

## ÁP DỤNG KỸ THUẬT ĐỌC VÀ SO SÁNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIT CỦA ĐOẠN ITS-1 TRONG VIỆC PHÂN LOẠI MỘT SỐ LOÀI TẢO CỦA VIỆT NAM

<sup>1</sup>*Dặng Diễm Hồng, <sup>1</sup>Hoàng Minh Hiền, <sup>1</sup>Nguyễn Đức Bách,  
<sup>1</sup>Phạm Ngọc Sơn, <sup>2</sup>Nguyễn Văn Đông*

<sup>1</sup> Viện Công Nghệ Sinh Học, <sup>2</sup> Viện Di Truyền Nông Nghiệp

**TÓM TẮT** Lần đầu tiên ở Việt Nam đã thành công trong việc sử dụng kỹ thuật PCR để nhân được đoạn ITS 1 khoảng cách nội phiên mã nằm giữa vùng ADN mã hóa cho 18S và 5,8S rADN (với cặp mồi ITS 1 và ITS 2) ở một số loài rong biển của Việt Nam. Dựa vào việc so sánh trình tự nucleotit của đoạn ITS 1, mối quan hệ di truyền của một số loài rong biển đại diện của Việt Nam như Rong Câu, Rong Mơ, Rong Đông ... đã được phân tích. Phương pháp này cho phép phân tích một cách chính xác mối quan hệ di truyền ngay trong cùng một loài rong biển nhưng thu thập được từ những vùng sinh thái địa lý cách xa nhau đã được thảo luận trong bài báo này.

## CHARACTERIZING PHYLOGENESIS OF VIETNAMESE ALGAE BASED ON SEQUENCE OF ITS-1

<sup>1</sup>*Dang Diem Hong, <sup>1</sup>Hoang Minh Hien, <sup>1</sup>Nguyen Duc Bach,  
<sup>1</sup>Pham Ngoc Son, <sup>2</sup>Nguyen Van Dong*

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, <sup>2</sup>Agricultural Genetics Institute,  
Ministry of Agricultural Rural Development S.R. Vietnam

**ABSTRACT** The first time in Vietnam using PCR technique, we amplified ITS 1-internal transcribed spacer, located in the region of DNA encoding for 18S and 5.8S ribosome (with primer ITS 1 and ITS 2) for some seaweed species of Vietnam. Based on the alignment of the ITS-1 sequence, phylogenetic relationship among representative seaweeds of Vietnam as *Gracilaria* sp., *Sargassum* sp., *Hypnea* sp., *Dunaliella* sp. and so on was analyzed. This method also allows to identify very good genetic relationship in common species of seaweeds isolated from very different geographies, and this is also discussed in this paper.

## I. MỞ ĐẦU

Hiện nay tảo (bao gồm cả tảo nước ngọt và tảo biển) có một vị trí và lợi ích to lớn trong đời sống của con người (là nguồn thức ăn, làm thuốc chữa bệnh, xử lý ô nhiễm môi trường, làm nguyên liệu trong các ngành công nghiệp, y dược, quân sự...), đang ngày càng thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng.

Do sự đa dạng và phong phú về chủng loại cùng với khả năng biến đổi về mặt hình thái để thích ứng trong 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. Hiện nay, cùng với phương pháp phân loại kinh điển (chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái) thì các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đang được sử dụng rộng rãi để phân loại các loài tảo. 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 phẩm ribosom: 5,8S, 16S, 18S, 25S...[1, 3, 5, 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 ví dụ như các đoạn ITS - 1 và 2 (nuclear ribosome internal transcribed spacer 1 and 2). 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 [2]. Hơn nữa kích thước của những đoạn gen này thường tương

đối nhỏ (khoảng từ 190 đến 450 bp) nên rất thuận tiện cho việc đọc trình tự nucleotit (đặc biệt là trong điều kiện Việt Nam), nên chính vì vậy người ta hay sử dụng việc đọc và so sánh trình tự nucleotit của các đoạn ITS -1 và 2 này 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 [2, 11, 13, 16].

