

SỬ DỤNG MÃ VẠCH DNA TRONG VIỆC ĐỊNH LOẠI CÁ BIỂN TẠI BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN VIỆT NAM

TRẦN THỊ VIỆT THANH, VŨ THỊ THU HIỀN, TRẦN THỊ LIỄU, PHAN KẾ LONG
*Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,
 Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Nghiên cứu định loại loài bằng các trình tự DNA ngắn, chuẩn được các nhà khoa học trên thế giới áp dụng và thực hiện trong những năm gần đây (Hebert, 2003, 2004 [7]). Phương pháp này được gọi là mã vạch DNA (DNA barcoding). Nguyên lý của phương pháp này là dựa trên việc so sánh các trình tự DNA ngắn giữa mẫu chưa biết với ngân hàng trình tự ADN của Genbank, để xác định tên loài cho mẫu nghiên cứu. Hiện nay phương pháp này đã được sử dụng trong định loại nhiều đối tượng khác nhau như động vật thân mềm, côn trùng, lưỡng cư, bò sát, cá, chim thú (<http://www.barcodeoflife.org>) [11]. Với cá biển, việc nhận dạng hình thái đối với con non và con trưởng thành thường phải cần các chuyên gia, đôi khi vẫn có nhầm lẫn giữa các loài trong giống. Sử dụng mã vạch DNA barcoding cho kết quả chính xác với lượng mẫu sử dụng rất nhỏ.

Sự khác biệt về trình tự DNA barcode của đa số các loài động vật là rất rõ ràng, do đó giải trình tự DNA ngắn được sử dụng làm mã vạch cho các loài động vật hứa hẹn sẽ cung cấp một công cụ giám định loài chính xác, hiệu quả và định loại được với cả các mẫu không nguyên vẹn, mẫu con non khó định loại bằng hình thái (Avisé, 1995 [1], Gill và Slikas., 1992 [5], Banks *et al.*, 2000; 2002; 2003 [2, 3, 4]). Hiện nay, vùng gen CO1 được coi là vùng gen chuẩn trong xây dựng mã vạch DNA để nhận dạng loài và được công nhận bởi tổ chức barcode quốc tế (<http://www.barcodeoflife.org>) [11]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả sử dụng trình tự gen CO1 để định loại 4 loài cá biển (01 mẫu cá mặt trắng, 01 mẫu cá mập và 02 mẫu cá đối) đang lưu giữ tại BTTNVN.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu cơ của 4 mẫu cá biển có ký hiệu CMT_BTTNVN, CM_BTTNVN, 11.2_BTTNVN, D57_BTTNVN (Bảng 1); các mẫu nghiên cứu được bảo quản trong ethanol (70%) ở nhiệt độ phòng. Cặp mồi dùng trong kỹ thuật PCR gồm: FishF1-Fish F2/Fish R1 (Ward và cs., 2005 [10]) nhân bản vùng gen CO1 có kích thước khoảng 627bp (bảng 2). Các hoá chất sử dụng trong nghiên cứu có xuất xứ từ hãng Fermentas, tinh sạch sản phẩm PCR bằng Kit Extraction Gel của QIAGEN.

Bảng 1

Danh sách mẫu nghiên cứu

TT	Mẫu nghiên cứu	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
1	Cá mặt trắng	CMT_BTTNVN	Nghệ An
2	Cá mập	CM_BTTNVN	Kiên Giang
3	Cá đối cỏ	11.2_BTTNVN	Kiên Giang
4	Cá đối vây trước	D57_BTTNVN	Nghệ An

DNA tổng số được tách chiết theo quy trình của Hillis *et al.*, 1996 [8] có cải tiến tại Phòng PLHTN & ĐDNG. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ hóa chất Genomic DNA Purification kit (#KO512, Fermentas).

Bảng 2

Trình tự các cặp mồi và kích thước vùng gen đích theo lý thuyết

Vùng gen	Kí hiệu mồi	Trình tự nucleotide	Kích thước (bp)	Nguồn tài liệu
CO1	FishF1	TCAACCAACCACACCGACATTGGCAC	650	Ward và cs., 2005
	FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC		
	FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA		

Nhân bản trình tự đích bằng kỹ thuật PCR. Hỗn hợp PCR có thể tích 25µl, với thành phần: Master mix 2X: 12,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 1µl; Taq polymerase 5 u/µl: 0,5 µl; DNA tổng số: 2 µl; Mồi xuôi 10 pM: 1,25 µl, Mồi ngược 10 pM: 1,25 µl. Chu trình nhiệt PCR: biến tính ban đầu ở 94°C 2 phút, tiếp theo 35 chu kỳ: 95°C 30 giây; 52°C 1 phút; 72°C 1 phút, chu kỳ cuối giữ ở 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%, nhuộm gel bằng ethidium bromide và chụp ảnh khi chiếu ánh sáng UV. Sản phẩm PCR được giải trình tự sợi đôi trực tiếp tại công ty Macrogen, Hàn Quốc.

