THÔNG BÁO KHOA HỌC

XÂY DỰNG CÂY PHÁT SINH CHỦNG LOẠI PHÂN TỬ CỦA ỐC CỐI *CONUS* SPP. Ở VÙNG BIỂN NAM TRUNG BỘ VIỆT NAM

MOLECULAR PHYLOGENY OF VENOMOUS CONE SNAILS CONUS SPP. IN THE COASTAL REGIONS OF SOUTHERN CENTRAL OF VIETNAM

Phạm Thu Thủy, Đặng Thúy Bình, Trương Thị Thu Thủy, Ngô Đăng Nghĩa
Viện Nghiên cứu CNSH & MT - Trường Đại học Nha Trang

TÓM TẮT

Giống ốc Conus thuộc họ ốc cối Conidae, lớp chân bụng Gastropoda, bộ Sorbeoconcha, phân bố chủ yếu ở các vùng biển nhiệt đới và vùng biển ấm và được xem là nguồn dược liệu quý. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm xây dựng cây phát sinh chủng loại của các loài ốc Conus spp. phân bố ở vùng ven biển Nam Trung bộ, Việt Nam dựa vào chỉ thị di truyền phân tử 16S rDNA ty thể. Tổng số 18 loài ốc cối đã được lấy mẫu. Sau khi giải trình tự gen, trình tự các đoạn gen 16S rDNA của 18 loài này được kết hợp với 3 trình tự từ Genbank để xây dựng cây chủng loại phát sinh bằng cách sử dụng 3 thuật toán maximum parsimony, maximum likelihood và Bayesian inference. Kết quả cho thấy sử dụng chỉ thị 16S rDNA đã phân chia các loài ốc cối thuộc các kiểu dinh dưỡng khác nhau (ăn giun biển, ăn cá, ăn nhuyễn thể) thành 4 nhánh chính. Trong đó, các loài ốc thuộc nhóm ăn giun biển được phân tách rõ ràng hơn trên cây tiến hóa với hai nhóm dinh dưỡng còn lại. Đây là lần đầu tiên một nghiên cứu quan hệ phát sinh loài ở mức độ phân tử được tiến hành trên các các loài ốc cối Việt Nam, góp phần quan trọng vào công tác bảo tồn và lưu giữ nguồn gen ốc cối.

Từ khóa: Conus, 16S rDNA, phát sinh chủng loại phân tử

ABSTRACT

The genus Conus belonging to the family Conoidea, class Gastropoda, order Sorbeoconcha, distributes mostly in warm tropical seas and are considered as precious pharmaceuticals. The aim of this study is to construct a phylogenetic tree of Conus species collected from coastal regions in the Southern Central of Vietnam based on the mitochondrial genetic molecular marker, 16S rDNA. Total 18 Conus species were collected. After sequencing, the partial 16S rRNA gene sequences were combined with 3 sequences from Genbank to construct a phylogenetic tree using three analysis methods of maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference. The results indicate that using the 16S rDNA marker the phylogentic tree of Conus species with different feeding modes (vermivorous, molluscivorous and piscivorous species) was divided into four main clusters. Among them, vermivorous species were separated more clearly than molluscivorous and piscivorous species. It is the first time a molecular phylogentic analysis of Conus species in Vietnam was reported, contributing to the conservation of Conus genetic sources.

Keywords: Conus, 16S rDNA, molecular phylogeny

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ ốc cối Conidae thuộc lớp chân bụng Gastropoda, bộ Sorbeoconcha, cùng với họ Terebridae và Turidae làm thành tổng họ Conoidea. Trong đó chiếm đa số là giống ốc cối *Conus* (Linnaeus, 1758) với khoảng 700 loài (Nam và cs, 2009). Chúng phân bố chủ yếu ở các vùng biển nhiệt đới và vùng biển ấm như Philippines, Indonesia, Australia, Mexico, Florida và Hawaii. Tuy nhiên, một số loài có thể thích ứng với sự thay đổi của điều kiện môi trường như ở vùng biển nóng mũi Hảo Vọng, Nam Phi hay vùng biển lạnh phía tây Califonia, Hoa Kỳ. Hầu hết các loài ốc *Conus* nhiệt đới sống trong hoặc gần các rạn san hô, trong khi các loài cận nhiệt đới được tìm thấy chủ yếu tại vùng dưới triều ở độ sâu từ 10 - 30m và dưới các tảng đá ở vùng triều nông. Ốc cối có hình chóp thuôn dài, có màu sắc sặc sỡ và hoa văn rất đa dạng, kích thước rất khác nhau tùy theo loài (loài lớn nhất có thể dài đến 23cm).

