

## PHÂN TÍCH DI TRUYỀN VÀ PHẢ HỆ CÁC DẠNG LAI “TỰ NHIÊN/HỖN HỢP” (NATURAL/ADMIXED HYBRID) VÀ LAI “CHÉO NGƯỢC” (INTROGRESSIVE HYBRID) CỦA SÁN LÁ GAN *FASCIOLA* SPP. Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thị Bích Nga<sup>1,✉</sup>, Đỗ Thị Roan<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Khuê<sup>1</sup>, Huỳnh Hồng Quang<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Đề<sup>3</sup>, Lê Thanh Hòa<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Sốt rét-Ký sinh trùng và Côn trùng Quy Nhơn

<sup>3</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

<sup>4</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: bichnga153@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.6.2018

Ngày nhận đăng: 27.8.2018

### TÓM TẮT

Sán lá gan lớn *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* và dạng “trung gian” (intermediate form) *Fasciola* sp. hay còn gọi là dạng “lai” là nguyên nhân gây bệnh sán lá gan lớn (fascioliasis) ở động vật nhai lại và ở người tại nhiều nước trên thế giới. Dạng lai gồm 2 loại: lai “tự nhiên” hay “hỗn hợp” (natural/admixed hybridization) và lai “chéo ngược” (introgressive hybridization). Việt Nam là “điểm nóng” đã phát hiện dạng lai sán lá gan *Fasciola* spp. trong cả nước. Xác định quan hệ phả hệ và khoảng cách di truyền của các dạng lai này với các loài trong họ Fasciolidae và Lớp Trematoda (Ngành Platyhelminthes) là cần thiết để khẳng định phân loại. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chuỗi ITS1 và ITS2 để phân biệt 2 dạng lai nói trên. Amino acid suy diễn từ các gen cytochrome b (*cob*), nicotinamide dehydrogenase 1 (*nad1*) và cytochrome oxidase 1 (*cox1*) của hệ gen ty thể từ 2 mẫu “lai” *Fasciola* spp. gồm Fsp-DL11-VN (mẫu trên trâu, lai “tự nhiên”); Fsp-FH1-VN (mẫu trên người, lai “chéo ngược”) và của loài *F. gigantica* “thuần” (Ffig-T4V-VN, mẫu trên bò) được thu nhận và kết hợp 3 gen (*cob+nad1+cox1*) làm chỉ thị phân tử sử dụng để phân tích phả hệ, cùng với 28 loài/chủng đại diện họ Fasciolidae và lớp Trematoda. Khoảng cách di truyền giữa 13 chủng/loài trong họ Fasciolidae, cũng đã được xác định nhằm xem xét chính xác mối quan hệ về loài của chúng. Kết quả tính toán cho thấy, tỷ lệ sai khác chỉ là 0,4% – 0,7% giữa các mẫu lai *Fasciola* spp. của Việt Nam và Trung Quốc, cao hơn là 1,3 – 2,0% với các mẫu *F. gigantica* “thuần”, trong khi đó tỷ lệ này khá cao so với *F. hepatica* (5,7% – 5,9%), và rất cao so với các loài *Fasciolopsis buski* (20,6% – 21,0%), *Fasciola jacksoni* và *Fascioloides magna* (11,0% – 12,6%). Cây phả hệ của 31 chủng/loài cho thấy có sự phân nhóm rõ ràng giữa các chủng/loài, tương ứng với 5 họ, Fasciolidae, Echinostomatidae, Echinochasmidae, Heterophyidae, Opisthorchiidae và nhóm ngoại hợp (Schistosomatidae). Hai mẫu dạng “lai” của Việt Nam (Fsp-FH1-VN và Fsp-DL11-VN) nhóm cùng chủng “lai” tham chiếu (Fsp-GHL-CN) của Trung Quốc; mẫu *F. gigantica* “thuần” của Việt Nam (Ffig-T4V-VN) cùng với chủng Ffig-Bali-ID (Indonesia) và Ffig-GX-CN (Trung Quốc). Kết quả nghiên cứu khẳng định các dạng “lai” sán lá gan (hybrid *Fasciola* spp.) có sự di truyền dòng mẹ từ loài “thuần” *F. gigantica*.

**Từ khóa:** *Fasciola gigantica*, *Fasciola* sp. lai, Fasciolidae, gen ty thể, khoảng cách di truyền, PCR, phả hệ, lớp Trematoda

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sán lá gan (fascioliasis) ở động vật nhai lại và lây sang người do 3 loài sán lá gan lớn, *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* và dạng “trung gian” hay còn gọi *Fasciola* sp. “lai”, gây ra (Mas-Coma *et al.*, 2009). *F. hepatica* phân bố rộng trên thế giới ở các nước ôn đới, *F. gigantica* chủ yếu ở các nước cận nhiệt đới và nhiệt đới, trong đó có Việt Nam. Phân

bổ của hai loài này có sự giao thoa địa lí ở một số nước thuộc vùng Trung và Đông Nam Á như Pakistan, Iran, Nhật Bản và Trung Quốc (Agatsuma *et al.*, 2000; Mas-Coma *et al.*, 2009).

