HOÀN KIẾM DỰA TRÊN TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CỦA ĐOẠN ITS-1 RIBOSOM

NGUYỄN ĐỨC BÁCH, ĐẶNG ĐIỂM HỒNG

Viện Công nghệ sinh học

DUƠNG ĐỨC TIẾN

Trung tâm Công nghệ sinh học, ĐHQG Hà Nội

NGUYỄN VĂN ĐỒNG

Viện Di truyền nông nghiệp

Scenedesmus là một chi thuộc ngành tảo lục (Chlorophyta) có số lượng loài và dưới loài khá lớn (trên 200 taxon) [1]. Nhiều chủng *Scenedesmus* có giá trị tích cực trong việc giảm thiểu ô nhiễm môi trường nước. Ngoài ra, chúng còn có hàm lượng protein rất cao (khoảng 50-60% trọng lượng khô) và giàu chất dinh dưỡng. Ở Việt Nam, *Scenedesmus* rất phong phú trong các loại hình thủy vực, trong đó hồ Hoàn Kiếm (Hà Nội) là nơi tập trung khá nhiều loại vi tảo này. Do sự đa dạng và phong phú về chủng loại cùng với khả năng biến đổi về hình thái để thích ứng với những điều kiện sống khác nhau nên việc phân loại và định tên chính xác các loài tảo nói chung gặp rất nhiều khó khăn, trong đó có *Scenedesmus*.

Hiện nay, cùng với phương pháp phân loại kinh điển thì các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đang được sử dụng rộng rãi để phân loại. Một trong những cơ sở của việc phân loại này là dựa vào sự sai khác về trình tự nucleotit ở một số gen có tính bảo thủ cao trong quá trình tiến hóa. Hệ gen được sử dụng phổ biến nhất là các gen mã hóa cho tiểu phần ribosom: 5,8S, 16S, 18S, 25S...[5, 7, 8, 9, 10] và gen rubisco [6] vv... Trong các hệ gen này, thường có một số đoạn ADN ngắn không mã hóa đóng vai trò như là các vùng đệm. Những biến đổi di truyền ngẫu nhiên (ở mức độ nucleotit) thường xảy ra ở các vùng này, kết quả là đã tạo ra một sự đa dạng rất lớn về loài cũng như dưới loài [6]. Chính vì vậy, người ta hay sử dụng các đoạn ITS (nuclear

ribosome internal transcribed spacer) hoặc Rubisco spacer... để kiểm tra và xác định mối quan hệ gần gũi giữa các loài hoặc mối quan hệ di truyền trong các quần thể của cùng một loài ở những điều kiện địa lý, sinh thái khác nhau [6, 11, 12, 13].

Theo hướng trên, chúng tôi đã nghiên cứu về tách dòng và đọc trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của 6 chủng tảo *Scenedesmus* được phân lập từ hồ Hoàn Kiếm, trên cơ sở đó xác định mối quan hệ về chủng loại của 6 chủng tảo này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Các mẫu tảo *Scenedesmus* được phân lập từ hồ Hoàn Kiếm do Dương Đức Tiến và cs. (Trung tâm Công nghệ sinh học, ĐHQGHN) cung cấp. 6 chủng đã được mô tả hình thái và xếp vào loài *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) var. *abundans* Kirchn, *Scenedesmus ellipsoides* Chod, *Scenedesmus obliquus* (Turp.) var. *alternans*, *Scenedesmus obliquus* (Turp.) var. *sp.*, *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kuetz. var. *obliquus* 367, *Scenedesmus quadricauda* var. *sp.* lần lượt được ký hiệu là S-1695, S-190, S-177, S-4, S-35 và S-G [3].

Vectơ PCR[®] 2.1 TOPO và các hóa chất chuẩn của hãng In Vitrogen.

