

Nghiên cứu môi trường nuôi trồng tạo stroma nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)

Nguyễn Thị Ngọc Sương*, Trần Minh Mẫn, Nguyễn Đỗ Thanh Phương

Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao

Ngày nhận bài 22/6/2016, ngày chuyển phản biện 30/6/2016, ngày nhận phản biện 11/8/2016, ngày chấp nhận đăng 15/8/2016

Trong nghiên cứu này, nấm *Cordyceps militaris* được sử dụng là chủng CM3 được lưu trữ trong bộ sưu tập của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao. Kết quả thu được khi nghiên cứu trên 9 môi trường cho thấy môi trường tối ưu nhất là M9 (có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, CaCl_2 0,1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, nước 90 ml). Trọng lượng tươi, trọng lượng khô và số lượng stroma thu được ở môi trường M9 có kết quả lần lượt là 19,54 g/bình, 3,8404 g/bình, 70,3 stroma/bình. Hàm lượng một số hoạt chất chủ yếu có trong stroma đã được xác định, bao gồm cordycepin (7,7551 mg/g), adenosine (2,0027 mg/g), polysaccharide (166,20 mg/g), ergosterol (1,7369 mg/g).

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, môi trường nuôi trồng thích hợp.

Chỉ số phân loại 4.6

A study into stroma cultivation medium of *Cordyceps militaris*

Summary

In this study, *Cordyceps militaris* strain CM3 stored in the collection of Research and Development Center for High Technology Agriculture was used. 9 media for *C. militaris* cultivation were investigated, and the optimal cultivation medium was found as M9 which consisted of the following components: brown rice 60 g, silkworm pupae 10 g, CaCl_2 0.1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, distilled water 90 ml; this medium is suitable for stroma production of *C. militaris*. Fresh weight, dry weight, and the number of stroma reached 19.54 g/bottle, 3.8404 g/bottle, 70.3 stroma/bottle, respectively. Biologically active substance contents of *Cordyceps militaris* stroma are adenosine (2.0027 mg/g), cordycepin (7.7551 mg/g), polysaccharide (166.20 mg/g), ergosterol (1.7369 mg/g).

Keywords: *Cordyceps militaris*, cultivation medium.

Classification numbers 4.6

Đặt vấn đề

Nhộng trùng thảo là loài nấm thuộc chi nấm *Cordyceps* (Fr.) Link thuộc lớp Ascomycetes, được tìm thấy trên ấu trùng, côn trùng trưởng thành. *Cordyceps* có một lịch sử lâu đời như một loại nấm được liệu quý hiếm. Hầu hết người phương Tây chỉ biết đến *Cordyceps* trong vòng 20 năm gần đây, trong suốt khoảng thời gian này, các phương pháp khoa học hiện đại được ứng dụng mạnh mẽ để nghiên cứu phạm vi ứng dụng rộng rãi trong y học của nhóm nấm này [1]. Nấm *Cordyceps* được cho là có khả năng chống ung thư, chống di căn, chống oxy hóa, chống viêm, diệt khuẩn, hạ đường huyết, chống lão hóa, bảo vệ thần kinh và bảo vệ thận [2, 3], tăng cường hệ thống miễn dịch và ức chế khối u [4]. *Cordyceps* đã được thu mẫu và miêu tả trên 400 loài khác nhau ở các vùng khác nhau trên thế giới. Trong đó có nhiều loài được chú ý nhiều đến được lý và dùng làm thuốc chữa bệnh với 2 loài chính là *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris*.

Hiện nay, Nhộng trùng thảo có nguồn gốc tự nhiên rất hiếm, giá rất cao, trong khi đó nhu cầu của con người ngày càng tăng. Do đó, cần có một nguồn cung cấp Nhộng trùng thảo số lượng lớn với chất lượng cao. Để đáp ứng yêu cầu này, mô hình công nghệ sản xuất Nhộng trùng thảo *in vitro* trên nguồn cơ chất sẵn có, dễ tìm, giá thành thấp đã được quan tâm nghiên cứu.

Cordyceps là dạng nấm ký sinh có thể nuôi cấy nhân tạo trên cơ thể côn trùng nhưng côn trùng có giá cao và

*Tác giả liên hệ: ngocsuongnguyen10@gmail.com

không có nguồn cung liên tục [5], thêm vào đó thao tác trên côn trùng khó và dễ nhiễm khuẩn nên những chất hữu cơ thay thế được nghiên cứu và thử nghiệm cho việc sản xuất thương mại stroma *C. militaris*. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định môi trường nuôi trồng thích hợp cho Nhộng trùng thảo, từ đó ứng dụng vào sản xuất tạo ra một lượng lớn stroma Nhộng trùng thảo trong thời gian ngắn, với chi phí thấp nhưng chất lượng cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: *C. militaris* CM3 thuộc bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao.