Trong 15 năm gần đây, một loạt các công bố xác nhận sự có mặt của một dạng “trung gian” giữa *F. hepatica* và *F. gigantica*, hay còn gọi là dạng “lai” *Fasciola* spp., trên các vật chủ động vật ăn cỏ và

người, ở các nước Việt Nam, Thái Lan, Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Iran, Ấn Độ, Myanmar, Bangladesh, Ai Cập (Agatsuma *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004; Le *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009; Choe *et al.*, 2011; Amor *et al.*, 2011; Nguyen S *et al.*, 2012; Wannasan *et al.*, 2014; Amer *et al.*, 2016). Indonesia được coi là vùng địa lí chỉ có duy nhất loài “thuần” *F. gigantica* tồn tại (Hayashi *et al.*, 2016). Lai “tự nhiên”/“hỗn hợp” (natural/admixed hybridization) là có sự hiện diện của cả 2 hệ gen của 2 loài khác nhau trong cùng một cá thể; còn lai “chéo ngược” (introgression) là sự chuyển gen (gene flow) từ một cá thể dòng bố/mẹ trước đó qua nhiều lần lai chéo lặp lại (Harison, Larson, 2014). Hình thái của dạng “lai” *Fasciola* spp. hoàn toàn giống với loài *F. hepatica*, nên rất khó phân biệt và dễ nhầm lẫn, nếu chỉ kiểm tra ngoại hình (Le *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2012). Do vậy, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra là cần phải dùng các phương pháp sinh học phân tử để phân biệt các đặc điểm di truyền của *F. gigantica* và loài lai *Fasciola* sp., từ đó mới xác định chính xác đặc điểm về loài của các mẫu *Fasciola* có ngoại hình gần giống *F. hepatica* này (Le *et al.*, 2008; Mas-Coma *et al.*, 2009; Ai *et al.*, 2011; Shoriki *et al.*, 2016).

Chỉ thị phân tử được dùng để xác định và phân biệt các loài sán lá gan *Fasciola* là ITS1, ITS2 (của vùng sao chép ribosome ở hệ gen nhân) và các gen ty thể, chủ yếu là cytochrome b (*cob*), nicotinamide dehydrogenase 1 (*nad1*), cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*), sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp đa gen để phân tích (Le *et al.*, 2008; Itagaki *et al.*, 2009; Ai *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen S *et al.*, 2012; Wannasan *et al.*, 2014; Amer *et al.*, 2016). Nói nhiều gen cho một chỉ thị đang được sử dụng nhiều và đã có những nghiên cứu rất thành công khi kết hợp gen nhân 18S và 28S, hoặc các gen ty thể để phân tích phá hệ một số loài (Littlewood, 2008; Dao *et al.*, 2017). Loài *Fasciola* “lai” có điểm cắt *RsaI* (GT<sup>^</sup>AC) ở ITS1 ở hệ gen nhân giống loài *F. hepatica*, nhưng lại có hệ gen ty thể như của loài *F. gigantica*. Do vậy, điểm cắt *RsaI* ở ITS1 và gen ty thể là các chỉ thị phân tử phân biệt với *F. gigantica* “thuần” (Le *et al.*, 2008; Itagaki *et al.*, 2009; Wannasan *et al.*, 2014). Tại Việt Nam, loài sán lá gan *Fasciola* sp. “lai” được phát hiện từ những năm 2000, trên trâu, bò, dê và người, đang ngày càng được quan tâm nghiên cứu rộng rãi (Le *et al.*, 2008; Itagaki *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen S *et al.*, 2012; Trần Thanh Dương *et al.*, 2013).

Trong bài báo này, để nghiên cứu mối quan hệ về loài của các mẫu sán lá gan lớn thuộc loài “thuần” *F. gigantica* và 2 dạng “lai” (“hỗn hợp” và “chéo ngược”) của *Fasciola* spp., sau khi phân biệt chính xác các dạng “lai”, chúng tôi sử dụng chuỗi amino acid suy diễn từ 3 gen (*cob*, *nad1*, *cox1*) mỗi loài, tính toán khoảng cách di truyền (genetic distance) và tương quan phá hệ (phylogenetic relationship) giữa các loài trong họ Fasciolidae và trong lớp Trematoda.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên liệu

Mẫu sán lá gan lớn thu từ bò ở Thừa Thiên-Huế, trong nghiên cứu này kí hiệu: Fgig-T4V-VN được xác định là loài *F. gigantica* “thuần” và một mẫu *F. gigantica* “thuần” khác thu từ bò ở Bali (Indonesia), kí hiệu Fgig-Bali-ID, làm tham chiếu.

Hai mẫu sán lá gan lớn được xác định là dạng lai *Fasciola* spp., gồm mẫu thu trên người là Fsp-FH1-VN ở Hà Tây (cũ) và mẫu thu trên trâu là Fsp-DL11-VN ở Đắk Lắk.

Tất cả các mẫu được tách DNA tổng số, kiểm tra các chỉ thị phân tử ở vùng ITS1/ITS2 và gen ty thể để xác định Fsp-FH1-VN là lai “chéo ngược” và Fsp-DL11-VN là lai “hỗn hợp”; và Fgig-T4V-VN là loài *F. gigantica* “thuần”.