Theo hướng trên trong bài báo này xin trình bày các kết quả thu được về tách dòng gen và đọc trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của một số loài tảo đặc trưng của Việt Nam, trên cơ sở đó xác định mối quan hệ về chủng loại của các loài tảo này.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Hai loài tảo *Dunaliella bardawil* và *Dunaliella salina* được lấy từ tập đoàn giống của Phòng Công Nghệ Tảo, Viện Công Nghệ Sinh Học.

*Gracilaria asiatica*, *G. blodgettii* (Thu tại trạm Quý Kim – Hải Phòng), *Gracilaria eucheumoides* thu ở vịnh Nha Trang và ở đảo Phan Vinh (thuộc vùng quần đảo Trường Sa vào tháng 5/1999), *Hypnea valentinae* (8/2000 tại đảo Phú Quốc) do Huỳnh Quang Năng, Phân Viện Khoa Học Vật Liệu Nha Trang phân loại và định tên.

Các mẫu tảo *Scenedesmus* được phân lập từ hồ Hoàn Kiếm do Dương Đức Tiến và cộng sự (Phòng Công Nghệ Tảo và Thủy Sinh Vật thuộc Trung Tâm Công Nghệ Sinh Học, Đại

Học Quốc Gia Hà Nội) cung cấp. 6 chủng đã được mô tả hình thái và xếp vào loài *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) var. *abudans* 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 [14].

Vector PCR<sup>®</sup>2.1 (của TA Kit) và các hóa chất chuẩn của hãng In Vitrogen, vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$  do Viện Công Nghệ Sinh Học cung cấp.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

**Tách chiết ADN:** ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp của Trần Hữu Quang và ctv [15].

**Phản ứng PCR:** Để nhân đoạn ITS-1 bằng kỹ thuật PCR từ ADN tổng số sử dụng cặp mồi: ITS - 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS - 2 (5'-CGACGCAAGAAGTAGACTCG-3') (Edwardsen *et al.*, 1998) [5]. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PTC-100 Programmable Thermal Controller MJ Research. Mỗi phản ứng (20 $\mu$ l) gồm: ADN genom (50-100 $\mu$ g) 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Bovine serum albumin); 100 $\mu$ M mồi; 100  $\mu$ M dNTP; 0,5 đơn vị Taq polymerase. Phản ứng được bắt đầu bằng bước biến tính ADN khuôn ở 96 $^{\circ}$ C trong 3 phút, tiếp đến là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm các bước thay đổi nhiệt độ như sau: 95 $^{\circ}$ C - 30 giây; 60 $^{\circ}$ C - 1 phút; 72 $^{\circ}$ C - 1 phút. Giai đoạn cuối cùng được thực hiện ở 72 $^{\circ}$ C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được

điện di trên gel agarose 1%, nhuộm bằng ethidium bromide, quan sát trên máy soi tử ngoại và chụp ảnh.

**Tạo dòng phân tử ADN:** Sản phẩm PCR được gắn vào vector PCR<sup>(R)</sup> 2.1 TA Kit của hãng In Vitrogen sau đó biến nạp vào tế bào *E. coli* (DH5 $\alpha$ ). 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  $\beta$  - D - galactopyranoside) và IPTG (isopropyl $\beta$  - D - thiogalactopyranoside). Trên môi trường chọn lọc thu được những khuẩn lạc xanh và trắng ở cả 13 loài nghiên cứu (các khuẩn lạc mang plasmit tái tổ hợp có màu trắng). Plasmit được tách từ các khuẩn lạc trắng riêng rẽ và chọn lọc trên gel agarose 0,8%. Để kiểm tra sự có mặt của đoạn ITS-1 trong plasmit đã kiểm tra lại bằng phản ứng PCR lần 2 và cắt bằng enzym cắt giới hạn *EcoRI*. Những khuẩn lạc đã mang gen được nhân với sinh khối lớn để tách và tinh sạch plasmit [12].

