

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA TUYẾN TRÙNG *Caenorhabditis briggsae* Ở TỈNH NINH BÌNH, ĐỒNG NAI VÀ LÂM ĐỒNG, VIỆT NAM

Lê Thọ Sơn^{1,*}, Hà Bích Hồng¹, Bùi Thị Mai Hương¹, Nguyễn Thị Thu¹

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Caenorhabditis briggsae là một trong số các loài tuyến trùng lưỡng tính và tự thụ tinh trong. Loài này là mục tiêu mô tả trong chuỗi nghiên cứu đa dạng của giống *Caenorhabditis* ở những khu bảo tồn thiên nhiên. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập, nuôi cấy và mô tả phân tử của loài *C. briggsae* phân bố ở Vườn Quốc gia Cát Tiên (tỉnh Đồng Nai và Lâm Đồng) và Cúc Phương (tỉnh Ninh Bình) của Việt Nam. Kết quả nghiên cứu đã phân lập và nuôi cấy nhân tạo được 17 chủng *C. briggsae* thu từ Vườn Quốc gia Cát Tiên và 10 chủng thu từ Vườn Quốc gia Cúc Phương. Độ tương đồng phân tử của trình tự 18S rDNA giữa các chủng giao động từ 99,53% đến 100% so với đối chứng *C. briggsae* AF16. Kết quả này cho thấy tiềm năng đa dạng cao của loài tuyến trùng *C. briggsae* ở Việt Nam. Tiếp theo, chúng tôi hướng tới sử dụng các chủng tuyến trùng *C. briggsae* từ hai Vườn để nghiên cứu mối quan hệ cấu trúc gen và tính đa hình tính trạng nói chung.

Từ khóa: *Caenorhabditis briggsae*, tuyến trùng, DNA barcoding, nuôi cấy, phân lập

GENETIC BIODIVERSITY OF THE NEMATODE *Caenorhabditis briggsae* FROM NINH BINH, DONG NAI, AND LAM DONG PROVINCES, VIETNAM

Le Tho Son^{1,*}, Ha Bich Hong¹, Bui Thi Mai Huong¹, Nguyen Thi Thu¹

¹ Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Caenorhabditis briggsae is hermaphroditic nematode species. This species is targeted in the biodiversity research of the nematode genus *Caenorhabditis* in ecological systems of national parks. In this research, we conducted the isolation, cultivation and genetic diversity of the nematode *C. briggsae* from Cuc Phuong and Cat Tien National Parks in Vietnam. In the results, we successfully found 17 new *C. briggsae* strains in Cat Tien while 10 in Cuc Phuong. The analyses of the 18S rDNA sequences presented the identities of 99.53% to 100% to the control *C. briggsae* AF16. This indicated the rich biodiversity of *C. briggsae* in the ecological systems within national parks. In the future, we possibly use the numerous strains for the trait-to-genetics diversity within.

Keywords: *Caenorhabditis briggsae*, cultivation, DNA barcoding, isolation, nematode

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các loài tuyến trùng thuộc giống *Caenorhabditis* đã trở thành mô hình cho rất nhiều nghiên cứu liên quan tới sinh học, trong đó loài *Caenorhabditis briggsae* là một trong những loài có vai trò nổi bật trong nghiên cứu tìm hiểu chức năng gen (Brenner, 1973; Gupta, *et al.*, 2007). Khi những nghiên cứu đa dạng sinh học gắn liền với đa dạng di truyền phân tử vượt ra khỏi khuôn khổ một hoặc một số loài thì nhu cầu có được nhiều loài và chủng tự nhiên ngày càng lớn (Nuez & Felix, 2012).

Cho tới nay có khoảng 60 loài tuyến trùng *Caenorhabditis* đã được phân lập trên toàn thế giới, trong đó phần lớn là từ châu Á, châu Mỹ và một số từ châu Âu (*Caenorhabditis* Evolution Community, 2020). Với sự phát hiện thêm từ Việt Nam, số lượng này còn tăng lên theo thời gian (Le *et al.*, 2017; Le *et al.*, 2021). Sự tăng trưởng số lượng tuyến trùng được phân lập sẽ giúp con người hiểu hơn về sự hiện diện và tính chất đa dạng của nhóm tuyến trùng *Caenorhabditis*.