Ốc cối là động vật ăn thịt, chúng ăn mồi sống. Thức ăn chính của chúng là giun biển, nhuyễn thể, các loài cá nhỏ và thậm chí các loài ốc cối khác. Một số công trình nghiên cứu đã cho thấy mối tương quan rõ rệt giữa cấu trúc và hình dáng dải răng kitin của ốc cối với phương thức dinh dưỡng chuyên biệt (James, 1980; Franklin và cs, 2007). Do di chuyển chậm nên khi bắt một số con mồi di chuyển nhanh như cá chúng sử dụng độc tố để tấn công làm tê liệt con mồi. Độc tố ốc cối (conotoxin) là những chuỗi peptide tương đối nhỏ, giàu liên kết disulfide, dài khoảng 10 - 40 amino acid (Olivera và cs, 2000). Tuyến độc của mỗi loài ốc cối chứa khoảng từ 100 - 200 polypeptide khác nhau. Vì vậy, người ta dự đoán có khoảng 70.000 peptide độc tố ốc cối khác nhau.

Từ các nghiên cứu độc tố của các loài ốc ăn cá cho thấy những loài có quan hệ gần gũi thường chứa các peptide độc tố tương đồng về mặt chức năng hơn so với các loài có quan hệ xa (Regina, 2006; Duda và cs, 2009). Vì vậy, nghiên cứu mối quan hệ tiến hóa giữa các loài ốc cối đóng một vai trò quan trọng trong việc phát hiện và xác định đặc tính của các conotoxin mới.

Việc phân tích quan hệ phát sinh chủng loại của các loài dựa trên các đặc điểm hình thái giải phẫu (chủ yếu là kích thước, màu sắc và hoa văn vỏ, cấu tạo của hệ thống tiêu hóa) thường mang lại kết quả không ổn định nhất là đối với các loài có quan hệ gần gũi và vì vậy có nhiều đặc điểm hình thái giải phẫu giống nhau (Röckel và cs, 1995).

Đối với lớp chân bụng Gastropoda, DNA ty thể đã được chứng minh là công cụ hữu hiệu trong phân tích đa dạng loài (McArthur và cs, 2003; Grande và cs, 2008; Nam và cs, 2009). Các marker chuẩn của DNA ty thể thường được sử dụng là các gen mã hóa cytochrome b, 12S rRNA, 16S rRNA, tRNA-Val và một số vùng không mã hóa như vùng liên gen trnF-cox3, atp6-trnM, cox1-cox2, cox3-trnK, nad1-trnP. Việc sử dụng toàn bộ trình tự DNA ty thể cũng nâng cao độ phân giải và độ tin cậy thống kê so với sử dụng từng đoạn gen riêng lẻ (Mueller, 2006; Grande và cs, 2008).

Tuy nhiên, cho tới nay, mối quan hệ phát sinh chủng loại của các loài thuộc giống ốc cối vẫn chưa được giải quyết một cách triệt để do các marker phân tử của DNA ty thể tỏ ra ít tin cậy khi được áp dụng để xác định vị trí phân loại của các loài mới tách ra (Espiritu và cs, 2002; Duda và cs, 2001; Duda và Kohn, 2005). Chính vì vậy, trong các nghiên cứu tiến hóa gần đây, các chỉ thị DNA ty thể thường được sử dụng kết hợp với các chỉ thị nhân có tốc độ tiến hóa thấp hơn và trong một số trường hợp

cho thấy mối quan hệ tiến hóa rõ hơn (Duda và Palumbi, 1999; Cunha và cs, 2005; Duda và Kohn, 2005; Bandyopadhyay và cs, 2008; Nam và cs, 2009). Các chỉ thị nhân đã được khảo sát bao gồm các vùng gen mã hóa 18S rRNA, 28S rRNA, EF1-α, Histone H3, calmodulin, và vùng không mã hóa như đoạn chèn ITS1 và ITS2 (Nam và cs, 2009).

Tại Việt Nam, ốc cối phân bố chủ yếu ở các vùng ven biển thuộc khu vực Nam Trung bộ từ Đà Nẵng đến Kiên Giang và quanh các hải đảo (như Trường Sa, Hoàng Sa, Côn Đảo) với khoảng 76 loài (Hylleberg và Kilburn, 2003). Tuy nhiên, các nghiên cứu về ốc cối Việt Nam cho tới nay mới chỉ được thực hiện ở mức độ khảo sát, thu thập mẫu và tư liệu liên quan, xác định độc tính và kiểm chứng tính chất của một số độc tố. Hiện vẫn chưa có nghiên cứu phát sinh chủng loại nào về ốc cối Việt Nam được tiến hành ở mức độ phân tử. Một vấn đề gây quan ngại đó là một số loài ốc cối có vỏ rất đẹp, vân đa dạng nên thường được khai thác lấy vỏ làm đồ mỹ nghệ. Nếu không có những nghiên cứu bảo tồn kịp thời, nguồn dược liệu quý này có thể bị mai một. Vì vậy, trong đề tài này, nghiên cứu phát sinh chủng loại ở mức độ phân tử được tiến hành trên các đối tượng ốc cối Việt Nam nhằm góp phần vào công tác bảo tồn và lưu giữ nguồn gen ốc cối Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu ốc cối