Môi trường thí nghiệm có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, nước cất 90 ml có bổ sung chất khoáng 0,1 g/l và vitamin 5 µg/l. Chất khoáng được sử dụng là KH_2PO_4 , MgSO_4 hoặc CaCl_2 . Vitamin được sử dụng là thiamin, biotin hoặc folic acid.

Các nghiệm thức bao gồm:

M0 (đối chứng): không bổ sung khoáng và vitamin;

M1: có bổ sung KH_2PO_4 + thiamin;

M2: có bổ sung KH_2PO_4 + biotin;

M3: có bổ sung KH_2PO_4 + folic acid;

M4: có bổ sung MgSO_4 + thiamin;

M5: có bổ sung MgSO_4 + biotin;

M6: có bổ sung MgSO_4 + folic acid;

M7: có bổ sung CaCl_2 + thiamin;

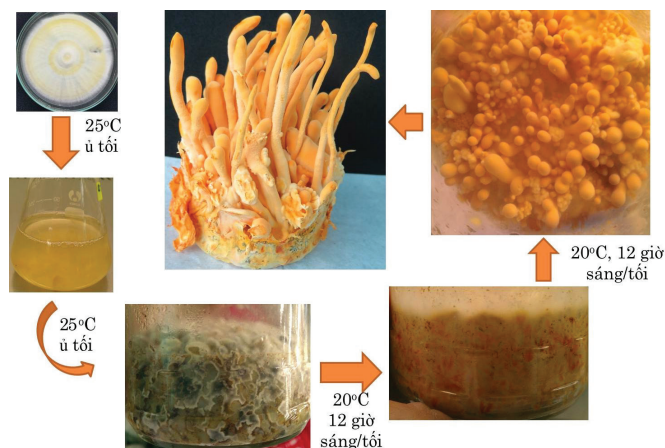
M8: có bổ sung CaCl_2 + biotin;

M9: có bổ sung CaCl_2 + folic acid.

C. militaris CM3 được nuôi cấy tĩnh trên môi trường PGB (potato glucose broth) trong 5 ngày ở nhiệt độ 25°C, ủ tối để tạo nguồn giống cho thí nghiệm. Môi trường PGB có thành phần gồm khoai tây 200 g/l, glucose 20 g/l.

Môi trường nuôi trồng được chuẩn bị theo công thức thí nghiệm và được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 40 phút. Giống dạng lỏng được cấy vào môi trường cơ chất với lượng giống là 5 ml/bình. Các bình nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 25°C trong tối. Sau khi tơi phủ kín cơ chất, các mẫu thí nghiệm được nuôi trồng trong điều kiện 20°C, chu kỳ chiếu sáng 12

giờ sáng/tối, cường độ ánh sáng 700-1.000 lux, độ ẩm không khí 80-90%.



Sơ đồ: quy trình nuôi trồng *C. militaris*

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu thập sau 50 ngày nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi là trọng lượng tươi (g/bình), trọng lượng khô (g/bình), số lượng stroma (stroma/bình), hàm lượng adenosine (mg/g), hàm lượng cordycepin (mg/g), hàm lượng ergosterol (mg/g) và hàm lượng polysaccharide (mg/g).

Trọng lượng tươi của stroma được ghi nhận ngay sau khi stroma được lấy ra khỏi bình nuôi cấy. Stroma của từng bình được đem sấy khô ở nhiệt độ 50°C đến trọng lượng không đổi. Các chỉ tiêu này được thu nhận bằng cân phân tích có độ chính xác cao. Số lượng stroma được đếm là số stroma có chiều cao lớn hơn 3 cm.

Stroma được phân tích hàm lượng hoạt chất cordycepin, adenosine và ergosterol bằng phương pháp HPLC-DAD và hàm lượng polysaccharide bằng phương pháp so màu tại Viện Công nghệ hóa học (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam).

Tất cả số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1.3.

Kết quả và thảo luận

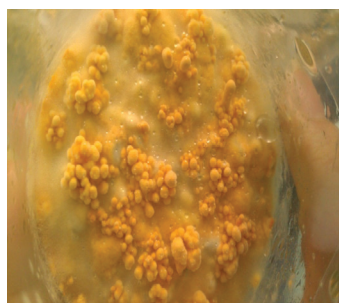
Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp

Ở nghiên cứu này, sau 50 ngày nuôi cấy stroma được thu hoạch. Tuy nhiên, chỉ có môi trường M2, M8, M9 tạo stroma rõ ràng. Các môi trường M0, M1, M3, M4, M5, M6, M7 tuy có tạo mầm stroma nhưng không tạo được stroma lớn. Sau khi phát triển đến chiều cao

hơn 1 cm, mầm stroma ở các công thức thí nghiệm này bị bao bọc bởi sợi nấm dày đặc và ngừng phát triển.