2. Phương pháp

a. Tách ADN: ADN tổng số được tách chiết

theo phương pháp của Trần Hữu Quang [4].

b. Phản ứng PCR: để nhân đoạn ITS-1 bằng kỹ thuật PCR từ ADN tổng số, chúng tôi đã sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAA-CCTGCGG-3') và ITS2 (5'-GCTGCGTTCTT-CATCGATGC-3') đặc hiệu cho các loài tảo [8]. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PTC-100 Programmable Thermal Controller MJ Reseach. Mỗi phản ứng (20 μ l) gồm: ADN genom (50-100 ng) 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01% bovine serum albumin); 100 nM mỗi; 100 μ M dNTP; 0,5 đơn vị Taq polymeraza. Phản ứng được bắt đầu bằng bước biến tính ADN khuôn ở 96°C trong 3 phút; tiếp đến là 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm các bước thay đổi nhiệt độ như sau: 95°C - 30 giây; 60°C - 1 phút; 72°C - 1 phút. Giai đoạn cuối cùng được thực hiện ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 1%.

c. Tạo dòng phân tử ADN: sản phẩm PCR được gắn vào vectơ PCR 2.1 TOPO của hãng In Vitrogen, sau đó biến nạp vào tế bào *E.coli* (DH5 α). Các khuẩn lạc mang plasmit tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường có bổ sung kanamycin, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indol β -D-galactopyranosit) và IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranosit). Plasmit được tách từ các khuẩn lạc trắng riêng rẽ và chọn lọc trên gel agarosa 0,8%. Sự có mặt của đoạn ITS-1 trong plasmit được kiểm tra lại bằng enzym cắt giới hạn *E.coRI*. Những khuẩn lạc đã mang gien được nhân với sinh khối lớn để tách và tinh sạch plasmit.

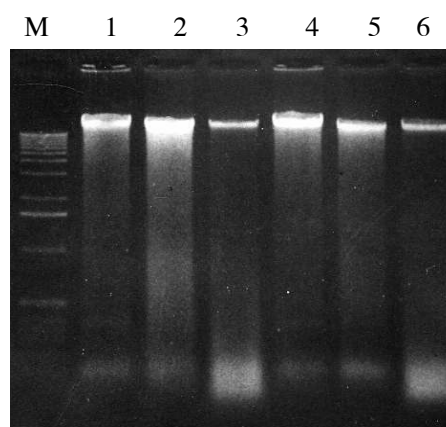
d. Xác định trình tự ADN: trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 của 6 mẫu *Scenedesmus* được thực hiện trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 377 ADN Sequencer, sử dụng ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit của hãng Perkin-Elmer.

Từ số liệu thu được, chúng tôi đã phân tích trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 của 6 mẫu *Scenedesmus* và xây dựng cây phân loại bằng máy tính dựa trên chương trình ClustalX Multiple Sequence Alignment Program (version 1.81, June 2000).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách chiết ADN

ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp của Trần Hữu Quang và cs. [4] và điện di kiểm tra trên gel agarosa 0,8%. Kết quả điện di ADN được trình bày trong hình 1. Sau khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 260/280 nm cho thấy ADN tách chiết được có hàm lượng và độ tinh sạch đủ để làm nguyên liệu cho phản ứng PCR.



Hình 1. ADN tổng số của 6 chủng *Scenedesmus* phân lập từ hồ Hoàn Kiếm

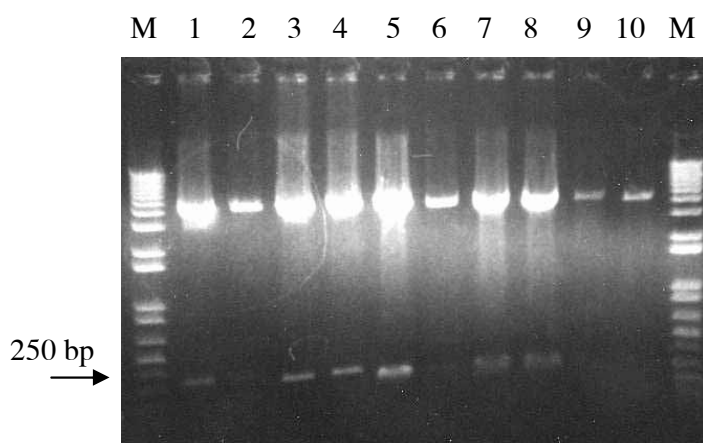
(M: Marker 1 Kb; Cột 1: S-4; Cột 2: S-35; Cột 3 : S-177; Cột 4: S-190; Cột 5: S-1695; Cột 6: S-G)

2. Chạy PCR nhân đoạn ITS-1

Để nhân đoạn ITS-1 của các chủng *Scenedesmus*, chúng tôi đã chạy PCR sử dụng cặp mồi ITS1 và ITS2 đặc hiệu cho các loài tảo. Sản phẩm được kiểm tra trên gel agarosa 0,8%, markơ được sử dụng là 1 kb. Kết quả đã thu được những sản phẩm đặc hiệu có kích thước khoảng 250 pb (kết quả không chỉ ra ở đây).