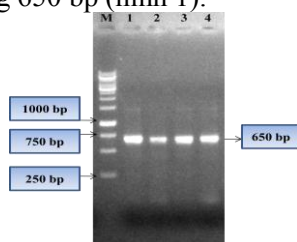
Dữ liệu trình tự được chỉnh sửa bằng phần mềm Bioedit. Tìm kiếm và so sánh giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng trên ngân hàng Genbank bằng chương trình BLAST. Sắp xếp các trình tự tương đồng bằng chương trình Clustal W. Xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Neighbor – Joined bằng phần mềm Mega 5.2.2 [9] với giá trị bootstrap lặp lại (replicate) 1000 lần.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân bản đoạn gen đích

DNA tổng số được tách chiết cho chất lượng tốt, điện di kiểm tra trên gel 0,9%, hình ảnh điện di cho một băng đậm rõ nét, đậm. Tất cả các mẫu thu được đều có độ sạch cao, không bị đứt gãy, chỉ số OD nằm trong giới hạn 1,8–2,0 DNA.

Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 1,2% cho thấy đã nhân bản được đoạn DNA đặc hiệu với kích thước khoảng 650 bp (hình 1).



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR các mẫu nghiên cứu trên gel agarose 1,2%

(Ký hiệu: giếng 1: mẫu CMT_BTTNVN; giếng 2: mẫu CM_BTTNVN, giếng 3: mẫu 11.2_BTTNVN, và giếng 4: mẫu D57_BTTNVN; M: marker phân tử 1kb)

(hình: Trần Thị Việt Thanh, 2014)

Kích thước sản phẩm PCR của 4 mẫu cá nghiên cứu phù hợp với kích thước lý thuyết của đoạn gen CO1 đích.

Xác định trình tự nucleotide cho các mẫu nghiên cứu

Trình tự nucleotide vùng gen CO1 ở sản phẩm PCR từ 4 mẫu cá nghiên cứu đã được xác định trình tự, chiều dài trình tự của mẫu cá mặt trắng, mẫu cá mập, mẫu cá đối cỏ và mẫu cá đối vây trước lần lượt là 620, 654, 599 và 598 bp.

Cá mặt trắng (CMT_BTTNVN)

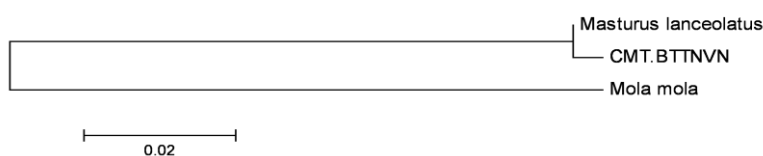
	10	20	30	40	50	
M. lanceolatus	AGTGGGAACG	GCCTTAAGCC	TGCTCATTTCG	AGCGGAGCTA	AGTCAACCTG	
Mola molaA.....A...	
CMT_BTTNVN	
	60	70	80	90	100	
M. lanceolatus	GGGCTCTCCT	TGGAGACGAC	CAAATTTACA	ATGTCATCGT	CACAGCACAT	Mola
mola	.T.....	.T.....	
CMT_BTTNVN	
	110	120	130	140	150	
M. lanceolatus	GCATTTGTAA	TAATTTTCTT	TATAGTAATA	CCAATTATGA	TCGGGGGCTT	Mola
molaT.....	
CMT_BTTNVN	160
	170	180	190	200		
M. lanceolatus	TGGAAATTGA	CTCATCCCTC	TTATGATTGG	GGCCCTGAT	ATGGCCTTT-	
Mola mola	C.....	C... ..GG.....C..C...C-	
CMT_BTTNVN	
	210	220	230	240	250	
M. lanceolatus	CCCCGGATGA	ACAATATGAG	CTTTTACTA	TTACCCCTT	CTTTCCTCCT	
Mola molaA...A..C..	..G.....A..T..T..	
CMT_BTTNVN	
	260	270	280	290	300	
M. lanceolatus	CCTCCTTGCT	TCTTCAGGCG	TCGAAGCAGG	TGCCGGAACG	GGGTGGACTG	
Mola mola	..T.....	C..C.....A..	..A..A....	
CMT_BTTNVN	
	310	320	330	340	350	
M. lanceolatus	TCTACCCTCC	TTTAGCCGGG	AATTTAGCCC	ACGCAGGCGC	CTCTGTTGAC	
Mola mola	.A.....	C.. ..A..	..C.....	.T.....T	
CMT_BTTNVN	
	360	370	380	390	400	
M. lanceolatus	TTACAATCT	TTTCCCTTCA	TCTGGCCGGC	ATCTCCTCAA	TTCTAGGGGC	
Mola mola	C..A.....	
CMT_BTTNVN	
	410	420	430	440	450	
M. lanceolatus	CATTAACCTT	ATCACAACAA	TCATTAATAT	GAAACCACCT	GCAATTTCTC	
Mola molaT..G..C..G...	..G.....A.	
CMT_BTTNVN	
	460	470	480	490	500	
M. lanceolatus	AATACCAAAC	CCCCTTGTTT	GTGTGAGCAG	TCCTCATCAC	GGCAGTACTT	
Mola molaG.....	C.....	..A..G.....T..	A.....	
CMT_BTTNVN	
	510	520	530	540	550	
M. lanceolatus	CTTCTTCTCT	CGCTCCCAGT	CCTTGACGCT	GGAATTACGA	TACTTCTTAC	
Mola molaC.....T.....G.....	.G.....	
CMT_BTTNVN	
	560	570	580	590	600	
M. lanceolatus	AGACCGAAAC	CTCAATACCA	CCTTCTTTGA	CCCGCGGGT	GGGGGGGACC	
Mola mola	..T.....	..T..C.....	.T.....	C.. ..A..C..	..A..A..T.	
CMT_BTTNVNC.....	
	610	620				
M. lanceolatus	CGATCCTGTA	TCAACACCTC				
Mola mola	.A..T..A..T...				
CMT_BTTNVNA..				