Hình 1: tơ nấm *C. militaris* phát triển trên môi trường gạo



Hình 2: mầm stroma hình thành trên môi trường gạo

Sau khi kết thúc thí nghiệm, stroma được cân đo trọng lượng tươi, trọng lượng khô và đếm số lượng stroma. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của một số môi trường đến sự tạo thành stroma *Nhộng trùng thảo (C. militaris)*

Môi trường	FW (g/bình)	DW (g/bình)	FB	F (%)
M0 (đối chứng)	-	-	-	-
M1 (KH ₂ PO ₄ + thiamin)	-	-	-	-
M2 (KH ₂ PO ₄ + biotin)	11,78 ^c	2,3735 ^b	9,5 ^b	5,08
M3 (KH ₂ PO ₄ + folic acid)	-	-	-	-
M4 (MgSO ₄ + thiamin)	-	-	-	-
M5 (MgSO ₄ + biotin)	-	-	-	-
M6 (MgSO ₄ + folic acid)	-	-	-	-
M7 (CaCl ₂ + thiamin)	-	-	-	-
M8 (CaCl ₂ + biotin)	12,70 ^b	2,1666 ^b	8,9 ^b	4,64
M9 (CaCl ₂ + folic acid)	19,54 ^a	3,8404 ^a	70,3 ^a	8,23

Các trung bình cùng ký tự không khác biệt có nghĩa thống kê ở mức xác suất $p < 0,05$

FW: trọng lượng tươi của stroma trên một bình nuôi cấy;

DW: trọng lượng khô của stroma trên một bình nuôi cấy;

FB: số stroma trên một bình nuôi cấy;

F: tỷ lệ giữa trọng lượng khô của stroma và cơ chất = $DW \times 100 / 46,66$

Theo kết quả ở bảng 1, môi trường M9 (gạo và nhộng tằm bổ sung CaCl₂ và folic acid) có trọng lượng tươi, trọng lượng khô và số lượng stroma cao hơn các môi trường còn lại. Ở nghiên cứu này, kết quả chỉ thu được ở 3/9 nghiệm thức nên chưa thể nêu lên tác động của khoáng và vitamin đến sự hình thành và phát triển stroma *Nhộng trùng thảo* trên môi trường gạo và nhộng tằm.

Trong nghiên cứu của Kang và cs (2014), 1 bình môi trường gồm 20 g gạo và 32 ml dung dịch dinh dưỡng (10 g/l glucose, 10 g/l peptone, 1 g/l MgSO₄·7H₂O, 1 g/l K₂HPO₄ và 1 mg/l NAA, 1.000 ml nước cất, pH

6,0) trọng lượng khô stroma thu được là 1,73 g sau 60 ngày nuôi cấy. Hàm lượng cordycepin trong stroma cao nhất là 9,17 mg/g sau 72 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ trọng lượng khô của stroma và trọng lượng của gạo (cơ chất tạo stroma) là $F = 8,65\%$ [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, $F = 8,23\%$. Như vậy kết quả thu được không chênh lệch đáng kể so với nghiên cứu của Kang và cs (2014).

Số lượng stroma của môi trường M9 ở các bình dao động khá lớn (30-150 stroma). Những bình có số lượng stroma ít thì kích thước stroma to và dài. Những bình có số lượng stroma nhiều (trên 100) thì chỉ có một số stroma to, đa số là stroma nhỏ và ngắn. Số lượng stroma trung bình của môi trường M9 cao gấp 7-8 lần so với môi trường M2 và M8 nhưng trọng lượng khô và trọng lượng tươi chỉ cao gấp 1,5 lần.



Môi trường M2



Môi trường M8



Môi trường M9



Môi trường đối chứng



Stroma bị tơ nấm bao phủ

Hình 3: stroma của *C. militaris* hình thành trên môi trường nuôi trồng

Tuy stroma thu được có số lượng stroma to ít nhưng có một số ưu điểm là sau khi được sấy khô, stroma màu cam đậm, cứng và đặc ruột. Một số sản phẩm

Nhộng trùng thảo trên thị trường Việt Nam có một số đặc tính cảm quan như: nhỏ và mềm; to, mềm và rỗng ruột, màu vàng nhạt. Như vậy, có thể xem đây là sản phẩm vượt trội hơn về mặt cảm quan.



