

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH DANH CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÌNH THÁI VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ

Trần Thị Thúy Hà^{1*}, Trần Nguyễn Ái Hằng², Nguyễn Thị Hương¹, Nguyễn Thị Thu Thủy¹

¹*Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1*

²*Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2*

Email*: thuyha@ria1.org

Ngày gửi bài: 12.03.2015

Ngày chấp nhận: 30.08.2017

TÓM TẮT

Để kiểm định chính xác cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), việc kết hợp hai phương pháp định danh bằng hình thái và sinh học phân tử là cần thiết. Phương pháp định danh bằng hình thái học đã nhận dạng được chính xác các mẫu thuộc loài cá Tra trong họ cá Pangasiidae dựa vào số gai lưng, số tia vây bụng, vây ngực.... Bên cạnh đó, phân tích trình tự gen ty thể cytochrome c oxidase I (COI) và cytochrome b (Cytb) kết hợp với những phần mềm chuyên dụng cho kết quả về định danh loài với độ tin cậy cao, góp phần hỗ trợ phương pháp phân loại hình thái. Để chứng minh tính hiệu quả của phương pháp kiểm định, trong nghiên cứu này, trình tự gen COI và Cytb của 30 mẫu cá Tra thu ở 2 tỉnh An Giang và Bến Tre thể hiện tính đặc trưng và có độ tương đồng tới 99-100% với trình tự ADN của loài cá Tra có tên khoa học là *P. hypophthalmus* trên ngân hàng gen (Genbank). Kết quả này khẳng định tính ưu việt và sự cần thiết của việc kết hợp hai quy trình kiểm định hình thái học và sinh học phân tử.

Từ khóa: COI, Cyt b, định danh, hình thái, giải trình tự, *Pangasianodon hypophthalmus*.

Protocol for Identification in Tra Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) by Morphological Taxonomy and Molecular Genetics methods

ABSTRACT

The combination of morphological taxonomy and molecular genetics methods is required for effective and accurate identification of Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). The identification based on morphological characteristics is possible to identify accurately Pangasiidae species that simply relies on number of spines, pelvic fins, pectoral fins, etc. In addition, sequence analysis of cytochrome c oxidase I (COI) and cytochrome b (Cytb) genes along with specialized softwares provide significantly reliable results, which contribute information to confirm the morphological classification. In this study, identification based on molecular genetics method revealed 99-100% similarity in nucleotide sequences of COI and Cytb genes between 30 fish samples collected in An Giang and Ben Tre provinces with Tra catfish *Pangasianodon hypophthalmus* species. Our finding confirms the superiority and necessity of combining two identifications methods, morphological taxonomy and molecular genetics methods.

Keywords: COI, Cyt b, identification, morphology, sequence, *Pangasianodon hypophthalmus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá Tra là đối tượng chủ lực của Việt Nam với sản lượng xuất khẩu không ngừng tăng lên trong thời gian qua. Tuy nhiên, việc xuất khẩu cá Tra cũng đang đứng trước gian lận thương mại do một số công ty trong nước câu kết với

công ty nước ngoài làm mất uy tín của cá Tra trên thị trường thế giới (Hellberg & Morrissey, 2011). Phân biệt chính xác loài cá là nhiệm vụ rất quan trọng nhằm phục vụ cho công tác nghiên cứu đa dạng loài và bảo vệ nguồn lợi thủy sản, đặc biệt là những loài có giá trị kinh tế cao nhưng chưa được định danh rõ ràng (Marko *et al.*, 2004).

Phương pháp phân loại dựa vào hình thái đạt được một số kết quả nhất định và được áp dụng từ rất lâu (Mai Đình Yên và cs., 1992). Tuy nhiên, trong một số trường hợp, hình thái bị giới hạn như đặc điểm khác biệt giữa các loài là quá nhỏ hoặc khó nhận thấy từ bên ngoài như xương lá mía, bóng hơi... hoặc các đặc tính hình thái đã bị loại bỏ trong quá trình tiêu hóa hoặc xử lý chế biến thì việc xác định trở nên khó khăn hoặc thậm chí không thể.

Hiện nay, phương pháp phân loại dựa vào trình tự một đoạn DNA đặc trưng cho loài (DNA barcoding) được áp dụng và đã giải quyết những khó khăn trong phân loại nếu chỉ dựa vào hình thái. Phương pháp này cho kết quả phân loại nhanh và chính xác cao (Steinke *et al.*, 2009). Trong đó, gene COI và Cyt b được xem như một mã vạch DNA đặc trưng cho các loài động vật (Hebert *et al.*, 2003; 2004; Kartavtsev & Lee, 2006). Các gen này được công nhận là có hiệu quả cao trong phân loại loài, chẳng hạn nghiên cứu về các loài cá biển ở Úc (Ward *et al.*, 2005), cá nước ngọt ở Canada (Hubert *et al.*, 2008) hay các loài cá cảnh kinh tế ở Bắc Mỹ (Steinke *et al.*, 2009).

