

ĐỊNH LOẠI LOÀI TẢO *PROROCENTRUM* SP. PHÂN LẬP ĐƯỢC Ở THÀNH PHỐ HẢI PHÒNG DỰA VÀO TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CỦA CÁC ĐOẠN GIEN 18S rDNA VÀ ITS1-5,8S-ITS2

ĐẶNG ĐIỂM HỒNG, HOÀNG MINH HIỀN, HOÀNG LAN ANH

Viện Công nghệ sinh học

CHU VĂN THUỘC

Viện Tài nguyên và Môi trường biển

Chi *Prorocentrum* thuộc ngành Dinoflagellatae bao gồm 31 loài tảo biển với cấu trúc tế bào rất giống nhau [9]. Người ta thấy chúng có mặt ở những nơi xuất hiện thủy triều đỏ hoặc có sự “nở hoa” của cả tảo độc và không độc. Độc tố DSP (Diarrhetic shellfish poisoning) có trong các loài tảo giáp sống trôi nổi hoặc sống đáy, hầu hết thuộc chi *Dinophysis* hoặc chi *Prorocentrum*, gây ảnh hưởng đến hệ tiêu hóa của người. Hiện tượng “nở hoa” của các loài tảo này trên biển và ở các thủy vực thường kéo theo sự nhiễm độc cho các loài hải sản và con người khi ăn phải chúng. Do vậy, việc phát hiện và ngăn chặn sự nở hoa của tảo độc là rất cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn to lớn trong việc giảm thiểu những tác động xấu của chúng tới môi trường, đặc biệt là đối với công việc nuôi trồng hải sản và bảo đảm an toàn thực phẩm [6, 9]. Các nghiên cứu về sự “nở hoa” của tảo độc bao gồm việc xác định và thống kê các loài tảo gây độc và hại, sự phân bố của chúng trong không gian, thời gian và các yếu tố môi trường liên quan đến hiện tượng bùng phát số lượng tảo độc [1] và các biện pháp phòng ngừa giảm thiểu tác hại của chúng. Phương pháp phân loại truyền thống dựa trên các đặc điểm hình thái có vai trò quan trọng trong việc xác định các loài tảo, tuy nhiên, có rất nhiều khó khăn khi gặp những loài có khả năng biến đổi hình thái để thích ứng trong những điều kiện sống khác nhau hoặc những loài rất giống nhau về mặt hình thái và những biến thái này của chúng lại rất khó phân biệt dưới kính hiển vi [6, 7]. Hiện nay, bên

cạnh các phương pháp phân loại truyền thống, các kỹ thuật sinh học phân tử đã được sử dụng nhằm góp phần phân loại một cách chính xác hơn các loài tảo.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả bước đầu phân loại loài tảo *Prorocentrum* sp. thu được tại thành phố Hải Phòng bằng phương pháp dựa vào các đặc điểm hình thái kết hợp với so sánh trình tự nucleotit của các đoạn gen 18S rDNA, ITS1-5,8S-ITS2. Trên cơ sở các kết quả thu được, tên và mối quan hệ về phát sinh chủng loại giữa loài mà chúng tôi phân lập được với các loài *Prorocentrum* spp. khác đã được công bố tại Ngân hàng gen thế giới GENE BANK.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Vật mẫu *Prorocentrum* sp. được phân lập ở Đồ Sơn, thành phố Hải Phòng do Viện Tài nguyên và Môi trường biển cung cấp. Độ thuần khiết theo tiêu chuẩn hình thái của tảo được kiểm tra dưới kính hiển vi laser quét Axiovert 100M của hãng CarlZeiss.

- Các trình tự của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 của 10 loài *Prorocentrum* đã được công bố tại Ngân hàng gen GENE BANK (bảng 1) đã được sử dụng.

- Vectơ pCR^R2.1, chủng vi khuẩn *E.coli*

DH5 α và các hóa chất chuẩn của hãng Invitrogen.

2. Phương pháp

- Tách chiết DNA tổng số của *Prorocentrum* sp. theo phương pháp đã công bố [5].

- Các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 được nhân bằng kỹ thuật PCR từ DNA tổng số với các cặp mồi đặc hiệu: 18S-F (5'-GAGAGGG-AGCCTGAGAAACG-3') và 18S-R (5'-GGCAT-CACAGACCTGTTATTGC-3'), ITS-F (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS-R (5'-CGA-CGCAAGAAGTAGACTCG-3').

- Điều kiện và thành phần của phản ứng PCR

theo như công bố [4, 5].

- Quá trình tách dòng các đoạn gen nhân được, được tiến hành theo công bố [4, 5, 8].

- Trình tự nucleotit của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 ở mẫu nghiên cứu được thực hiện trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM^(R)3100-Avant Genetic Analyzer (ABI, Mỹ) 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 *Prorocentrum* sp. thu thập tại Hải Phòng với trình tự của các loài *Prorocentrum* có sẵn tại GENE BANK.