Hình 4: stroma *C. militaris* khô thu được từ thí nghiệm

Một số hoạt chất sinh học trong stroma Nhộng trùng thảo

Stroma khô sau khi thu hoạch được phân tích tại Viện Công nghệ hóa học để khảo sát hàm lượng một số hoạt chất có trong stroma nhằm đánh giá sơ bộ chất lượng. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: hàm lượng một số hoạt chất sinh học có trong stroma và môi trường nuôi trồng Nhộng trùng thảo (*C. militaris*)

Tên hoạt chất	Hàm lượng (mg/g)
Cordycepin	7,7551
Adenosine	2,0027
Polysaccharide	166,20
Ergosterol	1,7369

Kết quả thu được cho thấy hàm lượng các hoạt chất cordycepin, adenosine, polysaccharide, ergosterol có trong stroma *C. militaris* CM3 trên môi trường M9 tương đối cao. Trong nghiên cứu của Lo và cs (2013), hàm lượng adenosine trong stroma *C. militaris* là $2,45 \pm 0,03$ mg/g [7]. Theo nghiên cứu của Hur (2008), hàm lượng adenosine trong stroma là 1,8 mg/g và trong hệ sợi nấm là 0,6 mg/g; hàm lượng cordycepin trong stroma là 9,7 mg/g và trong hệ sợi nấm là 3,6 mg/g [8]. Theo nghiên cứu của Kang và cs (2014), hàm lượng cordycepin là 9,17 mg/g, adenosine là 1,21 mg/g [6]. Còn theo Zhoua và cs (2009), hàm lượng ergosterol trong stroma nhân tạo của *Cordyceps* rất cao (10,68 mg/g) [9]. Tuy nhiên, một số sản phẩm Nhộng trùng thảo trên thị trường Việt Nam có hàm lượng cordycepin là 2,9 mg/g; hàm lượng adenosine là 0,43 và 1,1 mg/g. Như vậy, stroma thu được từ nghiên cứu này có hàm

lượng hoạt chất chưa cao bằng một số nghiên cứu trên thế giới nhưng không thua kém một số sản phẩm Nhộng trùng thảo Việt Nam.

Kết quả thu được ở nghiên cứu này là đã tạo được stroma trên môi trường nhân tạo năng suất tương đối cao nhưng hàm lượng hoạt chất chưa cao. Vì vậy cần có nghiên cứu tiếp về phương pháp làm tăng hàm lượng hoạt chất có trong stroma nhằm làm tăng giá trị kinh tế của sản phẩm.

Kết luận

- Môi trường thích hợp cho nuôi trồng Nhộng trùng thảo có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, CaCl_2 0,1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, nước 90 ml. Stroma thu được có trọng lượng tươi là 19,54 g/bình, trọng lượng khô là 3,8404 g/bình và số lượng stroma là 70,3 stroma/bình.

- Hàm lượng một số hoạt chất có stroma Nhộng trùng thảo là cordycepin 7,7551 mg/g, adenosine 2,0027 mg/g, polysaccharide 166,20 mg/g, ergosterol 1,7369 mg/g.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. Holliday, M. Cleaver, S.P. Wasser (2005), "Cordyceps", *Encyclopedia of dietary supplements*, pp.1-13.
- [2] M.G. Shashidhara, P. Giridhar, S.K. Udaya, B. Manohar (2013), "Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement - A review", *Journal of Functional foods*, **5**(3), pp.1013-1030.
- [3] R. Yu, L. Song, Y. Zhao, W. Bin, L. Wang, H. Zhang, Y. Wu, W. Ye, and X. Yao (2004), "Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*", *Fitoterapia*, **75**, pp.465-472.
- [4] Z.Z. Zhao, J.P.S. Yuen, J.L. Wu, et al (2006), "A systematic study on confused species of Chinese Materia Medica in the Hong Kong market", *Ann Acad Med Singap*, **35**, pp.764-769.
- [5] Q.Y. Lin, Y.J. Zhong, T.H. Li et al (2006), "Recent research advances in *Cordyceps* biology", *Acta Edulis Fungi*, **13**(2), pp.93-98.
- [6] J.C. Kang, T.C. Wen, G.R. Li, C. Kang and K.D. Hyde (2014), "Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*", *Chiang Mai J. Sci.*, **41**(4), pp.858-872.
- [7] H.C. Lo, H. Chienyan, Y.L. Fang and T.H. Hsu (2013), "A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChong XiaXao and Relates Bioactive ingredients", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **3**(1), pp.16-32.
- [8] H. Hur (2008), "Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*", *Mycobiology*, **36**(4), pp.233-235.
- [9] X. Zhoua, Z. Gongga, Y. Sua, J. Linb and K. Tang (2009), "Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**(3), pp.279-291.