Mỗi chủng tự nhiên có thể không giống với những chủng khác cùng loài vì lịch sử tiến hóa giữa chúng không giống nhau. Thông thường, sự đa dạng liên kết như vậy đều bắt nguồn từ khác biệt căn bản nào đó trong hệ gen, ví dụ sự khác biệt gen cơ bản đã làm cho những chủng *C. elegans* có tuổi thọ khác nhau (Croll *et al.*, 1977; Chen, 2011). Sự đa dạng chủng tự nhiên cũng sẽ gắn liền với sự đa dạng đặc điểm, cấu trúc và chức năng của sinh vật, ví dụ sự khác biệt nucleotide (SNP) trong hệ gen của *C. elegans* (Barriere & Felix, 2005) hay *C. inopinata* (Kanzaki *et al.*, 2018) dẫn tới tính đa hình. Tuy nhiên, xét về một tính trạng giữa những tuyến trùng mà có lịch sử tiến hóa không giống nhau thì tính trạng đó có sự giống hay khác nhau vẫn còn là ẩn số vì chưa thực sự có nhiều nghiên cứu minh chứng ở những mức độ hiện tượng cho tới phân tử. Vì vậy, tìm

kiếm và mô tả đặc điểm những loài và chủng tuyến trùng tự nhiên để bổ sung vào cơ sở dữ liệu là vô cùng cần thiết đối với những nghiên cứu đa dạng nói chung ở quy mô giống và ngoài giống tuyến trùng *Caenorhabditis* trong tương lai.

Tuyến trùng *Caenorhabditis* phân bố rộng ở những vùng nhiệt đới cận xích đạo là những vùng ẩm ướt, nhiệt độ ôn hòa và có thảm thực vật phong phú, ví dụ như khu vực Đông Nam Á (Felix *et al.*, 2013). Lãnh thổ Việt Nam là một trong những vùng sinh thái có những điều kiện như vậy và cần được tiến hành nghiên cứu sự đa dạng của tuyến trùng *Caenorhabditis* ở Việt Nam. Chúng tôi đã tiến hành điều tra sự hiện diện của tuyến trùng *Caenorhabditis* và thấy rằng có sự phong phú của nhóm sinh vật này tại những khu bảo tồn thiên nhiên. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập, nuôi cấy và tính đa dạng di truyền của tuyến trùng *C. briggsae* tự nhiên ở Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cúc Phương.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập và nuôi cấy tuyến trùng

Phương pháp phân lập và nuôi cấy tuyến trùng theo phương pháp của (Le *et al.*, 2021). Lấy khoảng 10 g mẫu thực vật (mùn lá rụng đang phân huỷ, hoa và quả chín) đang trong quá trình thối rữa thu từ những địa điểm khác nhau tại Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cúc Phương để ủ trên đĩa Petri có môi trường NcM18 đã nuôi trải *Escherichia coli* OP50 trong 03 ngày ở nhiệt độ phòng (khoảng 25°C) (Hình 1A-C). Tiếp sau đó, trung bình 02 cá thể tuyến trùng trưởng thành chọn lọc được nuôi cấy tiếp tục trên môi trường NcM18 và NGM có nuôi trải *E. coli* OP50 ở nhiệt độ (19 ± 1)°C. Sau đó phân loại hình thái chung (ví dụ hình thái tròn thuôn hai đầu và độ dài khoảng 2 mm) và có thực quản/hầu với cấu trúc kiểu “2 bóng đèn tròn (bulb)” (Barriere, 2006).

