

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP GEN MÔI TRƯỜNG TRONG NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG SINH HỌC VÀ BẢO TỒN TẠI VIỆT NAM

Lê Đức Minh^{1*}

Ngô Thị Hạnh²

TÓM TẮT

Kỹ thuật phân tích gen môi trường (environmental DNA) được định nghĩa là phương pháp thu thập và phân tích gen trong môi trường tự nhiên như đất, nước và không khí. Vì khả năng phát hiện sự có mặt của các loài ngay cả khi không nhìn thấy chúng, phân tích gen môi trường được coi là phương pháp hữu hiệu trong nghiên cứu bảo tồn đa dạng sinh học nhằm điều tra các loài nguy cấp quý hiếm và khó bắt gặp. Cho đến nay, phương pháp này đã được sử dụng để điều tra các loài rùa nước ngọt cực kỳ nguy cấp như Rùa hộp Zhou, Rùa hoàn kiếm và loài Thần lẩn cá sấu trong môi trường nước. Kỹ thuật này cũng phát triển mạnh mẽ trong những năm gần đây để điều tra các loài thú quý hiếm nằm trong dãy Trường Sơn sử dụng vật ký sinh/hút máu. Những ứng dụng này cho thấy phương pháp trong tương lai sẽ là công cụ trợ giúp đặc lực cho các nghiên cứu và công tác giám sát, bảo tồn đa dạng sinh học và đánh giá tác động môi trường trên cả nước

Từ khóa: Gen môi trường, eDNA, đa dạng sinh học, bảo tồn, loài nguy cấp.

1. GIỚI THIỆU

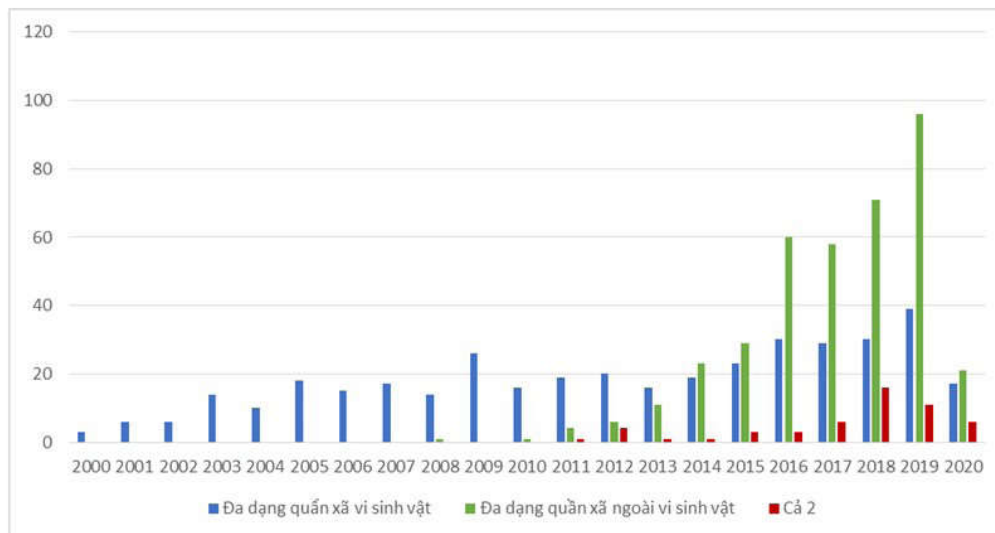
Thuật ngữ gen môi trường (environmental DNA hay thường được sử dụng ở dạng rút gọn eDNA) được định nghĩa là ADN thu được từ các mẫu mà không tách các sinh vật cần nghiên cứu trước khi phân tích. Các mẫu chủ yếu thu được từ phân, nước tiểu và các tế bào biểu bì có trong môi trường nước hoặc tồn tại trong các hạt hữu cơ hoặc vô cơ [1, 2]. Tuy nhiên, các nhà khoa học vẫn còn chưa thống nhất về định nghĩa thế nào là phương pháp gen môi trường. Một số cho rằng bất kỳ lượng ADN hòa tan trong môi trường và kể cả mẫu mô của sinh vật còn lại trong môi trường cũng được coi là gen môi trường [3]. Một số nhà khoa học khác lại coi gen môi trường là vật liệu di truyền thu trực tiếp từ các mẫu môi trường như đất, trầm tích và nước mà không có dấu hiệu của các vật liệu sinh học [4]. Theo định nghĩa hẹp này gen môi trường là một lượng rất nhỏ tế bào do sinh vật giải phóng ra môi trường và có thể phát hiện được khi thu các mẫu từ môi trường [5]. Trong những nghiên cứu gần đây, định nghĩa này đã được mở rộng và các phân tích ADN từ mẫu ruột, côn trùng, phân đều được coi là gen môi trường.