Hình 2: Kết quả so sánh trình tự nucleotide cá mặt trắng (CMT_BTTNVN) với trình tự tương đồng trong ngân hàng Genbank

Tìm kiếm trình tự tương đồng của trình tự mẫu cá mặt trắng trên Genbank cho kết quả trình tự có mã hiệu KF930108, thuộc loài *Masturus lanceolatus*, có độ tương đồng cao nhất (99,7%), chỉ sai khác 2 vị trí nucleotide. Trình tự thuộc loài *Mola mola* (JQ775087) chỉ có độ tương đồng 89,7%, với sai khác ở 66 vị trí nucleotide.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại của loài cá mặt trắng trên cơ sở trình tự vùng gen CO1 trong nghiên cứu này (trình tự tương đồng lấy từ Genbank) cho kết quả mẫu cá mặt trắng CMT_BTTNVN cùng nhánh với loài *Masturus lanceolatus* (KF930108) với giá trị bootstrap 100% (Hình 3).

Từ kết quả phân tích trên, xác định được mẫu cá mặt trắng CMT_BTTNVN là loài *Masturus lanceolatus*.



Hình 3: Mối quan hệ họ hàng của loài cá mặt trắng nghiên cứu (CMT_BTTNVN) với loài *Masturus lanceolatus* (KF930108) và loài *Mola mola* (JQ775087) đã công bố trên Genbank Mẫu cá mập (CM_BTTNVN)

Tìm kiếm trình tự tương đồng của trình tự mẫu cá mập CM_BTTNVN trên Genbank cho kết quả trình tự có mã hiệu KF793764, thuộc loài *Carcharhinus sorrah*, có độ tương đồng cao nhất (99,4%), chỉ sai khác 4 vị trí nucleotide: vị trí 7 (C-T), 22 (T-G), 36 (T-C) và 46 (C-A) (Hình 4).