Bảng 1

Các loài *Prorocentrum* có trình tự của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 được sử dụng để phân tích sự đa dạng di truyền

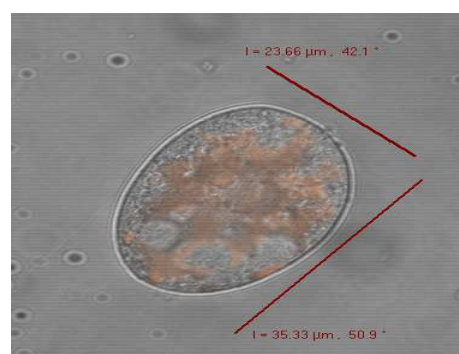
STT	Tên khoa học	Số hiệu taxon (TaxID)	Mã số GENE BANK	Gen mã hóa
1	<i>Prorocentrum lima</i> (Ehrenberg) Dodge 1975	39448	Y16235	18S rDNA
2	<i>P. arenarium</i> Faust 1994	72679	Y16234	18S rDNA
3	<i>P. maculosum</i> Faust 1993	72680	Y16236	18S rDNA
4	<i>P. concavum</i> Fukuyo 1981	72681	Y16237	18S rDNA
5	<i>P. panamensis</i> sp. nov.	72678	Y16233	18S rDNA
6	<i>P. micans</i> Ehrenberg 1834	2945	AJ415519	18S rDNA
7	<i>P. minimum</i> var. <i>triangulatum</i> Hulburt 1959	39449	AJ415520	18S rDNA
8	<i>P. minimum</i> (Pavillard) Schiller 1933	39449	Y16238	18S rDNA
9	<i>P. mexicanum</i> Osorio Tafall 1942	72677	Y16232	18S rDNA
10	<i>P. emarginatum</i> Fukuyo 1981	72682	Y16239	18S rDNA
11	<i>P. micans</i> Ehrenberg 1834	2945	AF208245	ITS1-5,8S-ITS2
12	<i>P. minimum</i> (Pavillard) Schiller 1933	39449	AF352370	ITS1-5,8S-ITS2
13	<i>P. minimum</i> var. <i>triangulatum</i> Hulburt 1959	39449	AF208244	ITS1-5,8S-ITS2
14	<i>P. triestinum</i> Schiller 1918	39450	AF208246	ITS1-5,8S-ITS2
15	<i>P. minimum</i> var. <i>mariae-lebourae</i> Hulburt 1959	39449	AF352371	ITS1-5,8S-ITS2

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

Dưới kính hiển vi laser quét, *Prorocentrum* sp. là các đơn bào chuyển động; tế bào gần giống hình ovan, dài 32,58-35,33 μm , rộng 22,84-23,66 μm . Như vậy, dựa vào các đặc điểm hình thái, vật mẫu *Prorocentrum* sp. mà chúng tôi phân lập được tại Hải Phòng có thể được xếp vào loài *Prorocentrum mexicanum* Osorio Tafall 1942.

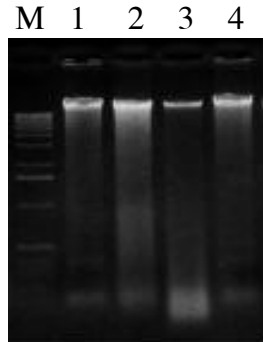
82



Hình 1. Hình thái tế bào của loài *Prorocentrum* sp. thu tại Hải Phòng dưới kính hiển vi laser quét.

2. Tách chiết DNA tổng số

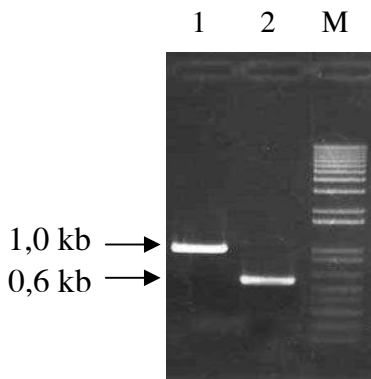
Kết quả tách DNA tổng số của *Prorocentrum* sp. được trình bày trên hình 2 cho thấy DNA có chất lượng tốt, không bị đứt gãy, phù hợp để làm nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra DNA của *Prorocentrum* sp.

Giếng 1: mackơ 1Kb; giếng 1-4: mẫu DNA tách từ *Prorocentrum* sp.

3. Nhân các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 bằng kỹ thuật PCR



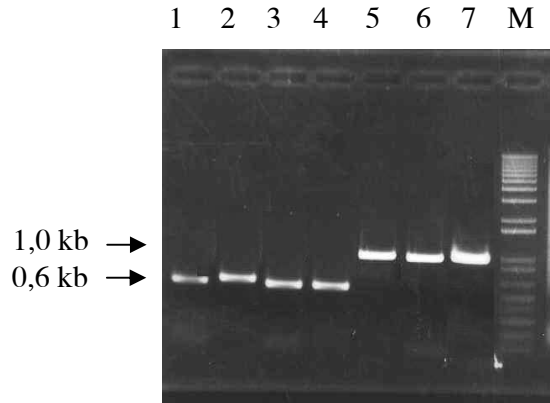
Hình 3. Điện di sản phẩm PCR của loài *Prorocentrum* sp.