Ở Việt Nam, Nguyễn Đức Bách và cs. (2016) nghiên cứu phân loại cá Chim vây vàng bằng phương pháp hình thái học và sinh học phân tử dựa vào trình tự gen ty thể COI. Kết quả cho thấy dựa vào tỉ lệ Lo/hD và so sánh trình tự đoạn gen ty thể COI đã phân biệt được 20 cá thể chim vây vàng thành 2 nhóm qua sự khác biệt rõ rệt ở 43 vị trí SNP trong trình tự gen COI. Nguyễn Phương Thảo và Dương Thúy Yên (2015) đã so sánh đặc điểm hình thái và trình tự gen COI của hai “loài” cá bống trôn *Butis butis* và *Butis humeralis*. Kết quả về hình thái cho thấy chúng giống nhau ở hình dạng thân, mõm, màu sắc và cấu tạo cơ gốc vi ngực và một số chỉ tiêu đo. Tuy nhiên, chúng khác nhau ở vạch và màu sắc của mắt, vị trí bắt đầu của vi lưng và vi hậu môn, tỉ lệ dài đầu/khoảng cách hai mắt và cao thân/cao cuống đuôi. Về trình tự gen COI, các mẫu của hai loài giống nhau ở mức 99 - 100%. Khoảng cách di truyền giữa 2 loài tương đương với khoảng cách di truyền trong cùng một loài ($0,003 \pm 0,001$). Trong bài viết này, dựa vào

kết quả nghiên cứu trên cá da trơn thuộc giống Pangasiidae, chúng tôi đưa ra quy trình kiểm định bằng hình thái và sinh học phân tử để phân biệt chính xác loài *P. hypophthalmus*, góp phần giúp các cơ sở nuôi trồng thủy sản chọn đúng loài cá, tránh nhầm lẫn trong sản xuất và thương mại cũng như bảo vệ quyền lợi của người tiêu dùng. Bên cạnh đó, việc ứng dụng quy trình này được thể hiện qua nghiên cứu định danh loài cá Tra *P. hypophthalmus*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu được nghiên cứu là cá Tra thu tại các trại và sông lớn ở Châu Phú (10 mẫu), Long Xuyên (5 mẫu) thuộc tỉnh An Giang và Châu Hưng (10 mẫu), Thành Thới B (5 mẫu) thuộc tỉnh Bến Tre. Kích thước cá trung bình > 500 g. Mẫu cá sau khi thu được rửa sạch bằng nước ngọt và được mã hóa. Tiến hành phân loại bằng hình thái khi mẫu còn tươi. Mẫu vây ngực (2 - 4 g) được thu và cố định riêng rẽ trong các ống eppendorf 2 ml, giữ trong cồn 96° và được bảo quản lạnh ở -4°C.

2.2. Phương pháp xây dựng quy trình

2.2.1. Định danh bằng hình thái học

- Dựa vào hệ thống phân loại cá thế giới của Fishbase (2016), “Catalog of fish” của Viện Hàn lâm Khoa học California - USA (1998-2000).

- Dựa vào khóa định loại phân của các tác giả trên thế giới và trong nước như Mai Đình Yên và cs. (1992), Nguyễn Văn Hảo (2005), So Nam *et al.* (2011) và Rainboth (1996).

Các bước tiến hành:

- Bước 1: Đo đếm và mô tả các chỉ tiêu hình thái ngoài và cấu tạo trong theo nguyên tắc phân loại động vật và hướng dẫn nghiên cứu cá của Mai Đình Yên và cs. (1992) với mẫu chuẩn và mẫu cần phân loại.

- Bước 2: Tính toán và xử lý số liệu: áp dụng công thức sau để tính sai khác giữa mẫu phân tích và mẫu cá Tra chuẩn bằng hệ số diff tính theo các chỉ tiêu đo:

$$\text{Hệ số diff} = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{(m_1^2 + m_2^2)}}$$

Trong đó: M_1 và M_2 là giá trị trung bình các nhóm cá 1 và 2

m_1 và m_2 là sai số trung bình của nhóm cá 1 và 2

+ Nếu hệ số diff < 3: không có sự khác biệt về loài giữa mẫu đang cần phân loại và mẫu chuẩn.i

+ Nếu hệ số diff ≥ 3 : mẫu cá đang phân loại có mức độ sai khác với mẫu chuẩn về các chỉ tiêu nghiên cứu. Trường hợp từ 5 chỉ tiêu trở lên có hệ số diff ≥ 3 thì có thể bước đầu khẳng định là dòng cá hoặc hai loài cá khác nhau.

- Bước 3: Sử dụng các khóa phân loại, mô tả và hình ảnh của mẫu cá Tra chuẩn được viết trong các tài liệu để xác định mẫu cá nghiên cứu thuộc ngành Chordata, lớp Actinopterygii, bộ cá nheo Siluriformes, họ cá Tra Pangasiidae và giống cá Tra *Pangasianodon*, loài *P. hypophthalmus* hay không.

2.2.2. Định danh bằng sinh học phân tử

Chi tiết các bước:

Bước 1 - Thu mẫu: Mẫu vây hoặc mẫu cơ cá (2 - 4 g) được thu và cố định riêng rẽ trong các ống eppendorf 2ml, giữ trong cồn 96°.

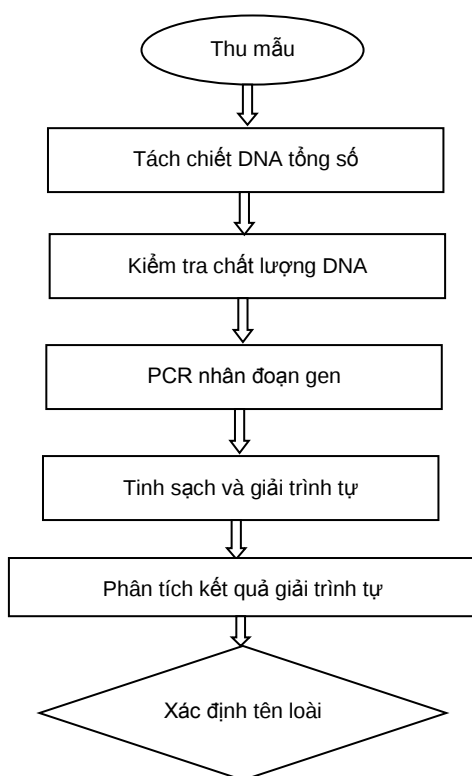
Bước 2 - Tách chiết DNA tổng số

Để tách chiết DNA tổng số có thể dùng Kit tách chiết DNA hoặc theo phương pháp kết tủa muối (Sambrook & Russell, 2001). Sau khi tách chiết, DNA được bảo quản ở 4°C.