### Phương pháp

#### Tách chiết DNA tổng số và thực hiện PCR

DNA tổng số được tách chiết từ một mảnh nhỏ cắt ở rìa con sán trưởng thành, sử dụng bộ sinh phẩm GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số được ghi kí hiệu mẫu và bảo quản mẫu ở -20 °C cho đến khi sử dụng.

Các cặp mồi FSP2F-FSP4R thu gen *cob*; FAND1F-FAND1R thu gen *nad1*; và FG7F-FGHR2 thu gen *cox1*, có sử dụng thêm mồi ngược giữa (UCO1R2) để giải trình tự (Bảng 1), được sử dụng trong phản ứng PCR theo chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở 94 °C/5 phút, 35 chu kỳ [94 °C/1 phút, 52 °C/1 phút; 72 °C/2 phút], chu kỳ cuối ở 72 °C/10 phút. Thành phần phản ứng PCR dung tích 50 µl bao gồm 25 µl DreamTaq PCR Master Mix (2X) (hãng Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) 2 µl mỗi loại mồi (10 pmol/µl), 2 µl khuôn DNA (50 ng/µl), 2 µl DMSO (dimethyl sulfoxide) và 17 µl

H<sub>2</sub>O. Sản phẩm PCR (10 µl) được kiểm tra trên thạch agarose 1%, nhuộm ethidium bromide, và soi gel kiểm tra bằng tia cực tím (Wealtec, USA). Các sản phẩm đủ chất lượng được tách ra khỏi agarose (“thời gel”) bằng bộ sinh phẩm Accuprep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và được giải

trình tự trực tiếp để thu nhận chuỗi nucleotide cuối cùng của từng loài nghiên cứu.

Tất cả sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự trực tiếp (hãng Macrogen, Hàn Quốc), sử dụng các môi tương ứng liệt kê ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Danh sách và chuỗi mỗi sử dụng cho phản ứng PCR thu nhận từng gen ty thể (*cob*, *nad1* và *cox1*).

Tên mỗi	Chuỗi mỗi (5' > 3')	Gen bao phủ	Độ dài gen
FSP2F (mỗi xuôi)	TTGGTTTCTTCTGTAGGTTAG	<i>cob</i>	1113 bp
FSP4R (mỗi ngược)	GATTCTCAACAACAATCAAAC		
FAND1F (mỗi xuôi)	AGATGTGTGCTCTGCGAGCG	<i>nad1</i>	903 bp
FAND1R (mỗi ngược)	GAGTTGRCTGGCCGGTA		
FG7F (mỗi xuôi)	TTGGTCGGTTACTGTCTGTG	<i>cox1</i>	1542 bp
UCO1R2 (mỗi ngược giữa)	GGCTGCTATAGTATGTTTGGG		
FGHR2 (mỗi ngược)	AAACCAACCTCACAGCAAAC		

### Phân tích chuỗi gen, xử lý số liệu

Trình tự chuỗi nucleotide được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng, gồm chương trình Chromas Lite 2.1 thu nhận chuỗi thô; sau đó so sánh các chuỗi đã thu nhận sử dụng chương trình GENEDOC 2.7 (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>) và hệ chương trình MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Các trình tự của từng gen *cob*, *nad1*, *cox1* của 4 mẫu trong nghiên cứu này (2 mẫu dạng lai: Fsp-FH1-VN và Fsp-DL11-VN; và 2 mẫu của loài *F. gigantica* thuần”: Fgig-T4V-VN và Fgig-Bali-ID) được nối lại với nhau (hợp nhất) tạo nên chuỗi nucleotide của 3 gen theo thứ tự *cob+nad1+cox1*, rồi chuyển đổi sang amino acid. Tương tự, các gen *cob*, *nad1*, *cox1* cũng được lấy từ hệ gen ty thể của 27 chủng/loài sán lá (trematode) có trong Ngân hàng gen và hợp nhất với nhau để làm dữ liệu phân tích. Bảng 2 liệt kê tất cả 31 chủng/loài thuộc 6 họ trong lớp Trematoda sử dụng cộng hợp 3 gen ty thể để phân tích trong nghiên cứu này.

### Tính toán khoảng cách di truyền và phân tích phá hệ

Ba mươi một chuỗi nucleotide hợp nhất 3 gen *cob+nad1+cox1* từ 31 chủng/loài sán lá (Bảng 2) được đưa vào chương trình GENEDOC2.7, chuyển đổi sang amino acid suy diễn bằng bảng mã di truyền ty thể và sắp xếp so sánh đối chiếu (alignment) bằng chương trình MEGA7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

Mười ba chuỗi amino acid hợp nhất của 13 chủng/loài thuộc họ Fasciolidae được tính toán

khoảng cách di truyền (pairwise genetic distance) theo thông số có trong chương trình MEGA7.0.