Thuật ngữ gen môi trường lần đầu tiên được sử dụng trong lĩnh vực vi sinh vật để mô tả phương pháp tách chiết ADN từ mẫu đất mà không cần tách các vi sinh vật là đối tượng nghiên cứu ra khỏi các mẫu các mẫu đất này [6]. Các ứng dụng của gen môi trường rất đa dạng từ phân tích tiến hóa của vi khuẩn, nghiên cứu đa dạng vi sinh vật trong các môi trường sống đặc biệt, cho tới giải trình tự toàn bộ hệ gen của vi sinh vật trong nước biển [7, 8, 9]. Những ứng dụng này đã tạo nên một cuộc cách mạng trong nghiên cứu đa dạng sinh học, tiến hóa và sinh thái. Khi kỹ thuật này trở nên dễ dàng sử dụng, được nhiều người biết tới và giá thành phân tích giảm xuống nhanh chóng trong những năm gần đây, nó được ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực với nhiều kỹ thuật mới [1].

Với công nghệ ngày càng phát triển, khả năng phát hiện một lượng vô cùng nhỏ gen môi trường tăng lên đáng kể trong những năm vừa qua từ nhận dạng một loài, liệt kê nhiều loài trong quần xã sinh vật cho tới thống kê sự biến đổi của quần thể (Hình 1) [10, 11].

¹Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội



▲ Hình 1. Số lượng bài báo công bố theo năm về các nghiên cứu sử dụng phương pháp gen môi trường nhằm nghiên cứu đa dạng quần xã vi sinh vật, đa dạng quần xã ngoài các loài vi sinh vật hoặc cả 2 từ năm 2000 đến năm 2020 [11].

Gen môi trường trở thành một công cụ hữu hiệu để điều tra các đa dạng sinh học đặc biệt trong môi trường nước vì sinh vật sống trong môi trường nước thường giải phóng ADN ra môi trường và ADN có thể tồn tại trong môi trường nước tương đối lâu do có tính ổn định cao hơn các môi trường khác như không khí và nước [2, 12]. Gen môi trường có ưu thế hơn các phương pháp điều tra truyền thống khác vì kỹ thuật này có thể phát hiện các sinh vật, đặc biệt là các loài nguy cấp, quý hiếm, ngay cả khi không quan sát được chúng. Vì vậy, việc sử dụng gen môi trường trong các nghiên cứu điều tra các loài sinh vật khó phát hiện phục vụ công tác bảo tồn ngày càng trở nên phổ biến [2, 13]. Các ứng dụng khác bao gồm phát hiện loài xâm hại và nghiên cứu các tương tác cũng như kiểu phân bố ở mức độ hệ sinh thái [10, 14].

Tuy nhiên, với những lợi thế lớn được hỗ trợ bởi công nghệ hiện đại, gen môi trường không thể thay thế hoàn toàn các phương pháp điều tra truyền thống. Thay vì đó, phương pháp này nên được sử dụng kết hợp với các phương pháp khác để có kết quả tốt nhất. Ví dụ, khi đánh giá hiệu quả của kỹ thuật gen môi trường trong việc phát hiện các loài thú trong môi trường nước biển, các nhà khoa học nhận thấy rằng các thiết bị giám sát bằng tiếng kêu truyền thống có hiệu quả cao hơn trong việc phát hiện Cá heo cảng (*Phocoena phocoena*) nhưng gen môi trường lại có thể phát hiện Cá voi vây dài (*Globicephala melas*) tốt hơn. Vì vậy, việc kết hợp hai phương pháp sẽ giúp cho chương trình giám sát thu được kết quả tốt nhất [15].

2. ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP GEN MÔI TRƯỜNG Ở VIỆT NAM

2.1. Sử dụng vắ làm mẫu gen môi trường

Một trong những nghiên cứu đầu tiên trên thế giới sử dụng vắ để điều tra các loài thú quý hiếm trong hệ sinh thái rừng thường xanh được thực hiện tại miền Trung của Việt Nam [16]. Trong hệ sinh thái rừng, vắ có số lượng rất lớn, dễ thu và thường hút máu của các vật chủ đặc biệt là thú. Nghiên cứu của Schnell và cộng sự cho thấy các mẫu máu của vật chủ có thể giữ được trong cơ thể vắ có thể giữ được ít nhất 4 tháng từ khi hút máu. Như vậy, vắ là mẫu gen môi trường gần như lý tưởng trong nghiên cứu điều tra các loài thú có trong hệ sinh thái. Schnell và cộng sự thu các mẫu vắ thuộc giống *Haemadipsa* và sau đó nhân bản các mẫu máu thu được bằng phản ứng PCR và giải trình tự thu được. Kết quả nghiên cứu này cho thấy có ít nhất 4 loài thú xuất hiện trong vùng nghiên cứu, bao gồm Thỏ vằn trường sơn (*Nesolagus timminsi*), Mang trường sơn (*Muntiacus truongsonensis*), Sơn dương (*Capricornis maritimus*) và Chồn bạc má bắc (*Melogale moschata*). Trong đó Thỏ vằn trường sơn và Mang trường sơn là hai loài thú quý hiếm rất khó có thể phát hiện bằng phương pháp điều tra thông thường. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng phát hiện một loài chồn ẩn sinh có quan hệ họ hàng gần gũi với Chồn bạc má nam (*Melogale personata*). Dựa trên thành công ban đầu, phương pháp thu mẫu vắ đã được sử dụng để điều tra Saola, một loài thú quý hiếm nhất trên thế giới, tại Lào và Việt Nam. Tuy nhiên,

phương pháp này chưa ghi nhận được Saola, có lẽ vì số lượng của loài này hiện còn quá ít và có thể loài này chỉ sống trong những vùng khó tiếp cận trong dãy Trường Sơn [16].

Phương pháp thu mẫu vật để điều tra thú cũng được kết hợp với phương pháp đặt bẫy ảnh để tận dụng lợi thế của cả hai phương pháp [17]. Trong nghiên cứu của Tilker và cộng sự, tổng số có 2043 mẫu vật thu được từ 98 vị trí đặt bẫy ảnh và 104 mẫu được nhân bản và giải trình tự thành công. Nghiên cứu này xác định được 25 loài thú và 7 loài xác định tới giống. Trong số này, có 19 loài là thú mặt đất. Danh sách loài thu được từ phương pháp thu mẫu vật và ghi nhận bằng bẫy ảnh có mức độ tương đồng cao. Có 4 loài chỉ xác định được bằng phương pháp bẫy ảnh là Tê tê, Khỉ đuôi lợn (*Macaca leonina*), Cây gấm (*Prionodon pardicolor*) và Triết bụng vàng (*Mustela kathiah*) và một loài Mèo gấm (*Pardofelis marmorata*) chỉ phát hiện được bằng phương pháp thu mẫu vật [17]. Như vậy, kết hợp cả hai phương pháp điều tra sẽ cho phép đưa ra được kết quả chính xác hơn là chỉ dùng một phương pháp.