**Phương pháp xác định trình tự ADN:** Trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của 13 loài rong tảo biển 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 đã phân tích trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của 13 mẫu nghiên cứu và xây dựng cây phân loại bằng máy tính dựa trên chương trình ClustalX Multiple Sequence Alignment Program (Version 1.81, June 2000).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

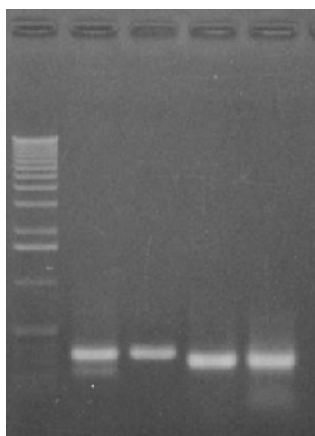
#### 1. Nhân đoạn ITS-1 bằng kỹ thuật PCR

Để nhân được đoạn ITS-1, tiến hành phản ứng PCR các mẫu ADN của 13 mẫu tảo biển được chọn nghiên cứu với cặp mồi ITS - 1 và ITS - 2 là cặp mồi đặc hiệu cho đoạn ITS-1. Kết quả là đã nhân được gene ITS - 1 này ở cả 13 loài tảo biển với các kích thước của gene đó như sau: khoảng 340 bp đối với loài *G. eucheumoides* Nha Trang và Trường Sa và 300 bp đối với hai loài *D. salina* và *D. bardawil*, *G. blodgettii*

(450bp), *G. asiatica* (300bp), *H. valentiae* (330 bp), *Scenedesmus* (35, g, 4, 177) (240 bp), *Scenedesmus* (190, 1695) (242 bp). Trên hình 1 chúng tôi đơn cử đại diện kết quả điện di sản phẩm PCR của gene ITS - 1 của một số loài như *G. eucheumoides* (Nha Trang), *G. eucheumoides* (Trường Sa), *D. salina* và *D. bardawil*.

Kích thước các băng thu được phù hợp với khoảng cách giữa hai mồi và với các kết quả của các tác giả khác thu được trên nhiều loài tảo khác nhau [6].

M 1 2 3 4



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi ITS-1 của các loài *Gracilaria* và *Dunaliella*. Cột 1: *G. eucheumoides* Nha Trang; Cột 2: *G. eucheumoides* Trường Sa; Cột 3: *D. salina*; Cột 4: *D. bardawil* và Cột M: Marker 1Kb

#### 2. Chọn tạo dòng phân tử ADN

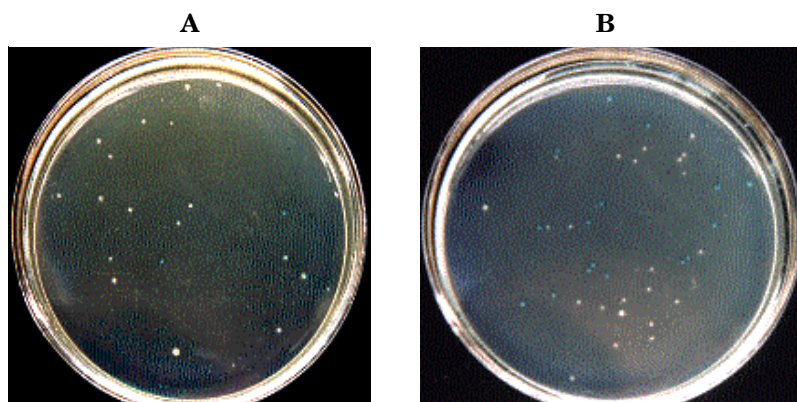
Nhằm mục đích cho thí nghiệm đọc trình tự gen, tiến hành gắn trực tiếp sản phẩm PCR thu nhận được ở trên vào vector pCR<sup>®</sup>2.1 trong TA cloning KIT (của hãng In VitroGene) và

biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$ . Trên môi trường có chứa Kanamicin, X-gal và IPTG thu được những khuẩn lạc xanh và trắng ở cả 13 loài nghiên cứu (các khuẩn lạc chứa plasmid dính đoạn ADN ngoại lai có màu trắng) (đại diện đơn cử cho kết