Phả hệ của 31 chủng/loài dựa trên thành phần amino acid được phân tích và thực hiện kiến tạo cây phả hệ (phylogenetic tree) bằng chương trình MEGA7.0, sử dụng phương pháp “kết nối liền kề” (neighbor-joining method (NJ)), tính toán thông qua thuật toán Jones-Taylor-Thornton (JTT) và Nearest-Neighbor-Interchange (NNI), với hệ số tin tưởng bootstrap 1000 lần lặp lại (Kumar *et al.*, 2016).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### So sánh khoảng cách di truyền của các dạng “lai” và các loài sán lá trong họ Fasciolidae

Kết quả so sánh và tính toán khoảng cách di truyền dựa vào phân tích hợp nhất chuỗi amino acid của Cob+Nad1+Cox1 giữa các dạng “lai” *Fasciola* spp. của Việt Nam với các loài sán lá gan lớn và sán lá khác được thống kê và trình bày ở bảng 3. Mười ba chủng/loài so sánh bao gồm 3 mẫu *F. gigantica* “thuần” trong đó có mẫu Việt Nam và mẫu Indonesia của nghiên cứu này và chủng tham chiếu của Trung Quốc (Fgig-GX-CN); 3 mẫu *Fasciola* lai gồm 2 mẫu của Việt Nam và 1 mẫu tham chiếu của Trung Quốc (Fsp-GHL-CN); 7 mẫu còn lại là loài *F. hepatica* (2 mẫu), loài *Fasciolopsis buski* (2 mẫu Việt Nam và 1 mẫu tham chiếu của Trung Quốc (Fbus-Jiangxi-CN)), loài *F. jacksoni* (mẫu Sri Lanka, sán lá gan trên voi) và loài *Fascioloides magna* (Bảng 3).

**Bảng 2.** Danh sách các chủng/loài cung cấp chuỗi gen *cob*, *nad1* và *cox1* của hệ gen ty thể để phân tích xác định quan hệ phả hệ của dạng lai *Fasciola* sp. ở Việt Nam.

	Họ/Loài	Kí hiệu loài	Kí hiệu mẫu	Nguồn gốc	Số đăng kí Ngân hàng gen
<b>Fasciolidae*</b>					
1	<i>Fasciola</i> sp (lai)	Fsp	DL11	Việt Nam	Nghiên cứu này
2	<i>Fasciola</i> sp (lai)	Fsp	FH1	Việt Nam	Nghiên cứu này
3	<i>Fasciola</i> sp (lai)	Fsp	GHL	Trung Quốc	KF543343
4	<i>Fasciola gigantica</i>	Fgig	GX	Trung Quốc	KF543342
5	<i>Fasciola gigantica</i>	Fgig	T4V	Việt Nam	Nghiên cứu này
6	<i>Fasciola gigantica</i>	Fgig	Bali	Indonesia	Nghiên cứu này
7	<i>Fasciola hepatica</i>	Fhep	Geelong	Australia	AF216697
8	<i>Fasciola hepatica</i>	Fhep	ByJP	n/a	AP017707
9	<i>Fasciola jacksoni</i>	Fjac	Madu	Sri Lanka	KX787886
10	<i>Fasciolopsis buski</i>	Fbus	Jiangxi	Trung Quốc	KX169163
11	<i>Fasciolopsis buski</i>	Fbus	HT	Việt Nam	Nghiên cứu này
12	<i>Fasciolopsis buski</i>	Fbus	NA	Việt Nam	Nghiên cứu này
13	<i>Fascioloides magna</i>	Fmag	Koko	Czek	KU060148
<b>Opisthorchiidae</b>					
14	<i>Opisthorchis viverrini</i>	Oviv	n/a	Lào	JF739555
15	<i>Opisthorchis viverrini</i>	Oviv	BD1	Việt Nam	Nghiên cứu này
16	<i>Opisthorchis viverrini</i>	Oviv	KK	Thái Lan	Nghiên cứu này
17	<i>Opisthorchis felineus</i>	Ofel	Tula	Nga	EU921260
18	<i>Clonorchis sinensis</i>	Csin	ND	Việt Nam	Nghiên cứu này
19	<i>Clonorchis sinensis</i>	Csin	GD	Trung Quốc	JF729303
20	<i>Clonorchis sinensis</i>	Csin	n/a	Hàn Quốc	JF729304
21	<i>Clonorchis sinensis</i>	Csin	Amur	Nga	FJ381664
22	<i>Metorchis orientalis</i>	Mori	HLJ	Trung Quốc	KT239342
<b>Heterophyidae</b>					
23	<i>Haplorchis taichui</i>	Htai	n/a	Lào	KF214770
24	<i>Haplorchis taichui</i>	Htai	QT	Việt Nam	MG972809
25	<i>Metagonimus yokogawai</i>	Myok	n/a	Hàn Quốc	KC330755
<b>Echinostomatidae</b>					
26	<i>Echinostoma caproni</i>	Ecap	SAMEA	Ai Cập	LL250667
27	<i>Echinostoma hortense</i>	Ehor	HLJ	Trung Quốc	KR062182
28	<i>Echinostoma paraensei</i>	Epar	UNM	n/a	KT008005
29	<i>Hypoderaeum conoideum</i>	Hcon	Hubei	Trung Quốc	KM111525
<b>Echinochasmidae</b>					
30	<i>Echinochasmus japonicus</i>	Ejap	PT	Việt Nam	KP844722
<b>Schistosomatidae</b>					
31	<i>Trichobilharzia regenti</i> **	Treg	n/a	N/A	DQ859919

Ghi chú: \* Tất cả 13 chủng/loài trong họ Fasciolidae được sử dụng tính toán khoảng cách di truyền. \*\* Loài sử dụng tạo nhóm ngoại hợp (outgroup) trong phân tích phả hệ; n/a: không có thông tin.