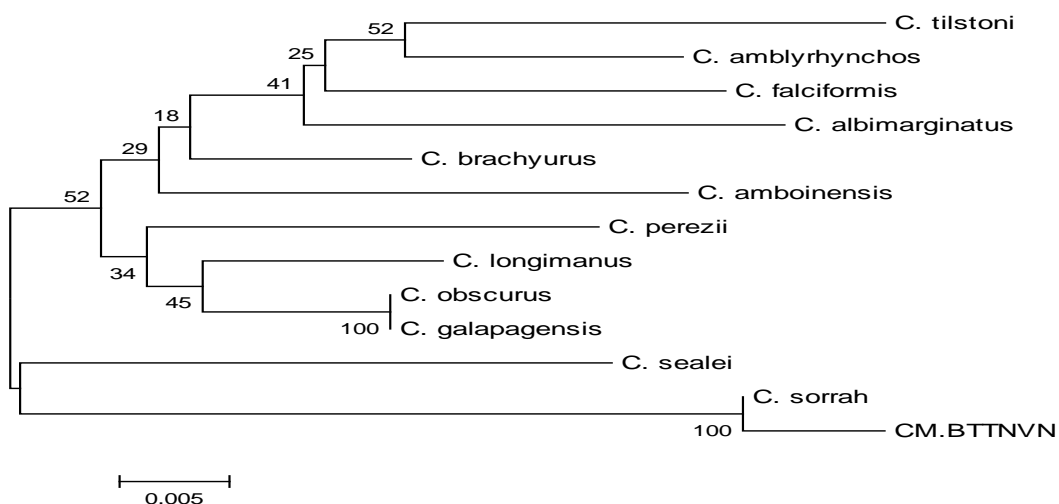
	10	20	30	40	50
C. sorrah	CTATACCTGA	TTTTTGGTGC	ATGAGCAGGT	ATAGTTGGAA	CAGCCCTAAG
CM_BTTNVNT.....G.....C.....A.....
	60	70	80	90	100
C. sorrah	TCTCCTAATT	CGAGCTGAAC	TTGGACAACC	TGGATCTCTT	TTAGGAGATG
CM_BTTNVN
	110	120	130	140	150
C. sorrah	ATCAGATTTA	TAATGTAATC	GTAACCGCCC	ACGCTTTTGT	AATAATCTTC
CM_BTTNVN
	160	170	180	190	200
C. sorrah	TTCATGGTTA	TACCAATTAT	GATTGGTGGT	TTCGAAAATT	GATTAGTACC
CM_BTTNVN
	210	220	230	240	250
C. sorrah	TTTAATAATT	GGAGCACCAG	ATATAGCCTT	CCCACGAATA	AACAACATAA
CM_BTTNVN
	260	270	280	290	300
C. sorrah	GTTTCTGACT	TCTTCCACCA	TCATTTTAC	TTCTTCTTGC	TTCTGCTGGA
CM_BTTNVN
	310	320	330	340	350
C. sorrah	GTAGAAGCTG	GAGCAGGCAC	TGGTTGAACA	GTCTACCCTC	CTTTAGCTAG
CM_BTTNVN
	360	370	380	390	400
C. sorrah	CAACTTAGCA	CATGCTGGAC	CATCTGTTGA	TTTAGCTATT	TTCTCTCTCC
CM_BTTNVN
	410	420	430	440	450
C. sorrah	ACTTAGCTGG	TGTTTCATCA	ATTTTAGCTT	CAATTAATTT	TATTACAAC
CM_BTTNVN
	460	470	480	490	500
C. sorrah	ATTATTAATA	TAAAACCACC	AGCCATCTCC	CAATATCAAA	CACCATTATT

```

CM_BTTNVN .....
                510          520          530          540          550
C. sorrah      TGTCCTGATCT ATTCTTGTA CCACTATTCT CCTTCTCCTC TCACTTCCAG
CM_BTTNVN      .....
                560          570          580          590          600
C. sorrah      TTCTTGCAGC AGGGATTACA ATATTACTTA CAGATCGTAA CCTTAATACT
CM_BTTNVN      .....
                610          620          630          640          650
C. sorrah      ACATTCTTTG ATCCTGCAGG TGGAGGAGAT CCAATCCTTT ATCAACATTT
CM_BTTNVN      .....
                654
C. sorrah      ATTT
CM_BTTNVN      ....
    
```

Hình 4: Kết quả so sánh trình tự từ mẫu cá mập CM_BTTNVN với trình tự tương đồng từ loài *Carcharhinus sorrah* (KF793764)

Xây dựng cây phát sinh chủng loại của 12 loài cá mập trong giống *Carcharhinus* trên cơ sở tiến hóa trình tự vùng gen CO1 trong nghiên này (trình tự tương đồng lấy từ Genbank) cho kết quả mẫu cá mập CM_BTTNVN cùng chung nhánh với loài *Carcharhinus sorrah* với giá trị bootstrap 100% (Hình 5).



Hình 5: Mối quan hệ họ hàng của mẫu cá mập CM_BTTNVN với một số loài thuộc giống *Carcharhinus*

Mức độ tương đồng giữa các loài trong giống *Carcharhinus* nêu trên dao động từ 93,7% (*C.obscurus*) đến 99,8% (*C.galapagensis*) (bảng 3).

Bảng 3

Mức độ tương đồng nucleotide của loài cá mập nghiên cứu (CM_BTTNVN) với một số loài thuộc giống *Carcharhinus*

TT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>C. sorrah</i>		95.0	95.3	91.1	95.1	95.3	94.5	93.7	94.8	94.3	93.7	94.2	99.4
2	<i>C. brachyurus</i>	5.3		96.6	93.3	97.4	97.2	95.7	96.5	96.5	95.4	96.6	96.2	94.3
3	<i>C. longimanus</i>	4.5	3.0		93.9	97.7	97.7	95.9	95.9	96.3	95.0	95.1	96.0	94.6
4	<i>C. perezii</i>	6.0	3.6	3.4		93.7	93.7	91.3	91.9	91.7	91.6	92.5	91.7	90.5