Sử dụng chỉ thị mã vạch để phân loại ốc hương

Thái Thanh Bình^{1*}, Nguyễn Văn Hà², Lưu Văn Huyền³

¹Trường Cao đẳng thủy sản

²Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III

³Trường Đại học Tài nguyên và môi trường

Ngày nhận bài 8/9/2016, ngày chuyển phản biện 12/9/2016, ngày nhận phản biện 14/10/2016, ngày chấp nhận đăng 21/10/2016

Ốc hương là loài nhuyễn thể có giá trị kinh tế cao. Hiện nay, ốc hương được nuôi phổ biến trong ao và lồng tại các tỉnh như: Phú Yên, Khánh Hòa, Bình Thuận, Kiên Giang. Sản lượng ốc hương cả nước hàng năm đạt trên 7.000 tấn. Nghề nuôi ốc hương phát triển được hơn 15 năm nhưng phân loại ốc hương còn chưa rõ ràng. Nghiên cứu trình bày kết quả phân loại ốc hương được thu từ 7 tỉnh ở Việt Nam bằng mã vạch ADN vùng gen COI (Cytochrome c oxidase subunit I). Trình tự ADN của ốc hương Việt Nam được so sánh với trình tự ADN dữ liệu các loài ốc hương trên ngân hàng gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy, số lượng Haplotype phát hiện được là 6, hệ số đa dạng haplotype là $0,442 \pm 0,124$, hệ số đa dạng nucleotide là 0,0008, ốc hương Việt Nam giống với mẫu ốc hương *Babylonia areolata* ở ngân hàng gen. Kết quả phân tích di truyền phủ hệ cũng xác định ốc hương Việt Nam là loài *Babylonia areolata*.

Từ khóa: ADN mã vạch, *Babylonia areolata*, COI, ốc hương.

Chỉ số phân loại 4.6

Application of DNA barcoding markers to classify Spotted babylon

Summary

Spotted babylon is a high value molluscos species. Nowadays spotted babylons are cultivating popularly in ponds and cages in Phu Yen, Khanh Hoa, Binh Thuan, and Kien Giang provinces. The annual production of spotted babylons is about 7000 tons. Although spotted babylons have been cultured over 15 years, the taxonomy of this species is still unclear. This study presents the taxonomy results of babylon snails collected from seven provinces in Vietnam using DNA barcoding of COI gene region. The DNA sequencing of Vietnamese spotted babylons was compared with those of Genbank data. The results of the study showed that 6 haplotypes was found. The haplotype diversity was 0.442 ± 0.124 ; the nucleotide diversity was 0.0008; and Vietnamese spotted babylonia was similar to the *Babylonia areolata* samples from the Genbank. Phylogenetic analysis also identified that Vietnamese spotted babylon is *Babylonia areolata*.

Keywords: *Babylonia areolata*, COI, DNA barcoding, Spotted babylon.

Classification number 4.6

Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, ốc hương phân bố rải rác dọc ven biển từ Bắc vào Nam, trong đó các khu hệ phân bố chính là Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, đặc biệt có nhiều ở 2 tỉnh Bình Thuận và Bà Rịa - Vũng Tàu. Khu vực ốc hương phân bố cách xa bờ 2-3 km, có nền đáy ghồ ghề tương đối dốc. Ốc hương là loài thủy sản nuôi và là mặt hàng xuất khẩu có giá trị cao (giá xuất khẩu khoảng 10-12 USD/kg), với nhiều thị trường tiềm năng như Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Hồng Kông [1].

Sản xuất giống và nuôi ốc hương thương phẩm đã được Nguyễn Thị Xuân Thu và cs thử nghiệm thành công vào năm 1998. Đến nay, nghề nuôi ốc hương đã phát triển rộng ra nhiều vùng trong tỉnh Khánh Hòa và các tỉnh Phú Yên, Thừa Thiên - Huế, Quảng Nam, Ninh Thuận, Bình Thuận. Hiện nay, cả nước có khoảng 600 trại sản xuất giống ốc hương, hơn 700 ha nuôi ốc hương thương phẩm cho sản lượng hàng năm trên 7.000 tấn, doanh thu ước tính trên 700 tỷ đồng [2].

Mặc dù ốc hương đã được nuôi phổ biến và trở thành mặt hàng xuất khẩu có tiềm năng của Việt Nam hơn 15 năm qua nhưng phân loại ốc hương Việt Nam dựa vào hình thái chưa đủ thuyết phục. Đoạn gen nằm trên ADN ty thể, COI được xem như là mã vạch ADN

*Tác giả liên hệ: Email: ttbinh@cdts.edu.vn

trong phân loại động vật rất hữu hiệu [3]. Mã vạch COI đã được sử dụng nhiều trong định danh nhuyễn thể (đánh giá các loài nhuyễn thể biển ở Canada [4], ốc ở châu Phi [5]).

Nghiên cứu này trình bày kết quả xác định hệ thống phân loại ốc hương Việt Nam, góp phần định hướng bảo tồn, quản lý giống thủy sản và đánh giá chất lượng sản phẩm đặc sản ốc hương Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Ốc hương được thu ở tự nhiên và nuôi ở các trại giống.

Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Phương pháp thu mẫu: mẫu ốc hương được thu từ các tỉnh Quảng Ninh, Thanh Hóa, Quảng Trị, Khánh Hòa, Bình Thuận và Bà Rịa - Vũng Tàu bằng hình thức thu mua của ngư dân khai thác. Ngoài ra, các mẫu ốc hương nuôi tại các trại giống ở Ninh Thuận và Khánh Hòa cũng được thu để đối chiếu và làm rõ loài ốc hương được nuôi phổ biến hiện nay. Nhận diện ốc hương bằng phương pháp mô tả các đặc điểm hình thái của Nguyễn Chính [6]. Số lượng mẫu thu và phân tích được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: địa điểm thu mẫu và số mẫu ốc hương được giải trình tự ADN

STT	Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu mẫu	Số mẫu được giải trình tự ADN (mẫu)	Ghi chú
1	Bán Sen, Văn Đồn, Quảng Ninh	BST	3	Tự nhiên
2	Quảng Lợi, Quảng Xương, Thanh Hóa	THT	3	Tự nhiên
3	Đo Hải, Gio Linh, Quảng Trị	QTT	3	Tự nhiên
4	Ninh Thọ, Ninh Hòa, Khánh Hòa	KHT	3	Tự nhiên
5	Vĩnh Hòa, Nha Trang, Khánh Hòa	KHN	3	Nuôi
6	Nhon Hải, Ninh Hải, Ninh Thuận	NTN	3	Nuôi
7	Phan Ri Cửa, Tuy Phong, Bình Thuận	BTT	3	Tự nhiên
8	Long Sơn, Bà Rịa - Vũng Tàu	VTT	3	Tự nhiên
	Tổng cộng		24	

Phương pháp bảo quản mẫu: mẫu là một phần chân bò của ốc hương (5-10 g/mẫu). Mẫu được bảo quản trong ống eppendorf (2 ml) có chứa cồn nồng độ 90%.

Phương pháp tách chiết và giải trình tự ADN

ADN tổng số được tách chiết từ cơ thịt của ốc hương bằng bộ kit Dneasy Blood & Tissue Kit - QIAgen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn gen COI của ADN ty thể được khuếch đại bằng sử dụng cặp mồi COI:LCO1490 và HCO2198 [7]. Mỗi phản ứng PCR

được thực hiện với thể tích 25 µl (nước tinh khiết 4,2 µl, Coral co 5, Top taq Maxter mix 12,5 µl, primers 2 µl, ADN cá bồng 1,3 µl). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR nhân bản vùng gen COI: 95°C trong 4 phút, tiếp theo 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, nhiệt độ gắn mồi 54°C và 72°C trong 1 phút), kéo dài đoạn 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được làm sạch bằng QIAGEN QIAquick PCR kit. Phương pháp làm sạch sản phẩm PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose/TAE 1,5%. Tiếp theo, trình tự ADN được giải trên máy ABI 3130XL, mỗi mẫu được giải trình tự bằng 2 mồi xuôi và ngược. Quá trình thực hiện tách chiết ADN, PCR, làm sạch sản phẩm PCR được thực hiện tại Phòng Công nghệ sinh học thủy sản, Trường Cao đẳng thủy sản (Bắc Ninh). Phản ứng giải trình tự và đọc trình tự ADN được thực hiện tại Trường Đại học Monash (Malaysia).

Phân tích số liệu

Các trình tự ADN ty thể của ốc hương vùng gen COI được dóng và so sánh với nhau bằng phần mềm đọc trình tự BioEdit [8]. Tổng số haplotype, số lượng vị trí đa hình polymorphic sites, đa dạng haplotype và đa dạng nucleotide được tính bằng phần mềm DNAsp5 [9]. Cây phả hệ xây dựng dựa trên 3 thuật toán Neighbor joining (NJ), Minimum Evolution (ME) và Maximum likelihood (ML), các phương pháp được phân tích bằng các phần mềm MEGA 6 [10]. Giá trị bootstrap được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán ME, ML và NJ với độ lặp lại là 1.000 lần.

Các trình tự ADN của ốc hương được đối chiếu với trình tự ADN của 6 loài ốc hương đã công bố trên ngân hàng gen, gồm: *B. areolata* (JN053011.1), *B. lutosa* (KF897830.1), *B. formosae* (HQ424447.1), *B. japonica* (AF373888), *B. lani* (HQ424448.1), *B. spirata* (JN088258.1) thông qua công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định mức độ giống nhau về loài.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Trình tự ADN vùng gen COI của ốc hương Việt Nam

Một phần của gen COI đã được phân tích, tỷ lệ các loại nucleotide như sau: adenine (A) chiếm 23,55%, cytosine (C) chiếm 18,13%, guanine (G) chiếm 19,96% và thymine (T) chiếm 38,37%. Trong chiều dài của đoạn gen gồm 662 bp (basepair) có 5 vị trí thay đổi trình tự nucleotide đã tìm thấy. Xu hướng thay đổi

trình tự nucleotide trong cùng nhóm (purine, A và G, hay pyrimidine, T và C) cao hơn so với thay đổi giữa các nhóm (bảng 2).