Cột M: thang chuẩn của DNA có kích thước 1 kb; cột 1: sản phẩm PCR với cặp mồi 18S F-R; cột 2: sản phẩm PCR với cặp mồi ITS F-R.

Để phân lập và tách dòng một phần của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 của *Prorocentrum* sp., chúng tôi đã thiết kế các cặp mồi đặc hiệu 18S F-R và ITS F-R dựa vào trình tự nucleotit của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 của chi *Prorocentrum* đã được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế (GENEBANK). Trong đó, theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR sẽ có kích thước khoảng

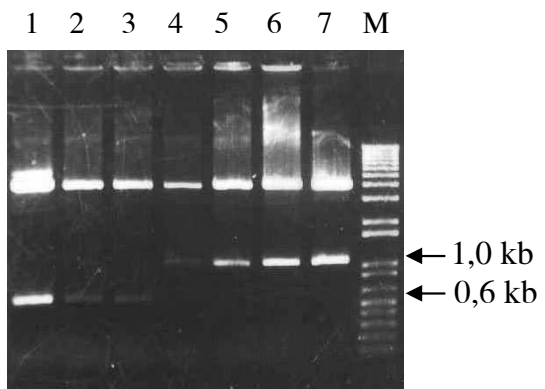
1,0 kb đối với cặp mồi 18S F-R và 0,6 kb với cặp mồi ITS F-R. Sản phẩm PCR của *Prorocentrum* sp. với hai cặp mồi nói trên được chỉ ra trên hình 3. Kết quả cho thấy chúng tôi đã nhân được các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 có kích thước tương ứng khoảng 1,0 kp và 0,6 kp. Kích thước của các sản phẩm PCR mà chúng tôi thu được phù hợp với khoảng cách giữa hai mồi và kích thước theo tính toán lý thuyết.

4. Tách dòng các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR kiểm tra các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 với cặp mồi 18S R-F và ITS F-R đã được gắn vào vector tách dòng pCR^R2.1.

Cột M: thang chuẩn của DNA có kích thước 1 kb; cột 1-4: các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp gắn đoạn gen 18S rDNA; cột 5-7: các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp gắn đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2.



Hình 5. Phân tích enzym giới hạn các plasmid tái tổ hợp mang các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2.

Cột M: thang chuẩn DNA có kích thước 1 kb; cột 1-3: vector pCR^R2.1 đã gắn sản phẩm PCR của đoạn gen 18S rDNA; cột 4-7: vector pCR^R2.1 đã gắn sản phẩm PCR của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2.

Các đoạn gen nhận được đã được tiến hành tách dòng, xác định trình tự theo các công bố [3, 4, 7]. Để khẳng định có phải là vectơ tái tổ hợp mang các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 mong muốn không, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR-checking các khuẩn lạc trắng với hai cặp môi 18S F-R và ITS F-R (hình 4) và cắt DNA plasmid tái tổ hợp với enzym giới hạn *EcoRI* (hình 5). Kết quả trên các hình 4, 5 thu được đã chứng tỏ rằng các đoạn gen mà chúng tôi mong muốn đã được gắn thành công vào vectơ tách dòng pCR^R2.1. Tiếp theo, các dòng plasmid tái tổ hợp nói trên được tách chiết và tinh sạch một lượng lớn để đọc trình tự.

5. So sánh trình tự nucleotit của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 của các loài *Prorocentrum*

Chúng tôi đã tiến hành so sánh các trình tự thu được của *Prorocentrum* sp. với 10 trình tự của đoạn gen 18S rDNA của 9 loài *Prorocentrum* khác (hình 6) và với 5 trình tự của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của 3 loài *Prorocentrum* khác đã được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế (hình 7). Kết quả ở các hình 6 và 7 cho thấy có sự sai khác của các trình tự này giữa các loài *Prorocentrum* với nhau. Tỷ lệ phần trăm tương đồng của từng cặp trình tự của các loài *Prorocentrum* được thống kê dưới dạng ma