Bước 3 - Kiểm tra chất lượng DNA

Sản phẩm sau khi tách chiết được điện di kiểm tra trên gel agarose (nồng độ 0,8%; vạch DNA tổng số sáng, gọn là đạt tiêu chuẩn) và đo OD bằng máy NanoDrop (các chỉ số 260/280 nằm trong khoảng 1,8-2,0 và 260/230 nằm trong khoảng 2,0-2,2 là đạt tiêu chuẩn).

Nồng độ DNA > 100 ng/μl được coi là đạt yêu cầu. Nếu nồng độ DNA > 200 ng/μl nên pha loãng về nồng độ 100 ng/μl.



Hình 1. Sơ đồ tóm tắt các bước định danh bằng sinh học phân tử

Bảng 1. Thông tin trình tự môi

Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Kích thước (bp)	Nguồn
COI	FishF2_t1 FishR2_t1	CGACTAATCATAAAGATATCGGCAC TTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	56 560 - 700	Ward <i>et al.</i> , 2009
Cyt b	L14735 H15149ad	AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTA GCICCTCARAATGAYATTTGTCCT CA	52 420- 650	Russell <i>et al.</i> , 2000 Wolf <i>et al.</i> , 2000

Bước 4 - PCR nhân đoạn gen

Các đoạn gen vùng COI và Cty b được khuếch đại với hai cặp môi với các thông tin trong bảng 1.

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 20µl bao gồm: 100mM Tris HCl (pH 8,3), 500 mM KCl (pH 8,3); 2,5 µl MgCl (25 mM); 0,5 µl dNTPs (5 mM); 0,5 µl mỗi loại mỗi ngược và mỗi xuôi (10 pm/µl mỗi môi) và 1U/ µl Taq Polymerase; 2,0µl DNA khuôn (~ 100 ng/µl) và nước đệm ion. Điều kiện phản ứng đối với 1 chu kỳ nhân đoạn gen thuộc vùng Cyt b/ COI lần lượt ở 94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 52/56°C trong 40 giây, 72°C trong 45 giây); kéo dài chuỗi ở 72°C trong 10 phút và giữ ở 4°C.

Bước 5 - Tinh sạch và giải trình tự

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% để kiểm tra kết quả. Sau đó, mẫu được tinh sạch bởi kit Expin™ PCR SV của hãng GeneAll và gửi đến công ty First BASE Laboratories, Malaysia để giải trình tự. Sản phẩm tinh sạch được gắn nhãn bằng bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, trong hỗn hợp phản ứng 10 µl có chứa: 4,94 µl nước tinh khiết, 1,94 µl BigDye buffer 5X (400 mM Tris-HCl pH 9,0 và 10 mM MgCl₂), 0,12 µl BigDye Terminator và 1 µl ExoSAP products. Phần mềm phân tích Genomelab system được sử dụng để tạo các file trình tự và đọc chiều dài liên kế.

Bước 6 - Phân tích kết quả giải trình tự

+ Kiểm tra và hiệu chỉnh trình tự: Các trình tự gen được kiểm tra chất lượng bằng

phần mềm Finch TV 1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Tín hiệu các nucleotide đã giải trình tự thông qua thông số “Quality” (Hình 2) được kiểm tra và cắt bỏ, thay thế đoạn trình tự đọc lỗi. Bên cạnh đó, trình tự ngược có được đảo chiều thông qua ứng dụng của phần mềm. Sau đó kiểm tra mã bộ ba kết thúc để tránh sai sót trong quá trình xử lý và đọc trình tự.

+ Phân tích và sắp xếp trình tự: Các trình tự từ nghiên cứu này được so sánh và căn chỉnh trình tự bằng chương trình Clustal W trong Bioedit. Các trình tự của mỗi xuôi và mỗi ngược sau khi so sánh với nhau được cắt bỏ phần trùng khớp và nối lại với nhau tạo thành một trình tự hoàn chỉnh, tăng độ tin cậy trình tự.

+ So sánh trình tự với ngân hàng gen NCBI (National Center for Biotechnology Information), BOLD (The Barcode of Life Data Systems):

* Đối với dữ liệu BOLD: trình tự được so sánh qua các bước tóm tắt như sau:

Bước 1: Đăng nhập cơ sở dữ liệu BOLD tại <http://www.barcodinglife.com>. BOLD sử dụng BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh trình tự được đưa vào cơ sở dữ liệu của trình tự đáp ứng công ước quốc tế dựa vào tiêu chuẩn cho mã vạch DNA.

Bước 2: Chọn “Identification” từ menu ở phía trên cùng của trang chủ:

Bước 3: Chọn “All Barcode Records on BOLD” từ “Search Databases” (Hình 2)

Bước 4: Dán chuỗi trình tự vào mục “Enter sequence in fasta format” và chọn “Submit”.

Bước 5: Nhìn vào kết quả tìm kiếm BOLD cho biết những loài gì được tìm thấy gần nhất với đoạn trình tự được tra tìm. Kết quả cho biết đầy đủ tên khoa học (chi và loài).

Bước 6: Ấn vào nút “Tree Based Identification” trên trang web để xem vị trí trình tự được đưa và trong cây phát sinh chủng loại mà cơ sở dữ liệu BOLD xây dựng.