3. Tạo dòng phân tử

Sản phẩm PCR được gắn vào plasmit PCR2.1 TOPO và biến nạp vào tế bào *E.coli* (DH5 α). Sau khi chọn được khuẩn lạc mang plasmit tái tổ hợp, chúng tôi đã tách plasmit. Để kiểm tra sự có mặt của đoạn ITS-1, chúng tôi đã dùng enzym giới hạn *E.coRI* để cắt. Sau khi chạy điện di, kiểm tra thấy đã văng ra một băng ADN có kích thước khoảng 250 bp. Điều đó chứng tỏ đoạn ITS-1 đã được gắn vào plasmit.



Hình 2. Kiểm tra đoạn ITS-1 của 6 chủng *Scenedesmus* được gắn trong plasmid bằng enzym cắt giới hạn *E.coRI*

Ghi chú: M: Markơ, Cột 2-9-10: đối chứng

Cột 1: S-1695, cột 3: S-190, cột 4: S-177, cột 5: S-4, cột 7: S-35, cột 8: S-G

4. Kết quả đọc trình tự nucleotit đoạn ITS-1

Sau khi tinh sạch plasmid, chúng tôi đã xác định trình tự nucleotit trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 377 DNA Sequencer, sử dụng bộ hóa chất chuẩn ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit của hãng Perkin-Elmer. Kết quả đọc trình tự nucleotit của 6 chủng *Scenedesmus* được trình bày trong hình 3.

```

S-1695 GCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTG 50
S-190 GCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTG
S-G GCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTG
S-4 GCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTG
S-35 GCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTG
S-177 GCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTG
*****

S-1695 TTTTCGTTAAAAGTCCGATTAACAGCAGCCGAAACTTCAGAGTTTGGTT 100
S-190 TTTTCGTTAAAAGTCCGATTAACAGCAGCCGAAACTTCAGAGTTTGGTT
S-G TTTTCGTTAAAAGTCCGATTAACAGCAGCCGAAACTTCAGAGTTTGGTT
S-4 TTTTCGTTAAAAGTCCGATTAACAGCAGCCGAAACTTCAGAGTTTGGTT
S-35 TTTTCGTTAAAAGTCCGATTAACAGCAGCCGAAACTTCAGAGTTTGGTT
S-177 TTTTCGTTAAAAGTCCGATTAACAGCAGCCGAAACTTCAGAGTTTGGTT
*****

S-1695 TAATCAATGGTTGGTCAATGGTGTGTGTGTGTGTAAGTAGGCCAAACC 150
S-190 TAATCAATGGTTGGTCAATGGTGTGTGTGTGTGTAAGTAGGCCAAACC
S-G TAATCAATGGTTGGTCAATGGTGTGTGTGTGTGTAAGTAGGCCAAAGGGG
S-4 TAATCAATGGTTGGTCAATGGTGTGTGTGTGTAAGTAGGCCAAACCGG
S-35 TAATCAATGGTTGGTCAATGGTGTGTGTGTGTAAGTAGGCCAAACCGG
S-177 TAATCAATGGTTGGTCAATGGTGTGTGTGTGTAAGTAGGCCAAACCGG
***** *

S-1695 GGTGAGGGTTCGACCTAACGTCGGTACACAAGTAAAAGAGTGCCTGTTGT 200
S-190 GGTGAGGGTTC -ACCTAACGTCGGTACACAAGTAAAAGAGTGCCTGTTGT
S-G TGAGGGTTCGACCTAACGTCGGTACACAAGTAAAAGAGTGCCTGTTGTGG
S-4 TGAGGGTTCGACCTAACGTCGGTACACAAGTAAAAGAGTGCCTGTTGTGG
S-35 TGAGGGTTCGACCTAACGTCGGTACACAAGTAAAAGAGTGCCTGTTGTGG
S-177 TGAGGGTTCGACCTAACGTCGGTACACAAGTAAAAGAGTGCCTGTTGTGG
* * * * *

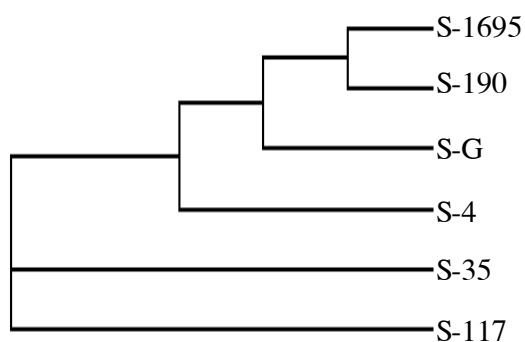
S-1695 GGTTCATATTCAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGA 242
S-190 GGTTCATATTCAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGA 242
S-G TTTGCATATTCAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGA 240
S-4 TTTGCATATTCAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGA 240
S-35 TTTGCATATTCAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGA 240
S-177 TTTGCATATTCAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGA 240
* ** * *

