

GIẢI TRÌNH TỰ GEN 16S-rRNA CỦA CÁC LOÀI CUA XANH (SCYLLA PARAMAMOSAIN) VÀ XÁC ĐỊNH QUAN HỆ DI TRUYỀN

16S-rRNA GENE SEQUENCING OF MUD CRAB SPECIES (SCYLLA PARAMAMOSAIN) AND DETERMINATION OF GENETIC RELATIONSHIP

TRƯƠNG THẾ QUANG^(*)

TÓM TẮT: Tách chiết và thu nhận được DNA tổng số của ba loài cua xanh Cần Giờ, Bến Tre, Cà Mau bằng phương pháp trích ly cột silica. Hiệu chỉnh thành công quy trình PCR khuếch đại vùng gen ty thể 16S ribosomal RNA (16S-rRNA) bằng cặp mồi M13U16S-F và M13U16S-R. So sánh trình tự gen 16S-rRNA của cua xanh trên GenBank có độ bao phủ và tương đồng đạt hơn 99% cho thấy mẫu vật thu thập ngoài thực địa không bị lẫn tạp các mẫu khác. Đã xác định được trình tự gen 16S-rRNA của loài cua xanh có kích thước phân tử 511 bp. Trên cơ sở phân tích đặc điểm phân tử đoạn trình tự này, đã định loại ba mẫu cua trên thuộc loài *Scylla paramamosain* phân bố ở vùng biển Việt Nam. Tiến hành xây dựng cây phát sinh loài và đánh giá quan hệ di truyền của sáu quần thể cua xanh thuộc chi *Scylla* và ba loài cua thuộc chi khác, kết quả phân loại thành sáu nhóm cua dựa trên trình tự 16S-rRNA.

Từ khóa: cua xanh, 16S-rRNA, cây phát sinh loài.

ABSTRACT: Extract and obtain the total DNA of three mud crab species in Can Gio, Ben Tre and Ca Mau by silica column extraction method. Successful modification of the PCR process amplified 16S ribosomal RNA (16S-rRNA) gene by M13U16S-F and M13U16S-R primers. Comparison of the 16S-rRNA gene sequences of blue crabs on GenBank with over 99% coverage and homology showed that specimens collected in the field were not mixed with other samples. The 16S-rRNA gene sequences of blue crabs with 511 bp molecular size were determined. Based on molecular analysis of this sequence, above three samples of crabs were identified as kind of *Scylla paramamosain* that distributed in the sea of Vietnam. Constructing phylogenetic tree and evaluate genetic relationships of six populations of blue crabs of the genus *Scylla* and three other crab species, the classification's result were categorized into six crab groups based on 16S-rRNA sequence.

Key words: Mud crab, 16S-rRNA, phylogeny tree.

^(*) TS. Trường Đại học Văn Lang, Email: truongthequang@vanlanguni.edu.vn.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cua xanh còn gọi là cua sen, cua bùn hay cua sú tên tiếng Anh là mud crab, green crab hay mangrove crab, đây là các loài giáp xác sống ở vùng cửa sông hoặc vùng biển. Cua xanh phân bố ở các vùng biển nhiệt đới Trung Quốc, Nhật Bản, Singapore, Philippines, Nam Phi, Ấn Độ. Ở Việt Nam, tại Đồng bằng sông Cửu Long, theo Keenan có hai loài chủ yếu là *Scylla paramamosain* và *Scylla olivacea* [5], trước đây bị nhầm lẫn là *Scylla serrata* [3],[8]. Nhưng thực sự loài *Scylla serrata* không được tìm thấy ở Đồng bằng sông Cửu Long, cũng như ở Việt Nam. Loài *Scylla paramamosain* chiếm 95% trong quần thể *Scylla*, và loài *Scylla olivacea* chỉ chiếm khoảng 5% [7].