trận tam giác tại các bảng 2 và 3. Theo kết quả ở các bảng 2 và 3, chúng tôi thấy độ tương đồng của đoạn gen 18S rDNA giữa các loài *Prorocentrum* là từ 92-100% và của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 là từ 77-99%. Như vậy, việc đọc và so sánh các trình tự của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 trong chi *Prorocentrum* là công cụ rất hữu hiệu để kiểm tra và xác định mối quan hệ phát sinh chủng loại trong cùng một loài và dưới loài ở những điều kiện địa lý, sinh thái khác nhau. Điều này được chỉ ra khi so sánh 2 nhóm *P. minimum* với nhau, độ tương đồng của đoạn gen 18S rDNA giữa hai nhóm *P. minimum* là 100% (bảng 2) nhưng với đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 là 99,3-99,5% (bảng 3). Cũng trên bảng 2, chúng ta nhận thấy rằng *Prorocentrum* sp. có độ tương đồng cao nhất, đạt đến 99,9% khi so sánh với *P. mexicanum* (Y16232), tiếp đó 99,8% với *P. micans* (AJ415519), 99,6% với *P. minimum* (AJ415520 và Y16238), 96,5% với *P. concavum* (Y16237), 96,4% với *P. panamensis* (Y16233), 95,6% với *P. emarginatum* (Y16239) và thấp nhất là 94,1% với *P. arenarium* (Y16234) và *P. maculosum* (Y16236). Kết hợp với các đặc điểm hình thái của *Prorocentrum* sp. miêu tả ở phần II.1 với kết quả phân tích trình tự của đoạn gen 18S rDNA trên đây, chúng tôi kết luận rằng *Prorocentrum* sp. thuộc loài *Prorocentrum mexicanum*.

AJ415520	GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16238	GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16232	GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
<i>Prorocentrum</i> sp.	GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
AJ415519	GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16239	GAGAGGGAGCCGAGACATGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16233	GAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACC
Y16237	GAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16234	GAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16235	GAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
Y16236	GAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC
	***** * * *****
AJ415520	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16238	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16232	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
<i>Prorocentrum</i> sp.	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
AJ415519	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16239	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16233	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCATCCATGTCTTGTA
Y16237	CAATCCTGACATAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16234	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16235	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
Y16236	CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCATAATTGTCTTGTA
	***** *****
AJ415520	ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCCCTTTACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16238	ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCCCTTTACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16232	ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCCCTTTACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
<i>Prorocentrum</i> sp.	ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCCCTTTACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
AJ415519	ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCCCTTTACGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC

Y16239 ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCCCTTTACGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16233 ATTGGAATGAGTAGAACTCAAACCTCCTCTACAAGTACCGATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16237 ATTGGAATGAGTAGAACTTAAATCCCTTTGCGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16234 ATTGGAATGAGTAGAACTTAAATCTCTTTGTGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16235 ATTGGAATGAGTAGAACTTAAATCTCTTTGTGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGC
Y16236 ATTGGAATGAGTAGAATTTAAATCTCTTTATGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGC
***** * ** * *****
AJ415520 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16238 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16232 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Prorocentrum sp. CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
AJ415519 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16239 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16233 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16237 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16234 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCATATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16235 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCATATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
Y16236 CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCATATATTTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGC
***** ** *****
AJ415520 TCGTAGTTGGATTTCTGCCGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGTATCTGGCTCGG
Y16238 TCGTAGTTGGATTTCTGCCGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGTATCTGGCTCGG
Y16232 TCGTAGTTGGATTTCTGCCGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGTATCTGGCTCGG
Prorocentrum sp. TCGTAGTTGGATTTCTGCCGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGTATCTGGCTCGG
AJ415519 TCGTAGTTGGATTTCTGCCGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGTATCTGGCTCGG
Y16239 TCGTAGTTGGAAGTCTGCCTAGGAAGACTGGTCCGCCCTCCGGGTGAGTATCTGGCTCGG
Y16233 TCGTAGTTGGACTTCTGCTGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGCATCTGGCTCGG
Y16237 TCGTAGTCGGATTTCTGCCGAGGACGACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGTATCTGGCTCGG
Y16234 TCGTAGTCGGATTTCTGCCGAGGACAACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGCATCTGGCTTGA
Y16235 TCGTAGTCGGATTTCTGCCGAGGACAACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGCATCTGGCTTGA
Y16236 TCGTAGTCGGATTTCTGCCGAGGACAACCGGTCCGCCCTCTGGGTGAGCATCTGGCTTGA
***** ** *****
AJ415520 CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16238 CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16232 CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Prorocentrum sp. CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
AJ415519 CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16239 CCTGGGCATTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16233 CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16237 CCTGGGCATCTTCTTGAGAACTGAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16234 TCTGGGCATCTTCTTGAGAGCGTAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16235 TCTGGGCATCTTCTTGAGAGCGTAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
Y16236 TCTGGGCATCTTCTTGAGAGCGTAGCTGCACCTGACTGTGTGGTGCAGGATCCAGGACT
** ***** * ** * *****
AJ415520 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTTACGCCTTGAATACATTAGCATGG
Y16238 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTTACGCCTTGAATACATTAGCATGG
Y16232 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTTACGCCTTGAATACATTAGCATGG
Prorocentrum sp. TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTTACGCCTTGAATACATTAGCATGG
AJ415519 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTTACGCCTTGAATACATTAGCATGG
Y16239 TGTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTGATGCCTTGTATACGTTAGCATGG
Y16233 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTTACGCCTTGAATACATTAGCATGG
Y16237 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTGATGCCTTGTATACGTTAGCATGG
Y16234 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTGATGCCTTGTATACGTTAGCATGG
Y16235 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTGATGCCTTGTATACGTTAGCATGG
Y16236 TTTACTTTGAGGAAATTAGAGTGTTCGAGCAGGCTGATGCCTTGTATACGTTAGCATGG
* ***** * ** * *****
AJ415520 AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16238 AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16232 AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Prorocentrum sp. AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
AJ415519 AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16239 CATACTAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16233 AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16237 AATAATAAGATAGGACCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16234 AATAATAAGATAGGACCTACTCTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16235 AATAATAAGATAGGACCTACTCTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
Y16236 AATAATAAGATAGGACCTTTCTCTATTTGTTGGTTTCTAGAGCTGAGG-TAATGATTA
*** ** * *****