Bước 7: Chọn “Download Tree link” để tải về một tập tin PDF có chứa cây phân loại (Hộp đen, Hình 3). Cũng có thể nhấp vào nút “View Image List” để xem hình ảnh của các loài có liên quan.

* Đối với dữ liệu NCBI: trình tự được so sánh qua các bước tóm tắt như sau:

Bước 1: Đăng nhập cơ sở dữ liệu NCBI tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Bước 2: Chọn “Nucleotide Blast” từ màn hình chính của BLAST (Hình 4)

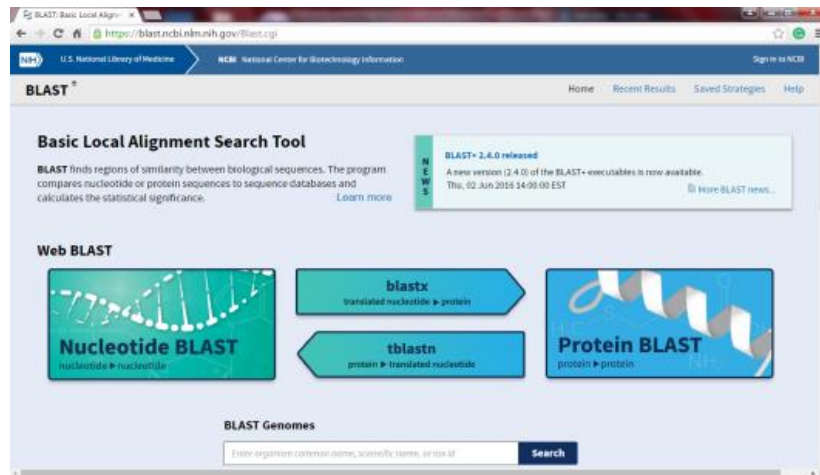
Bước 3: Dán chuỗi trình tự vào mục “Enter query sequence in fasta format” và chọn “BLAST” (Hình 5).

Bước 4: Kết quả tìm kiếm NCBI cho biết các loài có đoạn trình tự gần nhất với loài được tra cứu, thể hiện về mức độ bao phủ (Query cover), mức tương đồng (Identification).

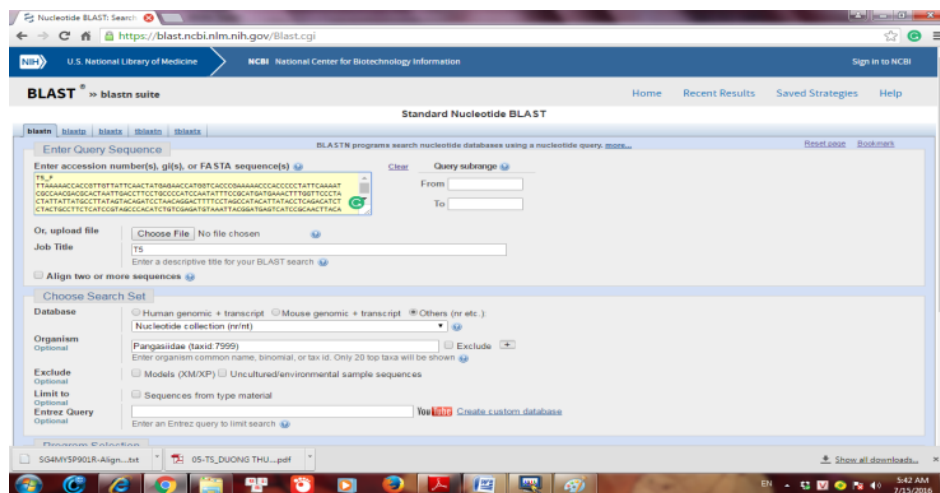
Hình 2. Kiểm tra trình tự DNA sử dụng BOLD

Hình 3. Xây dựng cây phân loại với các trình tự được tìm thấy trên BOLD

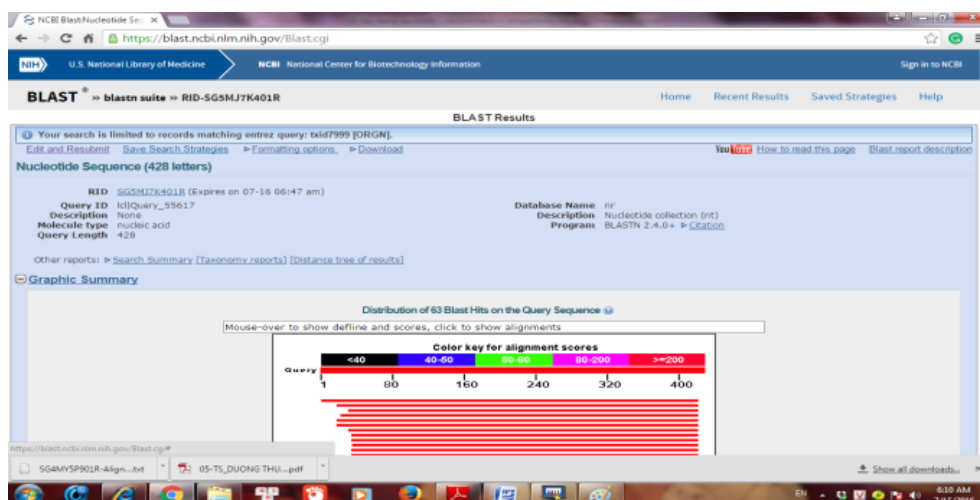
Xây dựng quy trình định danh cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp hình thái và sinh học phân tử