Cua xanh (*Scylla Paramamosain*) là nguồn thực phẩm có giá trị kinh tế của Việt Nam, mang lại cho Việt Nam khá nhiều lợi ích, giúp cân bằng hệ sinh thái, chế biến thực phẩm, xuất nhập khẩu. Ngoài ra, cua xanh còn tạo ra kháng thể chống vi khuẩn, virus và làm thuốc.

Trước đây đã có nhiều cách phân loại các loài cua, nhưng phân loại bằng trình tự gen 16S-rRNA là phương pháp mới. Việc phân loại các loài cua thuộc chi *Scylla* từng gặp nhiều khó khăn [2] và các nhà phân loại học đã phải kết hợp nhiều đặc điểm phân loại từ hình thái, cấu trúc nhiễm sắc thể, chỉ thị phân tử allozyme và DNA [4],[6],[10]. Ngay cả khi kết hợp các chỉ thị về hình thái và phân tử, việc định loài mẫu vật cũng không đơn giản đối với các mẫu thu ở các vùng có sự hiện diện của một vài loài. Chỉ thị phân tử DNA ty thể (mtDNA) mang nhiều thông tin có giá trị phân biệt

các loài và bậc lộ được mối quan hệ di truyền giữa chúng. Keenan và cộng sự [5] đã sử dụng chỉ thị allozyme, chỉ thị mtDNA (16S-rDNA và Cytochrome Oxidase Subunit I - COI) để phân tích khoảng cách di truyền và xác nhận thành phần loài của chi *Scylla*. Bình và cộng sự sử dụng trình tự DNA vùng gen COI ty thể để nhận dạng các loài cua xanh ở Việt Nam [12]. Sự khác biệt nucleotide giữa các quần thể địa lý của loài nhỏ hơn 2%, trong khi sự khác biệt này giữa các loài lớn hơn 9%.

Như vậy, việc phân loại cua xanh theo trình tự gen ty thể 16S-rRNA là cần thiết trong xác định mối quan hệ di truyền gần, xa giữa loài cua xanh nội địa và các loài cua ở khu vực lân cận, nhằm phục vụ cho quá trình nghiên cứu ứng dụng trong chọn giống và nuôi trồng thủy sản.

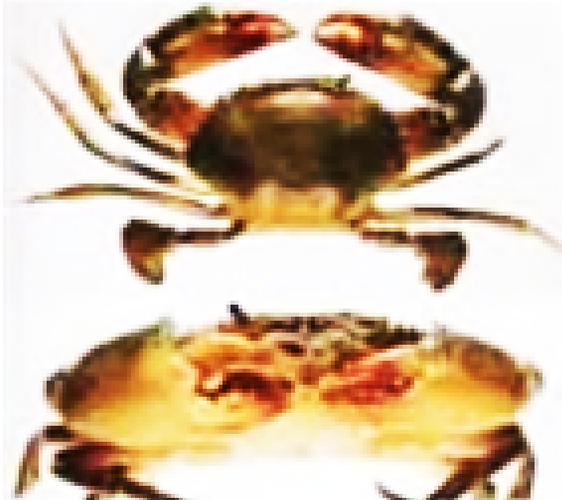
2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Mục tiêu nghiên cứu là giải trình tự gen ty thể 16S-rRNA của một số loài cua xanh Việt Nam và xác định quan hệ di truyền với các loài cua khác. Việc phân loại cua xanh theo trình tự gen ty thể 16S-rRNA là cơ sở khoa học ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản như chọn giống, tạo giống mới có chất lượng thịt cao và kháng bệnh bằng phương pháp lai tạo hoặc chuyển gen.