**Bảng 3.** Tính toán khoảng cách di truyền (pairwise genetic distance) sử dụng độ dài chuỗi amino acid hợp nhất của các gen *cob*, *nad1*, *cox1* giữa các mẫu của các dạng lai (Fsp-FH1-VN; Fsp-DL11-VN), loài thuần (Fgig-T4V-VN) của Việt Nam với các chủng/loài trong họ Fasciolidae.

Chủng/Loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 Fgig-T4V-VN-													
2 Fgig-ID-	0,8												
3 Fgig-GX-CN-KF543342	1,7	2,1											
4 <b>Fsp-FH1-VN=</b>	1,3	1,7	1,6										
5 <b>Fsp-DL11-VN-</b>	1,4	1,8	1,7	0,4									
6 <b>Fsp-GHL-CN-KF543343</b>	1,5	2,0	1,9	0,6	0,7								
7 Fhlep-GL-AU-AF216697	5,8	6,3	6,0	5,7	5,8	5,9							
8 Fhlep-byJP-AP017707	5,6	6,0	5,6	5,4	5,5	5,7	0,5						
9 Fbus-HT-VN	21,0	21,5	20,2	20,6	20,7	20,7	20,7	20,7					
10 Fbus-NA-VN	20,9	21,3	20,1	20,5	20,6	20,6	20,6	20,6	0,2				
11 Fbus-Jiangxi-CN-KX169163	21,0	21,5	20,2	20,6	20,7	20,7	20,7	20,7	0,3	0,1			
12 Fjac-Madu-LK-KX787886	12,5	12,9	12,3	12,3	12,4	12,6	12,1	11,9	20,7	20,6	20,7		
13 Fmag-Koko-CZ-KU060148	10,9	11,5	11,3	11,0	11,1	11,3	10,6	10,3	19,0	18,9	19,0	10,1	

Ghi chú: 1. Fgig-T4V-VN: *Fasciola gigantica*; 2. Fgig-ID: *F. gigantica*; 3. Fgig-GX-CN: *F. gigantica*; 4. Fsp-FH1-VN: *Fasciola* sp. (lai chéo ngược); 5. Fsp-DL11-VN: *Fasciola* sp. (lai hỗn hợp); 6. Fsp-GHL-CN: *Fasciola* sp (lai); 7. Fhlep-GL-AU: *F. hepatica*; 8. Fhlep-byJP: *F. hepatica*; 9. Fbus-HT-VN: *Fasciolopsis buski*; 10. Fbus-NA-VN: *Fasciolopsis buski*; 11. Fbus-Jiangxi-CN: *Fasciolopsis buski*; 12. Fjac-Madu-LK: *Fasciola jacksoni*; 13. Fmag-Koko-CZ: *Fascioloides magna*. Số đăng kí Ngân hàng gen (nếu có) ở cuối chuỗi. Đồng khung biểu thị so sánh 3 mẫu loài lai (4, 5, 6) với 3 mẫu (1, 2, 3) loài thuần *F. gigantica* (khung lớn) và 3 mẫu loài lai với nhau (khung nhỏ kế tiếp). Phần in đậm con số là tỷ lệ so sánh 3 mẫu loài lai (4, 5, 6) với 2 mẫu *F. hepatica* (7, 8) và các chủng/loài sán lá khác trong họ Fasciolidae.

Kết quả tính toán ở bảng 3 cho thấy, tỷ lệ sai khác giữa các loài hay còn gọi là khoảng cách di truyền, chỉ là 0,4% – 0,7% giữa các mẫu dạng lai *Fasciola* spp. của Việt Nam và chủng tham chiếu Trung Quốc; cao hơn là 1,3 – 2,0% với *F. gigantica* “thuần”. Trong khi đó tỷ lệ sai khác giữa các mẫu dạng lai *Fasciola* spp. của Việt Nam và Trung Quốc so với *F. hepatica* là khá cao (5,7% – 5,9%) và rất cao so với các loài sán lá khác, gồm *Fasciolopsis buski* (20,6% – 21,0%) và với *Fasciola jacksoni* và *Fascioloides magna* (11,0% – 12,6%).

Từ kết quả trên chúng tôi có nhận xét, cả hai mẫu thuộc dạng lai *Fasciola* spp. Việt Nam có tỷ lệ sai khác thấp, hay nói cách khác có tỷ lệ đồng nhất cao (99,3 – 99,6%) so với chủng tham chiếu của Trung Quốc (số Ngân hàng gen KF543343) và với

các chủng của loài *F. gigantica* thuần (98,0 – 98,3%), cho kết luận khẳng định, các dạng lai có di truyền dòng mẹ ty thể thuộc loài *F. gigantica*.