Hình 4. Màn hình chính của phần mềm BLAST



Hình 5. Màn hình chính của phần mềm BLAST



Hình 6. Kết quả so sánh trình tự của mẫu với dữ liệu trên NCBI của phần mềm BLAST

Dữ liệu trình tự COI/Cyt b của cả mẫu mới giải mã và dữ liệu có sẵn trong ngân hàng gen sẽ được chuẩn bị để phân tích khoảng các di truyền giữa các mẫu bằng cách sử dụng phần mềm MEGA phiên bản 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

+ Xác định loài nghiên cứu: dựa vào các kết quả phân tích trên để xác định tên loài nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phương pháp định danh bằng hình thái học

Áp dụng quy trình trên để phân loại 30 mẫu cá Tra đã thu được kết quả như sau:

Thể trình tự khóa phân loại đã nêu ở trên: ngành, lớp, bộ, họ, giống, loài.

Khóa phân loại đến loài *Pangasianodon hypophthalmus* theo So Nam(2011) - bản dịch của Ngô Sỹ Vân (2017)

Vây lưng có 6 tia, bóng hơi 1 ngăn kéo dài hết cả xoang bụng, răng trên xương lá mía và xương khẩu cái liên kế nhau thành vạch thẳng nghiêng dài. Thân màu xám...

Cá Tra *Pangasianodon hypophthalmus*

Đặc điểm nhận dạng:

+ Thân trần không phủ vảy, có cơ quan weber... (Bộ cá Nheo *Siluriformes*)

+ Có vây mỡ nhỏ, có từ 1 - 3 đôi râu (râu mõm, râu cằm, râu góc hàm). Răng hàm trên và

hàm dưới mịn, có răng vomer hoặc răng trên xương lá mía, chiều cao thân nhỏ hơn chiều rộng thân (Họ cá Tra *Pangasiidae*)

+ Lỗ mũi sau gần lỗ mũi trước hơn gần mắt, không có lườn bụng (sống bụng). Vây bụng có 8 tia (Giống cá Tra dầu *Pangasianodon*).

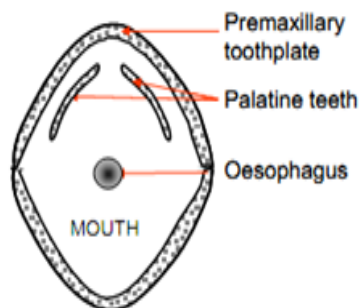
+ Hình dạng của dây răng palatin dài mảnh ở hai bên vòm miệng, trên thân có 3 sọc đen xen kẽ các phần trắng của cơ thể (cá nhỏ nhìn rất rõ - cá lớn hơi mờ). Lược mang, có vây hậu môn... cá Tra *P. hypophthalmus* (Sauvage, 1878).

Trong nghiên cứu này, hệ số diff của các chỉ tiêu đo đếm như Lo/T, Lo/H... của từng nhóm cá đều nằm trong khoảng [2 - 3]. Điều này cho thấy các chỉ tiêu gần như không có sự sai khác với mức tin cậy $P < 0,05$. Như vậy, một số chỉ tiêu hình thái chính để nhận dạng cá Tra *P. hypophthalmus* như số tia vây lưng, vây hậu môn, vây ngực, vây đuôi, đặc biệt là số tia vây bụng, bóng hơi rất ổn định không thay đổi giữa các vùng miền.

3.2. Phương pháp định danh bằng sinh học phân tử

3.2.1. Tách chiết DNA

Kết quả tách chiết DNA cho thấy các vạch băng sáng, rõ nét, kéo vệt không đáng kể. Điều này chứng tỏ DNA tổng số đã được tách chiết đủ điều kiện để thực hiện phản ứng PCR (hình ảnh không trình bày).



Hình 7. Cá Tra *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878)

3.2.2. Phản ứng PCR

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên 30 mẫu cá Tra cho thấy băng sản phẩm rõ nét, không xuất hiện sản phẩm phụ, kích thước đoạn gen COI được khuếch đại nằm trong khoảng 650bp phù hợp với nghiên cứu của Ward *et al.*(2005) và kích thước của đoạn gen Cyt b được khuếch đại nằm trong khoảng 430bp phù hợp với nghiên cứu Russell *et al.* (2000) và Wolf *et al.*(2000). Như vậy, chiều dài của đoạn gen COI, Cyt b trong nghiên cứu đã được khuếch đại là phù hợp với kích thước mong đợi và đáp ứng chất lượng cho các bước phân tích tiếp theo.

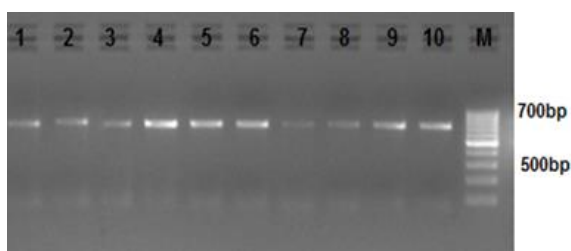
3.2.3. Giải trình tự và phân tích kết quả

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự gen vùng COI và Cyt b. Sau đó, sử dụng phần mềm chuyên dụng để so sánh các trình tự gen COI, Cytb của các mẫu nghiên cứu với nhau để thể hiện sự khác biệt giữa các trình tự

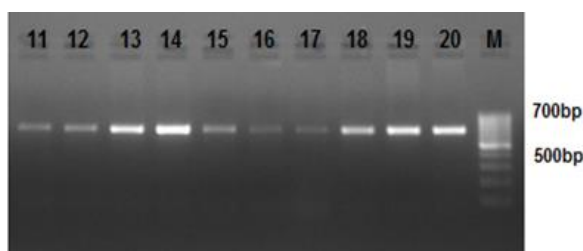
nucleotide và cũng là số liệu đầu vào của các bước phân tích tiếp theo.