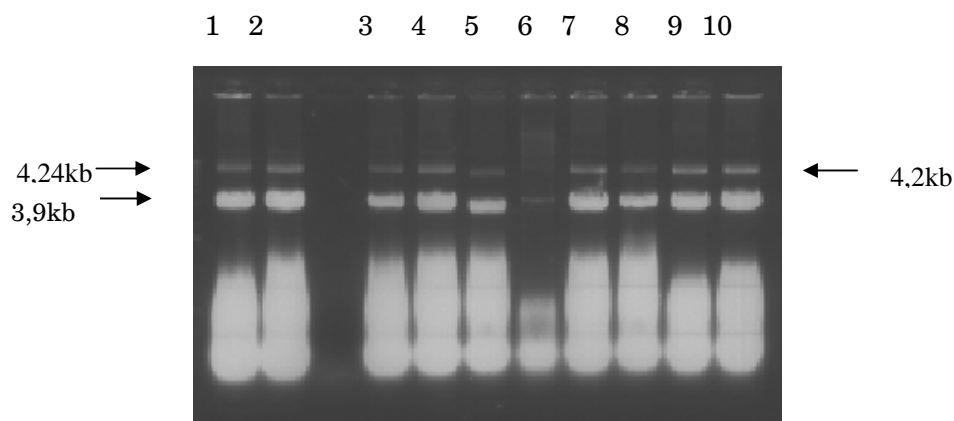
quả vector pCR<sup>(R)</sup> 2.1 có gắn sản phẩm PCR của *G. eucheumoides* (Trường Sa) và *D. salina* trên hình 2).

Tách chiết ADN plasmid từ những khuẩn lạc trắng thu được và chọn lọc những plasmid có kích thước

lớn hơn kích thước của vector gốc bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả những plasmid có kích thước lớn hơn là những plasmid có thể đã mang đoạn ITS-1 ngoại lai (hình 3).



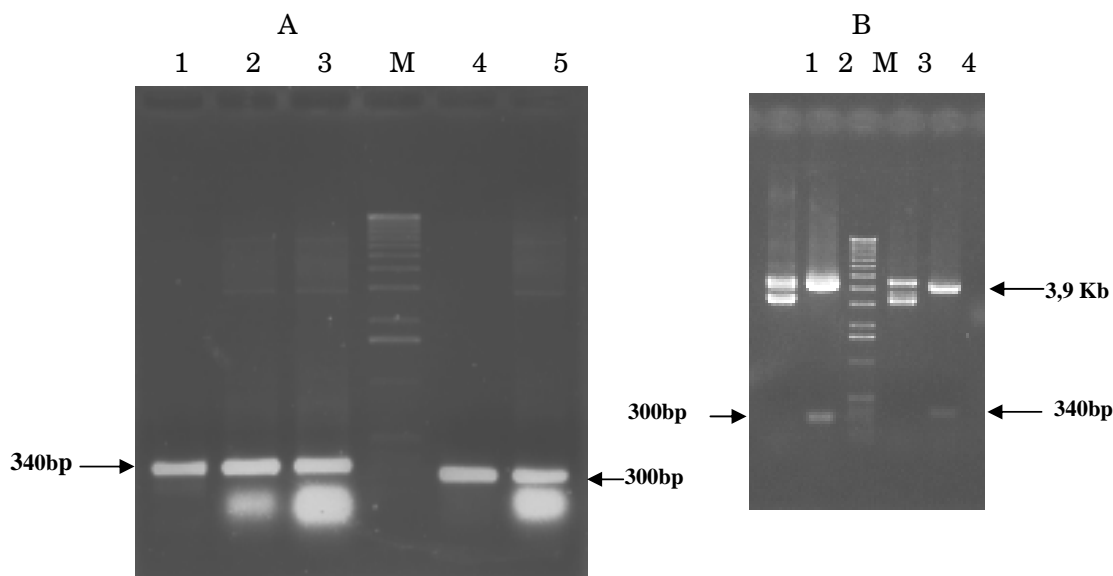
Hình 2: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 có gắn sản phẩm PCR của *G. eucheumoides* Trường Sa (A) và *D. salina* (B) sau khi biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$ . Trên môi trường có chứa Kanamicin, X-gal và IPTG. Khuẩn lạc trắng: Vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$  chứa plasmid tái tổ hợp mang đoạn ITS-1. Khuẩn lạc xanh: vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$  chứa plasmid không mang đoạn ITS-1



