

**PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ ĐOẠN GEN TY THỂ 16S-rDNA
CỦA CUA XANH (GIỐNG *SCYLLA*) Ở VIỆT NAM**

NGUYỄN GIANG SƠN

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

ĐỖ VĨ ANH KHOA

Trường Đại học Cần Thơ

NGUYỄN VĂN CHUNG

Viện Hải dương học Nha Trang

NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY

Viện Công nghệ Sinh học

Giống cua xanh *Scylla* DeHaan, 1833 thuộc họ Cua bơi Portunidae, là nghìn giáp xác thương mại có giá trị kinh tế cao trong vùng phân bố của chúng ở Ấn Độ Dương - Tây Thái Bình Dương. Việc phân loại các loài cua thuộc giống *Scylla* từng gặp nhiều khó khăn (Fushimi và cs, 1999) 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 (Sugama và Hutapea, 1999; Klinbunga và cs, 2000; Imai và cs, 2004). 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 họ được mối quan hệ di truyền giữa chúng. Keenan và cs. (1999) đã sử dụng chỉ thị allozyme và 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 giống *Scylla*. Bình và cs. (2009) sử dụng trình tự DNA vùng gen COI ty thể để nhận dạng các loài cua xanh ở Việt Nam. 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%. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích trình tự đoạn 16S rDNA để định loại 2 loài cua thuộc giống *Scylla* thu ở vùng biển phía Nam Việt Nam và tìm hiểu quan hệ phát sinh giữa các loài trong giống.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

02 mẫu cua thu ở vùng biển thuộc tỉnh Cà Mau, mã hiệu là sp1 và sp2. DNA hệ gen tách chiết từ cơ chân theo Ausubel và cs. (1995). Đoạn DNA ty thể vùng mã hóa cho tiểu phần 16S RNA ribosomal có kích thước phân tử 562 bp được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu (Biomers, German) có trình tự mồi xuôi (F):5'-CGCC TGTTTATCAAAAACAT-3' và mồi ngược (R): 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAC GT-3'. Chu trình nhiệt PCR gồm các bước: Biến tính toàn bộ 95°C trong 3 phút; lặp lại 35 chu kỳ các bước biến tính 95°C trong 30 giây, bám mồi ở 47°C trong 45 giây; tổng hợp chuỗi ở 72°C trong 45 giây; chu kỳ cuối ở 72°C trong 10 phút và ủ mẫu ở 15°C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Đức) và giải trình tự nucleotide trực tiếp bằng đánh dấu kết thúc chuỗi sử dụng bộ hóa chất BigDye v3.1 kit và máy đọc trình tự ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA). Trình tự nucleotide được kiểm tra đối chiếu với cơ sở dữ liệu trình tự DNA của Genbank bằng công cụ trực tuyến (BLAST). Các trình tự DNA tương đồng của các loài được thu thập và dùng trong phân tích (Bảng 1). Phân tích số liệu bằng phần mềm GenDoc v2.6.002 (Nicholas, 1997) và MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood và giá trị bootstrap 1000 lần.

Bảng 1

Các trình tự đoạn gen 16S-rDNA từ Genbank sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên khoa học	Mã hiệu Genbank	Nguồn gốc (kí hiệu)
1.	<i>S. olivacea</i>	AF109321	Taiwan (TW)
2.	<i>S. olivacea</i>	NC_012569	Thailand (TL)
3.	<i>S. serrata</i>	NC_012565	Thailand (TL)
4.	<i>S. serrata</i>	FM208779	Lamu, Kenya (KN)
5.	<i>S. serrata</i>	AF109318	Taiwan (TW)
6.	<i>S. tranquebarica</i>	NC_012567	Thailand (TL)
7.	<i>S. tranquebarica</i>	AF109320	Taiwan (TW)
8.	<i>S. paramamosian</i>	AF109319	Taiwan (TW)
9.	<i>S. paramamosian</i>	AY841365	China (CN)
10.	<i>S. paramamosian</i>	AY841366	Viet Nam (VN)
11.	<i>S. paramamosian</i>	NC_012572	Thailand (TL)
12.	<i>Portunus pelagicus</i>	DQ062734	China (CN)