Phương pháp thu mẫu vật còn được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của loài Thỏ vằn trường sơn quý hiếm tại miền Trung Việt Nam và Lào. Nghiên cứu của Nguyen và cộng sự đã thu được 4877 mẫu vật và được gộp vào thành 651 mẫu dựa trên địa điểm thu mẫu và loại vật thu được. Sử dụng phương pháp mã vạch tổng quát, Nguyen và cộng sự đã ghi nhận ADN của Thỏ vằn trường sơn trong 11 mẫu gộp từ 5 địa điểm nghiên cứu [18]. Phương pháp giải trình tự mới cho phép thu được tới 3000 nucleotid của 6 gen ty thể. Cây phát sinh loài xây dựng từ số liệu thu được cho thấy loài Thỏ vằn trường sơn có đa dạng di truyền thấp giữa các vùng nghiên cứu. Phương pháp đánh giá đa dạng di truyền từ mẫu vật này mở ra một hướng mới trong nghiên cứu đa dạng sinh học và định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Điều tra các loài quý hiếm từ mẫu nước

Phương pháp gen môi trường được áp dụng đầu tiên tại Việt Nam vào năm 2015 để điều tra 2 loài rùa cực kỳ nguy cấp, Rùa hộp Zhou (*Cuora zhoui*) và loài Rùa trung bộ (*Mauremys annamensis*) [19]. Nghiên cứu này xử lý 31 mẫu nước thu được từ tỉnh Bắc Kạn, nơi phân bố tiềm năng của loài Rùa hộp Zhou. Mặc dù không ghi nhận loài này trong các mẫu nước thu được, các phân tích phát hiện ra loài Rùa đũa (*Cyclemys oldhamii*) trong 1 mẫu nước và xác nhận sự xuất hiện của loài này trong vùng nghiên cứu. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng tiến hành phân tích 149 mẫu nước thu từ các tỉnh Phú Yên, Quảng Nam và Quảng Ngãi.

Tuy nhiên, không mẫu nước nào có ADN của loài rùa Trung Bộ và xác nhận loài rùa này có thể đã tuyệt chủng trong tự nhiên tại các vùng thu mẫu.

Phương pháp gen môi trường cũng đã được sử dụng để điều tra và xác nhận sự xuất hiện của cá thể Rùa hoàn kiếm (*Rafetus swinhoei*) ở hồ Xuân Khanh, ngoại thành Hà Nội. Rùa hoàn kiếm là loài rùa lớn và quý hiếm nhất trên thế giới. Việc tìm kiếm các cá thể khác của loài rùa này trên phạm vi cả nước là một công việc rất khó khăn vì số lượng cá thể đã bị giảm đi đáng kể trong những thập kỷ gần đây. Vào năm 2017, Chương trình bảo tồn rùa châu Á phát hiện một cá thể rùa mai mềm tại hồ Xuân Khanh nhưng vì hồ rộng, cá thể rùa này lại khá nhỏ và khó tiếp cận, nên việc định danh bằng phương pháp quan sát không khả thi. Tuy nhiên, qua phân tích rất nhiều các mẫu nước thu được từ hồ Xuân Khanh cuối cùng các nhà khoa học cũng đã tìm thấy ADN của loài Rùa Hoàn Kiếm và mở ra triển vọng xây dựng chương trình nhân nuôi sinh sản cho các cá thể còn lại tại Việt Nam. Hiện nay, hoạt động điều tra Rùa Hoàn Kiếm bằng phương pháp gen môi trường vẫn được tiếp tục thực hiện. Tuy nhiên, thách thức lớn nhất là số lượng cá thể quá ít và lượng nước trong các thủy vực nghiên cứu lại quá lớn nên việc phân tích gen môi trường từ các mẫu nước rất khó khăn.

Phân tích mẫu nước cũng giúp hoạt động điều tra giám sát loài Thần lằn cá sấu (*Shinsaurus crocodilurus*) có tập tính bán thủy sinh. Sử dụng phương pháp qPCR [20] đã xác nhận sự xuất hiện của loài này tại 4 trong số 6 địa điểm nghiên cứu và hỗ trợ kết quả thu được từ phương pháp điều tra truyền thống. Vì đây là một trong những loài bò sát nguy cấp, quý, hiếm bị tác động mạnh bởi các hoạt động săn bắt và mất môi trường sống, phương pháp gen môi trường sẽ là công cụ hỗ trợ hữu hiệu trong việc điều tra loài này trong tương lai, đặc biệt tại những vùng có mật độ cá thể thấp.