2.2. Xác định loài tuyến trùng bằng DNA barcoding

Phương pháp thu dung dịch DNA tổng số được áp dụng là “Single Worm Lysis” (Ahringer, 2006). Trình tự 18S rDNA được khuếch đại bằng PCR cùng với primer (SSU18A (5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3') và SSU26R (5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG-3') (Barriere, 2006)). Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit tinh sạch, giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu 18S rDNA của “the

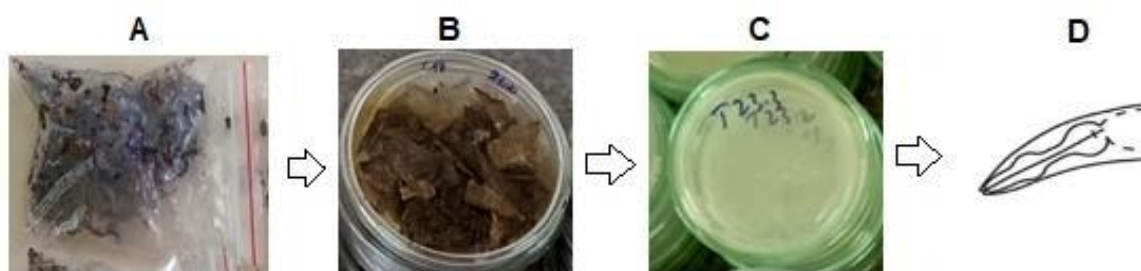
National Center for Biotechnology Information (NCBI)”.

2.3. Phân tích phát sinh chủng

Các trình tự nucleotide của những đoạn 18S rDNA không cắt ghép thu được từ phản ứng khuếch đại PCR bằng phần mềm và giải trình tự được sử dụng làm cơ sở dữ liệu xây dựng quan hệ chủng loại của *C. briggsae* trong nghiên cứu này. Cây quan hệ chủng loại được thực hiện bằng phương pháp Neighbor-joining trong phần mềm MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập tuyến trùng



Hình 1. Các bước căn bản phân lập tuyến trùng từ lá cây đang phân huỷ.

A- Túi mẫu thực vật đang phân huỷ; B- Mẫu thực vật được ủ trên đĩa (9 cm) môi trường NcM18 + *E. coli* OP50; C- Cá thể tuyến trùng được nuôi trên đĩa (5 cm) môi trường NGM + OP50; D- Tuyến trùng *Caenorhabditis* có thực quản kiểu “2 bóng đèn tròn”.

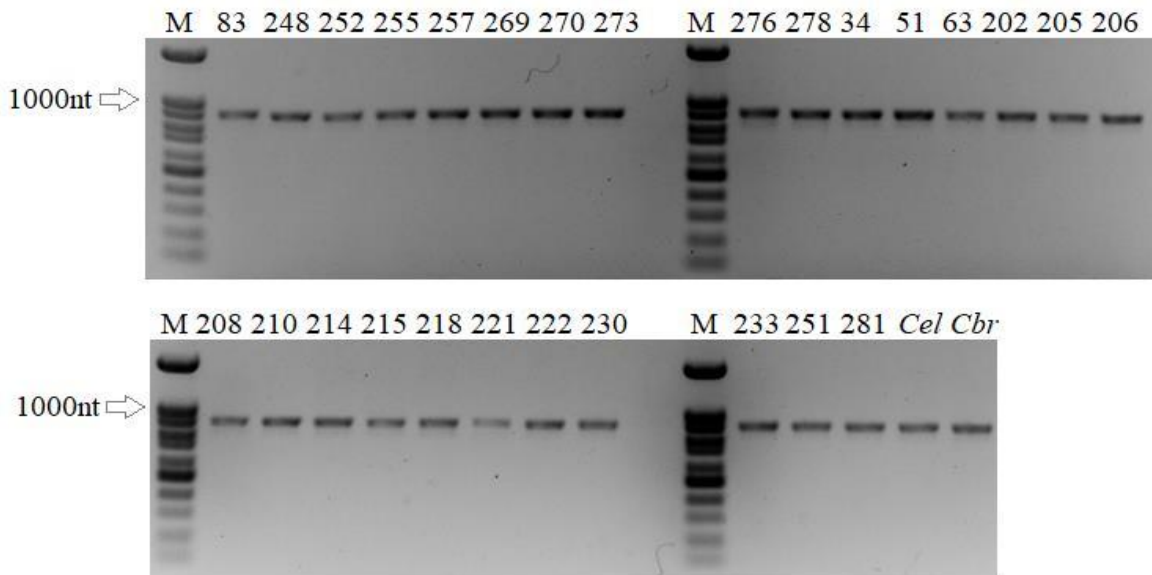
Sau thời gian ủ mẫu trên đĩa nuôi cấy, tuyến trùng bắt đầu xuất hiện trên mặt đĩa. Mỗi một cá thể tuyến trùng trưởng thành có những đặc điểm kích thước, cơ thể trong suốt và kiểu bò lượn sóng dưới kính hiển vi (độ phóng đại 4X) tương tự *C. elegans* xuất hiện trên bề mặt đĩa trải mẫu thực vật NcM18 hoặc NGM + *E. coli* OP50 được chuyển qua 01 đĩa nuôi cấy NcM18 hoặc NGM + *E. coli* OP50. Để tạo chủng, mỗi cá thể mang trứng được tiếp tục nuôi cấy trên đĩa trong 07 tới 10 ngày để sinh sản một số thế hệ tiếp theo (> 5). Những chủng này được quan sát hình thái hầu/họng dưới kính hiển vi (độ phóng đại 40X), chủng tuyến trùng được dự