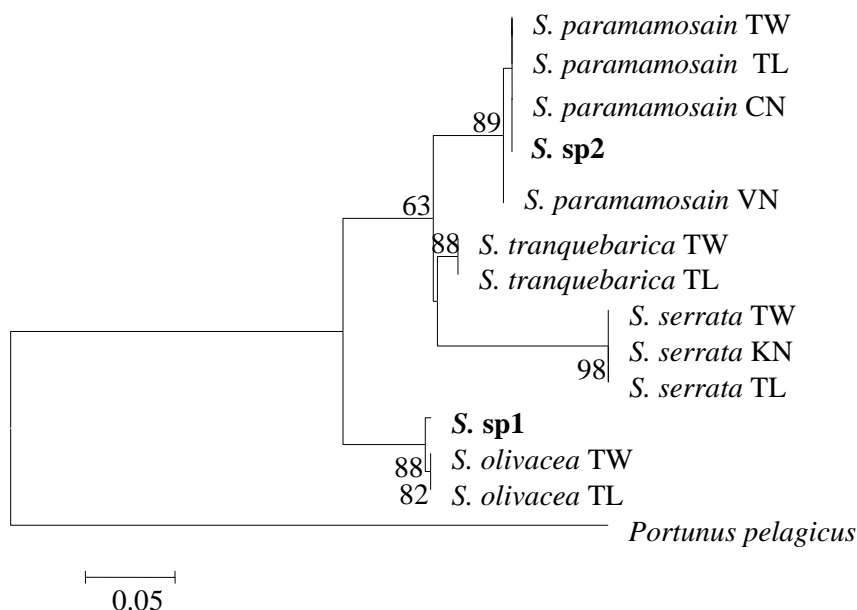
II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Đã xác định được đoạn trình tự đích gen 16S-rDNA có kích thước 496 bp của 02 mẫu của nghiên cứu và có thành phần nucleotide không khác biệt nhiều giữa 2 mẫu nghiên cứu sp1 và sp2 tương ứng là: Adenine = 36,7 và 36,9%; Cytosine = 11,1 và 10,5%; Guanine = 18,5 và 17,5%; Thymine = 33,7 và 35,1%. So sánh các trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng của các loài thuộc giống *Scylla* cho thấy vùng gen nghiên cứu có sự đa dạng cao với 65 biến dị, trong đó 62 biến dị mang thông tin parsimony, chỉ số đa dạng nucleotide $\pi = 0,053$ (Bảng 2). Số liệu Bảng 2 thể hiện trình tự nucleotide đặc trưng loài xuất hiện ở nhiều vị trí khác nhau, trong đó mẫu của xanh sp1 và loài *S. olivacea*, mẫu sp2 và loài *S. paramamosian* có chung trình tự nucleotide ở nhiều vị trí.