5	<i>C. obscurus</i>	5.1	2.7	1.9	3.1		99.8	95.1	95.4	96.3	95.9	96.2	96.0	94.5
6	<i>C. galapagensis</i>	4.9	2.8	1.9	3.1	0.2		95.1	95.4	96.5	96.0	96.0	96.2	94.6
7	<i>C. tilstoni</i>	5.6	4.3	4.0	6.0	5.0	5.0		94.8	96.6	93.4	94.6	95.4	94.2
8	<i>C. albimarginatus</i>	6.1	3.2	4.3	5.7	4.3	4.3	5.2		96.2	94.0	94.3	95.9	93.1
9	<i>C. amblyrhychos</i>	5.4	3.6	3.3	5.3	3.8	3.6	3.3	3.5		94.3	94.6	97.2	94.2
10	<i>C. sealei</i>	5.9	4.8	4.8	5.5	4.3	4.1	6.9	5.8	6.0		94.2	94.6	94.0
11	<i>C. amblyrhychos</i>	6.6	3.5	4.7	4.4	4.0	4.1	5.5	5.5	5.6	6.2		95.6	93.4
12	<i>C. falciformis</i>	6.1	4.0	3.6	5.3	4.1	4.0	4.6	3.8	2.8	5.6	4.6		93.6
13	CM_BTTNVN	0.6	5.9	5.1	6.7	5.8	5.6	5.9	6.8	6.1	6.3	7.0	6.8	

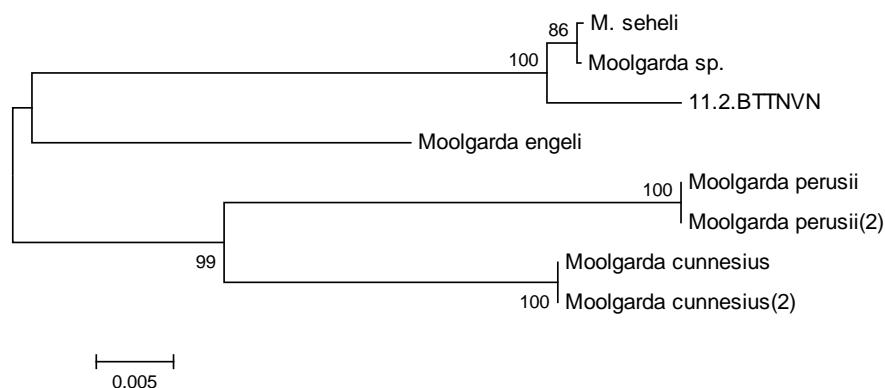
Mẫu cá đối cở 11.2_BTTNVN

Tìm kiếm trình tự tương đồng của trình tự mẫu cá đối cở 11.2_BTTNVN trên Genbank cho kết quả trình tự có mã hiệu JQ060808, thuộc loài *Moolgarda seheli*, có độ tương đồng cao nhất (97,3%), sai khác 16 vị trí nucleotide: vị trí 7 (C-T), 22 (T-G), 36 (T-C) và 46 (C-A) (Hình 6).

	10	20	30	40	50
M. seheli	TTTCATCCG	AGCAGAACTA	AGCCAGCCTG	GCGCTCTCCT	GGGAGACGAC
11.2_BTTNVNT.....
	60	70	80	90	100
M. seheli	CAGATTTATA	ATGTAATCGT	AACTGCTCAC	GCCTTCGTGA	TAATCTTCTT
11.2_BTTNVNGG..G...	..T.....TA.
	110	120	130	140	150
M. seheli	TATAGTAATA	CCAATCATGA	TTGGAGGGTT	CGGGAATTGA	CTTGTCCTT
11.2_BTTNVNGA.....	A.....
	160	170	180	190	200
M. seheli	TAATGATTGG	CGCCCCAGAC	ATAGCCTTC	CCCCGAATAA	ATAACATGAG
11.2_BTTNVN
	210	220	230	240	250
M. seheli	TTTTTGCTG	CTTCCCCTT	CTTCTCCT	TCTCTTAGCG	TCATCGGCAG
11.2_BTTNVNA...C....
	260	270	280	290	300
M. seheli	TTGAAGCAGG	GGCCGGGACA	GGATGAACTG	TCTACCCACC	TCTCGCTAGC
11.2_BTTNVNG.....
	310	320	330	340	350
M. seheli	AACTTGGCAC	ACGCCGGAGC	ATCCGTCGAC	TTAACCATCT	TCTCCCTCCA
11.2_BTTNVN
	360	370	380	390	400
M. seheli	TCTGGCAGGT	GTCTCCTCAA	TTTTAGGTGC	TATTAATTTT	ATTACCACTA
11.2_BTTNVNT.....A..
	410	420	430	440	450
M. seheli	TTATTAACAT	GAAACCCCT	GCCATCTCTC	AATACCAAAC	ACCCCTATTC
11.2_BTTNVN
	460	470	480	490	500
M. seheli	GTATGGGCAG	TTCTTATCAC	GGCCGTCCTT	CTTCTCCTGT	CCCTCCAGT
11.2_BTTNVN
	510	520	530	540	550
M. seheli	TCTTGCTGCT	GGAATCACAA	TACTCCTTAC	AGATCGAAAC	CTAAACACCT
11.2_BTTNVN
	560	570	580	590	
M. seheli	CTTCTTTGA	CCCTGCAGGA	GGGGGAGACC	CAATTCTTTA	CCAACATCT
11.2_BTTNVNA..