3. KẾT LUẬN

Phương pháp gen môi trường là một công cụ tương đối mới trong nghiên cứu đa dạng sinh học. Tính hữu hiệu của phương pháp này đã được thể hiện trong nhiều nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau. Phương pháp này ngày càng được sử dụng rộng rãi trong việc điều tra và giám sát loài giúp hỗ trợ việc quản lý tài nguyên thiên nhiên. Với sự phát

triển của công nghệ sinh học, gen môi trường ngày càng có nhiều lợi thế so với các phương pháp điều tra truyền thống, như giá thành cạnh tranh, rút ngắn thời gian nghiên cứu, độ nhạy và chính xác cao hơn. Ngoài ra, với địa hình đồi núi hiểm trở ở Việt Nam, sử dụng phương pháp gen môi trường là lựa chọn hiệu quả và an toàn hơn so với phương pháp điều tra truyền thống đối với các loài phân bố ở tuổi cao. Tuy nhiên, do một số loài ở Việt Nam phân bố trong các khu vực nước tĩnh, nước bẩn, phương pháp gen môi trường cũng có một số hạn chế nhất định do bị ảnh hưởng bởi độ tinh sạch của nước. Vì vậy, để tăng hiệu quả của phương pháp gen môi trường, các mẫu này có thể được lọc để loại bỏ cặn cát hoặc một số thành phần khác như rong, rêu trước khi đưa vào lọc qua màng lọc eDNA. Tuy chưa thể thay thế hoàn toàn các phương pháp truyền thống, phương pháp gen môi trường có thể hỗ trợ và làm tăng hiệu quả thu được khi sử dụng kết hợp. Mặc dù việc ứng dụng gen môi trường vào nghiên cứu đa dạng sinh học tại Việt Nam bắt đầu khá muộn, nhiều nghiên cứu mang tính đột phá đã được tiến hành tại nước ta, đặc biệt trong việc

sử dụng các mẫu vật làm mẫu gen môi trường. Trong tương lai, công tác điều tra và giám sát đa dạng sinh học nên sử dụng phương pháp gen môi trường để cung cấp số liệu chính xác và đáng tin cậy nhằm nâng cao hiệu quả quản lý tài nguyên thiên nhiên trong cả nước. Ngoài ra, cần có thêm các nghiên cứu sử dụng phương pháp mã vạch tổng quát để đánh giá đa dạng sinh học trong môi trường nước đặc biệt tại những vùng có loài xâm hại và để điều tra các loài quý hiếm khó phát hiện bằng phương pháp điều tra truyền thống. Phương pháp mã vạch tổng quát cũng có thể giúp đánh giá tác động của ô nhiễm môi trường bằng việc xác nhận sự xuất hiện hay vắng mặt của các sinh vật chỉ thị cho chất lượng môi trường nước■

LỜI CẢM ƠN: Chúng tôi xin cảm ơn ThS. Nguyễn Văn Thành, ThS. Nguyễn Thị Thảo, CN. Đỗ Hạnh Quyền, CN. Bùi Thị Phương Thanh, ThS. Phan Quang Tiến, CN. Hồ Thị Ngọc Ánh đã hỗ trợ công tác thực địa và phân tích mẫu eDNA. Nghiên cứu được tài trợ một phần bởi Quỹ EDGE – Hiệp hội Động vật học London (ZSL) và Tổ chức National Geographic, Vườn thú Cologne.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C. 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6: e23398.
2. Thomsen, P., Kielgast, J.O.S., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012a. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565-2573.
3. Mahon, A.R., Jerde, C.L., Galaska, M., Bergner, J.L., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., Hunter, M.E., Nico, L.G. 2013. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS ONE* 8: e58316.
4. Thomsen, P.F., Willerslev, E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4–18.
5. Turner, C.R. và cộng sự 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5(7).
6. Ogram, A., Sayler, G.S., Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods* 7: 57-66.
7. Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution *Microbiology. Review* 51: 221
8. Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740
9. Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
10. Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4: 423-425.
11. Pawlowski, J., Apothéloz-Peret-Gentil, L., Altermatt, F. 2020. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology* 29: 4258–4264.
12. Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P. 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources* 14: 109-116.