Các loài ốc cối được thu thập tại các vùng biển thuộc khu vực đảo Lý Sơn (Quảng Ngãi), Cù Lao Chàm (Quảng Nam) và vịnh Vân Phong (Khánh Hòa) từ năm 2008 - 2010. Các mẫu ốc cối sau đó được phân loại sơ bộ dựa trên các đặc điểm hình thái theo mô tả của Röckel và cs (1995) và Nguyễn Ngọc Thạch (2007). Các loài được khảo sát bao gồm: *Conus arenatus, C. bandanus, C. betulinus, C. capitaneus, C. caracteristicus, C. distans, C. generalis, C. imperialis, C. literatus, C. lividus, C. magus, C. marmoreus, C. miles, C. quercinus, C. striatus, C. tessulatus, C. textile* và *C. vexillum*. Các cá thể ốc cối được giữ trong nitơ lỏng và bảo quản ở -70°C. Mỗi loài có 3 cá thể được chọn cho các nghiên cứu phân tử tiếp theo.

2. Tách chiết DNA và nhân gen bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số được tách chiết từ phần mô cơ chân bò của từng cá thể ốc cối bằng bộ kit Wizard SV genomic DNA purification system (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đoạn gen 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi 16S (Integrated DNA Technologies) có trình tự như sau: mồi xuôi 16SF 5′-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3′ và mồi ngược 16SR 5′-GTTTACCAAAAACATGGCTTC- 3′ (Espiritu và cs, 2001).

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 50 µl (bao gồm 20 ng khuôn DNA, Taq buffer 1X, 0,25 nM mỗi loại dNTP, 0,2 pM mỗi mồi, 2 mM $MgCl_2$ và 1 đơn vị Taq polymerase) trên máy luân nhiệt Icycler (Bio-rad) theo chương trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu tại 94°C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ của 94°C trong 40 giây, 47°C trong 40 giây, 72°C trong 90 giây và giai đoạn cuối ở 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% nhuộm ethidium bromide. Kết quả được ghi nhận sử dụng hệ thống ghi ảnh gel tự động Geldoc và phần mềm Quantity One® (Bio-rad).

3. Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit

PCR clean up system (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng làm khuôn trực tiếp cho phản ứng tiền giải trình tự theo nguyên tắc dye-labelled dideoxy terminator (Big Dye® Terminator v.3.1, Applied Biosystems) với các đoạn mồi 16SF và 16SR theo chương trình nhiệt như sau: 96^{0}C trong 20 giây, 50^{0}C trong 20 giây và 60^{0}C trong 4 phút. Sản phẩm phản ứng được phân tích trên máy phân tích trình tự tự động ABI Prism® 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems). Các trình tự xuôi và ngược được kết nối bằng phần mềm Vector NTI v.9.

4. Phân tích trình tự

Trình tự của các loài ốc cối được xác nhận bằng chương trình BLAST (*http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*). Các trình tự được chỉnh sửa bằng phần mềm BioEdit 7.0.1 (Hall, 1999) và gióng hàng bằng phần mềm Clustal X v.1.8 (Thompson và cs, 1997).

5. Phân tích phát sinh chủng loại các loài ốc cối

Phân tích phát sinh chủng loại được thực hiện dựa trên trình tự đoạn gen 16S rDNA của 18 loài ốc cối thuộc nghiên cứu hiện tại và 3 trình tự từ Genbank (Bảng 1). Trình tự 16S rDNA của 2 loài ốc thuộc họ Conidae là *Lophiotoma erithiformis* và *Thatcheria mirabilis* từ Genbank được sử dụng làm nhóm ngoại.

Phân tích được tiến hành dựa trên 3 thuật toán maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) và Bayesian inference (BI) bằng các phần mềm PAUP 4.0 (Swofford, 2001) và MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck và Ronquist, 2001). Đối với thuật toán MP, 1000 độ lặp lại ngẫu nhiên được áp dụng. Tuy nhiên, đối với thuật toán ML, độ lặp lại là 100 vì tổng số trình tự nghiên cứu quá lớn. Trước khi tiến hành thuật toán ML và BI, các mô hình tiến hóa được kiểm tra bằng phần mềm Modeltest 3.7 (Posada và Crandall, 1998) và MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004). Mô hình tối ưu là HKY+I+G với tần suất các base nitơ là A = 0,3487; C = 0,1299; G = 0,1744; T = 0,3470, tỷ lệ các vị trí đa hình là 0,4011 và thông số dạng phân bố gamma là 0,4110.