Hình 6: Kết quả so sánh trình tự nucleotide mẫu 11.2_BTTNVN với trình tự nucleotide loài *Moolgarda seheli* (JQ060808)

Xây dựng cây phát sinh chủng loại của 8 loài cá đối cỡ trong giống *Moolgarda* trên cơ sở tiến hóa trình tự vùng gen CO1 trong nghiên cứu này (trình tự tương đồng lấy từ Genbank) cho kết quả mẫu cá đối cỡ 11.2_BTTNVN cùng nhánh với loài *Moolgarda seheli* (JQ060808) với giá trị bootstrap 100% (Hình 7).



Hình 7: Mối quan hệ họ hàng của mẫu cá đối cỡ 11.2_BTTNVN với 7 loài thuộc giống *Moolgarda*

Mức độ sai khác di truyền giữa mẫu nghiên cứu với 7 loài trong giống *Moolgarda* dao động từ 0,2% (*Moolgarda* sp.), 2,7% (11.2_BTTNVN); cao nhất 20,9% (*Moolgarda perusii*) (bảng 4).

Các kết quả phân tích trên đã xác định mẫu cá đối cỡ 11.2_BTTNVN là loài *Moolgarda seheli*.

Bảng 4

Mức độ tương đồng nucleotide của loài cá đối cỡ (11.2_BTTNVN) với loài 7 loài thuộc giống *Moolgarda*

TT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>Moolgarda seheli</i>		99.8	74.0	87.1	83.3	83.5	85.0	97.3
2	<i>Moolgarda</i> sp.	0.2		74.1	87.3	83.5	83.6	85.1	97.2
3	<i>Moolgarda perusii</i>	20.9	20.7		76.8	89.6	81.6	79.1	73.6
4	<i>Moolgarda engeli</i>	14.3	14.1	16.8		86.0	86.0	86.1	86.0
5	<i>Moolgarda perusii</i>	19.4	19.2	0.4	15.9		90.5	88.5	83.1
6	<i>Moolgarda cunnesius</i>	19.2	18.9	10.1	15.9	10.4		88.5	83.0
7	<i>Moolgarda cunnesius</i>	17.3	17.1	13.5	15.8	12.9	12.9		84.0
8	11.2_BTTNVN	2.7	2.9	21.4	15.8	19.6	19.8	18.7	

Mẫu cá đối vây trước D57_BTTNVN

Tìm kiếm trình tự tương đồng của trình tự mẫu cá đối vây trước D57_BTTNVN trên Genbank cho kết quả trình tự có mã hiệu JQ060448, thuộc loài *Liza affinis*, có độ tương đồng cao nhất (100%) (Hình 8).

```

10          20          30          40          50
Liza affinis  TGCTTATCCG GGCAGAACTA AGCCAGCCTG GCGCTCTCCT AGGGGACGAC
D57_BTTNVN   .....

60          70          80          90          100
Liza affinis  CAGATTTATA ATGTAATCGT TACAGCACAC GCTTTCGTAA TAATTTTCTT
D57_BTTNVN   .....

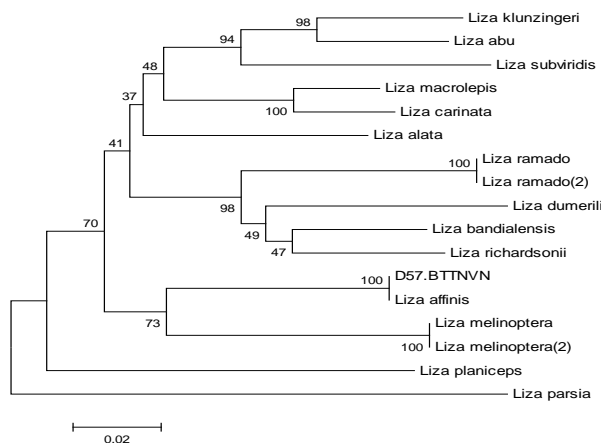
110         120         130         140         150