Bảng 2: tỷ lệ thay đổi trình tự nucleotide của đoạn gen COI của ốc hương Việt Nam

	A	T	C	G
A	-	0,0049	0,0023	31,8904
T	0,0030	-	9,7737	0,0025
C	0,0030	20,6876	-	0,0025
G	37,6229	0,0049	0,0023	-

Tỷ lệ trên được ước lượng dựa vào phương pháp Maximum Composite Likelihood, thực hiện bằng chương trình MEGA5.2. Số in đậm thể hiện tỷ lệ thay đổi trong cùng nhóm và in nghiêng là tỷ lệ thay đổi giữa các nhóm bazơ

Kết quả phân tích số liệu các trình tự ADN của ốc hương cho thấy, trên tổng số 662 base thì có 6 vị trí đa hình và 6 haplotype được phát hiện. Hệ số đa dạng haplotype là $0,442 \pm 0,124$ và hệ số đa dạng nucleotide là 0,0008.

So sánh trình tự ADN ốc hương Việt Nam với dữ liệu trên ngân hàng gen

Kết quả so sánh trình tự ADN của ốc hương Việt Nam với các trình tự ADN của các loài ốc hương đã được công bố ở ngân hàng gen cho thấy, ốc hương Việt Nam có mức độ tương đồng (ident) cao với loài *B. areolata* từ 99 đến 100%, loài *B. lani* 95-96% nhưng thấp với các loài *B. formosae*, *B. japonica*, *B. spirata*. Mức độ tương đồng 82-91% (bảng 3).

Bảng 3: so sánh mức độ tương đồng trình tự ADN của ốc hương Việt Nam với trình tự ADN của các loài ốc hương đã công bố trên Genbank

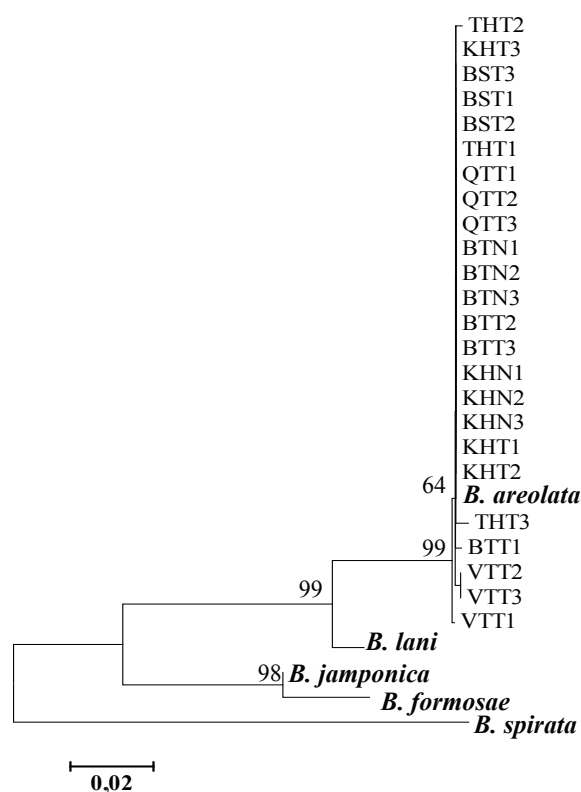
	<i>B. areolata</i>	<i>B. formosae</i>	<i>B. japonica</i>	<i>B. lani</i>	<i>B. spirata</i>
BST	99	89	90	96	84
THT	100	87	90	95	83
QTT	100	88	91	95	82
KHT	100	87	89	95	83
KHN	99	87	90	96	83
NTN	99	88	90	96	83
BTT	100	87	91	95	84
VTT	100	87	91	95	83

Theo Stackebrandt và Ebers [11], khi sử dụng công cụ BLAST ở ngân hàng gen để so sánh trình tự ADN của một loài cần nghiên cứu với số liệu trên ngân hàng gen có chỉ số giống nhau lớn hơn hoặc bằng 97% thì được cho là cùng một loài và ngược lại nếu chỉ số giống nhau nhỏ hơn 97% là khác loài. Do đó có thể

khẳng định ốc hương Việt Nam là loài *B. areolata*. Kết quả của nghiên cứu này cũng giống với kết quả nghiên cứu phân loại ốc hương Việt Nam của Nguyễn Chính [6], tác giả đã sử dụng các đặc điểm hình thái của ốc hương để phân loại như: hình xoay của tháp ốc, hình dạng các phiến màu ở vỏ ốc.