**Mối quan hệ về loài giữa sán lá gan “lai” và các loài sán lá dựa trên phân tích phả hệ**

Hình 1 trình bày cây phả hệ thể hiện mối quan hệ về loài của các chủng sán lá gan lớn, trong đó có 2 mẫu dạng lai *Fasciola* spp. và 2 chủng thuộc *F. gigantica* thuần và 27 chủng đại diện cho các loài sán lá tham chiếu từ Ngân hàng gen. Kết quả dựa trên cây phả hệ ở hình 1 cho thấy, 31 chủng sán lá gan và sán lá của Việt Nam và thế giới được phân thành 6 nhóm chính:

- Nhóm thứ nhất (họ **Fasciolidae**) gồm 13 chủng/loài thuộc họ Fasciolidae, chia làm hai nhánh

phụ: i) nhánh phụ thứ nhất chứa 3 chủng thuộc loài *Fasciolopsis buski*; ii) nhánh phụ thứ 2 bao gồm 10 chủng/loài còn lại thuộc sán lá gan *Fasciola* spp. và *Fascioloides magna*. Hai mẫu “lai” của Việt Nam (Fsp-FH1-VN và Fsp-DL11-VN) ở cùng với loài “lai” tham chiếu (Fsp-GHL-CN) của Trung Quốc; trong khi đó, mẫu sán lá gan thuộc *F. gigantica* “thuần” Việt Nam (Fgig-T4V-VN) cùng với Fgig-Bali-ID (Indonesia) và Fgig-GX-CN (Trung Quốc).

- Nhóm thứ hai (họ **Echinostomatidae**) gồm 4 loài có hệ gen ty thể đã công bố hoặc đăng kí trong Ngân hàng gen (Bảng 2).

- Nhóm thứ ba (họ **Echinochasmidae**) là họ mới nâng cấp, tách ra từ Echinostomatidae, gồm loài *Echinochasmus japonicus* mới công bố gần đây (Ngân hàng gen: KP844722).

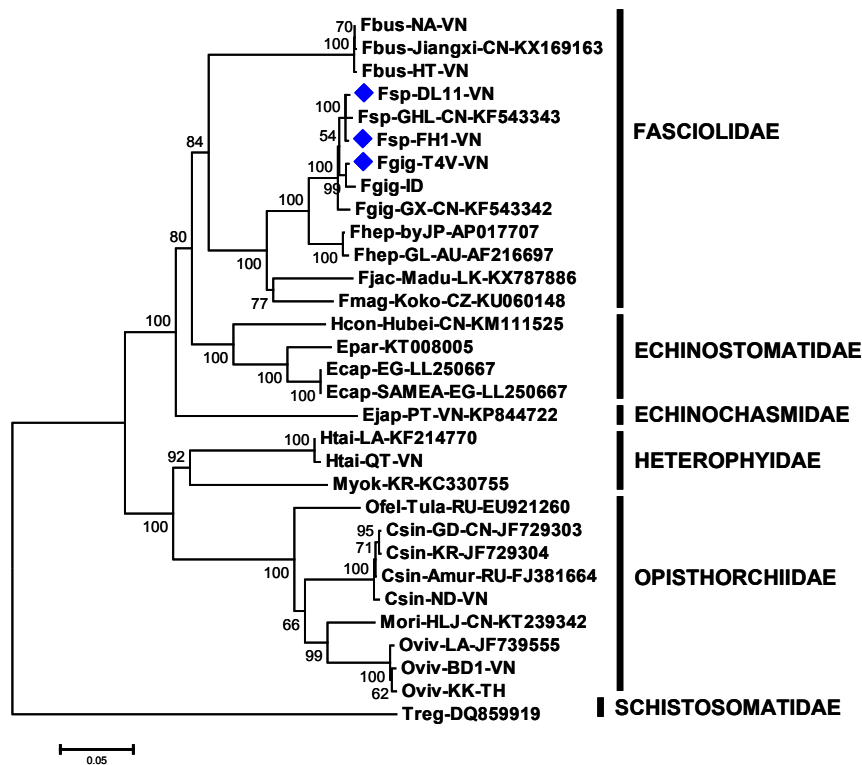
- Nhóm thứ tư (họ **Heterophyidae**) gồm 2 chủng của loài *Haplorchis taichui* và loài

*Metagonimus yokogawai* có hệ gen ty thể đã công bố hoặc đăng kí trong Ngân hàng gen (Bảng 2).

- Nhóm thứ năm (họ **Opisthorchiidae**) gồm các chủng thuộc 4 loài sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini* và *Metorchis orientalis*.

- Nhóm thứ sáu (họ **Schistosomatidae**) là nhóm ngoại hợp trong phân tích phả hệ, chỉ chọn một loài *Trichobilharzia regenti* làm đại diện.

Như vậy, nhánh chứa 2 mẫu dạng lai *Fasciola* spp. của Việt Nam (Fsp-FH1-VN và Fsp-DL11-VN) ở vị trí cùng chủng tham chiếu Trung Quốc (Fsp-GHL-CN) và loài thuần *F. gigantica* của Việt Nam (Fgig-T4V-VN) cùng với chủng Fgig-Bali-ID (Indonesia) là chủng được coi là thuần nhất của loài *F. gigantica*, khẳng định vị trí phân loại rõ ràng của chúng trong họ Fasciolidae.