AF208244 GATAGCATCGATGCCCCATGCAGAGACTCAAGGGCAGCAAGCCAGGCTCAGACCCTCTT
AF352371 GATAGCATCGACGCCCCATGCAGAGACTCAAGGGCAGCAAGCCAGGCTCAGACCCTCTT
AF352370 GATAGCATCGACGCCCCATGCAGAGACTCAAGGGCAGCAAGCCAGGCTCAGACCCTCTT
AF208246 GATAGCATCGATTCCCCATGCAGAC-TTCAAGGGCACTGGGCCAGGTGCGGACCGTCTT
*** ***** * *** ***** ** ***** ***** ** *****

AF208245 CCTTTCCTGTCCCTGTGCCATGTCTTCAACTTGTCTACAAAGCATTATTTGTTCCATTTG
Prorocentrum sp. CCTTGCCTGCCCCCTGTGCCATCGCTTCAACTTGTCTATTCAGCATTATTTGTTTC--TTT
AF208244 CTGTGCCTGTCCCTGTGTCG--GGTGTCTTCTGATCTTCTGTGTTTTTGAATC----T
AF352371 CTGTGCCTGTCCCTGTGTCG--GGTGTCTTCTGATCTTCTGTGTTTTTGAATC----T
AF352370 CTGTGCCTGTCCCTGTGTCG--GGTGTCTTCTGATCTTCTGTGTTTTTGAATC----T
AF208246 CTGCATCTGCGCTGCTGCCA-ATTGCTTTTGAATTATTGGTTCTTCATATCC----T
* * * * * * *

AF208245 TTCTCGAGTGGTTATCCACTTGTTTATTGTATTACAACCTTTCAGCGACGGATGTCTCGGC
Prorocentrum sp. TCTTCGAGTGGTTATCCACTTATTCATCGCATTACAACCTTTCAGCGACGGATGTCTCGGC
AF208244 CTCCTGAGTGGTC-TCCACTCTCACATCTACTTACAACCTTTCAGCGACGGATGTCTCGGC
AF352371 CTCCTGAGTGGTC-TCCACTCTCACATCTACTTACAACCTTTCAGCGACGGATGTCTCGGC
AF352370 CTCTTGAGTGGTC-TCCACTCTCACATCTACTTACAACCTTTCAGCGACGGATGTCTCGGC
AF208246 ATCTCTTGTGGCTTGTTCACATGTCTTTCATACAACCTTTCAGCGATGGATGTCTCGGC
***** * * *****

AF208245 TCGAACAACGATGAAGGGCGCAGCGAAGTGTGATAAGCATTGTGAATTGCAGAATCCGT
Prorocentrum sp. TCGAACAACGATGAAGGGCGCAGCGAAGTGTGATAAGCATTGTGAATTGCAGAATCCGT
AF208244 TCGAACAACGATGAAGGGCGCAGCGAAGTGTGATAAGCATTGTGAATTGCAGAATCCGT
AF352371 TCGAACAACGATGAAGGGCGCAGCGAAGTGTGATAAGCATTGTGAATTGCAGAATCCGT
AF352370 TCGAACAACGATGAAGGGCGCAGCGAAGTGTGATAAGCATTGTGAATTGCAGAATCCGT
AF208246 TCGAACAACGATGAAGGGCGCAGCGAAGTGTGATAAGCATTGTGAATTGCAGAATCCGT