Các mẫu cua xanh được thu thập từ Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh, 5 mẫu ký hiệu (D); Bến Tre, 5 mẫu ký hiệu (BT); Cà Mau, 5 mẫu ký hiệu (CM) được phân loại sơ bộ, đo kích thước, khối lượng và chụp ảnh. Quá trình tách chiết DNA, khuếch đại vùng 16S-rRNA bằng PCR, điện di để tinh sạch và kiểm tra nhằm chọn ra ba mẫu đại diện cho cua xanh (D), (BT),

(CM), sau đó giải trình tự gen ty thể 16S-rRNA. Các thí nghiệm này đều được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Trung tâm Pháp y Thành phố Hồ Chí Minh. Số liệu được xử lý bằng các công cụ

phần mềm tin sinh học BLAST trên cơ sở dữ liệu GenBank, Mega 7.0.26 để tạo danh sách trình tự tương đồng, ma trận tương đồng, xây dựng cây phát sinh loài và phân loại.



Scylla paramamosain



Scylla olivacea



Scylla serrata



Scylla tranquebarica

Hình 1. Các loài cua xanh thuộc chi *Scylla*

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Tách chiết DNA, khuếch đại, tinh sạch và giải trình tự

Mẫu thịt cua được thu thập ngẫu nhiên ở chợ. Mẫu được xử lý và bảo quản ở -20°C cho việc tách chiết DNA tổng số. DNA tổng số được trích ly từ mô cơ cẳng cua bằng cột có màng silica với bộ kit

WIZARD SV genomic DNA theo chỉ dẫn của nhà sản xuất hãng Promega. Sau khi chạy phản ứng PCR khuếch đại trình tự gen 16S-rRNA, tiến hành điện di để kiểm định chất lượng sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,2 % qua sự xuất hiện các band DNA với kích thước mong muốn khi đặt trên bản soi

UV. Sản phẩm PCR của các mẫu sẽ được tải vào các giếng cùng với một giếng chứa DNA ladder. Sau điện di, các band sáng xuất hiện và DNA ladder sẽ dùng làm thang chuẩn đo kích thước cho các sản phẩm PCR, trong thang chuẩn hai band sáng liên tiếp cách nhau khoảng 100 bp, band nhỏ nhất nằm dưới cùng có kích thước 100 bp, band lớn nhất có kích thước 1500 bp (1,5 kb). Mỗi band sáng sẽ biểu diễn cho các đoạn DNA có khối lượng phân tử khác nhau. Sản phẩm khuếch đại vùng gen ty thể 16S-rRNA với cặp mồi M13U16S-F và M13U16S-R được so sánh với DNA ladder để biết được kích thước của band sản phẩm. Band DNA phải sáng rõ, chiều rộng của band lớn thì xem như phản ứng khuếch đại thành công và có thể sử dụng các sản phẩm PCR để giải trình tự.

3.2. So sánh trình tự 16S-rRNA với cơ sở dữ liệu GenBank

Sau khi có kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA, tiến hành thu thập các mối quan hệ tương quan và kiểm tra các sai lệch dựa trên sắp hàng hai trình tự gồm trình tự truy vấn 16S-rRNA với từng trình tự trong cơ sở dữ liệu nucleotide GenBank bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST tìm ra những trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank có tỷ lệ tương đồng cao với trình tự truy vấn.

3.3. Phân tích phát sinh chủng loài

Phân tích phát sinh chủng loài được thực hiện dựa trên sắp hàng nhiều trình tự gen 16S-rRNA của ba loài cua xanh (D), (BT), (CM) nghiên cứu và các trình tự có tỷ lệ tương đồng cao từ GenBank (Bảng 1). Trình tự 16S-rRNA của ba loài cua *Callinectes* *sapidus*, *Corystes*

cassivelaunus và *Helice tridens tientsinensis* khác chi từ GenBank được sử dụng làm nhóm ngoại. Phân tích được tiến hành dựa trên thuật toán Maximum Likelihood (ML) ứng dụng các công cụ phần mềm Mega 7.0.26.