đoán là *Caenorhabditis* cần có đặc điểm hình thái thực quản/hầu (pharynx) điển hình có “2 bóng đèn tròn” (Hình 1). Trong số những chủng được kiểm tra, một lượng lớn (khoảng 100) chủng đã được chọn lọc ra từ đĩa nuôi cấy. Thêm nữa, hầu hết các chủng này đều xuất hiện hai giới (đực và cái) tương tự như những loài đơn tính thuộc giống tuyến trùng *Caenorhabditis* để thực hiện xác định trình tự 18S rDNA. Như vậy, những loài tuyến trùng *Caenorhabditis* xuất hiện nhiều trong mẫu mùn thực vật ở Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cúc Phương.

Kết quả thể hiện được sự hiện diện “phong phú” của nhóm chủng loài *C. briggsae* trong những nơi thu mẫu như dự báo. Rất có thể số lượng chủng thuộc nhóm loài này còn nhiều hơn nữa vì số lượng mẫu thu nhận còn hạn chế trong 2 vườn bảo tồn. Hiện nay, những nghiên cứu sự đa dạng loài và chủng thuộc giống tuyến trùng *Caenorhabditis* vẫn đang được tiếp tục trong đó có *C. brenneri* (Le, Nguyen, 2021). Tập hợp những nghiên cứu này sẽ cho thấy tổng quan đa dạng tuyến trùng *Caenorhabditis*.

Quá trình phân lập cần nhiều kinh phí cho việc tạo môi trường nuôi cấy. Có thể sử dụng môi trường thông dụng là NGM + *E. coli* OP50 và NcM18 + *E. coli* OP50 để thực hiện bước phân lập cá thể và nuôi cấy cá thể thành chủng riêng biệt. Tuy nhiên, NcM18 là môi trường có “giá thành thấp” và chủ động tạo ra dựa vào nguồn nguyên liệu xuất hiện phổ biến trong đời sống Việt Nam so với môi trường phổ thông NGM là môi trường giá cao hơn phổ biến ở những nước phát triển và nguyên liệu phụ thuộc vào những hóa chất công nghiệp tinh sạch.

3.2. Phân tích phân tử xác định thành phần loài



Hình 2. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose gel.

M- Chỉ thị kích thước DNA; Con số ở trên mỗi sản phẩm PCR tương ứng (độ lớn gần với vạch 1000nt) của 27 chủng *C. briggsae* (CFB83 tới 278 từ Vườn Quốc gia Cúc Phương và CFB34 tới 281 từ Vườn Quốc gia Cát Tiên); *Cel* và *Cbr* - Đối chứng từ loài *C. elegans* N2 và *C. brenneri* CFB50 (Le & Nguyen, 2021).

Tiếp theo phân lập mô tả đặc điểm của tuyến trùng thuộc giống *Caenorhabditis*, nuôi cấy, các chủng tuyến trùng được xác định thành phần loài dựa vào trình tự DNA barcode. Trình tự 18S rDNA của mỗi một trong số 27 chủng

được khuếch đại bằng PCR cho sản phẩm khoảng 800 tới dưới 900 nucleotide (nt) (Hình 2). Sản phẩm PCR được gửi tới dịch vụ giải trình tự DNA để thu nhận trình tự nucleotide của mỗi chủng.