AF208245 GAACCAATAGGGACTTGAACGTATACTGCGCTTTCGGGATATCCCTGAAAGCATGCGCTGC
Prorocentrum sp. GAACCAATAGGGACTTGAACGTATACTGCGCTTTCGGGATATCCCTGAAAGCATGCGCTGC
AF208244 GAACCAATAGGGACTTGAACGTATACTGCGCTTTCGGGATATCCCTGAAAGCATGCGCTGC
AF352371 GAACCAATAGGAGACTTGAACGTATACTGCGCTTTCGGGATATCCCTGAAAGCATGCGCTGC
AF352370 GAACCAATAGGGACTTGAACGTATACTGCGCTTTCGGGATATCCCTGAAAGCATGCGCTGC
AF208246 GAACCAATAGGGACTTGAACGTATACTGCGCTTTCGGGATATCCCTGAAAGCATGCGCTGC

AF208245 TTCAGTGTCTATTCTTTTTTTCATTCAGCGATCTTGGGTTTCAGCGCTCGCTTGTGTGTCT
Prorocentrum sp. TTCAGTGTCTATTCTTTTTTTCATTCAGCGACCTGGTTTTCAGAGTCTCGCTTGTGTGTCT
AF208244 TTCAGTGTCTATTCTGTATCATTCCAGCT-TCTGGCCTGTCCAGAA-CGCTTGTGTGTTT
AF352371 TTCAGTGTCTATTCTGTATCATTCCAGCT-TCTGGCCTGTCCAGAA-CGCTTGTGTGTTT
AF352370 TTCAGTGTCTATTCTGTATCATTCCAGCT-TCTGGCATGTCCAGAA-CGCTTGTGTGTTT
AF208246 TTCAGTGTCTAATTCATTTTCATTCAGCAACCTGGT-TTTCAGTGTCTTGGGTGTAT

AF208245 TTGTGCGTTAGAGCGCTCGCCTTGCGCAGCCTTTGACGCATTAAATGCA-CAGGGACCCC
Prorocentrum sp. TTGTGCGTTAGGGCGCTCGCTTCTTTCGCGCCCTTGAACGCATTCAATGCA-CAGGGACCCC
AF208244 CTGTGTGCCAGGGCGCCC-----TGCGCCTCTGGCGCATTCAGTGA-CAGGGTCTTC
AF352371 CTGTGTGCCAGGGCGCCC-----TGCGCCTCTGGCGCATTCAGTGA-CAGGGTCTTC
AF352370 CTGTGTGCCAGGGCGCCC-----TGCGCCTCTGGCGCATTCAGTGA-CAGGGTCTTC
AF208246 TTGTGTGTCAGTGTGCTT-----TTTGCCTTTGACACATGAGCTCATCAGGTTTTCC

AF208245 TCGCACAAGCAACTAGAAAGAGCCTC--TTGGCGTTTCTTGTGTCTTGCCTGCGAGGAG
Prorocentrum sp. TTGCACAAGCAACTAGAAAGAGCCTC--TTGGCGTTTCTTGTGTCTTGCCTGCGAGGAG
AF208244 CCACGCAAGCAACTAGAAAGAGTGTCT--TCTGATGTATCTGTGCTTGTGTTGGGCA
AF352371 CCACGCAAGCAACTAGAAAGAGTGTCT--TCTGATGTATCTGTGCTTGTGTTGGGCA
AF352370 CCACGCAAGCAACTAGAAAGAGTGTCT--TCTGATGTATCTGTGCTTGTGTTGGGCA
AF208246 TTGCGCAAGCAATTAGAAAGGTTATTATGACGCTATCTGTTGCTTGTGTTGCTAAGGG
* * * * * *

AF208245 GGCCTTGCCATCCAGTGCCTAGCGCACTCCA
Prorocentrum sp. GGCTTTGCCATCCAGTGCAGAACGCACTCCA
AF208244 GGCCTTGCTGTCTAGTGCCTAGCGCACTCCT
AF352371 GGCCTTGCTGTCTAGTGCCTAGCGCACTCCT
AF352370 GGCCTTGCTGTCTAGTGCCTAGCGCACTCCT
AF208246 AAGCTTGGCTTGCAGTGCCTTGTGCACTCAA
*** * *** ***

Hình 7. So sánh trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của *Prorocentrum* sp. với 5 trình tự nucleotit của đoạn gen này của 3 loài khác: *P. micans* với mã số ký hiệu tại Ngân hàng gen quốc tế là AF208245, *P. minimum*-AF208244, AF352371, AF352370 và *P. triestinum*-AF208246.