Bảng 2

Các biến dị trong vùng gen 16S-rDNA giữa các loài thuộc giống *Scylla*

Vị trí nucleotide	8	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60	63	66	69	72	75	78	81	84	87	90	93	96	99	102	105	108	111	114	117	120	123	126	129	132	135	138	141	144	147	150	153	156	159	162	165	168	171	174	177	180	183	186	189	192	195	198	201	204	207	210	213	216	219	222	225	228	231	234	237	240	243	246	249	252	255	258	261	264	267	270	273	276	279	282	285	288	291	294	297	300	303	306	309	312	315	318	321	324	327	330	333	336	339	342	345	348	351	354	357	360	363	366	369	372	375	378	381	384	387	390	393	396	399	402	405	408	411	414	417	420	423	426	429	432	435	438	441	444	447	450	453	456	459	462	465	468	471	474	477	480	483	486	489	492	495	498	501	504	507	510	513	516	519	522	525	528	531	534	537	540	543	546	549	552	555	558	561	564	567	570	573	576	579	582	585	588	591	594	597	600	603	606	609	612	615	618	621	624	627	630	633	636	639	642	645	648	651	654	657	660	663	666	669	672	675	678	681	684	687	690	693	696	699	702	705	708	711	714	717	720	723	726	729	732	735	738	741	744	747	750	753	756	759	762	765	768	771	774	777	780	783	786	789	792	795	798	801	804	807	810	813	816	819	822	825	828	831	834	837	840	843	846	849	852	855	858	861	864	867	870	873	876	879	882	885	888	891	894	897	900	903	906	909	912	915	918	921	924	927	930	933	936	939	942	945	948	951	954	957	960	963	966	969	972	975	978	981	984	987	990	993	996	999	1002	1005	1008	1011	1014	1017	1020	1023	1026	1029	1032	1035	1038	1041	1044	1047	1050	1053	1056	1059	1062	1065	1068	1071	1074	1077	1080	1083	1086	1089	1092	1095	1098	1101	1104	1107	1110	1113	1116	1119	1122	1125	1128	1131	1134	1137	1140	1143	1146	1149	1152	1155	1158	1161	1164	1167	1170	1173	1176	1179	1182	1185	1188	1191	1194	1197	1200	1203	1206	1209	1212	1215	1218	1221	1224	1227	1230	1233	1236	1239	1242	1245	1248	1251	1254	1257	1260	1263	1266	1269	1272	1275	1278	1281	1284	1287	1290	1293	1296	1299	1302	1305	1308	1311	1314	1317	1320	1323	1326	1329	1332	1335	1338	1341	1344	1347	1350	1353	1356	1359	1362	1365	1368	1371	1374	1377	1380	1383	1386	1389	1392	1395	1398	1401	1404	1407	1410	1413	1416	1419	1422	1425	1428	1431	1434	1437	1440	1443	1446	1449	1452	1455	1458	1461	1464	1467	1470	1473	1476	1479	1482	1485	1488	1491	1494	1497	1500	1503	1506	1509	1512	1515	1518	1521	1524	1527	1530	1533	1536	1539	1542	1545	1548	1551	1554	1557	1560	1563	1566	1569	1572	1575	1578	1581	1584	1587	1590	1593	1596	1599	1602	1605	1608	1611	1614	1617	1620	1623	1626	1629	1632	1635	1638	1641	1644	1647	1650	1653	1656	1659	1662	1665	1668	1671	1674	1677	1680	1683	1686	1689	1692	1695	1698	1701	1704	1707	1710	1713	1716	1719	1722	1725	1728	1731	1734	1737	1740	1743	1746	1749	1752	1755	1758	1761	1764	1767	1770	1773	1776	1779	1782	1785	1788	1791	1794	1797	1800	1803	1806	1809	1812	1815	1818	1821	1824	1827	1830	1833	1836	1839	1842	1845	1848	1851	1854	1857	1860	1863	1866	1869	1872	1875	1878	1881	1884	1887	1890	1893	1896	1899	1902	1905	1908	1911	1914	1917	1920	1923	1926	1929	1932	1935	1938	1941	1944	1947	1950	1953	1956	1959	1962	1965	1968	1971	1974	1977	1980	1983	1986	1989	1992	1995	1998	2001	2004	2007	2010	2013	2016	2019	2022	2025	2028	2031	2034	2037	2040	2043	2046	2049	2052	2055	2058	2061	2064	2067	2070	2073	2076	2079	2082	2085	2088	2091	2094	2097	2100	2103	2106	2109	2112	2115	2118	2121	2124	2127	2130	2133	2136	2139	2142	2145	2148	2151	2154	2157	2160	2163	2166	2169	2172	2175	2178	2181	2184	2187	2190	2193	2196	2199	2202	2205	2208	2211	2214	2217	2220	2223	2226	2229	2232	2235	2238	2241	2244	2247	2250	2253	2256	2259	2262	2265	2268	2271	2274	2277	2280	2283	2286	2289	2292	2295	2298	2301	2304	2307	2310	2313	2316	2319	2322	2325	2328	2331	2334	2337	2340	2343	2346	2349	2352	2355	2358	2361	2364	2367	2370	2373	2376	2379	2382	2385	2388	2391	2394	2397	2400	2403	2406	2409	2412	2415	2418	2421	2424	2427	2430	2433	2436	2439	2442	2445	2448	2451	2454	2457	2460	2463	2466	2469	2472	2475	2478	2481	2484	2487	2490	2493	2496	2499	2502	2505	2508	2511	2514	2517	2520	2523	2526	2529	2532	2535	2538	2541	2544	2547	2550	2553	2556	2559	2562	2565	2568	2571	2574	2577	2580	2583	2586	2589	2592	2595	2598	2601	2604	2607	2610	2613	2616	2619	2622	2625	2628	2631	2634	2637	2640	2643	2646	2649	2652	2655	2658	2661	2664	2667	2670	2673	2676	2679	2682	2685	2688	2691	2694	2697	2700	2703	2706	2709	2712	2715	2718	2721	2724	2727	2730	2733	2736	2739	2742	2745	2748	2751	2754	2757	2760	2763	2766	2769	2772	2775	2778	2781	2784	2787	2790	2793	2796	2799	2802	2805	2808	2811	2814	2817	2820	2823	2826	2829	2832	2835	2838	2841	2844	2847	2850	2853	2856	2859	2862	2865	2868	2871	2874	2877	2880	2883	2886	2889	2892	2895	2898	2901	2904	2907	2910	2913	2916	2919	2922	2925	2928	2931	2934	2937	2940	2943	2946	2949	2952	2955	2958	2961	2964	2967	2970	2973	2976	2979	2982	2985	2988	2991	2994	2997	3000
S. sp1	A G G T G G A A G C A A C T G A G G G G A A C C A T G A G A T G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. olivacea</i> TW																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. olivacea</i> TL																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. serrata</i> TL	T . T . . A . G G A T . . . C A G A A A A . G T G G - A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. serrata</i> KN	T . T . . A . G G A T . . . C A G A A A A . G T G G - A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. serrata</i> TW	T . T . . A . G G A T . . . C A G A A A A . G T G G - A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. tranquebarica</i> TL	T A T A . A G G . . T A . A . A A G . . A . A . G . . . A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. tranquebarica</i> TW	T A T A . A G G . . T A . A . A A G . . A . A . G . . . A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. paramamosain</i> TW	T . T G . A T T G T . A G A . A A G . T T . . A . A G C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. paramamosain</i> CN	T . T A . A T T G T . A G A . A A G . T T . . A . A G C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. paramamosain</i> VN	T . T G . A T T . T . A G A . A A G . T T . . A . A G C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<i>S. paramamosain</i> TL	T . T G . A T T G T . A G A . A A G . T T . . A . A G C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
S. sp2	T . T G C R T T G T . A G A . A A G . T T . . A . A G C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					