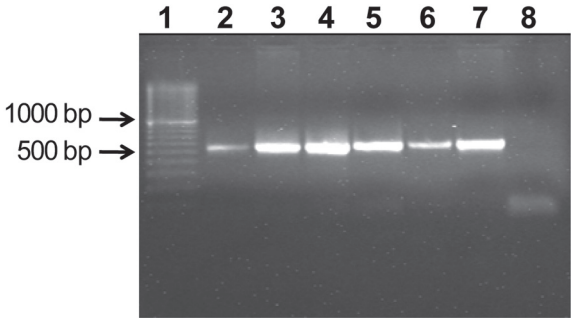
Đối với thuật toán BI, các mô hình thay thế được tính toán. Chương trình được chạy trên 4 kênh với 1 triệu thế hệ, với tần suất tính toán trên 100 thế hệ. Phân tích được lặp lại 2 lần để xác định độ chính xác của phương pháp phân tích. Giá trị tin cậy được biểu hiện trên các nhánh của cây tiến hóa (Huelsenbeck và Ronquist, 2001).

Giá trị bootstrap được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán MP với độ lặp lại 100. Do sự hạn hẹp về thời gian và số lượng trình tự quá lớn, chúng tôi áp dụng phương pháp xấp xỉ liên tiếp (successive approximation approach) (Sullivan và cs, 2005) đối với thuật toán ML, xác định cây tiến hóa dựa trên mô hình tiến hóa và so sánh kết quả thu được với phương pháp phân tích MP và BI. Cây đa dạng loài được hiển thị và hiệu chỉnh bằng phần mềm TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

III. KẾT QUẢ

1. Khuếch đại đoạn gen 16S rDNA

DNA tổng số của các mẫu ốc sau khi kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch được dùng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen 16S rDNA. Theo tính toán lý thuyết, khi sử dụng cặp mồi 16S, sản phẩm PCR thu được là đoạn DNA có kích thước ~ 550 bp. Kết quả nhân gen được hiển thị trên Hình 1. Sản phẩm điện di là một băng đậm nét có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết.



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen 16S rDNA của các mẫu ốc cối

Sản phẩm PCR (6 µl) được điện di trên gel agarose 1,2%. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp. Giếng 2-7, sản phẩm PCR của các mẫu ốc cối. Giếng 8: đối chứng âm.

2. Giải trình tự đoạn gen 16S rDNA của các loài ốc cối

Để đảm bảo độ tin cậy, phản ứng giải trình tự được tiến hành theo cả hai chiều xuôi và ngược với mỗi mẫu được lặp lại 2 lần. Sau khi phân tích và kiểm tra, trình tự đoạn gen 16S rDNA của 18 mẫu ốc cối nghiên cứu được đăng ký trên Genbank. Mã số trình tự và thông tin chi tiết về các loài ốc cối được trình bày trong Bảng 1. Hầu hết các loài ốc cối thu thập tại các vùng ven biển Việt Nam thuộc loại ăn giun biển (ký hiệu là V). Có 3 loại thuộc nhóm ăn nhuyễn thể (ký hiệu là M), 1 loài ăn cá (ký hiệu là P) và 2 loài vừa ăn giun biển và cá tùy theo giai đoạn phát triển của chúng (ký hiệu là P&V)). Các loài có chế độ ăn chưa được nghiên cứu cụ thể ký hiệu là U (Nam và cs, 2009; Duda và cs, 2001).

3. Xây dựng cây phát sinh chủng loại ốc cối

Sau khi so sánh và gióng hàng, trình tự thu được gồm 548 bp đoạn gen 16S rDNA của 18 loài ốc cối nghiên cứu được sử dụng cho phân tích. Trong đó có 347 nucleotide không đổi (constant character), 76 nucleotide không mang thông tin (parsimony-uninformative character) và 125 nucleotide mang thông tin (parsimony-informative character). Trình tự đoạn gen 16S rDNA của 3 loài ốc cối khác trên Genbank cũng được sử dụng trong xây dựng cây phát sinh chủng loại với nhóm ngoại là 2 loài ốc *Lophiotoma cerithiformis* và *Thatcheria mirabilis.*