Bảng 1. So sánh trình tự 18S rDNA của những chủng *C. briggsae* trong nghiên cứu này với cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI)

Số thứ tự	Ký hiệu chủng	Mã GenBank (NCBI)	Xuất xứ mẫu	Mức độ giống (trình tự so sánh) [‡]
1	CFB83	OQ927242	Vườn Quốc gia Cúc Phương (tỉnh Ninh Bình)	99,53% (MN519141.1)
2	CFB248	OQ921598		100% (MN519141.1)
3	CFB252	OQ921594		99,65% (MN519141.1)
4	CFB255	OQ921596		99,88% (MN519141.1)
5	CFB257	OQ921597		99,88% (MN519141.1)
6	CFB269	OQ921602		99,65% (MN519141.1)
7	CFB270	OQ921601		99,53% (MN519141.1)
8	CFB273	OQ921603		99,76% (MN519141.1)
9	CFB276	OQ927241		100% (MN519141.1)
10	CFB278	OQ921605		100% (MN519141.1)
11	CFB34	OQ921606	Vườn Quốc gia Cát Tiên (tỉnh Đồng Nai và Lâm Đồng)	99,64% (MN519141.1)
12	CFB51	OQ921607		100% (MN519141.1)
13	CFB63	OQ921600		99,41% (MN519141.1)
14	CFB202	OQ921592		99,76% (MN519141.1)
15	CFB205	OQ921589		99,76% (MN519141.1)
16	CFB206	MZ467311		99,65% (MN519141.1)
17	CFB208	OQ921590		99,88% (MN519141.1)
18	CFB210	OQ921588		99,88% (MN519141.1)
19	CFB214	OQ921587		99,76% (MN519141.1)
20	CFB215	OQ921586		100% (MN519141.1)
21	CFB218	OQ921593		99,76% (MN519141.1)
22	CFB221	OQ921608		99,65% (MN519141.1)
23	CFB222	OQ921591		99,65% (MN519141.1)
24	CFB230	OQ921599		99,76% (MN519141.1)
25	CFB233	MZ457559		100% (MN519141.1)
26	CFB251	OQ921595		99,88% (MN519141.1)
27	CFB281	OQ921604		99,76% (MN519141.1)

[‡] Sự giống nhau giữa trình tự 18S rDNA của chủng CFB tìm ra trong nghiên cứu với trình tự có mức độ giống nhau cao nhất là với trình tự so sánh MN519141.1 của chủng *C. briggsae* AF16 được công bố trên GenBank (NCBI). Phần bôi màu nâu là mẫu thu từ khu vực Vườn Quốc gia Cát Tiên thuộc tỉnh Lâm Đồng; Phần không bôi là thuộc tỉnh Đồng Nai.

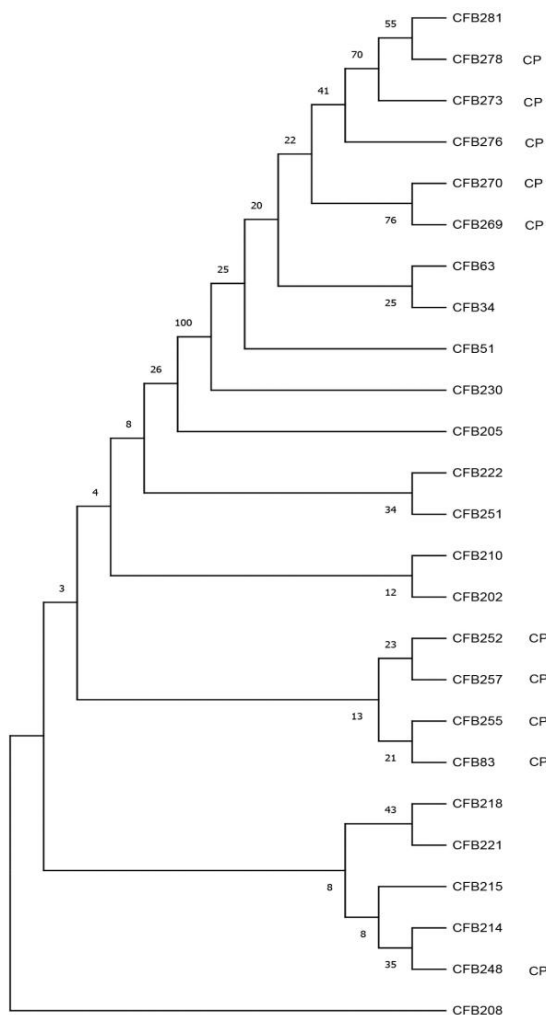
So sánh những trình tự này với cơ sở dữ liệu 18S rDNA của NCBI cho thấy rằng tất cả chủng *C. briggsae* có độ tương đồng từ 99,53% đến 100% so với trình tự so sánh đầu tiên của chủng *C. briggsae* AF16 đã được thế giới phát hiện (Bảng 1). Như vậy, nói chung không có sự khác biệt lớn khi so sánh đoạn nhất định của trình tự 18S rDNA giữa 27 chủng được phân lập bắt nguồn từ hai vườn quốc gia của Việt Nam với chủng cùng loài *C. briggsae* AF16 được phân lập