13. Torresdal, J.D., Farrell, A.D., Goldberg, C.S. 2017. Environmental DNA detection of the golden tree frog (*Phytotriades auratus*) in bromeliads. *PLoS ONE*: 12(1).
14. Madden, A.A., Barberán, A., Bertone, M.A., Menninger, H.L., Dunn, R.R., Fierer, N. 2016. The diversity of arthropods in homes across the United States as determined by environmental DNA analyses. *Molecular Ecology*.
15. Thomsen, P.F. và cộng sự 2016. Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE* 11: e0165252.
16. Schnell, I.B., Thomsen, P.F., Wilkinson, N., Rasmussen, M., Jensen, L.R., Willerslev, E., Bertelsen, M.F., Gilbert, M.T.P. 2012. Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current Biology* 22: R262-R263.
17. Tilker, A., Abrams J.F., Nguyen, A., Hörig L., Axtner J., Louvrier J., Rawson B.M., Nguyen A.Q.H., Guegan E., Nguyen T.V., Le M., Sollmann R., Wilting A. 2020. Identifying conservation priorities in a defaunated tropical biodiversity hotspot. *Diversity and Distributions* 26: 426-440.
18. Nguyen, T.V., Tilker A., Nguyen A., Hörig L., Axtner J., Schmidt A., Le M., Nguyen A.Q.H., Rawson B.M., Wilting A., Fickel J. 2021. Using terrestrial leeches to assess the genetic diversity of an endemic species: the Annamite striped rabbit *Nesolagus timminsi*. *Environmental DNA* 3: 780-791.
19. CRES (Centre for Natural Resources and Environmental Studies). 2016. Strengthening conservation of the most critically endangered turtles in Vietnam through application of environmental DNA. *CEPF Final Completion Report*.
20. Reinhardt, T., van Schingen M., Windisch H.S., Nguyen T.Q., Ziegler T., Fink P. 2019. Monitoring a loss: Detection of the semi-aquatic crocodile lizard (*Shinisaurus crocodilurus*) in inaccessible habitats via environmental DNA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29: 353-360.

APPLICATION OF ENVIRONMENTAL DNA TO BIODIVERSITY RESEARCH AND CONSERVATION IN VIETNAM

Lê Đức Minh^{1*}, Ngô Thị Hạnh²

¹Faculty of Environmental Sciences, University of Science,

Vietnam National University, Hanoi

²Faculty of Biology, University of Science,

Vietnam National University, Hanoi

ABSTRACT

Environmental DNA or eDNA is defined as a technique to collect and analyze DNA of targeted organisms from their living environment, such as soil, water, and air. As eDNA can detect elusive species in samples even without seeing them, it has been considered an effective measure in biodiversity conservation study, especially in surveying endangered species, which are hard to observe using conventional methods. To date, the approach has been employed to survey the critically endangered Zhou's Box Turtle (*Cuora zhoui*), Swinhoe's Softshell Turtle (*Rafetus swinhoei*), Vietnamese Pond Turtle (*Mauremys annamensis*) and Vietnamese Crocodile Lizard (*Shinisaurus crocodilurus vietnamensis*) based on collected water samples. The technique has also recently been advanced to survey endangered terrestrial mammals in Truong Son Range using blood sucking leeches. These applications show that eDNA is especially effective in monitoring terrestrial mammals and in the future will be a very useful tool for surveying and monitoring endangered and elusive the species and undertaking environmental impact assessments nationwide.

Key words: Environmental DNA, eDNA, biodiversity, conservation, endangered species.