Hình 3: ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc trắng. Cột 5 Vector pCR<sup>®</sup>2.1 gốc; Cột từ 1-2: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 tái tổ hợp có dính đoạn ITS-1 của *G. eucheumoides* Trường Sa; Cột từ 3-4: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 tái tổ hợp có dính đoạn ITS-1 của *G. eucheumoides* Nha Trang; Cột 6-8: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 tái tổ hợp có dính đoạn ITS-1 của *D. salina*; Cột 9-10: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 tái tổ hợp có dính đoạn gen ITS - 1 của *D. bardawil*

Đã tiến hành kiểm tra các plasmid có chứa đoạn ITS-1 hay không bằng phân tích enzym giới hạn và bằng kỹ thuật PCR dùng ADN plasmid làm khuôn mẫu. Trong vector pCR<sup>®</sup>2.1 có một vị trí cắt của *EcoRI* ở đầu 5' và một vị trí ở đầu 3' của gen, vì vậy khi cắt bằng enzym *EcoRI* thì vector

pCR<sup>®</sup>2.1 có gắn đoạn ITS-1 sẽ tách ra một đoạn ADN với chiều dài là 340 bp đối với mẫu *G. eucheumoides* Nha Trang và Trường Sa và 300 bp đối với hai mẫu *D. salina*, *D. bardawil* (ở đây chúng tôi chỉ đưa ra kết quả đại diện cho hai loài này, hình 4).



Hình 4: (A): Kiểm tra đoạn ITS-1 trong plasmid tái tổ hợp bằng phản ứng PCR. Cột 1 và 4: Sản phẩm PCR từ ADN tổng số của *G. eucheumoides* Trường Sa và *D. salina*; Cột 2, 3: Sản phẩm PCR từ plasmid tái tổ hợp của *G. eucheumoides* Trường Sa; Cột 5: sản phẩm PCR từ plasmid tái tổ hợp của *D. salina*; Cột M: Marker 1Kb (B): Phân tích enzym giới hạn các plasmid tái tổ hợp mang đoạn ITS-1. Cột 1 và 2: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 mang gen ITS-1 của *D. bardawil* chưa cắt và được cắt bằng *EcoRI*; Cột 3 và 4: Vector pCR<sup>®</sup>2.1 mang gen ITS-1 của *G. eucheumoides* Nha Trang chưa cắt và được cắt bằng *EcoRI*; Cột M: Marker 1Kb

Kết quả trên hình 4 cho thấy khi kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng ADN plasmid làm khuôn, đã nhận được các băng ADN có kích thước khoảng 340 bp đối với loài *G. eucheumoides* Nha Trang và Trường Sa và 300 bp đối với hai loài *D. salina*, *D. bardawil* đúng với kích thước của sản phẩm PCR gốc từ ADN tổng số (hình

4a). Tiếp theo, khi phân tích các plasmid bằng enzym giới hạn *EcoRI* nhận 2 băng: một băng có kích thước khoảng 3,9 kb và một băng có kích thước khoảng 340 bp đối với *G. eucheumoides* Nha Trang và Trường Sa và 300 bp đối với hai loài *D. salina*, *D. bardawil*. Trong đó 3,9 kb là kích thước của vector gốc, còn 340 bp hoặc 300 bp

là kích thước của đoạn ITS-1 (hình 4b) [6]. Điều này chứng tỏ rằng đoạn ITS-1 đã được gắn vào vector.