Bảng 2

Tỷ lệ % tương đồng (ma trận tam giác trên) và khoảng cách di truyền (ma trận tam giác dưới) của đoạn gen 18S rDNA giữa các loài trong chi *Prorocentrum*

	Tỷ lệ % tương đồng													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
Khoảng cách di truyền	1		99,6	99,8	99,9	96,4	94,3	94,0	94,3	96,7	99,6	95,7	1	AJ415519
	2	0,4		99,6	99,7	96,4	94,2	93,9	99,2	96,6	100	95,6	2	AJ415520
	3	0,2	0,4		99,9	96,4	94,1	93,8	94,1	96,5	99,6	95,6	3	<i>Prorocentrum</i> sp.
	4	0,1	0,3	0,1		96,4	94,2	94,0	94,2	96,5	99,7	95,7	4	Y16232
	5	3,7	3,7	3,7	3,6		92,9	92,9	92,7	94,2	96,3	92,8	5	Y16233
	6	5,8	5,9	6,1	5,9	7,3		99,9	99,0	94,3	94,2	91,8	6	Y16234
	7	6,0	6,1	6,2	6,1	7,2	0,1		98,5	93,9	93,8	91,8	7	Y16235
	8	5,9	5,9	6,1	6,0	7,5	1,0	1,1		94,2	94,2	92,0	8	Y16236
	9	3,3	3,4	3,5	3,4	6,0	5,9	6,1	5,9		96,6	93,6	9	Y16237
	10	0,4	0,0	0,4	0,3	3,7	5,9	6,1	5,9	3,4		95,6	10	Y16238
	11	4,4	4,6	4,6	4,5	7,6	8,9	8,8	8,7	6,9	4,6		11	Y16239
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			

Bảng 3

Tỷ lệ % 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 *Prorocentrum*

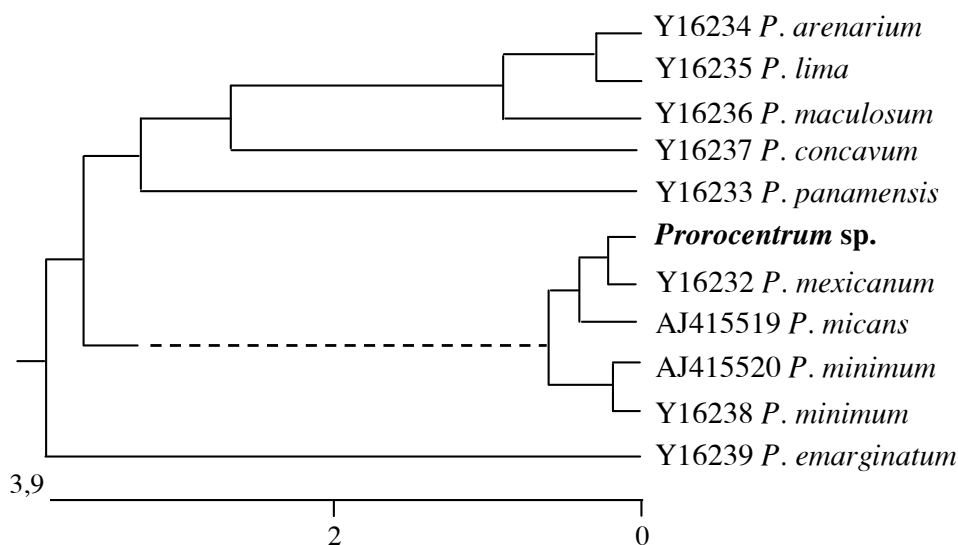
	Tỷ lệ % tương đồng								
	1	2	3	4	5	6			
Khoảng cách di truyền	1		80,3	79,6	99,3	99,5	79,9	1	AF208244
	2	25,2		77,4	80,1	79,6	91,5	2	AF208245
	3	28,2	30,9		79,2	79,0	77,4	3	AF208246
	4	0,7	24,9	28,5		99,1	79,9	4	AF352370
	5	0,5	25,7	28,8	0,9		79,1	5	AF352371
	6	24,5	10,3	32,5	24,5	25,4		6	<i>Prorocentrum</i> sp.
	1	2	3	4	5	6			

6. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của một số loài *Prorocentrum*

Dựa vào khoảng cách di truyền của đoạn gen 18S rDNA từ một số loài *Prorocentrum* khác nhau và bằng chương trình DNASTAR để tính toán khả năng lớn nhất có thể xảy ra, chúng tôi xây dựng cây phát sinh chủng loại của các loài *Prorocentrum* này (hình 8). Cây phát sinh chủng loại cho thấy các loài này được chia thành 2 nhóm: nhóm thứ nhất có duy nhất 1 loài là *P. emarginatum* và nhóm thứ 2 gồm các loài còn lại; trong đó, lại được chia ra làm 2 nhóm nhỏ: nhóm nhỏ thứ nhất gồm các loài: *P. aenarium*, *P. lima*, *P. maculosum*, *P. concavum* và *P. panamensis* và nhóm nhỏ thứ 2 gồm: *Prorocentrum* sp., *P. mexicanum*, *P. micans* và *P. minimum*.

Prorocentrum sp. nằm ngay cạnh loài *P. mexicanum* trong cây phát sinh chủng loại, có hệ số đồng dạng di truyền cao nhất 99,9% và chúng chỉ có khác biệt nhau ở 1 nucleotit khi so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen 18S rDNA. Sự khác biệt ở 1 nucleotit này có thể chỉ là sự khác biệt ở trong cùng loài *P. mexicanum*. Như vậy, *Prorocentrum* sp. có thể là loài *Prorocentrum mexicanum* và kết quả phân loại này cũng phù hợp với việc phân loại dựa vào các đặc điểm hình thái mà chúng tôi đã đề cập ở trên.