3.4. Xây dựng cây phát sinh loài

Cây phát sinh loài là công cụ thể hiện mức độ tương đồng giữa các trình tự qua quá trình tiến hóa. Thông qua cây phát sinh loài có thể phân loại thành từng nhóm sinh vật hoặc cho biết các sinh vật nào chiếm số lượng nhiều hay loài nào sơ khai loài nào phát triển. Việc xây dựng cây phát sinh loài để miêu tả lịch sử tiến hóa của một nhóm các loài với những đặc tính khác nhau nhưng có cùng mối quan hệ họ hàng với nhau và cùng hình thành từ một tổ tiên chung trong quá khứ. Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên các ma trận tỷ lệ tương đồng hoặc ma trận khoảng cách tương đồng là kết quả sắp hàng nhiều trình tự bằng các công cụ của phần mềm Mega 7.0.26.

4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả tách chiết DNA, khuếch đại vùng 16S-rRNA, tinh sạch và giải trình tự

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu cơ cang cua, sau đó lấy 2 μ l dung dịch DNA tách chiết, chạy phản ứng PCR khuếch đại chọn lọc vùng 16S-rRNA gen ty thể với cặp mồi:

M13U16S-F 5'-3':

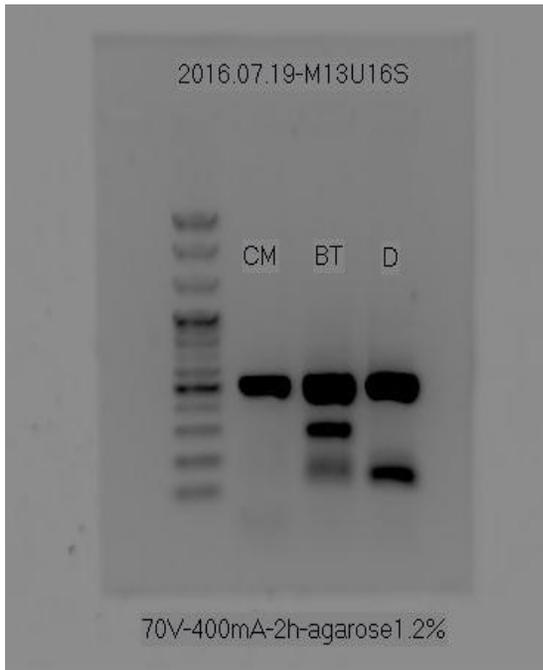
ACCGTGCAAAGGTAGCATAAT

M13U16S-R 5'-3':

TCCGGTCTGAACTCAGATCAC

Kết quả chạy PCR đã khuếch đại thành công vùng 16S-rRNA gen ty thể, sản phẩm tạo thành là band DNA có kích thước

khoảng 500 bp. Tuy nhiên, hai mẫu của Bến Tre và của Cần Giờ lại có thêm vạch phụ nhỏ hơn 500 bp nằm ở dưới có thể do môi này không đặc hiệu cho mẫu cua (Hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Tiến hành cắt lấy band 500 bp và tinh sạch gel theo quy trình gel slice của hãng Promega. Sau khi tinh sạch các mẫu được đem đi giải trình tự theo nguyên tắc của Sanger và hiệu chỉnh trình tự bằng hệ thống 3130 và 3500 Genetic Analyzer do hãng Life Technologies sản xuất.

4.2. Kết quả so sánh trình tự 16S-rRNA với cơ sở dữ liệu GenBank

Trình tự vùng gen ty thể 16S-rRNA sau khi loại bỏ vùng mơ hồ do lỗi đọc trình tự nằm ở hai đầu, kết quả đọc phản ứng giải trình tự có độ dài trong khoảng 450 bp đến 550 bp. Các điểm mơ hồ nằm bên trong kết quả giải trình tự cũng được kiểm tra chéo bằng cách so sánh trình tự hai chiều. Kiểm tra sơ bộ bằng công cụ BLAST trên ngân hàng GenBank cho thấy trình tự vùng gen ty thể 16S-rRNA của cả ba mẫu của xanh *Scylla paramosain* (D), (BT), (CM) đều có tỷ lệ tương đồng 100% với loài *Scylla paramosain from Viet Nam* trong GenBank.