### 3. Kết quả đọc trình tự axit nucleic ITS-1

Sau khi phân tích các plasmit bằng enzym giới hạn *EcoRI* để khẳng định đoạn gen ITS – 1 đã được gắn vào

vector hay chưa, tiến hành đọc trình tự nucleotit trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 377 DNA Sequencer, sử dụng ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit của hãng Perkin-Elmer. Kết quả trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 của các loài tảo biển này được trình bày trên hình 5.

G.blodgettii	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGAGAAGCCGGAGGAATTCGTTTGCAGTG	60
G.asiatica	-----	
G.eu TS	-----	
G.eu NT	-----	
H.valentiae	-----	
S.35	-----	
S.g	-----	
S.4	-----	
S.177	-----	
S.190	-----	
S.1695	-----	
D.bardawil	-----	
D.salina	-----	
G.blodgettii	AGAGTGGGTTTCAGTATAATATTTTTTATTGTGTTGCACGAAAAATCAAAATCCTTGTTTT	120
G.asiatica	-----	
G.eu TS	-----TCC	3
G.eu NT	-----TCC	3
H.valentiae	-----TCC	3
S.35	-----	
S.g	-----	
S.4	-----	
S.177	-----	
S.190	-----	
S.1695	-----	
D.bardawil	-----	
D.salina	-----	
G.blodgettii	CTGTGTGGTCTTG-AGTCTCGAAAACGGAGAAACAG---TAGAGCTGCCATTTTCGAAAGT	176
G.asiatica	-----TCCGTAGGTGAAGGTGCGGAAGG	23
G.eu TS	GTAGGTGAACCTGCGG-AAGGATCATTCAAAAATAAGCTCAAATCTGC--TTTTGGAAGT	60
G.eu NT	GTAGGTGAACCTGCGGGAAGGATCATTCAAAAATAAGCTCAAATCTGC--TTTTGGAAGT	61
H.valentiae	GTAGGTGAACCTGCGG-AAGGATCATTCAAAAATAAGCTCAAATCTGC--TTTTGGAAGT	60
S.35	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
S.g	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
S.4	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
S.177	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
S.190	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
S.1695	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
D.bardawil	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
D.salina	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG	23
	, , , , ,	
G.blodgettii	TGTGG---AGTTGTGTCCAGTTCAA--AATGAG---TACAGAT-TCGATCGCATGAAA	226
G.asiatica	ATCATTATCGAATATCCAAA?-CTTACCGTGCGAATCCGTGCGG-----CCGCAAGGCG	75
G.eu TS	GTTAT---ATATATTTCTTTTTGGGTGGATGAACTCTGCGAAA-AAAAGTGT-TGAGA	114
G.eu NT	GTTAT---ATATATTTCTTTTTGGGTGGATGAACTCTGCGAAA-AAAAGTGT-TGAGA	115
H.valentiae	GTTAT---ATATATTTCTTTTTGGGTGGATGAACTCTGCGAAA-AAAAGTGT-TGAGA	114
S.35	ATCATT---GAATATGCAAAC---CACAACACGCACTCTTTT-----ACTTGT-----	65
S.g	ATCATT---GAATATGCAAAC---CACAACACGCACTCTTTT-----ACTTGT-----	65



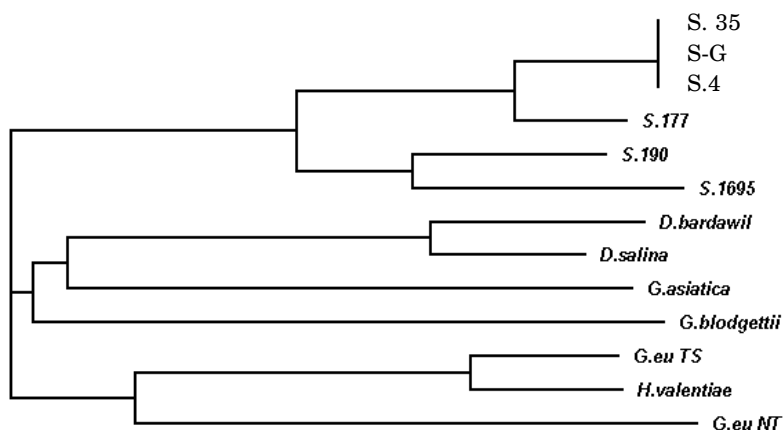


Dựa trên chương trình Clustal X Multiple Sequence Alignment Program (Version 1.81, June 2000) đã xây dựng cây phân loại của 13 loài tảo được nghiên cứu (hình 6).