3.2.4. So sánh trình tự với dữ liệu trên BOLD và NCBI

Trình tự gen COI, Cytb của các mẫu nghiên cứu được so sánh với trình tự tương ứng đã được đăng ký trên ngân hàng gen NCBI và BOLD để xác định độ tương đồng. Kết quả BLAST cho thấy sự tương đồng cao của các trình tự nucleotide gen COI, Cyt b của các mẫu cá Tra trong nghiên cứu này lần lượt với trình tự nucleotide gen COI, Cyt b được Quyen *et al.* (2015) và Pouyaud *et al.* (2000) công bố trên ngân hàng gen NCBI khi nghiên cứu loài *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) nằm trong khoảng 99 - 100% (Bảng 2). Từ đây, có thể kết luận về kết quả định danh bằng chỉ thị sinh học phân tử COI, Cyt b và kết quả định danh bằng hình thái học.

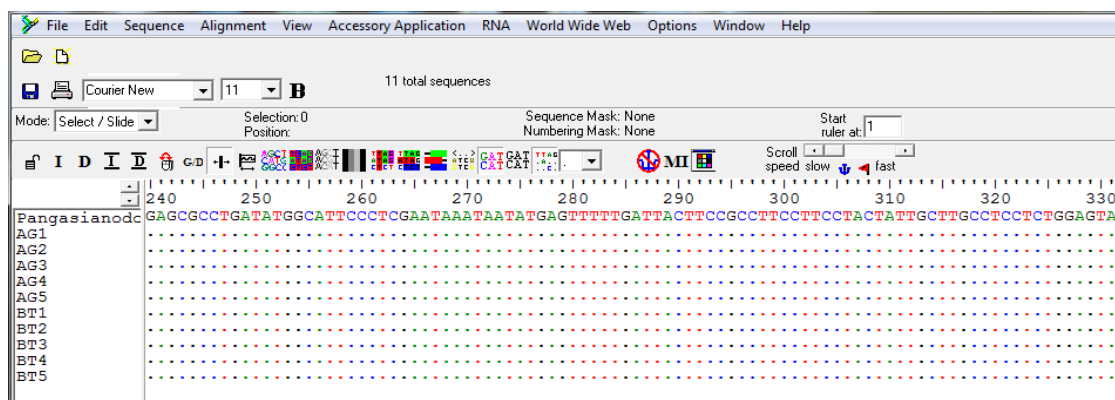


Hình 8. Sản phẩm PCR của gen COI sau khi điện di trên gel agarose 2%



Hình 8. Sản phẩm PCR của gen COI sau khi điện di trên gel agarose 2%

Chú thích: Giếng 1→ 10 lần lượt là sản phẩm PCR của mẫu thu An Giang với cặp mồi FishF2 + FishR2. Giếng 11→ 20 lần lượt là sản phẩm PCR của mẫu thu An Giang với cặp mồi L14735 + H15149ad. Giếng M: ladder 100bp.



Hình 10. Minh họa phần kết quả so sánh các trình tự của cá thể nghiên cứu

Bảng 2. Kết quả so sánh BLAST trên ngân hàng gen NCBI

STT	Mẫu	Loài tương đồng	Độ tương đồng (%)	Mã số (NCBI)		Mã số (BOLD)
				Cytb	COI	COI
1	AG1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
2	AG2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
3	AG3	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
4	AG4	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	99	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
5	AG5	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
6	AG6	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1 KY451464.1 KY451464.1 KY451464.1 KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
7	AG7	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	99	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
8	AG8	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
9	AG9	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
10	AG10	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
11	AG11	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	99	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
12	AG12	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
13	AG13	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
14	AG14	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	99	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
15	AG15	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
16	BT1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
17	BT2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
18	BT3	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
19	BT4	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
20	BT5	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
21	BT6	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
22	BT7	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
23	BT8	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
24	BT9	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	99	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
25	BT10	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
26	BT11	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
27	BT12	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	99	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
28	BT13	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237
29	BT14	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	<u>AAE3237</u>
30	BT15	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	100	KY451464.1	KR080263.1	AAE3237

3.2.5. Phân tích khoảng cách di truyền

Kết quả phân tích khoảng cách di truyền sử dụng phần mềm MEGA6 của 10 trình tự nucleotide

trong nghiên cứu này và trình tự của 3 loài trong họ *Pangasiidae* trên genbank (gồm *Pangasianodon hypophthalmus*; *Pangasius*

bocourti; *Pangasius krempfi* với mã số lần lượt là KR080263.1; JF292414.1; KT289877.1) được trình bày trên hình 12 và hình 13. Trong nghiên cứu này, khoảng cách di truyền của 10 trình tự nucleotide mẫu nghiên cứu nhỏ (0,000 - 0,008). Hơn nữa, khoảng cách di truyền của 10 mẫu trên có quan hệ gần nhất với trình tự COI, Cyt b của loài *P. hypophthalmus* lần lượt là (0,000 - 0,002) và (0,000 - 0,008) trong số 3 trình tự loài khác nhau trong họ Pangasiidae được lấy trên Genbank. Bên cạnh đó, khoảng cách di truyền của 10 mẫu nghiên cứu có mức độ khác biệt tương đối lớn với hai loài *Pangasius bocourti*; *Pangasius krempfi* là (8,6 - 14,2) với gen Cyt b và (9,8 - 11,4) gen COI. Như vậy, chúng ta đã thấy rõ được sự tương đồng của 10 mẫu nghiên cứu với loài cá Tra *P. hypophthalmus* cũng như sự sai khác rõ rệt của các mẫu nghiên cứu trên

