

**Nghiên cứu đa dạng sinh học của Hải miên (Porifera) tại Đảo Côn Cỏ, tỉnh  
Quảng Trị**

**LÊ THÀNH LONG**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Trần Mỹ Linh, người đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành tốt luận văn này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ths. Phan Minh Tuấn và các cán bộ Phòng Phát triển Công nghệ y sinh, Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các cán bộ Phòng tài nguyên sinh vật và Phòng nghiên cứu cấu trúc, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong thời gian thu thập số liệu và vật liệu nghiên cứu để thực hiện luận án.

Nhân dịp này tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy cô, bạn bè và gia đình đã chỉ dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Xin chân thành cảm ơn.

Hà Nội, ngày tháng 1 năm 2016

Học viên

**Lê Thành Long**

# MỤC LỤC

## LỜI CẢM ƠN

## MỤC LỤC

<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>3</b>
1.1 Giới thiệu chung về hải miên .....	3
1.2 Đặc điểm cấu tạo và sinh lý .....	4
1.3 Đặc điểm sinh sản và phát triển .....	6
1.4 Đa dạng sinh học của hải miên .....	6
1.4.1 Hệ thống phân loại hải miên .....	6
1.4.2 Tình hình nghiên cứu về đa dạng sinh học và phát sinh chủng loại của hải miên.....	7
1.5 Chỉ thị trong đánh giá đa dạng sinh học.....	12
1.6 Các chỉ thị DNA trong đánh giá đa dạng sinh học hải miên.....	14
<b>CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
2.1 Vật liệu .....	16
2.1.1 Đối tượng nghiên cứu .....	16
2.1.2 Hóa chất .....	16
2.1.2 Trang thiết bị .....	17
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.2.1 Phương pháp xử lý mẫu nghiên cứu .....	18
2.2.2 Phương pháp tách DNA tổng số từ hải miên .....	18
2.2.3 Phương pháp PCR.....	19
2.2.4 Phương pháp điện di kiểm tra kết quả .....	20
2.2.5 Phương pháp xử lý trình tự nucleotide.....	20
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>23</b>
3.1 Kết quả tách chiết DNA tổng số .....	23
3.2 Kết quả PCR và xác định trình tự các đoạn DNA chỉ thị .....	24
3.3 Phân tích đa dạng di truyền của các mẫu hải miên nghiên cứu .....	25
3.4 Cây phát sinh chủng loại.....	30
<b>CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>32</b>
4.1 Kết luận .....	32
4.2 Kiến nghị.....	32
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>33</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>36</b>

## CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÍ HIỆU

CTAB	Cetyl Trimethyl Amoni Bromid
DNA	Deoxyribonucleic acid
rDNA 18S	Gen ribosome DNA 18S
ETDA	Ethylenediamine tetraacetic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
TAE	Tris Acetate EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tm	Nhiệt độ nóng chảy (Melting Temperatures)
UV	Ultraviolet (light)

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1: So sánh một số đặc điểm cấu tạo giữa các lớp hải miên .....	7
Bảng 1.2: Số lượng loài hải miên qua các nghiên cứu tại Việt Nam.....	11
Bảng 2.1: Danh sách mẫu hải miên.....	16
Bảng 2.2: Danh sách mẫu hải miên.....	17
Bảng 2.3: Thành phần cho phản ứng PCR với thể tích 25 $\mu$ l .....	19
Bảng 2.4: Chu trình nhiệt phản ứng PCR .....	20
Bảng 2.5: Danh sách trình tự của một số các loài hải miên lưu trữ trên ngân hàng Genbank .....	21
Bảng 3.1: Độ tương đồng (%) giữa trình tự nucleoitde của các mẫu hải miên nghiên cứu và các trình tự tham khảo tương ứng .....	25

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Sơ đồ các kiểu cấu tạo cơ thể của hải miên .....	5
Hình 1.2: Sơ đồ Khu vực nghiên cứu tại Đảo Côn Cỏ .....	12
Hình 3.1: Kết quả điện di DNA tổng số của mẫu Hải miên .....	23
Hình 3.2: Ảnh điện di sản phẩm PCR mẫu hải miên bằng môi 18S .....	24
Hình 3.3: Trình tự gen 18S mẫu hải miên.....	27
Hình 3.4: Cây phát sinh chủng loại của 6 mẫu hải miên và các trình tự tham khảo dựa vào đoạn DNA chỉ thị trên rDNA 18S .....	30

