

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐOẠN DNA BARCODE VÙNG GEN 28S CHO TU HÀI *LUTRARIA RHYNCHAENA* JONAS, 1844

Thái Thanh Bình¹, Triệu Anh Tuấn^{2*}

¹Trường Cao đẳng Kinh tế, Kỹ thuật và Thủy sản, Bắc Ninh

²Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ

Ngày nhận bài: 13/8/2023; Ngày chỉnh sửa: 5/9/2023; Ngày duyệt đăng: 7/9/2023

DOI: <https://doi.org/10.59775/1859-3968.147>

Tóm tắt

Hiện nay công nghệ mã vạch DNA đã sử dụng nhiều vùng trình tự DNA tiêu chuẩn để xác định, phân loại và khám phá loài. Mã vạch DNA đề cập đến các chuỗi DNA, phục vụ việc nhận dạng và truy xuất thông tin nguồn gốc các loài. Với mục đích xây dựng được hệ thống ký hiệu tốt nhất có thể biểu thị chuỗi mã vạch DNA, trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích trình tự DNA vùng gene 28S với chiều dài 1350 nucleotide của 10 loài thuộc họ Mactridae làm cơ sở để xây dựng mã vạch cho loài tu hải *Lutraria rhynchaena*. Trình tự nucleotide vùng gene 28S của các loài được so sánh mức tương đồng bằng phần mềm Blast. So sánh trình tự nucleotide vùng gene 28S cho thấy, tu hải *Lutraria rhynchaena* khác so với các loài khác trong họ Mactridae đã công bố, có thể sử dụng trình tự gene 28S để nhận dạng và phân biệt loài *Lutraria rhynchaena*.

Từ khóa: DNA, Bacoding, Vân Đồn, 28S.

1. Đặt vấn đề

Tu hải *Lutraria rhynchaena* Jonas, 1844 là loài nhuyễn thể có giá trị kinh tế cao, là loài hải sản quan trọng, có giá trị về mặt xuất khẩu. Giống *Lutraria* hiện có khoảng 14 loài, việc định loại các loài chủ yếu dựa trên các đặc điểm hình thái, do đó kết quả định loại đôi khi còn chưa rõ ràng [1].

Hiện nay, phương pháp nghiên cứu di truyền phân tử được sử dụng nhằm mục đích hỗ trợ nhận dạng và định danh loài. Trong đó, trình tự DNA được sử dụng như một công cụ hiệu quả vì có tốc độ biến đổi nhanh, cung cấp những sai khác

quan trọng trong trình tự giữa các loài [2]. Một số vùng gene được sử dụng nhiều để nghiên cứu và ứng dụng trong phân loại phân tử ở động vật có thể kể đến như COI, 16S rRNA, D-loop [3-5] và một số vùng gene nhân H3, 18S, 28S [6-8]. Hiện nay, trên cơ sở dữ liệu GenBank đã ghi nhận 10 loài thuộc họ Mactridae có công bố vùng gene 28S, trong đó có hai loài thuộc giống *Lutraria*.

Các nghiên cứu công bố đã chỉ ra mã vạch vùng gene nhân có thể được sử dụng để định danh đối với nhiều loại động vật, trong đó có vùng gene 28S. Ở vùng gene này có các đoạn trình tự dễ bị thay thế làm khả năng tiến hóa,

phát sinh loài [8]. Mã vạch DNA đã được sử dụng để phân loại đối với nhiều loài trong họ Mactridae. Với loài tu hải hiện nay các nghiên cứu về mã vạch còn rất hạn chế [9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích một số trình tự vùng gene 28S của tu hải *Lutraria rhynchaena* Jonas, 1844 tại Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh để phân tích và xây dựng mã vạch DNA, nhằm cung cấp thêm phương pháp định loại và quản lý các sản phẩm tu hải trên thị trường hiện nay.