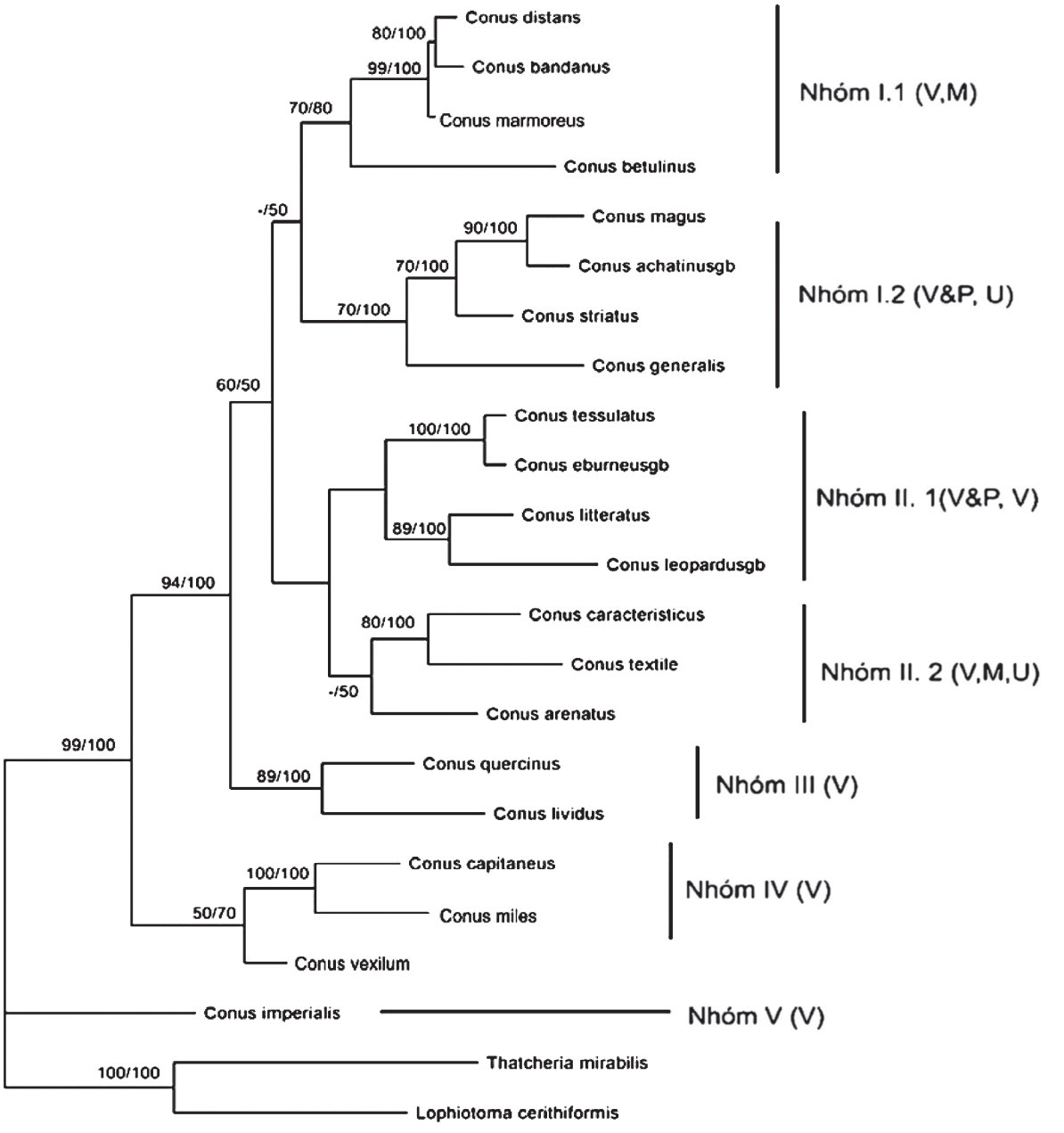
Phân tích cây phát sinh chủng loại được tiến hành dựa trên cả 3 thuật toán maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) và Bayesian inference (BI). Kết quả phân tích dữ liệu trình tự gen 16S rDNA dựa trên phương pháp MP và BI cho kết quả tương tự về cây đa dạng loài. Tuy nhiên, phương pháp ML cho thấy mức độ thấp trong mối quan hệ loài.

Cây phân loại loài thu được theo phương pháp MP được trình bày trên Hình 2 với giá trị bootstrap (BT) và độ tin cậy (PP) được biểu hiện trên các nhánh. Đối với thuật toán MP, cây đa dạng loài thu được với 549 bước (Consistency index = 0,5301, Retention index = 0,5204). Theo Hình 2 cho thấy các loài thuộc giống ốc cối có sự tương đồng cao với giá trị bootstrap và độ tin cậy cao (PR 99%, BI 100%). Từ cây phát sinh loài cho thấy các loài ốc cối nghiên cứu phân thành 4 nhóm loài (từ nhóm I-IV) với giá trị bootstrap và độ tin cậy tương đối (>70%), và 1 loài (nhóm V) có vị trí phân loại không xác định (*C. imperialis*).

Nhóm I và nhóm II lần lượt lại tiếp tục được chia thành 2 nhóm nhỏ: nhóm I.1 bao gồm các loài *C. distans*, *C. bandanus*, *C. mamoreus*, *C. betulinus*; nhóm I.2 bao gồm các loài *C. magus*, *C. achatinus*, *C. striatus, C. generalis*; nhóm II.1 bao gồm các loài *C. tessulatus*, *C. eburneus*, *C. literatus*, *C. leopardus*; và nhóm II.2 bao gồm các loài *C. caracteristicus*, *C. textile*, *C. arenatus.* Nhóm III bao gồm 2 loài *C. quercinus* và *C. lividus.* Nhóm IV gồm 3 loài *C. capitaneus*, *C. miles* và *C. vexillum.*

Bảng 1: Danh mục các loài ốc cối sử dụng cho phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn gen 16S rDNA