Từ kết quả chỉ ra trên hình 5 nhận thấy rằng: đối với 2 loài *D. bardawil* và *D. salina* đã nhận được trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 giống nhau hoàn toàn. Còn đối với *Gracilaria eucheumoides* Trường Sa và Nha Trang có trình tự tại vị trí thứ 20 trong trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của *G. eucheumoides* Trường Sa đã bị mất đi 1 nucleotit loại Guanin (G) so với trình tự nucleotit đoạn ITS-1 của *G. eucheumoides* Nha Trang.

Từ kết quả nhận được ở trên (về việc so sánh trình tự nucleotit của đoạn ITS-1) có thể cho rằng *D. bardawil* và *D. salina* chỉ là 1 loài, mặc dù các nhà phân loại học cổ điển (dựa vào hình thái) đã phân chúng thành 2 loài khác

nhau, thuộc chi *Dunaliella*. Điều này bổ sung cho những kết quả nghiên cứu và công bố trước đây về nghiên cứu tính đa dạng của một số loài *Dunaliella* bằng kỹ thuật RAPD [8]. Trong công trình này đã xác định được hệ số đồng dạng di truyền giữa *D. bardawil* và *D. salina* có giá trị là 0,6286. Đây là một giá trị khá cao thường tính được giữa các loài rất gần nhau về mặt địa lý hoặc các đơn vị dưới loài. Như vậy, cùng với kỹ thuật RAPD và xác định hệ số đồng dạng di truyền thì phương pháp xác định trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 đã ủng hộ cho giả thiết rằng hai loài *D. bardawil* và *D. salina* có thể xem là một loài. Hơn nữa, bằng các phương pháp này có thể xác định được sự sai khác về mặt di truyền ngay trong cùng một loài *G. eucheumoides* có nguồn gốc từ các vùng sinh thái khác nhau (Trường Sa và Nha Trang).



Hình 6: Cây phân loại dựa trên việc so sánh trình tự nucleotit của 13 loài *Gracilaria*, *Scenedesmus*, *Hypnea* and *Dunaliella*

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.

Theo cây phân loại ở trên, 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 đã công bố sử dụng kỹ thuật RAPD để xác định mối quan hệ giữa các chủng *Scenedesmus* [14] 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 là 2 chủng khác nhau. Dựa vào chương trình Clustal X Multiple Sequence Alignment Program (Version 1.81, June 2000) và TreeView (1.6.1-2000) 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.

Kết quả thu được về trình tự nucleotit của 13 loài tảo được nghiên cứu trên đã được cấp số đăng ký trên Database như sau: *Hypnea valentiae* (AJ 496 264, AJ 496 524), *Dunaliella salina* (AJ 496 573), *Scenedesmus quadricaud* (AJ 496 521), *Scenedesmus obliquus* (AJ 496 388), *Gracilaria verrucosa (asiatica)* (AJ 496 522), *Gracilaria blodgettii* (AJ 496 523), *Gracilaria eucheumodes* (Nha Trang) (AJ 504 691), *Gracilaria eucheumoides* (Trường Sa) (AJ 504 692).

#### IV. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi ITS1 và ITS2 đã nhân bản được đoạn ITS-1 có kích thước khoảng 340 bp đối với loài *G. eucheumoides* Nha Trang và Trường Sa và 300 bp đối với hai loài *D. salina* và *D. bardawil*, 450bp - *G. blodgettii*, 300bp - *G. asiatica*, 330 bp - *H. valentiae*, 240 bp - *Scenedesmus* (35, g, 4, 177), 242 bp *Scenedesmus* (190, 1695).