Hình 1: Quan hệ phát sinh chủng loại giữa các loài của giống *Scylla* theo phương pháp Maximum Likelihood, số ở các gốc là giá trị bootstrap (%)

Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood được thể hiện ở Hình 1, trình tự loài *Portunus pelagicus* được sử dụng làm tham chiếu ngoài nhóm. Mô hình phân tích lựa chọn là mô hình Tamura 3 tham số với phân phối Gamma (BIC = 1832.934, AICc = 1634.954, lnL = -787.307, $\gamma = 0.26$, R = 4.41).

Cây phát sinh chủng loại thể hiện nguồn gốc hình thành các loài rõ ràng, với giá trị bootstrap cao (> 80%). Cây phát sinh loài cũng thể hiện sự phân hóa di truyền giữa các loài: Loài *S. olivacea* tách biệt thành nhánh riêng và phân rẽ trước so với các loài còn lại. 3 loài *S. paramamosain*, *S. tranquebarica* và *S. serrata* được hình thành từ một gốc phát sinh chung gần nhau hơn và phân rẽ muộn hơn. Ở nhánh phát sinh 3 loài của này, *S. tranquebarica* có ít biến đổi so với tổ tiên chung, còn *S. serrata* có sự tiến hóa nhanh hơn 2 loài của nằm cùng nhánh.

III. KẾT LUẬN

Đã xác định được trình tự gen 16S RNA ribosomal (16S-rDNA) với kích thước phân tử 562 bp từ 02 mẫu của xanh ở vùng biển thuộc tỉnh Cà Mau. Trên cơ sở phân tích đặc điểm phân tử đoạn trình tự này đã định loại 02 mẫu của trên thuộc loài *S. olivacea* và *S. paramamosain* phân bố ở vùng biển thuộc tỉnh Cà Mau. Đã tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loại và đánh giá quan hệ phát sinh chủng loại giữa một số quần thể của các loài của giống *Scylla*

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, Hawai'i, November 10-12, 1999. UJNR Technical Report No. 28: 9-13.

3. **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, 31-34.
4. **Keenan, C.P.**, 1999: Proceedings of an international scientific forum held in Darwin, Australia, 21-24 April 1997, pp. 52-58.
5. **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, 180-187.
6. **Nicholas, Karl B, Hugh B Jr.**, 1997: GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.
7. **Sugama, K. and J. H. Hutapea**, 1999: Genetic characterization in the mud crab *Scylla*
8. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S.**, 2011: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (published).
9. **Thái Thanh Bình, Nguyễn Văn Việt, C Austin**, 2009: Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2009. Thái Nguyên, 26-27/11/2009, 54-57.

SEQUENCE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL 16S RNA RIBOSOMAL GENE OF MUD CRABS (GENUS *SCYLLA*) IN VIETNAM

NGUYEN GIANG SON, DO VO ANH KHOA.
NGUYEN VAN CHUNG, NGUYEN THI DIEU THUY

SUMMARY

Partial DNA sequence of 16S ribosomal gene of mitochondrial genome (16S-rDNA) with the length of 496 bp of two mud crab samples collected in Ca Mau province, Vietnam, labeled sp1 and sp2 respectively, were sequenced and analyzed. The comparison results showed that sp1 sample belongs to *S. olivacea* and sp2 belongs to *S. paramamosain* with more than 98% nucleotide identities with corresponding sequences. Phylogenetic trees based on the 16S-rDNA sequences revealed the genetic relationships among species within genus *Scylla*. They have identical genetic variations. *S. olivacea* evolved early and created a separate branch. Three species including *S. paramamosain*, *S. tranquebarica* and *S. serrata* belonged to another branch and divided simultaneously. *S. tranquebarica* possesses more primitive characteristics with only some changes compared with its common ancestry. Many nucleotide substitutions were found in *S. serrata*. This study confirms the distribution of *S. olivacea* and *S. paramamosain* in Ca Mau and contributes to the taxonomy of *Scylla* in Vietnam.