Bảng 1. Các loài cua trong sắp hàng nhiều trình tự gen ty thể 16S-rRNA

STT	Tên loài cua	Version	Chi
1	<i>Scylla paramosain from Viet Nam</i>	AY841366.1	Scylla
2	<i>Scylla paramosain from China</i>	AY841365.1	
3	<i>Scylla oceanica</i>	AM410522.1	
4	<i>Scylla olivacea</i>	KU306746.1	
5	<i>Scylla serrata</i>	KU296942.1	
6	<i>Scylla tranquebarica</i>	AF109320.1	
7	<i>Callinectes sapidus</i>	U75267.1	Callinectes
8	<i>Corystes cassivelaunus</i>	FM208781.1	Corystes
9	<i>Helice tridens tientsinensis</i>	AY048992.1	Helice

(Nguồn: National Center for Biotechnology Information, 2017)

Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank nhằm mục đích cho một kết quả tham khảo với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Tuy nhiên, dựa vào kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao 99% cũng không thể suy ngược lại tên loài. Bởi kết quả BLAST chỉ hiển thị trình tự tương đồng nhất mà trên GenBank hiện có và với những trình tự ở mức độ dưới loài, chỉ dựa trên vùng trình tự gen ty thể 16S-

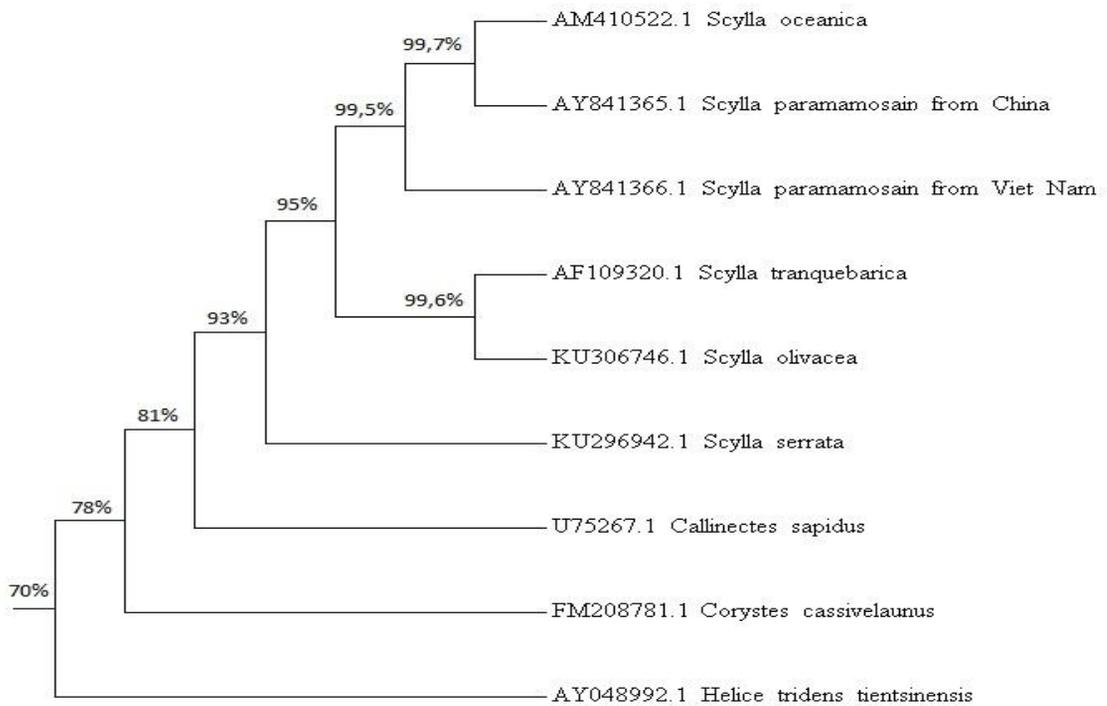
rRNA chưa đủ để kết luận. Do đó, qua tham khảo trên cơ sở dữ liệu GenBank chọn ra năm loài cua xanh cùng chi *Scylla* để so sánh mức độ tương đồng trình tự vùng 16S-rRNA với cua xanh Việt Nam và ba loài cua có chi khác để xác định mối quan hệ di truyền, xây dựng ma trận tương đồng, cây phát sinh loài và phân loại (Bảng 1).