từ mẫu đất thu tại thành phố Ahmedabad, Ấn độ (Fodor, *et al.*, 1983). Hình dạng quan sát hiển vi (40X) cho thấy rằng 27 chủng này có hình thái phổ biến của các cá thể tuyến trùng thuộc giống *Caenorhabditis*: kích thước cơ thể trưởng thành là khoảng 1 - 2 mm và cơ thể trong suốt (Hình 3). Chú thích: màu xanh trong hình 3 là do màu nền mặc định của phần mềm OptikaView 7 để vận hành Camera 4083.B5 gắn với kính hiển vi Optika B-293.



Hình 3. Cá thể trưởng thành chủng *C. briggsae*. Cơ thể của những chủng *C. briggsae* trong suốt, có thể nhìn xuyên qua.

Phân tích phát sinh chủng loại bằng phương pháp Neighbor-joining với trình tự 18S rDNA của 27 chủng *C. briggsae* cho thấy những hệ số thống kê (bootstrap) thấp, bởi vì có sự khác nhau phức tạp về nucleotide giữa các trình tự (Hình 4).



Hình 4. Mối quan hệ phát sinh của chủng *C. briggsae*. Trình tự 18S rDNA được giữ nguyên bản, không có sự cắt và ghép. CP- Chủng phân lập từ Vườn Quốc gia Cát Tiên; Những chủng còn lại từ Vườn Quốc gia Cát Tiên.

Như vậy, kết quả này phản ánh có sự đa dạng nhất định về chủng của loài *C. briggsae* phân lập từ hai vườn quốc gia.

Dựa vào phân tích trình tự 18S rDNA bằng phương pháp phân tích Neighbor-joining, 27 chủng *C. briggsae* phân lập trong nghiên cứu này cho thấy sự khác nhau. Hai nhóm loài từ 02 vườn quốc gia có xu thế “tách nhau” chứ không phải “đan xen” tồn tại, điều này cho thấy có thể có xu thế biệt hóa di truyền đã xuất hiện giữa hai nhóm. Sự phân ly di truyền có thể phản ánh lịch sử tiến hóa lâu đời của mỗi nhóm trong hệ sinh thái mỗi khu bảo tồn mà chúng phát triển và tồn tại qua rất nhiều thế hệ. Chúng tôi cho rằng số lượng chủng *C. briggsae* còn lớn hơn hiện tại nếu có nghiên cứu sâu rộng hơn ở những địa điểm khác ở Việt Nam, như vậy sự đánh giá đa dạng di truyền của *C. briggsae* sẽ được toàn diện hơn. Vì vậy hy vọng rằng *C. briggsae* có thể được sử dụng làm sinh vật mô hình nghiên cứu đa dạng phân tử hỗ trợ cho mô hình phổ biến hiện tại là *C. elegans*.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy rằng 27 chủng tuyến trùng *C. briggsae* đã được phân lập từ mẫu thực vật ở Vườn Quốc gia Cát Tiên và Cát Tiên. Chúng được nuôi cấy nhân tạo thành công và mô tả phân loại phân tử mức độ 18S rDNA. Có nhiều sự khác biệt giữa các trình tự nucleotide của 18S rDNA dẫn tới tính đa dạng di truyền giữa các chủng *C. briggsae*.