STT	Tên loài	Mã số Genbank	Chế độ dinh dưỡng	Tài liệu tham khảo
1	*Conus arenatus*	HM212491	V	Nghiên cứu hiện tại
2	*Conus bandanus*	HQ234757	M	Nghiên cứu hiện tại
3	*Conus betulinus*	HQ234758	V	Nghiên cứu hiện tại
4	*Conus capitaneus*	HM212492	V	Nghiên cứu hiện tại
5	*Conus caracteristicus*	HM212493	U	Nghiên cứu hiện tại
6	*Conus distans*	HM212494	V	Nghiên cứu hiện tại
7	*Conus generalis*	HQ234761	V	Nghiên cứu hiện tại
8	*Conus imperialis*	HQ234755	V	Nghiên cứu hiện tại
9	*Conus literatus*	HM212495	V	Nghiên cứu hiện tại
10	*Conus lividus*	HQ234760	V	Nghiên cứu hiện tại
11	*Conus magus*	HM212496	V&P	Nghiên cứu hiện tại
12	*Conus marmoreus*	HQ234759	M	Nghiên cứu hiện tại
13	*Conus miles*	HQ234756	V	Nghiên cứu hiện tại
14	*Conus quercinus*	HM212497	V	Nghiên cứu hiện tại
15	*Conus striatus*	HM212498	P	Nghiên cứu hiện tại
16	*Conus tessulatus*	HM212499	V	Nghiên cứu hiện tại
17	*Conus textile*	HM212500	M	Nghiên cứu hiện tại
18	*Conus vexillum*	HM212501	V	Nghiên cứu hiện tại
19	*Conus eburneus*	AF174165	V&P	(Duda và cs, 2001)
20	*Conus leopardus*	AF174175	V	(Duda và cs, 2001)
21	*Conus achatinus*	FJ868053	U	(Puillandre và cs, 2010)
22	*Lophiotoma cerithiformis*	EU682307		(Nam và cs, 2009)
23	*Thatcheria mirabilis*	GU137313		(Nam và cs, 2009)



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của các loài ốc cối thu nhận tại các vùng ven biển Nam Trung bộ, Việt Nam

Phân tích được thực hiện dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA của 21 loài ốc trong đó có 18 loài thuộc nghiên cứu hiện tại và 3 trình tự từ Genbank (được ký hiệu với đuôi gb). Các loài ốc Lophiotoma cerithiformis và Thatcheria mirabilis được sử dụng làm nhóm ngoại.
Giá trị bootstrap (phân tích MP) và giá trị tin cậy (phân tích BI) được biểu hiện tại các nhánh. Cây phát sinh loài được chia làm 4 nhóm chính.
Chế độ dinh dưỡng của các loài trong nhóm được hiển thị trong ngoặc đơn (M: ăn nhuyễn thể; V: ăn giun biển; P: ăn cá; V&P: ăn cá và giun biển; U: chưa biết).

IV. THẢO LUẬN

1. Mối quan hệ loài của ốc cối (*Conus* spp.) Việt Nam được nghiên cứu ở mức độ phân tử

Việc phân loại ốc cối theo phương pháp truyền thống thường dựa trên các đặc điểm hình thái như kích thước vỏ, kiểu hoa văn và màu sắc vân trên vỏ, số vòng xoắn ở phần nón, chế độ dinh dưỡng và đặc điểm hình thái các dải răng chitin. Tuy nhiên, do các đặc điểm hình thái có thể chịu tác động của môi trường, hay biến dị cá thể cùng loài và khác loài, nên dễ gây nhầm lẫn trong quá trình phân loại. Chính vì vậy, các marker phân tử của DNA ty thể và DNA nhân hiện đang được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu di truyền, định danh và xây dựng mối quan hệ tiến hóa (Nam và cs, 2009; Duda và cs, 2001; Espiritu và cs, 2001; Duda và Kohn, 2005).

Nghiên cứu hiện tại sử dụng chỉ thị 16S rDNA đã phân chia các loài ốc cối thành các nhóm riêng biệt. Kết quả phân tích phát sinh chủng loại của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó. Ví dụ hai loài thuộc nhóm ăn nhuyễn thể *C. bandanus* và *C. marmoreus*, có phần nón rộng, được chia về cùng nhóm I.1; hai loài C. *tessulatus* và *C. eburneus* được phân chia về cùng một nhánh (Nam và cs, 2009). Các loài *C. magus* và *C. striatus; C. miles* và *C. vexillum*; *C. quercinus* và *C. lividus* có quan hệ di truyền rất gần gũi (Espiritu và cs, 2001).

Mặc dù vậy mối quan hệ tiến hóa giữa các loài thuộc các nhóm dinh dưỡng khác nhau vẫn chưa được phân tách rõ ràng. Ví dụ loài *C. distans* thuộc nhóm ăn giun biển được xếp vào nhóm I.1 cùng với hai loài thuộc nhóm ăn nhuyễn thể, điều này cho thấy việc sử dụng chỉ thị 16S đơn lẻ chưa giải quyết triệt để được mối quan hệ giữa các loài ốc thuộc các nhóm dinh dưỡng.