4.3. Kết quả phân tích phát sinh chủng loài và xây dựng cây phát sinh loài

Bảng 2. Ma trận tỷ lệ tương đồng của các loài cua dựa trên trình tự 16S-rRNA

Tên loài cua	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>S. paramosain</i> from Viet Nam	100%								
2. <i>S. paramosain</i> from China	99,6%	100%							
3. <i>Scylla oceanica</i>	99,5%	99,7%	100%						
4. <i>Scylla olivacea</i>	96,1%	95,9%	94,6%	100%					
5. <i>Scylla serrata</i>	95,7%	95,7%	94,6%	99,6%	100%				
6. <i>Scylla tranquebarica</i>	93,1%	92,9%	91,1%	94,4%	94,9%	100%			
7. <i>Callinectes sapidus</i>	82,1%	81,9%	77,9%	82,3%	82,4%	81,5%	100%		
8. <i>Corystes cassivelaunus</i>	79,3%	79,1%	75,4%	80,2%	80,2%	80,3%	72,8%	100%	
9. <i>Helice tridens tientsinensis</i>	71,5%	71,5%	71,2%	70,1%	70,1%	71,3%	64,2%	69,5%	100%

(Nguồn: Trương Thế Quang và ctv, 2016)



Hình 3. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S-rRNA

Kết quả sắp hàng nhiều trình tự gen ty thể 16S-rRNA của 9 loài cua (Bảng 1) bằng các công cụ Multiple Align, Distance, Phylogeny của phần mềm Mega 7.0.26 thu được ma trận tỷ lệ tương đồng (Bảng 2) và cây phát sinh loài (Hình 3).

Dựa vào cây phát sinh loài phân thành sáu nhóm cua như sau: Nhóm 1: *Scylla paramosain from Viet Nam*, *S. paramosain from China* và *Scylla oceanica*; Nhóm 2: *Scylla olivacea* và *Scylla tranquebarica*; Nhóm 3: *Scylla serrata*; Nhóm 4: *Callinectes sapidus*; Nhóm 5: *Corystes cassivelaunus*; Nhóm 6: *Helice tridens tientsinensis*.

Tỷ lệ tương đồng (%) giữa các nhóm: Nhóm 1 so với nhóm 2 tỷ lệ tương đồng 95%; Nhóm 1, 2 so với nhóm 3 tỷ lệ tương đồng 93%; Nhóm 1, 2, 3 so với nhóm 4 tỷ lệ tương đồng 81%; Nhóm 1, 2, 3, 4 so với

nhóm 5 tỷ lệ tương đồng 78%; Nhóm 1, 2, 3, 4, 5 so với nhóm 6 tỷ lệ tương đồng 70%.

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu thu được kết quả như sau: Tách chiết và thu nhận được DNA tổng số của ba mẫu cua xanh ở Cần Giờ, Bến Tre, Cà Mau bằng phương pháp trích ly cột silica. Hiệu chỉnh thành công quy trình PCR khuếch đại vùng gen ty thể 16S ribosomal RNA (16S-rRNA) bằng cặp mồi M13U16S-F và M13U16S-R. Khuếch đại được vùng gen ty thể 16S-rRNA, kết quả thu được sản phẩm đúng kích thước nhưng vẫn còn lẫn tạp. Cặp mồi M13U16S-F và M13U16S-R có thể sử dụng khuếch đại vùng gen ty thể 16S-rRNA nhưng không thể thực hiện phản ứng ngay giải trình tự mà phải thêm bước tinh sạch gel; So sánh trình tự gen 16S-rRNA của cua xanh trên