## MỞ ĐẦU

Ngành Porifera (được Grant phân loại năm 1836), tên thường gọi là hải miên, là một trong những loài động vật biển có độ đa dạng cao nhất đồng thời đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái biển. Đặc biệt, hải miên được đánh giá là nhóm sinh vật biển chứa nhiều hợp chất mới mang các hoạt tính sinh học liên quan y - dược như chống ung thư, hỗ trợ điều trị thần kinh, tăng khả năng miễn dịch, giảm đau, kháng virus, kháng vi sinh vật, vi khuẩn lao...

Việt Nam có nguồn tài nguyên sinh vật biển phong phú, đặc biệt là các loài hải miên. Tuy nhiên, chỉ có một số ít nghiên cứu về hải miên ở biển Việt Nam liên quan tới thành phần loài và phân bố của hải miên tại các vùng biển thuộc vịnh Nha Trang và vịnh Hạ Long. Gần đây, các nghiên cứu về thành phần hóa học của một số loài hải miên tại biển Việt Nam đã phân lập được nhiều hợp chất có cấu trúc mới và nhiều hoạt chất có giá trị. Mặc dù vậy, hướng nghiên cứu về hải miên còn khá mới mẻ, đáng chú ý là chưa có nghiên cứu nào ở mức độ sinh học phân tử hay đánh giá đa dạng di truyền đối với hải miên ở biển Việt Nam. Từ trước tới nay, nghiên cứu đa dạng loài hải miên mới dừng ở đa dạng hình thái. Số lượng loài hải miên tại Việt Nam khá nhiều, nhiều loài có hình thái tương đối giống nhau; do vậy, các nghiên cứu đánh giá đa dạng hải miên ở cấp độ sinh học phân tử sẽ góp phần tìm hiểu và phát triển tiềm năng ứng dụng của hải miên. Do đó, vấn đề cấp thiết hiện nay là phải phát huy được những giá trị và tiềm năng ứng dụng của hải miên bằng các nghiên cứu thích hợp và có hệ thống.

Khu vực nghiên cứu được lựa chọn là Khu bảo tồn biển đảo Côn Cỏ thuộc tỉnh Quảng Trị. Đây là khu vực biển được đánh giá là một trong những vùng có mức độ đa dạng sinh học biển khá cao ở Việt Nam, trong đó nhóm hải miên xuất hiện phong phú cả về số lượng và thành phần loài.

Trên cơ sở đó, luận văn “**Nghiên cứu đa dạng sinh học của Hải miên (Porifera) tại Đảo Côn Cỏ, tỉnh Quảng Trị**” được thực hiện. Luận văn này có mục tiêu bước đầu nghiên cứu phát triển các chỉ thị sinh học phân tử nhằm đánh giá đa dạng di truyền và đa dạng sinh học, góp phần hỗ trợ cho việc định loài một số mẫu hải miên thu thập được ở tại Đảo Côn Cỏ, tỉnh Quảng Trị.

**Nội dung của luận văn gồm:**

1. Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu hải miên nghiên cứu.
2. Tối ưu hóa các điều kiện PCR để nhân dòng các đoạn DNA chỉ thị.
3. Đánh giá đa dạng di truyền của các mẫu hải miên nghiên cứu.



## CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1 Giới thiệu chung về hải miên

Ngành Porifera (được Grant phân loại năm 1836), tên thường được gọi là hải miên hay bọt biển, được tìm thấy trong hầu hết các môi trường nước, tuy nhiên, hải miên sinh sống phổ biến và đa dạng nhất trong môi trường biển. Theo Van Soest và cộng sự, 2016, có 8701 loài hải miên được ghi nhận [20], được phân loại thành 4 lớp, trong đó lớp Demospongiae (được Sollas phân loại năm 1885) là lớp đa dạng nhất, chiếm 80% số loài hải miên được biết cho tới nay. Hải miên được coi là động vật đa bào chưa hoàn thiện (Parazoa). Hải miên là nhóm động vật sống bám, tuy vậy một số loài có khả năng vận động nhờ vào tế bào chất hay roi. Màu sắc, hình dạng, kích thước cơ thể các loài hải miên rất đa dạng: loài bé nhất khoảng vài milimét, loài lớn nhất có thể tới hàng mét. Hải miên hầu như có mặt trên toàn thế giới, sinh sống trong một loạt các môi trường dưới đại dương, từ các vùng cực đến các vùng nhiệt đới [11]. Thường hải miên phân bố ở các vùng yên tĩnh, bởi vì trầm tích khuấy động bởi sóng hoặc dòng sẽ chặn các lỗ chân lông, làm cho chúng khó khăn trong việc ăn và thở [7]. Phần lớn hải miên thường được tìm thấy trên bề mặt vững chắc như đá, nhưng một số loài có thể gắn vào trầm tích mềm mại [9].

Hải miên dồi dào hơn ở vùng biển ôn đới nhưng ít đa dạng hơn so với vùng nhiệt đới, có thể vì các sinh vật con mồi của chúng phong phú ở vùng biển nhiệt đới [11]. Hải miên thuộc lớp Hexactinellida (hải miên thủy tinh) là phổ biến nhất ở vùng biển Bắc cực và các khu vực sâu của vùng biển ôn đới và nhiệt đới cơ thể hải miên thủy tinh rất xốp cho phép trích xuất thực phẩm từ các vùng biển nghèo thức ăn mà không cần phải hoạt động nhiều. Hải miên thuộc lớp Demospongiae và hải miên lớp Calcarea (hải miên đá vôi) phong phú và đa dạng ở các vùng nước có độ sâu ít hơn [14].

## 1.2 Đặc điểm cấu tạo và sinh lý

Hải miên được coi là động vật đa bào chưa hoàn thiện (Parazoa) vì có các đặc điểm sau [3]:

- Cơ thể đa bào nhưng chưa có mô phân hóa. Có nhiều lỗ thủng trên thân, trong thân có các khe, rãnh .
- Đối xứng phóng xạ hay chưa có kiểu đối xứng ổn định.
- Biểu bì có các tế bào gai dẹp, có lớp tế bào cổ áo làm nhiệm vụ dẫn nước vào và đẩy nước ra.
- Tầng trung gian khá dày có các tế bào amip và gai xương. Xương là canxi, silic hay sợi collagen (spongín).
- Chưa có miệng, tiêu hóa nội bào, bài tiết và hô hấp bằng thẩm thấu.
- Chưa có tế bào thần kinh, phản ứng với kích thích theo kiểu cảm ứng.
- Sinh sản vô tính bằng chồi hay mầm, sinh sản hữu tính bằng trứng và tinh trùng. Phân hóa các lá phôi chưa ổn định, ấu trùng sống tự do.

Các loài hải miên có hình dạng rất phong phú, trường hợp đơn giản nhất là cơ thể có dạng một cái cốc, có đáy bám vào giá thể, đối diện với đáy là lỗ thoát nước (osculum) thành cơ thể có nhiều lỗ thủng thông nước (được gọi là ostium). Nước từ ngoài vào xoang cơ thể qua ostium và thoát ra theo osculum. Nước vào xoang không chỉ theo một ống thẳng mà có thể đi qua nhiều khoang khác nhau có lát cắt tế bào cổ áo. Xoang cơ thể còn được gọi là xoang trung tâm hay xoang vị giả (pseudogastrula). Tùy theo mức độ phức tạp của hệ ống dẫn nước và các phòng roi lát bằng các tế bào cổ áo mà chia thành các kiểu cấu tạo cơ thể hải miên khác nhau [3]. Có 4 kiểu cấu trúc cơ thể:

- Kiểu ascon: có rãnh dẫn nước thông trực tiếp với xoang.
- Kiểu sycon: nước qua hốc lõm mới vào xoang vị giả.
- Kiểu leucon: có hệ thống rãnh và hốc phức tạp.
- Kiểu ragon: có hệ thống phức tạp hơn nhiều (ví dụ *Leuconic aspera* chỉ cao 7cm, dày 1cm nhưng có tới 20.000 khoang và 80.000 rãnh dẫn nước)