2. Phương pháp nghiên cứu

Bảng 1. Trình tự vùng gene 28S từ cơ sở dữ liệu GenBank được sử dụng

STT	Tên loài	Mã số GenBank	STT	Tên loài	Mã số GenBank
1	<i>L. lutraria</i>	AM779727.1	6	<i>M. striata</i>	AM779729.1
2	<i>S. solidissima</i>	JN196041.1	7	<i>A. cycladea</i>	AM779730.1
3	<i>S. solida</i>	AM779726.1	8	<i>T. capax</i>	KC429510.1
4	<i>M. lateralis</i>	KX713403.1	9	<i>R. cuneata</i>	KC429509.1
5	<i>M. nicobarica</i>	AM779725.1	10	<i>L. rhynchaena</i>	NC023384.1

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định khoảng cách di truyền

Ước lượng khoảng cách tiến hóa giữa các loài và trong cùng một loài được ước tính bằng phương pháp khoảng cách tối thiểu (*p-distance*), khoảng cách *p* là thước đo sự khác biệt di truyền giữa các loài hoặc giữa các quần thể trong một loài. Khoảng cách *p* giữa các cặp trình tự được tính toán dựa trên phần mềm MEGA X [12]. Ngoài ra, việc so sánh cặp giữa các mẫu nghiên cứu được thực hiện bằng phần mềm BioEdit theo phương pháp sắp xếp đồng trục (Global Alignment) [13].

2.2. Xây dựng cây phát sinh loài

Trình tự vùng gene 28S được đóng hàng và căn chỉnh bằng chương trình MAFFT [14]. Xây

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Trình tự DNA vùng gene 28S của 2 mẫu tu hải *Lutraria rhynchaena* Jonas, 1844 tại Vân Đồn, Quảng Ninh đã công bố trên cơ sở dữ liệu bộ gene với mã truy cập VIBL00000000 [10] và mã đăng ký NC023384.1 [11] được khai thác.

Ngoài ra, trình tự vùng gene 28S của loài *Lutraria lutraria* và trình tự vùng gene 28S của các taxa thuộc họ Mactridae được công bố trên GenBank (NCBI) đã được sử dụng để phân tích trong nghiên cứu này (Bảng 1).

dựng cây phát sinh loài được thực hiện bằng phần mềm MEGAX [12].

2.3. Phân tích trình tự vùng gene 28S của loài *Lutraria rhynchaena*

Trình tự vùng gene 28S của hai loài thuộc giống *Lutraria* sau khi đóng hàng bằng chương trình MAFFT [14], sau đó tiến hành so sánh trình tự bằng chương trình BioEdit để tìm kiếm các vị trí sai khác nucleotide [13].

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Mức độ tương đồng trình tự DNA của các loài

Trình tự DNA vùng gene 28S, kích thước 1468 bp của hai mẫu tu hải *Lutraria rhynchaena* Jonas, 1844 thu tại huyện Vân Đồn, tỉnh Quảng

Ninh (Mã đăng ký VIBL00000000) và mẫu còn lại (với mã đăng ký NC023384.1) có mức tương đồng 100%.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng di truyền chỉ ra giữa loài *L. rhynchaena* so với 9 loài khác

thuộc họ Mactridae được khai thác trên GenBank bằng công cụ BLAST và giữa các loài trong họ Mactridae thu được kết quả tại Bảng 2. Kết quả cho thấy trình tự các mẫu tương đồng từ 91,29 đến 97,38 %.

Bảng 2. Mức độ tương đồng trình tự DNA vùng gene 28S giữa các loài thuộc họ Mactridae đã công bố trên GenBank (%)

Tên loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>L. rhynchaena</i>									
2. <i>L. lutraria</i>	97,01								
3. <i>S. solidissima</i>	95,98	96,66							
4. <i>S. solida</i>	95,23	96,59	99,25						
5. <i>M. lateralis</i>	95,28	95,13	97,26	96,32					
6. <i>M. nicobaric</i>	94,78	96,13	95,58	95,71	95,29				
7. <i>M. striata</i>	92,95	93,88	92,72	92,85	92,43	93,47			
8. <i>A. cycladea</i>	94,36	95,78	94,62	94,55	94,61	94,29	92,47		
9. <i>T. capax</i>	93,19	95,08	94,69	94,69	94,20	97,38	91,29	93,1	
10. <i>R. cuneata</i>	95,52	96,47	96,91	96,55	94,19	97,38	92,06	94,8	94,6

Qua kết quả ở Bảng 2, trình tự DNA loài *L. rhynchaena* có mức tương đồng cao với loài *L. lutraria* (AM779727.1), tương đồng đạt 97,01% và thấp nhất với loài *M. striata* (MN990548), tương đồng đạt 92,95 %. Trong khi mức tương đồng giữa hai loài *M. striata* và loài *T. capax* trong họ Mactridae đạt thấp nhất 91,29 % và giữa hai loài *M. nicobaric* và *T. capax*, *R. cuneata* đạt cao nhất 97,38 % (Bảng 2). Việc so sánh trình tự nucleotide trong cơ sở dữ liệu sẽ cung cấp kết quả tham chiếu về phân loại, kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài [15]. Do đó chúng tôi sử dụng phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại và xây dựng mã vạch để góp phần phân loại loài.