GenBank có độ bao phủ và tương đồng đạt hơn 99%, cho thấy mẫu vật thu thập ngoài thực địa không bị lẫn tạp các mẫu khác, quá trình bảo quản mẫu tốt và đạt độ tin cậy cao; Đã xác định được trình tự gen 16S-rRNA của của ba mẫu cua xanh. Trên cơ sở phân tích đặc điểm phân tử đoạn trình tự này đã định loại ba mẫu cua trên thuộc loài *Scylla paramamosain* phân bố ở vùng biển Việt Nam với kích thước phân tử 511 bp. Tiến hành xây dựng cây phát sinh loài và đánh giá quan hệ di truyền của sáu quần thể cua xanh thuộc chi *Scylla* và ba loài cua thuộc chi khác, kết quả phân thành sáu nhóm cua dựa trên trình tự 16S-rRNA.

Kiến nghị cần nghiên cứu mở rộng, sâu hơn và nghiên cứu ứng dụng theo các hướng: Mở rộng phạm vi nghiên cứu thu thập thêm nhiều mẫu cua xanh của Việt Nam và thế giới; Thiết kế mồi đặc hiệu hơn cho vùng gen ty thể 16S-rRNA để có thể giải trình tự cho các loài cua; Cần sử dụng thêm một số trình tự của các vùng khác trong genome để có thể định danh chính xác tên loài và xây dựng hệ thống DNA barcode cho các loài cua; Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản như chọn giống, lai tạo giống và chuyển gen để tạo ra các giống cua mới có chất lượng thịt cao và kháng bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1995), *Short protocols in Molecular Biology*, 3rd, ed. John Wilert and Sons, Inc.
2. Fushimi, H. and S. Watanabe. (1999), *Proceedings of the Twenty-eighth UJNR Aquaculture Panel Symposium*. Kihei, Hawaii, November 10-12, UJNR Technical Report No. 28.
3. Hoàng Đức Đạt (1992), *Sinh học và nuôi cua biển*, Tập huấn nuôi trồng thủy sản ở Đồng Bằng Sông Cửu Long, Việt Nam.
4. Imai, H, Cheng J-H., Hamasaki, K., Numachi, K-I. (2004), *Identification of four mud crab species (genus Scylla) using ITS-1 and 16S rDNA markers*. Aquat. Living Resour. 17.
5. Keenan, C. P. (1999), *Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia*. 21-24 April 1997.
6. Klinbunga S., Boonyapakdee A, Partoomchat B. (2000), *Genetic diversity and species-diagnostic markers of Mud Crabs (Genus Scylla) in Eastern Thailand determined by RAPD analysis*. Mar. Biotechnol. 2.
7. Le Vay, L. (2001), *Ecology and management of mud crab Scylla Spp*, Asian Fisheries Science.
8. Nguyen Anh Tuan, Tran Ngoc Hai, Tran Thi Thanh Hien and Le Quang Minh (1996), *Culture of mud crabs in the Mekong Delta, Vietnam*, Manuscript, College of Aquaculture, Cantho University.

9. Nicholas, Karl B, Hugh B Jr. (1997), *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. Distributed by the author.
10. Sugama, K. and J. H. Hutapea (1999), *Genetic characterization in the mud crab Scylla*.
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. (2017), *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution.
12. Thái Thanh Bình, Nguyễn Văn Việt, C. Austin (2009), *Nhận dạng các loài cua xanh ở Việt Nam dựa trên trình tự DNA vùng gen COI ty thể*, Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2009, Thái Nguyên, 26-27/11/2009.
13. Trương Thế Quang, Bùi Nguyễn Chí Hiếu, Trần Thị Kim Khánh (2016), *Xác định mối quan hệ di truyền của một số loài cua dựa trên gen 16S-rRNA ty thể*. Trường Đại học Văn Lang, Thành phố Hồ Chí Minh.

Ngày nhận bài: 04/7/2017. Ngày biên tập xong: 14/7/2017. Duyệt đăng: 17/7/2017