```

Hình 3. So sánh trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của 6 chủng *Scenedesmus* phân lập từ hồ Hoàn Kiếm

Kết quả thu được ở trên cho thấy: 4 chủng (S-G), (S-4), (S-35) và (S-177) có trình tự nucleotit hoàn toàn giống nhau. Hai chủng còn lại là (S-1695) và (S-190) chỉ sai khác duy nhất 1 nucleotit ở vị trí 162 trên chuỗi trình tự của đoạn ITS-1.

Dựa trên chương trình ClustalX Multiple Sequence Alignment Program (version 1.81, June 2000), chúng tôi đã xây dựng cây phân loại của 6 chủng *Scenedesmus* (hình 4).



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của 6 chủng *Scenedesmus* phân lập từ hồ Hoàn Kiếm

Theo cây phân loại này, 6 chủng *Scenedesmus* đã phân chia thành 2 nhóm: nhóm thứ nhất gồm 2 chủng S-177 và S-35. Nhóm thứ 2 gồm 4 chủng S-4, S-G, S-1695 và S-190.

So sánh với kết quả sử dụng kỹ thuật RAPD để xác định mối quan hệ giữa các chủng *Scenedesmus* đã công bố [3] thì chủng S-4 và S-G đã tách ra thành một nhóm và chủng S-G trở thành một nhánh của chủng S-4. Trong khi đó, 2 chủng S-1695 và S-190 không có sự thay đổi, chúng vẫn nằm trên cùng một nhánh và là nhánh phụ của chủng S-G.

Như vậy, bằng cách phân tích trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 thì 4 chủng S-G, S-4, S-35 và S-177 có thể là cùng một loài thuộc chi *Scenedesmus* còn 2 chủng S-1695 và S-190 thuộc 2 loài khác nhau. Dựa vào chương trình ClustalX Multiple Sequence Alignment Program (version 1.81, June 2000) và TreeView(1.6.1-2000), chúng tôi đã xác định được hệ số xa nhau về mặt di truyền giữa 4 chủng (S-G, S-4, S-35 và S-177) và 2 chủng (S-1695 và S-190) là 0,34179. Trong đó, khoảng cách giữa 2 chủng S-1695 và S-190 là rất nhỏ (0,00136) chứng tỏ chúng có mối quan hệ di truyền rất gần gũi. Kết quả này bổ sung cho kết quả đã công bố bằng kỹ thuật RAPD và phân loại kinh điển [3].

III. KẾT LUẬN

1. Lần đầu tiên ở Việt Nam, bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi ITS1 & ITS2 đặc hiệu cho các loài tảo, chúng tôi đã nhân và tách dòng được đoạn ITS-1 (kích thước 250 bp) của 6 chủng *Scenedesmus* phân lập từ hồ Hoàn Kiếm.