3.2. Khoảng cách di truyền giữa các loài trong họ Mactridae

Khoảng cách di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền giữa loài trong nghiên cứu này, giá trị khoảng cách di truyền càng thấp thì mối quan hệ di truyền giữa các loài càng gần và ngược lại giá trị khoảng cách di truyền càng cao thì mối quan hệ di truyền giữa các loài càng xa nhau. Từ dữ liệu phân tích trình tự vùng gene 28S của các loài trong họ Mactridae trong nghiên cứu này bằng chương trình MEGA X, kết quả khoảng cách di truyền thu được giữa các loài được mô tả tại Bảng 3.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền giữa các loài thuộc họ Mactridae

Tên loài	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>L. rhynchaena</i>									
<i>L. lutraria</i>	0,029								
<i>S. solidissima</i>	0,028	0,033							
<i>S. solida</i>	0,047	0,034	0,007						
<i>M. lateralis</i>	0,056	0,045	0,046	0,045					
<i>M. nicobarica</i>	0,039	0,036	0,025	0,034	0,046				
<i>M. striata</i>	0,056	0,040	0,054	0,054	0,059	0,051			
<i>A. cycladae</i>	0,068	0,058	0,070	0,068	0,061	0,068	0,072		
<i>T. capax</i>	0,071	0,054	0,054	0,054	0,024	0,056	0,071	0,083	
<i>R. cuneata</i>	0,097	0,092	0,098	0,097	0,093	0,100	0,102	0,113	0,114

Hệ số sai khác di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền giữa các loài được so sánh với nhau. Kết quả phân tích khoảng cách di truyền giữa các loài trong họ Mactridae trong nghiên cứu này cho thấy, hệ số di truyền dao động từ 0,007 - 0,114 (Bảng 3).

Hệ số di truyền thấp nhất là 0,007 khi so sánh giữa hai loài *S. Solidissima* và *S. Solida* và hệ số di truyền đạt cao nhất là 0,114 khi so sánh giữa hai loài *T. capax* và *R. cuneata*. Trong khi hệ số di truyền giữa loài *L. rhynchaena* so với 9 loài trong nghiên cứu này dao động từ 0,028- 0,097, đạt thấp nhất (0,028) khi so sánh giữa hai loài *L. rhynchaena* và *S. solidissima*, đạt cao nhất so sánh giữa hai loài *L. rhynchaena* và *R. cuneata*, hệ số di truyền khi so sánh 2 loài *L. rhynchaena* và *L. lutraria* thấp, đạt 0,029.

3.3. Cây phát sinh loài giữa các loài trong họ Mactridae

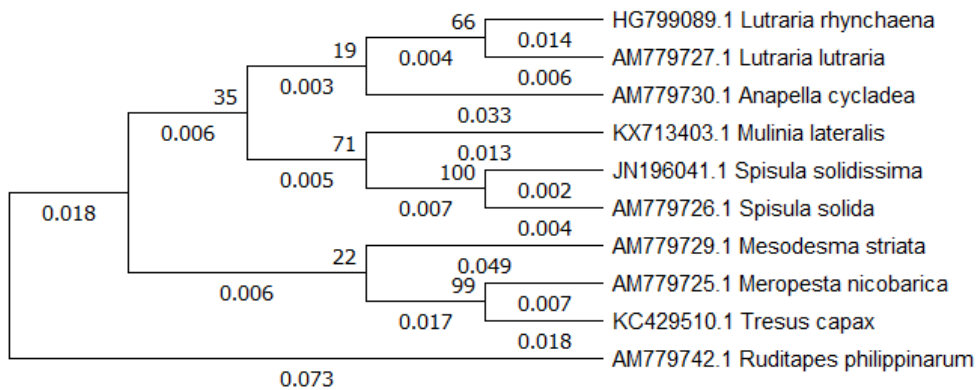
Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên việc sử dụng trình tự vùng gen 28S của 10 loài thuộc họ Mactridae được công bố trình tự trên cơ sở dữ liệu GenBank. Kết quả cho thấy, hai loài thuộc giống *Lutraria* đều được xếp chung một nhánh (Hình 1) và tách riêng so với các loài khác