so với 2 loài cá còn lại trong họ cá Pangasiidae. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu phân loại cá trong họ Pangasiidae dựa trên phân tích DNA vùng gen Cytochrome b của Pouyaud *et al.* (2000) với giá trị khoảng cách truyền của họ là (0,004 - 0,149) cho thấy các mẫu là khác loài. Thêm vào đó, nghiên cứu của Azlina *et al.* (2013) cũng khuếch đại gen COI làm cơ sở để phân loại các loài đặc trưng trong họ Pangasiidae ở Malaysia. Nghiên cứu đã so sánh khoảng cách di truyền của 42 mẫu của 4 loài *P. nasutus*, *P. bocourti*, *P. micronemus* và *P. hypophthalmus* trong cùng họ Pangasiidae, kết quả chỉ ra rằng các mẫu là khác loài nếu chúng có khoảng cách di truyền nằm trong khoảng từ 0,083 - 0,128. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với kết quả của nghiên cứu trước đó.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. AG1													
2. AG2	0.000												
3. AG3	0.000	0.000											
4. AG4	0.000	0.000	0.000										
5. AG5	0.000	0.000	0.000	0.000									
6. BT1	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002								
7. BT2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002							
8. BT3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000						
9. BT4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000					
10. BT5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000				
11. Pangasianodon hypophthalmus	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000			
12. Pangasius krempfi	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116	0.119	0.116	0.116	0.116	0.116	0.116		
13. Pangasius bocourti	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.116	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.098	

Hình 11. Khoảng cách di truyền trình tự gen COI của 10 mẫu nghiên cứu và trình tự của 3 loài trong họ Pangasiidae trên Genbank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. AG1													
2. AG2	0.005												
3. AG3	0.005	0.000											
4. AG4	0.005	0.000	0.000										
5. AG5	0.008	0.003	0.003	0.003									
6. BT1	0.000	0.005	0.005	0.005	0.008								
7. BT2	0.005	0.000	0.000	0.000	0.003	0.005							
8. BT3	0.005	0.000	0.000	0.000	0.003	0.005	0.000						
9. BT4	0.005	0.000	0.000	0.000	0.003	0.005	0.000	0.000					
10. BT5	0.008	0.003	0.003	0.003	0.000	0.008	0.003	0.003	0.003				
11. Pangasianodon hypophthalmus	0.005	0.000	0.000	0.000	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000	0.003			
12. Pangasius krempfi	0.138	0.138	0.138	0.138	0.142	0.138	0.138	0.138	0.138	0.142	0.138		
13. Pangasius bocourti	0.135	0.135	0.135	0.135	0.138	0.135	0.135	0.135	0.135	0.138	0.135	0.086	

Hình 12. Khoảng cách di truyền trình tự gen Cyt b của 10 mẫu nghiên cứu và trình tự của 3 loài trong họ Pangasiidae trên Genbank

4. THẢO LUẬN

Về đặc điểm hình thái, cá Tra giống với một số loài trong họ Pangasiidae như thân trần không phủ vảy, có cơ quan weber, có bóng hơi, có vây mỡ nhỏ, râu có 2 đôi râu (râu cằm và râu góc hàm), các chỉ tiêu đo đếm, một số tỉ lệ đo. Tuy nhiên chúng khác nhau ở lườn bụng, sọc đen trên lưng, vị trí bắt đầu của vi lưng và vi hậu môn, số tia vây lưng, cấu tạo của răng xương khẩu cái và xương lá mía. Sự khác biệt này có thể do tác động của môi trường sống nên sự khác biệt hình thái giữa các quần thể (Norton *et al.*, 1995; Wainright, 1996).

Bằng việc kết hợp hai chỉ thị COI và Cyt b, chúng tôi đã tiến hành định danh loài cá Tra và cho kết quả trùng khớp với phân loại hình thái. Lợi thế của chỉ thị COI và Cyt b thuộc hệ gen ty thể là đoạn trình tự ngắn để có thể giải trình tự một cách nhanh chóng và không tốn kém. Thêm vào đó, trật tự nucleotit trong đoạn COI và Cyt b có tính bảo tồn rất cao nên thuận lợi trong việc xác lập nên các bộ mã vạch di truyền cho nhiều loài động vật (Xu *et al.*, 2014). Chính vì vậy, việc kết hợp hai chỉ thị sẽ giúp cho quá trình phân loại cá Tra được chính xác đến 99%. Tùy vào từng đối tượng mà người ta sẽ kết hợp một hay nhiều chỉ thị để phân loại đến cấp độ loài. Hiện nay có rất nhiều đối tượng được phân loại sử dụng hai phương pháp hình thái và sinh học phân tử như Wang *et al.* (2013) đã phân loại hình thái và kết hợp với phân loại di truyền phân tử cho thấy mối quan hệ gần gũi của tất cả các loài, loài phụ của giống cá *Percocypris* dựa trên phân tích 3 gen ty thể (16S rRNA, COI và CYTB) và một gen nhân (rag2). Một ví dụ khác là ở cá hồi *Oncorhynchus mykiss*, loài này có 2 dòng với 2 tên gọi khác nhau, cá hồi vân và cá hồi búa. Chúng có hình dạng bên ngoài ở giai đoạn trưởng thành và đặc điểm vòng đời khác nhau (cá hồi búa di cư từ sông ra biển để sinh sản, hồi vân sống trong nước ngọt) nhưng đều cùng một loài (Docker & Heath, 2003). Kết quả nghiên cứu trên cá Tra cùng những ví dụ nêu trên đã chứng tỏ những trường hợp định danh loài bằng phương pháp hình thái chưa thuyết phục, cần kết hợp với ứng dụng phương pháp

DNA mã vạch. Có thể hai hay nhiều gen mã vạch cần được sử dụng trong những trường hợp mẫu nhỏ và khó định loại.