```

<i>Liza affinis</i>	TATAGTAATG	CCAATTATGA	TTGGAGGGTT	TGGAAACTGA	CTAATCCCCC
D57_BTTNVN
	160	170	180	190	200
<i>Liza affinis</i>	TAATGATCGG	CGCCCCGAT	ATGGCCTTCC	CTCGAATAAA	TAACATAAGC
D57_BTTNVN
	210	220	230	240	250
<i>Liza affinis</i>	TTTTGACTCC	TACCTCCTTC	GTTCCCTTCTT	CTCTTAGCGT	CTTCTGGCGT
D57_BTTNVN
	260	270	280	290	300
<i>Liza affinis</i>	AGAAGCAGGG	GCCGGAAGT	GATGAACCGT	CTATCCTCCT	CTAGCCAGCA
D57_BTTNVN
	310	320	330	340	350
<i>Liza affinis</i>	ACCTAGCACA	TGCCGGAGCA	TCAGTTGACC	TTACAATTTT	CTCCCTTCAC
D57_BTTNVN
	360	370	380	390	400
<i>Liza affinis</i>	CTGGCAGGTG	TCTCCTCAAT	TTTAGGTGCT	ATTAACCTCA	TTACTACTAT
D57_BTTNVN
	410	420	430	440	450
<i>Liza affinis</i>	TATTAACATG	AAACCTCCCG	CAATTTCCCA	GTACCAAACC	CCACTCTTCG
D57_BTTNVN
	460	470	480	490	500
<i>Liza affinis</i>	TATGGGCTGT	TCTTATTACT	GCCGTTCTCC	TGCTTCTATC	CCTGCCAGTT
D57_BTTNVN
	510	520	530	540	550
<i>Liza affinis</i>	CTCGCTGCCG	GAATTACCAT	GCTTTTAACA	GATCGAAACT	TAAACACTTC
D57_BTTNVN
	560	570	580	590	
<i>Liza affinis</i>	TTTCTTCGAC	CCAGCAGGAG	GAGGGGATCC	TATTCATATAC	CAGCACCT
D57_BTTNVN

Hình 8: Kết quả so sánh trình tự nucleotide mẫu D57_BTTNVN với trình tự nucleotide loài *Liza affinis* (JQ060448)

Xây dựng cây phát sinh chủng loại với 16 trình tự của 14 loài thuộc giống *Liza*, sử dụng trình tự vùng gen CO1 trong nghiên cứu này và trình tự tương đồng từ Genbank cho kết quả mẫu cá đối vây trước D57_BTTNVN cùng chung nhánh với loài *Liza affinis* (JQ060448) với giá trị bootstrap 100% (Hình 9).



Hình 9: Mối quan hệ họ hàng của loài cá đối vây trước D57_BTTNVN với 14 loài thuộc giống *Liza*

Mức độ sai khác giữa mẫu D57_BTTNVN với 14 loài trong giống *Liza* dao động từ 0% (*Liza affinis*); đến 21,3% (*Liza parsia*) (bảng 5). Tương ứng với mức độ giống nhau về trình tự DNA là 100% với loài *Liza affinis*.

Các kết quả nêu trên cho phép xác nhận mẫu cá đối vẩy trước D57_BTTNVN là loài *Liza affinis*.

Bảng 5

Mức độ tương đồng nucleotide của loài cá đối vẩy trước (D57_BTTNVN) với 14 loài thuộc giống *Liza*

T T	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<i>Liza macrolepis</i>		88.3	88.0	89.5	68.4	92.3	88.0	88.0	87.5	88.0	96.2	86.6	91.1	89.5	87.1	88.6	88.6
2	<i>Liza subviridis</i>	12.9		85.6	90.0	66.9	87.5	85.6	87.1	86.5	85.8	87.6	86.0	87.1	89.6	85.1	86.8	86.8
3	<i>Liza ramado</i>	13.6	16.4		86.3	68.2	86.0	100	90.5	84.6	91.3	88.1	88.8	88.3	88.1	86.0	86.0	86.0
4	<i>Liza klunzingeri</i>	11.6	11.0	15.6		67.2	88.0	86.3	89.5	87.5	88.3	89.0	87.0	89.3	93.6	85.5	87.1	87.1
5	<i>Liza parsia</i>	19.0	21.6	19.3	20.9		67.1	68.2	68.1	67.1	67.9	67.9	66.2	68.4	67.7	67.9	68.1	68.1
6	<i>Liza melinoptera</i>	8.3	13.9	16.1	13.4	21.3		86.0	86.6	90.0	86.1	90.5	86.1	89.3	88.0	86.3	90.6	90.6
7	<i>Liza ramado</i>	13.6	16.4	0.0	15.6	19.3	16.1		90.5	84.6	91.3	88.1	88.8	88.3	88.1	86.0	86.0	86.0
8	<i>Liza bandialensis</i>	13.5	14.5	10.5	11.5	19.6	15.3	10.5		86.5	93.8	87.6	91.3	88.0	88.6	85.6	87.5	87.5
9	<i>Liza melinoptera</i>	13.9	15.4	17.7	14.0	21.2	10.8	17.7	15.5		86.3	87.0	86.0	88.1	85.1	86.6	90.5	90.5
10	<i>Liza richardsonii</i>	13.6	16.4	9.5	13.0	19.9	15.9	9.5	6.6	15.6		88.3	90.8	88.6	88.1	85.3	87.5	87.5
11	<i>Liza carinata</i>	4.0	13.9	13.3	12.2	19.9	10.5	13.3	13.9	14.8	13.1		86.6	90.0	89.3	87.1	88.3	88.3
12	<i>Liza dumerili</i>	15.1	15.9	12.5	14.6	22.7	15.8	12.5	9.4	15.9	10.0	15.1		88.0	86.3	84.1	86.6	86.6
13	<i>Liza alata</i>	9.1	13.9	12.6	11.3	18.6	11.3	12.6	13.0	12.5	12.2	10.5	12.9		89.3	86.5	87.5	87.5
14	<i>Liza abu</i>	11.6	11.3	13.3	6.7	20.2	13.4	13.3	12.7	16.9	13.3	11.8	15.6	11.3		84.8	87.8	87.8
15	<i>Liza planiceps</i>	14.6	17.1	16.1	16.6	19.9	15.6	16.1	16.5	15.1	17.0	14.5	18.4	14.9	17.6		86.0	86.0
16	<i>Liza affinis</i>	12.7	15.0	16.1	14.5	19.5	10.2	16.1	14.2	10.4	14.1	13.0	15.1	13.6	13.6	16.1		100
17	D57_BTTNVN	12.7	15.0	16.1	14.5	19.5	10.2	16.1	14.2	10.4	14.1	13.0	15.1	13.6	13.6	16.1	0.0	