Trình tự nucleotit của đoạn ITS - 1 của các mẫu thu được đã được đăng ký trên Database với các số đăng ký đã được cấp.

Loài *Dunaliella bardawil* và *Dunaliella salina* có trình tự nucleotit của đoạn ITS-1 giống nhau hoàn toàn. Dựa trên kết quả so sánh này có thể xem chúng là cùng một loài (cũng như đối với 4 loài *Scenedesmus* (35, g, 4, 177) và hai loài (190, 1695).

Có thể xác định được sự sai khác về mặt di truyền ngay trong cùng một loài (*G. eucheumoides*) có nguồn gốc từ các vùng sinh thái khác nhau (Trường

Sa và Nha Trang) bằng cách đọc và so sánh sự sai khác nhau ở trình tự nucleotit của đoạn gene ITS - 1.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baker F. T., Olsen J. L., Stam W. T. and Van D. H. C., 1992. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region (ITS-1 and ITS-2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (Chlorophyta), *Journal of Phycology*, vol. 28: 839-845.
2. Bente E. and Linda M., 1998. Genetic analysis of authentic and alternate forms of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta), *Phycologia*, vol. 37 (4): 275 - 283.
3. Bird C. J., Rice E. L., Muphy C. A. and Ragan M. A., 1992. Phylogenetic relationships in the *Gracilariales* (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia* 31, pp. 510-522.
4. Dương Đức Tiến, Võ Hành, 1997. Tảo nước ngọt Việt Nam, phân loại bộ Tảo Lục (Chlorococcales). Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp.
5. Edvardsen E. and Medlin L., 1998. Genetic analysis of authentic and alternate forms of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta). *Phycologia*, 37: 275 – 283.
6. Edvardsen E. and Medlin L., 1998. Genetic analysis of authentic and alternate forms of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta). *Phycologia* 37: 275 – 283.
7. Hoàng Thị Minh Hiền, Trần Kiên Cường, Trần Văn Tựa, Đặng Diễm Hồng, Trần Hữu Quang, Võ Thương Lan, 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.
8. Hoàng Thị Minh Hiền, Trần Hữu Quang, Trần Kiên Cường, Trần Văn Tựa, Võ Thương Lan, Đặng Diễm Hồng, 2000. Nghiên cứu tính đa dạng của một số loài *Dunaliella* (Chlorophyta) bằng kỹ thuật RAPD-PCR. Báo cáo khoa học Hội Nghị Sinh Học Quốc Gia “Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học”. Trang 66 – 71.
9. Kaku H., Suto G. E., Ochiai H., Fang-Ping H. and Kato K., 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. 29/11-1/2/1999. Chiang Mai, Thailand, pp. 705 – 716.
10. Naomi P., Celia M. Smith and Clifford W. Morden., 2001. An effective DNA extraction protocol for brown algae. *Phycological Research*, vol. 49: 97 – 102.
11. Norishige Y., Tadashi K., Taizo M. and Terunobu I., 2001. Random amplified polymorphic DNA markers for three Japanese

- laminarian species. Fisheries science, vol. 67: 857 - 862.
12. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis, 1989. Molecular cloning: a laboratory manuals. Cold Spring Harbor Laboratory.
  13. Tadao Y., Valérie S., Takeo H., 2000. *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. Phycological Research, vol. 48: 125 – 131.
  14. Trần Dự Chi, Vũ Thanh Lâm, Hoàng Thị Minh Hiền, Đặng Diễm Hồng, Dương Đức Tiến, 2000. Một số chủng *Scenedesmus* phân lập được từ hồ Hoàn Kiếm. Tạp chí Sinh học, tập 23(3a): 170 – 177.
  15. Trần Hữu Quang, Trần Kiên Cường, Vũ Văn Dũng, Võ Thương Lan, Đặng Diễm Hồng, 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, trang 107-113.
  16. Valérie S., Takeo H., Tadao Y., Annette W. C. and Michio M., 2000. Phylogenetic relationships of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section Phyllocystae based on ITS-2 nrDNA sequences. Phycological Research, vol. 48: 251 - 260.