Khoảng cách và mối quan hệ di truyền giữa các loài ốc hương

Cây phả hệ của các loài ốc hương được xây dựng dựa trên trình tự ADN của ốc hương Việt Nam và dữ liệu ở ngân hàng gen bằng 3 thuật toán (NJ, ME và ML) cho kết quả giống nhau (hình 1).



Hình 1: cây phả hệ từ phương pháp Maximum Likelihood với độ lặp lại 1.000 lần dựa trên gen COI của ốc hương Việt Nam

Từ cây phả hệ cho thấy, ốc hương Việt Nam nằm trong 1 nhóm lớn bao gồm mẫu ốc hương *B. areolata*. Ốc hương Việt Nam có quan hệ gần với loài *B. lani* và xa với các loài *B. formosae*, *B. japonica* và *B. spirata*.

Các mẫu ốc hương tự nhiên và nuôi ở Việt Nam gần như không có sự khác biệt với mẫu ốc hương ở ngân hàng gen *B. areolata* ($F_{st} = 0-0,001$). Ốc hương Việt Nam gần với loài *B. lani* ($F_{st} = 0,037$) và khác với 3 loài *B. formosae*, *B. japonica* và *B. spirata* ($F_{st} = 0,114-0,217$) (bảng 4).

Bảng 4: khoảng cách di truyền giữa các loài ốc hương

	<i>B. areolata</i>	<i>B. lani</i>	<i>B. jamponia</i>	<i>B. formosae</i>
<i>B. areolata</i>				
<i>B. lani</i>	0,037			
<i>B. jamponia</i>	0,114	0,103		
<i>B. formosae</i>	0,140	0,128	0,017	
<i>B. spriata</i>	0,217	0,183	0,187	0,179

Kết quả bảng 4 cho thấy, mã vạch COI rất hữu hiệu trong đánh giá đa dạng di truyền giữa các loài. Trong nghiên cứu này, các loài ốc hương có khoảng cách di truyền 0,037-0,217. Chen và cs [12] cũng đã công bố khoảng cách di truyền giữa các loài ngao phân bố ở vùng triều của Trung Quốc có khoảng cách di truyền 0,043-0,148 khi giải trình tự vùng gen COI.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy mã vạch COI rất hữu hiệu trong việc nhận biết ốc hương Việt Nam. Ốc hương Việt Nam có tên khoa học là *Babylonia areolata*.

Các nghiên cứu tiếp theo cần sử dụng thêm mã vạch từ các gen trong nhân để bổ trợ thêm phân loại của ốc hương.

Tài liệu tham khảo

[1] Nguyễn Văn Hà (2004), “Tình hình phát triển nghề nuôi ốc hương (*Babylonia areolata* Link 1807) ở các tỉnh miền Trung”, *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội thảo động vật thân mềm toàn quốc lần thứ*

3, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

[2] Nguyễn Văn Hà (2014), “Tình hình phát triển nghề nuôi ốc hương ở Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **4**, pp.16-21.

[3] P.D. Hebert, A. Cywinski, S.L. Ball, J.P. Dewaard (2003), “Biological identifications through DNA barcodes”, *Biological Sciences*, **270**, pp.313-321.

[4] K.S.K. Layton, L.A. Martel, N.D.P. Hebert (2014), “Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs”, *PLoS ONE*, **9**(4), e95003. doi:10.1371/journal.pone.0095003.

[5] V. Herman, Der Bank, G. Richard (2015), “Richard Greenfield1A pioneer survey and DNA barcoding of some commonly found gastropod molluscs on Robben Island”, *ZooKeys*, **481**, pp.15-23.

[6] Nguyễn Chính (1996), *Một số loài nhuyễn thể có giá trị kinh tế ở biển Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

[7] O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek (1994), “DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates”, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, pp.294-299.

[8] T.A. Hall (1999), “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”, *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp.95-98.

[9] P. Librado, J. Rozas (2009), “DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data”, *Bioinformatics*, **25**(11), pp.1451-1452.

[10] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kuma (2013), “MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0”, *Molecular Biology and Evolution*, **30**, pp.2725-2729.

[11] E. Stackebrandt, J. Ebers (2006), “Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards”, *Microbiology Today*, **33**, pp.152-155.

[12] Chen Ai-hui, Li Zhao-xia, Feng Gong-neng (2009), “Phylogenetic Relationships of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) Based on Mitochondrial COI Gene Sequences”, *Zoological Research*, **30**(3), pp.233-239.