5. KẾT LUẬN

Kết hợp hai phương pháp phân loại bằng hình thái và sinh học phân tử, loài cá Tra *P. hypophthalmus* trong họ cá Pangasiidae đã được kiểm định chính xác. Phương pháp đã được xây dựng hoàn toàn phù hợp với mục đích kiểm định và định danh loài với độ chính xác cao lên tới 99%. Đây được coi là cơ sở để tiến hành định danh các loài cá da trơn khác trong họ cá Pangasiidae nói riêng và cho động vật thủy sản nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu phát triển và ứng dụng mã vạch di truyền (DNA barcoding) trên cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)” thuộc chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp, thủy sản - Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azlina, Z.M., Daud, S.K., Siraj, S.S., Aliabadian M. and Moghaddam, F.Y. (2013). Molecular phylogeny of Malaysian Pangasiid based on cytochrome C oxidase I (COI) DNA sequences.
- Docker, M.F. and Heath, D.D. (2003). Genetic comparison between sympatric anadromous steelhead and freshwater resident rainbow trout in British Columbia, Canada. *Conservation Genetics*, 4: 227-231.
- Eschmeyer W.N. (1998). *Catalog of Fishes* - California Academy of Sciences, USA.
- Fishbase. Truy cập ngày 5/7/2015 tại www.Fishbase.org.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and de Waard, J.R. (2004). “Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely

- related species”, Proceeding of the Royal Society Part B: Biological Sciences, 270(1): 96 - 99.
- Hellberg, R.S. and Morrissey M.T. (2011). Advances in ADN-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market Part B: Biological Sciences, 270(1512): 313-322.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., Burridge, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J. and Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. Plos ONE 3e2490 -2490.
- Kartavtsev, Y.P. and Lee, J.S. (2006). Analysis of nucleotide diversity at genes Cyt-b and Co-1on population, species and genera levels. Applicability of DNA and allozyme data in genetics of speciation. Russ. J. Genet., 42: 341-362.
- Mai Đình Yên, Nguyễn Văn Trọng, Nguyễn Văn Thiện, Lê Hoàng Yến và Hứu Bạch Loan (1992). Định loại cá nước ngọt Nam bộ. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 343 trang.
- Marko, P.B., Lee, S.C., Rice, A.M., Gramling, J.M., Fitzhenry, T.M., McAlister, J.S., Harper, G.R. and Moran, A.L. (2004). Fisheries: Mislabeling of a depleted reef fish. Nature, 430: 309-310.
- Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Minh Khuyển, Ngô Thanh Hương và Nguyễn Thị Mai (2016). Phân loại cá chim vây vàng bằng đánh giá hình thái và phân tích trình tự gen ti thể MT-COI. Báo cáo khoa học về nghiên cứu và giảng dạy sinh học ở Việt Nam, Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ hai, Đà Nẵng.
- Nguyễn Phương Thảo và Dương Thúy Yên (2015). So sánh đặc điểm hình thái và DNA mã vạch của hai loài cá bống trôn *Butis butis* và *Butis humeralis*. Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ, 40: 23-30.
- Nguyễn Văn Hào (2005). Cá nước ngọt Việt Nam, tập II, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Norton, S.F., Luczkovich, J.J. and Motta, P.J. (1995). The role of ecomorphological studies in the comparative biology of fishes. Environment. Biology. Fish, 44: 287-304.
- Pouyaud, L., Teugels, G.G., Gustiano, R. and Legendre, M. (2000). Contribution to the phylogeny of pangasiid catfishes based on allozymes and mitochondrial DNA. Journal of Fish Biology, 56: 1509-1538.
- Quyen, H.D.V., Phuong, T.T.L., Oanh, T.T., Thuoc, T.L. and Binh, D.T. (2015). Phylogenetic relationships of of Freshwater Fish in Vietnamese Mekong. International conference on biological, environment and food engineering (BEFE), Singapore, May 15-16, 2015.
- Rainboth W.J. (1996). Fishes of the Cambodian Mekong FAO.
- So Nam, Eric Baran and Leng Sy Vann (2011). Identification key to Pangasiid catfishes in Cambodia.
- Steinke, D., Zemlak, T.S., Boutillier, J.A. and Hebert, P.D.N. (2009). DNA barcoding of Pacific Canada’s fishes. Mar Biol., 156: 2641-2647.
- Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- Wainwright, P.C. (1996). Ecological explanation through functional morphology: the feeding biology of sunfishes. Ecology, 77: 1336-1343.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. and Hebert, B.D.N. (2005). DNA barcoding Australia’s fish species. Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences, 360: 1847-1857.
- Wang M., Yang J.X. and Chen X.Y. (2013). “Molecular phylogeny and biogeography of *percocypris (cyprinidae, teleostei)*”, PloS One 8, e61827.
- Wolf, C., Burgener, M., Hübner, P. and Lüthy, J. (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. LWT-Food Science and Technology, 33: 144-150.
- Xu, H., Zhang, Y., Xu, D., Lou, B., Guo, Y., Sun, X. and Guo, B. (2014). Genetic population structure of miiuy croaker (*Miiichthys miiuy*) in the Yellow and East China Seas base on mitochondrial COI sequences. Biochemical Systematics and Ecology, 54: 240-246.