**Hình 1.** Cây phả hệ xác định mối quan hệ về loài dựa trên phân tích chuỗi amino acid suy diễn từ hợp nhất các gen *cob+nad1+cox1* giữa các mẫu sán lá gan lớn của Việt Nam (dấu hình thoi) và sán lá khác đại diện 6 họ Fasciolidae, Echinostomatidae, Echinochasmidae, Heterophyidae, Opisthorchiidae và Schistosomatidae (ngoại hợp). Ghi chú: Cây phả hệ được xây dựng bằng chương trình MEGA7.0, phương pháp kết nối liền kề (Neighbor-joining), với hệ số tin cậy bootstrap là 1000 lần lặp lại (Kumar *et al.*, 2016). Ký hiệu quốc gia theo bảng qui định quốc tế ([http://www.nationsonline.org/oneworld/country\\_code\\_list.htm](http://www.nationsonline.org/oneworld/country_code_list.htm)), ví dụ VN: Việt Nam; TH: Thái Lan; CN: Trung Quốc. Ký hiệu chủng lấy từ địa phương phân lập (nếu có) và ký hiệu loài được liệt kê tại Bảng 2. Hệ số tin cậy (bootstrap) được ghi ngay tại mỗi nhóm phân nhánh. Số đăng ký Ngân hàng gen được đặt ở cuối chuỗi; hoặc là các chủng thuộc nghiên cứu này. Vạch ngang ở cuối hình (0.05) biểu thị sai khác nucleotide (5/100 nucleotide) ở mỗi nhánh.

## KẾT LUẬN

Hai mẫu sán lá gan lớn thuộc dạng lai *Fasciola* spp. của Việt Nam có tỷ lệ tính toán khoảng cách di truyền ty thể rất cao (99,3 – 99,6%) với 1 chủng của loài lai *Fasciola* sp. tham chiếu của Trung Quốc và một chủng thuộc loài thuần *F. gigantica* của Việt Nam hoàn toàn đồng nhất với loài *F. gigantica* tham chiếu của Indonesia. Cây phả hệ xây dựng từ 31 chủng thuộc 18 loài trong 6 họ của lớp sán lá Trematoda cũng xác định vị trí phân loại của chúng trong họ Fasciolidae.

**Lời cảm ơn:** Cảm ơn tài trợ kinh phí của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài mã số 106-YS.02-2013.06 để thực hiện công trình này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agatsuma T, Arakawa Y, Iwagami M, Honzako Y, Cahuaningsin U, Kang SY, Hong SJ (2000) Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitol Int* 49: 231–238.
- Ai L, Chen MX, Alasaad S, Elsheikha HM, Li J, Li HL, Lin RQ, Zou FC, Zhu XQ, Chen JX (2016) Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches. *Parasit Vectors* 4: 101. Review.
- Amer S, ElKhatam A, Zidan S, Feng Y, Xiao L (2016) Identity of *Fasciola* spp. in sheep in Egypt. *Parasit Vectors* 9(1): 623.
- Amor N, Halajian A, Farjallah S, Merella P, Said K, Ben Slimane B (2011) Molecular characterization of *Fasciola* spp. from the endemic area of northern Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Exp Parasitol* 128(3): 196–204.
- Bui TD, Doanh PN, Saegerman C, Losson B (2016) Current status of fasciolosis in Vietnam: an update and perspectives. *J Helminthol* 90(5): 511–522. Review.
- Choe SE, Nguyen TT, Kang TG, Kweon CH, Kang SW (2011) Genetic analysis of *Fasciola* isolates from cattle in Korea based on second internal transcribed spacer (ITS-2) sequence of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol Res* 109(3): 833–839.
- Dao TTH, Nguyen TTG, Gabriël S, Bui KL, Dorny P, Le TH (2017) Updated molecular phylogenetic data for *Opisthorchis* spp. (Trematoda: Opisthorchioidea) from ducks in Vietnam. *Parasit Vectors* 10(1): 575.
- Harrison RG, Larson EL (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *J*

*Hered* 105 Suppl 1: 795–809.

Hayashi K, Ichikawa-Seki M, Allamanda P, Wibowo PE, Mohanta UK, Sodorun, Guswanto A, Nishikawa Y (2016) Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola gigantica* from western Java, Indonesia. *Parasitol Int* 65(5A): 424–427.

Huang WY, He B, Wang CR, Zhu XQ (2004) Characterisation of *Fasciola* species from mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Vet Parasitol* 120: 75–83.

Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, Sasaki O, Yoshihara S, Van Dung T (2009) Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Int* 58: 81–85.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870–1874.

Le TH, De NV, Agatsuma T, Nguyen TGT, Nguyen QD, McManus DP, Blair D (2008) Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of *Fasciola* in Vietnam. *Int J Parasitol* 38: 725–730.

Littlewood DT (2008) Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite* 15(3): 333–341. Review.

Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009) Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol* 69: 41–146.