III. KẾT LUẬN

Xác định, so sánh và phân tích trình tự vùng gen CO1 (Cytochrome c oxidase 1) từ 4 mẫu cá biển lưu giữ ở BTTNVN đã định danh được mẫu cá CMT_BTTNVN là *Masturus lanceolatus*, mẫu CM_BTTNVN là *Carcharhinus sorrah*; mẫu 11.2_BTTNVN là *Moolgarda seheli* và D57_BTTNVN là *Liza affinis*. Việc sử dụng mã vạch DNA barcoding COI trong việc giám định các mẫu cá biển ở BTTNVN là hiệu quả.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài cơ sở 2014-2015 “Giải mã vùng gen Barcoding (Cytochrome c oxidase 1-COI) cho một số mẫu cá và chim của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam” và một phần kết quả nghiên cứu của nhiệm vụ hợp tác quốc tế về KH & CN theo Nghị định thư với Ấn Độ (Quyết định số 3833/QĐ-BKH-CN, ngày 12/12/2011) được Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Bộ Khoa học công nghệ Ấn Độ phê duyệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Awise, J. C.**, 1995. Conservation Biology, 9 (3): 686-690.
2. **Banks, R. C., C. Cicero, J. L. Dunn, A.W. Kratter, H. Ouellet**, 2000. The Auk, 117:847-858.

3. **Banks R.C., C. Cicero, J.L. Dunn, A.W. Kratter, P.C. Rasmussen**, 2002. *The Auk*, 119: 897-906.
4. **Banks, R. C., C. Cicero, J.L. Dunn, A.W. Kratter, P.C. Rasmussen**, 2003. *The Auk*, 120: 923–931.
5. **Gill, F. B., B. Slikas**, 1992. *The Condor*, 94: 20–28.
6. **Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Waard**, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313–321
7. **Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen, W. Hallwachs**, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14812– 14817.
8. **Hillis, D. M., C. Moritz, B. K. Mable**, 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. Second edition.
9. **Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar**, 2011. MEGA 5.2.2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 2731–2739.
10. **Ward R. D., T.S. Zemlak, B. H. Ininner, P.R. Last, P.D.N. Hebert**, 2005. Barcoding Australia’s fish species. *Phil.Trans.R Soc, B* 360: 1847-1857.
11. Web: www.barcodeoflife.org; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

USING CO1 DNA BARCODES TO IDENTIFY MERINE FISH SPECIMEMS IN VIETNAM NATIONAL MUSEUM OF NATURE

**TRAN THI VIET THANH, VU THI THU HIEN,
TRAN THI LIEU, PHAN KE LONG**

SUMMARY

Barcoding method based on CO1 sequence was used for identification of 4 fish specimens in Vietnam National Museum of Nature (CMT_BTTNVN), sharks (CM_BTTNVN) and mullet (11.2_BTTNVN, D57_BTTNVN). The Mega software version 5.2.2 and BLAST program were used for analyzing the data. The results showed that CMT_BTTNVN belongs to *Masturus lanceolatus*, shark CM_BTTNVN belongs to *Carcharhinus sorrah*, an two remainings 11.2_BTTNVN and D57_BTTNVN belong to *Moolgarda seheli* and *Liza affinis*, respectively. The CO1 sequences are registered at the GenBank with accession numbers as follows: KR261938, KR261939, KR261940 and KR261942. The results showed the high potentiality in using CO1 sequences to identify marine fish.