Lời cảm ơn: Chúng tôi gửi lời cảm ơn tới cán bộ Vườn Quốc gia Cát Tiên và Vườn Quốc gia Cát Tiên đã hỗ trợ trong quá trình thu mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahringer J., 2006. Reverse genetics. WormBook. WormBook, The *C. elegans* Research Community.
2. Barriere A. and M.A. Felix, 2005. "High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations." *Curr Biol* 15(13): 1176 - 1184.
3. Barriere A., Felix, M. A., 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. WormBook. T. C. e. R. Community, WormBook: 1 - 9.
4. Brenner S., 1973. "The genetics of behaviour." *Br Med Bull* 29(3): 269 - 271.
5. Caenorhabditis Evolution Community, 2020. List of available Caenorhabditis species and the state of their genome projects.
6. Chen H.H., 2011. Impact of natural sequence variation on aging in the recombinant inbred lines of *Caenorhabditis elegans*, ProQuest, UMI Dissertation Publishing.
7. Croll N.A., J.M. Smith and B.M. Zuckerman, 1977. "The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture." *Exp Aging Res* 3(3): 175 - 189.
8. Felix M.A., R. Jovelin, C. Ferrari, S. Han, Y.R. Cho, E.C. Andersen, A.D. Cutter and C. Braendle, 2013. "Species richness, distribution and genetic diversity of Caenorhabditis nematodes in a remote tropical rainforest." *BMC Evol Biol* 13(10): 1 - 13.
9. Fodor A., D.L. Riddle, F.K. Nelson and J.W. Golden, 1983. "Comparison of a new wild-type *Caenorhabditis briggsae* with laboratory strains of *C. briggsae* and *C. elegans*". *Nematologica* 29: 203 - 217.
10. Gupta B.P., R. Johnsen and N. Chen, 2007. "Genomics and biology of the nematode *Caenorhabditis briggsae*." WormBook: 1 - 16.
11. Kanzaki N., I.J. Tsai, R. Tanaka, V.L. Hunt, D. Liu, K. Tsuyama, Y. Maeda, S. Namai, R. Kumagai, A. Tracey, N. Holroyd, S.R. Doyle, G.C. Woodruff, K. Murase, H. Kitazume, C. Chai, A. Akagi, O. Panda, H.M. Ke, F.C. Schroeder, J. Wang, M. Berriman, P.W. Sternberg, A. Sugimoto and T. Kikuchi, 2018. "Biology and genome of a newly discovered sibling species of *Caenorhabditis elegans*". *Nat Commun* 9(1): 3216.
12. Le T.S. and H.D. Nguyen, 2021. "Isolation, cultivation, and lifespan of the nematode *Caenorhabditis brenneri* in Vietnam".
13. Le T.S., T.T.H. Nguyen, B. Thi Mai Huong, H.G. Nguyen, B.H. Ha, V.S. Nguyen, M.H. Nguyen, H.H. Nguyen and J. Wang, 2021. "Cultivation of *Caenorhabditis elegans* on new cheap monoxenic media without peptone". *J Nematol* 53.
14. Le T.S., F.J. Yang, Y.H. Lo, T.C. Chang, J.C. Hsu, C.Y. Kao and J. Wang, 2017. "Non-Mendelian assortment of homologous autosomes of different sizes in males is the ancestral state in the *Caenorhabditis* lineage". *Sci Rep* 7(1): 12819.
15. Nuez I. and M.A. Felix, 2012. "Evolution of susceptibility to ingested double-stranded RNAs in *Caenorhabditis* nematodes." *PLoS One* 7(1): e29811.
16. Tamura K., G. Stecher and S. Kumar, 2021. "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11". *Mol Biol Evol* 38(7): 3022 - 3027.

Email tác giả liên hệ: sonlt@vnuf.edu.vn

Ngày nhận bài: 15/05/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 18/05/2023

Ngày duyệt đăng: 24/05/2023