Bandyopadhyay và đồng tác giả (2008) đã sử dụng chỉ thị 16S rDNA và vùng liên gen *coxI/coxII* nhằm phân tích quan hệ phát sinh chủng loại của các loài ốc cối Philippines. Kết quả cho thấy, vùng liên gen *coxI/ coxII* của các loài ốc cối dao động từ 130 - 170 bp, trong đó đoạn gen này của *C. textile* lớn hơn so với tất cả các loài còn lại. Nhóm tác giả đánh giá rằng đoạn chèn này rất hữu dụng trong các nghiên cứu tiến hóa, cũng như định danh loài.

Hơn nữa, gần đây Nam và đồng tác giả (2009) đã sử dụng chỉ thị nhân ITS2 (đoạn chèn giữa gen mã hóa 5,8S và 28S rRNA) nhằm đánh giá mối quan hệ tiến hóa của 26 loài ốc thu thập tại vùng biển thuộc quần đảo Marinduque, Philippines. Kết quả cho thấy trình tự ITS2 được bảo tồn giữa các cá thể thuộc cùng một nhóm dinh dưỡng, nhưng lại thể hiện sự đa dạng ở mức độ phù hợp cho việc xác định vị trí phân loại của các loài mới phân hóa. Hơn nữa, việc sử dụng kết hợp các chỉ thị ty thể (12S rDNA, 16S rDNA và COI) và chỉ thị nhân ITS2 đã chia nhóm ăn nhuyễn thể (M) thành 3 nhánh rõ ràng là *Conus, Cyclinder*, và *Darioconus*. Chính vì vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi, chỉ thị DNA ty thể cần được sử dụng kết hợp với chỉ thị nhân để có thể đánh giá chính xác hơn mối quan hệ loài của ốc cối Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 18 loài ốc cối Việt Nam dựa trên trình tự đoạn gen ty thể 16S rDNA. Đây là lần đầu tiên mối quan hệ loài của giống ốc cối *Conus* ở Việt Nam được nghiên cứu ở mức độ phân tử. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng góp phần vào công tác bảo tồn và lưu giữ nguồn gen ốc cối

Việt Nam.

2. Mối liên hệ giữa phát sinh loài với chế độ dinh dưỡng và độc tố ốc cối

Duda và cộng sự (2001) đã khảo sát mối quan hệ giữa phát sinh loài và chế độ dinh dưỡng của 76 loài ốc cối thu thập từ các vùng biển Ấn Độ, Thái Bình Đương và Tây Đại Tây Dương. Kết quả cho thấy hình thức dinh dưỡng ăn giun biển nhiều tơ (errant polychaetes) là hình thức cổ xưa nhất. Các dạng dinh dưỡng khác như ăn các loài chân bụng, và một số họ giun biển khác như Terebellidae, Nereidae và Amphinomidae được tách ra cùng một lần, trong khi đó các loài ăn cá có thể tách ra từ 2 đến 3 lần trên cây tiến hóa.

Các loài ốc cối Việt Nam trong nghiên cứu hiện tại chủ yếu thuộc loại ăn giun biển. Có ba loài thuộc nhóm ăn nhuyễn thể là *C. bandanus*, *C. marmoreus* và *C. textile.* Chỉ duy nhất một loài ăn cá (*C. striatus*) và một loài có chế độ ăn đa dạng, vừa ăn giun biển vừa ăn cá tùy theo giai đoạn sống (*C. magus*) được khảo sát. Trong đó, hầu hết các loài thuộc nhóm ăn giun biển được tách ra từ gốc cây tiến hóa (Hình 2). Điều này khá phù hợp với lý thuyết khi chế độ ăn giun biển là phương thức dinh dưỡng cổ xưa nhất (Duda và cs, 2001). Hơn nữa các loài thuộc nhóm ăn giun biển được phân chia thành các nhóm rất rõ ràng là nhóm III và nhóm IV.

Tuy nhiên, một số loài ăn giun biển khác cũng được nhóm cùng với các loài ăn nhuyễn thể (nhóm I.1), và với các loài vừa giun biển vừa ăn cá, cũng như với các loài mà chế độ ăn chưa được nghiên cứu (nhóm I.2 và nhóm II.1). Điều này cho thấy sự chuyên biệt của các chế độ dinh dưỡng trong quá trình tiến hóa của ốc cối.