trong họ Mactridae. Kết quả này cho thấy rằng, loài *L. rhynchaena* có khoảng cách di truyền nhất định so với loài khác trong họ Mactridae.

Kết quả phân tích và xây dựng cây phát sinh loài từ trình tự vùng gene 28S của 10 loài thuộc họ Mactridae được xếp thành hai nhóm như Hình 1. Trong đó, nhóm I gồm 3 phân nhánh, phân nhánh thứ nhất có 3 loài *L. rhynchaena*, *L. lutraria* và *A. cycladae*, phân nhánh thứ hai gồm 3 loài *M. Lateralis*, *S. Solidissima* và *S. Solida*, phân nhánh còn lại gồm *M. striata*, *M. nicobarica* và *T. capax*. Nhóm còn lại là loài *R. philippinarum* nằm riêng lẻ (Hình 1).

3.4. So sánh trình tự DNA giữa hai loài thuộc giống *Lutraria*

Phân tích trình tự vùng gene 28S của hai loài thuộc giống *Lutraria* được thực hiện sau khi được dóng hàng và căn chỉnh trình tự DNA. Kích thước trình tự DNA vùng gene 28S rRNA của hai loài tu hài với chiều dài 1440 nucleotide, đã xác định được 42 vị trí sai khác giữa loài *Lutraria rhynchaena* và loài *Lutraria lutraria* (Bảng 4). Tỷ lệ các loại nucleotide ở hai loài này đều tương đương nhau, trong đó, Thymine (T) chiếm tỷ lệ cao nhất (trung bình 30,6%), thấp nhất là Guanine (trung bình 18,7%).



Hình 1. Cây phát sinh loài xây dựng dựa trên trình tự vùng gene 28S bằng phần mềm MEGAX dựa trên phương pháp Maximum Neighbor Joining [12]

Bảng 4. Các vị trí sai khác nucleotide trên trình tự vùng gene 28S (1440bp) của 2 loài tu hài trong nghiên cứu

Tên loài	Vị trí nucleotide sai khác											
	18	43	65	66	80	83	102	104	105	116	133	206
Trình tự tương đồng	G	A	T	T	C	C	G	G	C	C	C	T
<i>L.rhynchaena</i>
NC023384.1
<i>L. lutraria</i>	A	G	G	A	T	T	A	A	A	T	T	G

Tên loài	Vị trí nucleotide sai khác											
	446	447	461	469	474	475	535	545	550	573	575	777
Trình tự tương đồng	G	C	C	G	T	C	A	C	T	C	C	C
<i>L.rhynchaena</i>
NC023384.1
<i>L. lutraria</i>	A	G	A	C	C	T	G	T	C	T	T	T

Tên loài	Vị trí nucleotide sai khác											
	580	597	606	608	609	686	696	729	737	828	960	870
Trình tự tương đồng	G	C	G	T	A	C	C	T	C	G	G	C
<i>L.rhynchaena</i>
NC023384.1
<i>L. lutraria</i>	A	T	A	A	C	T	T	C	A	A	A	T

Tên loài	Vị trí nucleotide sai khác					
	894	895	897	933	936	1425
Trình tự tương đồng	C	A	C	A	T	C
<i>L.rhynchaena</i>
NC023384.1
<i>L. lutraria</i>	T	C	T	C	C	T