Sau khi đã xác định được *Prorocentrum* sp. là loài *Prorocentrum mexicanum*, trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Prorocentrum mexicanum* này đã được đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế, với số đăng ký được cấp là AY 886 763.



Hình 8. Cây phát sinh chủng loại của một số loài *Prorocentrum* dựa trên so sánh trình tự nucleotit của đoạn gen 18S rDNA.

III. KẾT LUẬN

1. Chúng tôi đã phân lập, tách dòng và đọc thành công trình tự nucleotit của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Prorocentrum* sp. phân lập được tại Hải Phòng.

2. Dựa trên các đặc điểm hình thái và so sánh trình tự nucleotit của các đoạn gen 18S rDNA và ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Prorocentrum* sp. với các trình tự tương ứng của các *Prorocentrum* khác đã được công bố tại Ngân hàng gen quốc tế, đã cho phép chúng tôi xác định loài tảo này là *Prorocentrum mexicanum*.

3. Trình tự nucleotit của đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của loài *Prorocentrum mexicanum* thu được tại Hải Phòng có số đăng ký tại Ngân hàng gen quốc tế là AY 886 763.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Altamirano R. C. and Beltran A. P. S., 2003: J. Phycol., 39: 221-225.
2. Asai R. et al., 2003: Phycological Research, 51: 118-125.
3. Casas M. S. et al., 2002: Diseases of Aquatic Organisms, 50: 51-65.
4. Đặng Diễm Hồng và cs., 2004: Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị khoa học “Biển Đông 2002”: 424-436. Nha Trang.
5. Đặng Diễm Hồng và cs., 2002: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 40: 161-167.
6. Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền, 1999: Công nghệ sinh học Vi tảo. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Faust M. A., 1997: J. Phycol., 33: 851-858.
8. Nguyễn Đức Bách và cs., 2003: Tạp chí Sinh học, 25(3): 1-5.
9. Taylor F. J. R., 1993: The species problem and its impact on harmful phytoplankton studies, with emphasis on dinoflagellate morphology. In: T. J. Smayda and Y. Shimizu (eds), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea: 81-86. New York, Elsevier Science Inc.
10. Takano Y. and Horiguchi T., 2004: Phycological Research, 52: 107-116.
11. Witek B., Plinski M., 2000: Oceanologia, 41(2): 29-36.
12. Grzebyk D. et al., 1998: J. Phycol., 34: 1055-1068.

**TAXONOMY OF *PROROCENTRUM* SP. SAMPLED
FROM HAIPHONG CITY BY BASING ON THE NUCLEOTIDE
SEQUENCES OF THE 18S rDNA AND ITS1-5.8S-ITS2 GENE FRAGMENTS**

DANG DIEM HONG, HOANG MINH HIEN, HOANG LAN ANH, CHU VAN THUOC

SUMMARY

The nucleotide sequences of the 18S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 gene fragments were determined in *Prorocentrum* sp., which was collected from Haiphong city, Vietnam in 2004. The length of the 18S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 gene fragments in *Prorocentrum* sp. were 1059 bp and 657bp, respectively. By comparing the *Prorocentrum* sp. sequence data with the published sequences of *P. lima*, *P. arenarium*, *P. maculosum*, *P. concavum*, *P. panamensis*, *P. micans*, *P. minimum*, *P. mexicanum*, *P. emarginatum* and *P. triestinum* in the GeneBank and constructing the phylogenetic tree, the phylogenetic relationships between *Prorocentrum* sp. and the ten other *Prorocentrum* species were established. The classification of *Prorocentrum* species based on the 18S rRNA gene coincided with the classification based on the ITS1-5.8S-ITS2 gene. The results showed that the genetic distances between the species within these two groups were low. The similar of these *Prorocentrum* species was 94% and they were divided into two groups. The first group included *P. emarginatum*. The second group included other species with 2 subgroups; the first subgroup included *P. arenarium*, *P. lima*, *P. maculosum*, *P. concavum* and *P. panamensis* and the second subgroup included *Prorocentrum* sp., *P. mexicanum*, *P. micans* and *P. minimum*. Among these species, *Prorocentrum* sp. had a close phylogenetic relationship with *P. mexicanum* (99.9%). The morphological characteristics of *Prorocentrum* sp. also showed a relatively high similarity with *P. mexicanum*. It has been shown that *Prorocentrum* sp. collected from Haiphong belonged to the species *P. mexicanum*. The nucleotide sequence of the ITS1-5.8S-ITS2 gene fragments of *P. mexicanum* (collected from Haiphong) was submitted to the GeneBank with accession number-AY886 763.

Ngày nhận bài: 11-05-2005