Nguyen S, Amer S, Ichikawa M, Itagaki T, Fukuda Y, Nakai Y (2012) Molecular identification of *Fasciola* spp. (Digenea: Platyhelminthes) in cattle from Vietnam. *Parasite* 19(1): 85–89.

Nguyen TGT, De NV, Vercruysse J, Dorny P, Le TH (2009) Genotypic characterization and species identification of *Fasciola* spp. with implications regarding the isolates infecting goats in Vietnam. *Exp Parasitol* 123: 354–361.

Peng M, Ichinomiya M, Ohtori M, Ichikawa M, Shibahara T, Itagaki T (2009) Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Res* 105(3): 809–815.

Shoriki T, Ichikawa-Seki M, Suganuma K, Naito I, Hayashi K, Nakao M, Aita J, Mohanta UK, Inoue N, Murakami K, Itagaki T (2016) Novel methods for the molecular discrimination of *Fasciola* spp. on the basis of nuclear protein-coding genes. *Parasitol Int* 65(3): 180–183.

Trần Thanh Dương, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Thị Hương Bình (2013) Dạng lai trong mẫu sán lá gan lớn trên

trâu, bò và người ở Quảng Ngãi. *Tạp chí Y học thực hành* 858(1): 48–52.

Walker SM, Prodöhl PA, Hoey EM, Fairweather I, Hanna RE, Brennan G, Trudgett A (2012) Substantial genetic divergence between morphologically indistinguishable populations of *Fasciola* suggests the possibility of cryptic

speciation. *Int J Parasitol* 42(13-14): 1193–1199.

Wannasan A, Khositharattanakool P, Chaiwong P, Piangjai S, Uparanukraw P, Morakote N (2014) Identification of *Fasciola* species based on mitochondrial and nuclear DNA reveals the co-existence of intermediate *Fasciola* and *Fasciola gigantica* in Thailand. *Exp Parasitol* 146: 64–70.

## ANALYSIS OF GENETIC DISTANCE AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF “NATURAL/ADMIXED” AND “INTROGRESSIVE” HYBRIDIZATION OF *Fasciola* spp. IN VIET NAM

Nguyen Thi Bích Nga<sup>1</sup>, Do Thi Roan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Khue<sup>1</sup>, Huynh Hong Quang<sup>2</sup>, Nguyen Van De<sup>3</sup>, Le Thanh Hoa<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Institute of Malariology, Parasitology and Entomology, Quy Nhon*

<sup>3</sup>*Hanoi Medical University*

<sup>4</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

*Fasciola hepatica*, *F. gigantica* and “intermediate” forms of *Fasciola* species, are responsible for fascioliasis in ruminant animals and humans in many countries. There are two forms: “natural/admixed” and “introgressive” hybridization. Vietnam is a “hot spot” country, where the “hybrid” *Fasciola* forms have been found nationwide. Determination of phylogenetic relationships and genetic distance of these hybrid forms with those in family Fasciolidae and class Trematoda (Phylum Platyhelminthes) is necessary to confirm their taxonomic classification. In this study, we sequenced the ITS1 and ITS2 for discrimination of two kinds of hybrid *Fasciola* mentioned above. The deduced amino acid sequences of the entire mitochondrial genes, cytochrome b (*cob*), nicotinamide dehydrogenase 1 (*nad1*) and cytochrome oxidase 1 (*cox1*), from two hybrid *Fasciola* spp. including Fsp-DL11-VN (from buffalo, admixed hybrid), Fsp-FH1-VN (from human, introgressive hybrid) and “pure” *F. gigantica* (Fgig-T4V-VN, from cattle) were obtained and combined (*cob+nad1+cox1*). These sequences were used as markers for phylogenetic analysis together with 28 representative isolates/species of Fasciolidae and Trematoda. Genetic distances between 13 isolates/species in the family Fasciolidae have also been determined to accurately account for their species-relationships. As results, pairwise genetic distance calculation showed that the distance rate was only 0.4% – 0.7% between *Fasciola* spp. hybrids of Vietnam and China, slightly higher, 1.3 – 2.0% with “pure” *F. gigantica*, whilst this rate was quite high compared with *F. hepatica* (5.7% – 5.9%), with *Fasciolopsis buski* (20.6% – 21.0%), and two other fasciolids, *Fasciola jacksoni* and *Fascioloides magna* (11.0% – 12.6%). The phylogenetic tree of 31 strains/species showed 5 distinct groups, corresponding to 5 families, ie., Fasciolidae, Echinostomatidae, Echinochasmidae, Heterophyidae, Opisthorchiidae and an outgroup, Schistosomatidae. Two “hybrid” *Fasciola* species of Vietnam (Fsp-FH1-VN and Fsp-DL11-VN) grouped with the reference “hybrid” Fsp-GHL-CN strain of China; and “pure” Fgig-T4V-VN with the two “pure” *F. gigantica*, Fgig-Bali-ID (Indonesia) and Fgig-GX-CN (China). These results confirmed that “hybrid” *Fasciola* spp. were of the maternally inherited mitochondrial lineage from *F. gigantica*.

**Keywords:** *Fasciola gigantica*, hybrid *Fasciola* spp., mitochondrial genes, genetic distance, PCR, phylogeny, Fasciolidae, Trematoda