Cuối cùng, phân tích mối quan hệ tiến hóa giữa các loài ốc cối đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu tính đa dạng của các độc tố ốc cối, cũng như việc phát hiện và xác định đặc tính của các độc tố mới. Đây là nguồn dược liệu quý để sản xuất thuốc giảm đau trong y học. Chẳng hạn, Espiritu và cs (2001) đã phân tích nguồn gốc tính đa dạng của độc tố δ-conotoxin trên 9 loài ốc cối bằng sử dụng chỉ thị 16 rDNA ty thể. Kauferstein và cs (2004) cũng sử dụng các trình tự 16 rDNA đại diện cho 104 haplotype nhằm khảo sát khả năng sản xuất các độc tố (thuộc siêu họ I) mới phát hiện ở các loài ốc cối khác nhau.

V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Bằng cách sử dụng chỉ thị phân tử 16S rDNA ty thể, chúng tôi đã xây dựng cây phát sinh chủng loại của 18 loài ốc cối *Conus* thu thập tại các vùng biển thuộc khu vực Nam Trung bộ, Việt Nam. Kết quả cho thấy các loài ốc cối thuộc 3 nhóm dinh dưỡng được chia làm 4 nhóm chính trên cây chủng loại phát sinh. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đó. Mặc dù vậy, việc sử dụng chỉ thị 16S rDNA vẫn có những hạn chế nhất định trong việc phân tách các loài ốc có quan hệ tiến hóa gần gũi. Vì vậy, để có thể xác định chính xác mối quan hệ loài của ốc cối Việt Nam, trong các nghiên cứu tiếp theo, các chỉ thị đa phân tử trong đó có các gen mã hóa độc tố ốc cối sẽ được sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandyopadhyay PK, Stevenson BJ, Ownby JP, Cady MT, Watkins M, Olivera BM (2008). The mitochondrial genome of conus textile, coxi-coxii intergenic sequences and conoidean evolution. *Mol Phylogenet Evol*, 46:215-223.
2. Cunha RL, Castilho R, Ruber L, Zardoya R (2005). Patterns of cladogenesis in the venomous marine gastropod genus conus from the cape verde islands. *Syst Biol*, 54:634-650.
3. Duda TF, Jr., Kohn AJ (2005). Species-level phylogeography and evolutionary history of the hyperdiverse marine gastropod genus conus. *Mol Phylogenet Evol,* 34:257-272.
4. Duda TF, Jr., Palumbi SR (1999). Developmental shifts and species selection in gastropods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:10272-10277.
5. Duda TF, Kohn AJ, Palumbi SR (2001) Origins of diverse feeding ecologies within Conus, a genus of venomous marine gastropods. *Biol. J. Linnean Soc,* 73:391-409.
6. Espiritu DJ, Watkins M, Dia-Monje V, Cartier GE, Cruz LJ, Olivera BM (2001). Venomous cone snails: Molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon*, 39:1899-1916.
7. Franklin JB, Fernando SA, Chalke BA, Krishnan KS (2007) Radular morphology of Conus (Gastropoda: Caenogastropoda: Conidae) from India. *Molluscan Research*, 27(3):111-122.
8. Grande C, Templado J, Zardoya R (2008). Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. *BMC Evol Biol*, 8:61.
9. Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41:95-98. Oxford University Press.
10. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). Mrbayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754-755.
11. Hylleberg J, Kilburn RN (2003). Marine Molluscs of Vietnam. Tropical marine mollusk Programe (TMMP), 106-111.
12. James MJ (1980). Comparative morphology of radular teeth in conus: observations with scanning electron microscopy. *J Mollus Stud*, 46(1):116-128.
13. Kaufersteina S, Huysb I, Kucha U, Melauna C, Tytgatb J, Mebsa D (2004). Novel conopeptides of the I-superfamily occur in several clades of cone snails. *Toxicon*, 44(5):539-548.
14. McArthur AG, Harasewych MG (2003). Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. Smithsonian Books, Washington,140-160.
15. Mueller RL (2006). Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in bayesian phylogenetic analysis. *Syst Biol*, 55:289-300.
16. Nam HH, Corneli PS, Watkins M, Olivera B, Bandyopadhyay P (2009). Multiple genes elucidate the evolution of venomous snail-hunting conus species. *Mol Phylogenet Evol*, 53:645-652.
17. Nylander JA (2004). Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University, Uppsala, Sweden.
18. Nguyễn Ngọc Thạch (2007). Recently collected shells of Viet Nam. L' Informatore piceno & N.N.T: 7-8 & 24-142.
19. Page RD (1996). Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*,12:357-358.

20. Puillandre N, Watkins M, Olivera BM (2010). Evolution of conus peptide genes: Duplication and positive selection in the a-superfamily. *J Mol Evol* (*in press*)
21. Röckel D, Korn W, Kohn AJ (1995). Manual of the Living Conidae (Vol. I: Indo- Pacific Region). Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden, Germany.
22. Sullivan J, Abdo Z, Joyce P, Swofford DL (2005). Evaluating the performance of a successive-approximations approach to parameter optimization in maximum-likelihood phylogeny estimation. *Mol Biol Evol*, 22:1386-1392.
23. Swofford DL (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
24. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The clustal-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25:4876-4882.