4. Kết luận

Vùng gene 28S có chiều dài 1440 bp của 2 loài trong giống *Lutraria* trong nghiên cứu được phân tích, so sánh và xác định được có 42 điểm sai khác giữa loài *L. rhynchaena* so với loài *L. lutraria*. Từ đó, bước đầu đề xuất có thể sử dụng trình tự vùng gene 28S để phân biệt và nhận dạng loài *L. rhynchaena*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ đề tài KH&CN cấp cơ sở Trường Đại học Hùng Vương, mã số HV04.2023. Trân trọng cảm ơn các thành viên đề tài đã đóng góp thực hiện các nội dung nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] N. T. Dang and T. H. Ho (2007). *Fundamentals of Hydrobiology*. Publishing House for Science and Technology, Hanoi.
- [2] J. A. Castro, A. Picornell, and M. Ramon (1998). Mitochondrial DNA: A tool for populational genetics studies, *Int Microbiol*, vol. 1, no. 4, pp. 327-332.
- [3] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R deWaard (2003). Biological identifications through DNA barcodes, *Proc Biol Sci*, vol. 270, no. 1512, pp. 313-321.
- [4] P. Taberlet, G. Pautou, and J. Bouvet (2007). Universal primer for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, vol. 17, pp. 1105-1109.
- [5] K. K. S. Layton, A. L. Martel, and P. D. N. Hebert (2014). Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs, *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e95003.
- [6] H. V. der Bank and G. Richard (2015). A pioneer survey and DNA barcoding of some commonly found gastropod molluscs on Robben Island. *ZooKeys*, vol. 481, pp. 15-23.
- [7] T. B. Thai, V. H. Nguyen and V. H. Luu (2017). Application of DNA barcoding markers to classify Spotted babylon, *Vietnam Science and Technology*, vol. 13, no. 2, pp. 49-52.
- [8] Plant Working Group CBOL (2009). A DNA barcoding for land plants, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, vol. 106, no. 31, pp. 12794-12797.
- [9] A. T. Trieu, T. B. Thai, X. V. Nguyen (2022). DNA barcoding of otter clam (*Lutraria rhynchaena*) in Van Don district, Quang Ninh province, TNU Journal of Science and Technology, Số 227 (05), Tr.299-307, ISSN: 1859-2171, 2374-9098; e-ISSN 2615-9562.
- [10] T. B. Thai, P. Y. Lee, M. H. Gan, C. M. Austin, L. J. Croft, A. T. Trieu, and H. M. Tan (2019). Whole Genmon Assembly of the Snout Otter Clam, *Lutraria rhynchaena*, Using Nanopore and Illumina Data, Benchmarked Against Bivalve Genome Assemblies, *Frontiers in Genetics*, vol. 10, p. 158.
- [11] M. H. Gan, H. M. Tan, T. B. Thai, C. M. Austin (2016). The complete mitogenome of the marine bivalve *Lutraria rhynchaena* Jonas, 1844 (Heterodonta: Bivalvia: Mactridae), *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 27(1), 335-336.
- [12] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Mol Biol Evol*, vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549.
- [13] T. A. Hall (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis, *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, pp. 95-98.
- [14] K. Katoh, J. Rozewicki, and K. D. Yamada (2019). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Briefings in Bioinformatics*, vol. 20, pp. 1160-1166.
- [15] E. Stackebrandt and J. Ebers (2006). Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards, *Microbiol Today*, vol. 8, pp. 6-9.

**RESEARCH TO IDENTIFY THE DNA BARCODE OF 28S GENE REGION FOR OTTER CLAM
LUTRARIA RHYNCHAENA JONAS, 1844**

Thai Thanh Binh¹, Trieu Anh Tuan^{2*}

¹*College of Economic, Technical and Fisheries, Bac Ninh*

²*Faculty of Natural Sciences, Hung Vuong University, Phu Tho*

Abstract

DNA barcodes today use many standard DNA sequence regions to construct to identify, classify and discover species. DNA barcoding refers to DNA sequences, serving the identification and retrieval of species origin information. With the aim of building the best symbology that can represent DNA barcode sequences, in this study, we analyzed the DNA sequence of the 28S gene region with a length of 1350 nucleotides of 10 species of the Mactridae family as a basis to build a barcode for the geoduck *Lutraria rhynchaena*. The nucleotide sequences of the 28S gene region of the species were compared for similarity using Blast software. Comparing the nucleotide sequence of the 28S gene region shows that the otter clam *Lutraria rhynchaena* is different from other published species in the Mactridae family. The 28S gene sequence can be used to identify and distinguish *Lutraria rhynchaena* species.

Keywords: *DNA, Barcoding, Vân Đồn, 28S.*