2. Kết quả phân tích và so sánh trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa 6 chủng *Scenedesmus* này ở mức độ phân tử. Trong đó, 4 chủng *S. obliquus* (Turp.) var. *alternans*, *S. obliquus* (Turp.) Kuetz. var. *obliquus* 367, *S. obliquus* (Turp.) var. sp. và *S. quadricauda* var. sp. có trình tự nucleotit hoàn toàn giống nhau. Như vậy chúng có thể được xếp vào cùng một loài. 2 chủng còn lại *S. quadricauda* (Turp.) var. *abundans* Kirchn và *S. ellipsoides* Chod chỉ khác biệt duy nhất ở 1 nucleotit, chứng tỏ chúng có thể là 2 loài khác nhau nhưng có mối quan hệ di truyền rất gần gũi.

3. Để làm sáng tỏ hơn nữa mối quan hệ giữa các chủng *Scenedesmus* cũng như các loài vi tảo khác, cần phải đọc và so sánh trình tự của nhiều gen khác nữa như đoạn ITS-2, các gen rubisco, những vùng intron nằm trong các gen bảo thủ khác v.v ...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dương Đức Tiến, Võ Hành**, 1997: Tảo nước ngọt Việt Nam, phân loại bộ tảo lục (Chlorococcales). NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. **Hoàng Thị Minh Hiền và cs.**, 2000: Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của một số loài *Dunaliella* (Chlorophyta) bằng kỹ thuật PCR-RAPD. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. **Trần Dụ Chi và cs.**, 2000: Tạp chí Sinh học, 23(3a): 170-177.
4. **Trần Hữu Quang và cs.**, 1999: Nghiên cứu quá trình tách chiết nhanh và làm sạch axit nucleic từ các loài tảo biển. Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1999: 107-113.
5. **Baker F. T. et al.**, 1992: *J. Phycology*, 28: 839-845.

6. **Bente E. and Linda M.**, 1998: *Phycologia*, 37(4): 275-283.
7. **Bird C. J. et al.**, 1992: *Phycologia*, 31: 510-522.
8. **Edwardsen E. and Medlin. L.**, 1998: *Phycologia*, 37: 275-283.
9. **Kaku H. et al.**, 1999: Genetic diversity analysis of *Agrobacteria* and *Rhizobia* based on PCR-RFLP of 16S rDNA- 23S rDNA intergenic spacer region. International Conference on Asian Network on Microbial Research. Chiang Mai, Thailand, 705-716.
10. **Naomi. P., Celia M. S. and Clifford W. M.**, 2001: *Phycological Research*, 49: 97-102.
11. **Norishige Y. et al.**, 2001: *Fisheries science*, 67: 857- 862.
12. **Tadao Y., Valérie S. and Takeo H.**, 2000: *Phycological Research*, 48: 125-131.
13. **Valérie S. et al.**, 2000: *Phycological Research*, 48: 251-260.

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF SOME *SCENEDESMUS* STRAINS
(CHLOROPHYTA) ISOLATED FROM THE HOANKIEM LAKE
BY BASING ON ITS-1 DNA SEQUENCES**

NGUYEN DUC BACH, DANG DIEM HONG, DUONG DUC TIEN,
NGUYEN VAN DONG

SUMMARY

Six strains of *Scenedesmus*, differing in their organic body scale morphology, were isolated from the Hoankiem lake, Hanoi city. Using PCR technique, we amplified and sequenced the ITS-1 (internal transcribed spacer), located in the region of DNA encoding for 18S and 5,8 S ribosomes. Based on the alignment of the ITS-1 sequence and the phylogenetic representation, six strains were divided into two main clusters (genetic distant coefficient was 0.34179). One of which was absolutely identical in genetic-homology and composed of *S. obliquus* (Turp.) var. *alternans*, *S. obliquus* (Turp.) Kuetz. var. *obliquu* 367, *S. obliquus* (Turp.) var. *sp.* and *Scenedesmus quadricauda* var. *sp.*; these four strains were suggested to be an exclusive species of the genus *Scenedesmus*. The second group included *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) var. *abudans* Kirchn and *Scenedesmus ellipsoides* Chod (genetic distant coefficient was 0.00136) might be two distinct species but were almost identical in genetic relationship.

Ngày nhận bài: 23-5-2002