

SỬ DỤNG MÃ VẠCH ADN ĐỊNH LOẠI MẪU RÁI CÁ TẠI BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN VIỆT NAM

Trần Thị Việt Thanh¹, Phan Kế Long^{1,2}, Nguyễn Minh Tâm¹

¹Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Xác định tên loài bằng mã vạch DNA (DNA barcode) dựa trên nguyên lý so sánh các trình tự DNA ngắn giữa mẫu chưa biết với trình tự DNA của loài đã biết trong ngân hàng Genbank hoặc các cơ sở dữ liệu DNA barcode khác. Phương pháp này được các nhà khoa học trên thế giới áp dụng cho nhiều nhóm động vật trong những năm gần đây (Hebert, 2003; 2004; <http://www.barcodeoflife.org>). Ưu điểm của phương pháp này cho kết quả chính xác với lượng mẫu sử dụng rất nhỏ, kể cả các mẫu không nguyên vẹn, mẫu đồng hình khó định loại bằng hình thái (Avisé, 1995, Gill và Slikas.,1992, Banks *et al.*, 2000; 2002; 2003. Rái cá (thuộc họ Mustelidae) gồm các loài phân bố rộng khắp từ châu Á, châu Phi và châu Âu. Việt Nam là nơi sinh sống của 4 loài Rái cá: Rái cá lông mũi (*Lutra sumatrana*), Rái cá lông mượt (*Lutra perspicillatan*), Rái cá thường (*Lutra lutra*) và Rái cá vuốt bé (*Aonyx cinerean*), chúng phân bố ở Lai Châu, Lào Cai, Yên Bái, Bắc Kạn, Hoà Bình, Quảng Ninh, Hà Nội, Gia Lai, Lâm Đồng (Đặng Huy Huỳnh và nnk, 2008), tình trạng bảo tồn VU, quy định nhóm IB Nghị định 32/2006/NĐ-CP. Về hình thái, Rái cá có thân dài, mềm, mõm ngắn, đầu hơi dẹp bề ngang, có màng bơi da trần phủ hết ngón, tai nhỏ, vành tai tròn có nắp che lỗ tai, dài đuôi xấp xỉ nửa dài thân, đuôi dài tròn đều nhỏ dần từ gốc đến mút đuôi, da mũi trần có viền hình chiếc đe. Các loài Rái cá khác nhau rất nhỏ ở ngón chân, như với loài Rái cá vuốt bé ngón chân 3,4 dài hơn ngón 2, 5 trong khi loài Rái cá lông mũi thì ngược lại, loài rái cá thường vuốt dài vươn ra xa ở đầu ngón chân, loài Rái cá lông mượt ngón 3 tự do rời khỏi màng bơi.

Năm 2016, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam được chuyển giao 05 mẫu Rái cá từ Hạt Kiểm lâm Tiên Yên (tỉnh Quảng Ninh). Nhận dạng hình thái ban đầu đã sơ bộ xác định gồm hai loài Rái cá thường và Rái cá vuốt bé. Để xác định chính xác tên loài cho mẫu vật phục vụ cho công tác trưng bày, giáo dục cộng đồng, Bảo tàng TNVN đã phân tích vùng gen CO1 làm trình tự ADN barcode để giám định lại các mẫu nêu trên.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Năm mẫu cơ Rái cá được đánh số theo mã hiệu của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam là VNMN1175, VNMN1176, VNMN1177, VNMN1178 và VNMN1179 và bảo quản trong ethanol (70%) ở nhiệt độ phòng. DNA tổng số được tách chiết theo quy trình của Hillis *et al.*, 1996 có cải tiến thành phân đệm chiết với các hóa chất của hãng Fermentas.

Nhân bản gen đích CO1 có kích thước 750 bp bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi: mồi xuôi (LCO1490) 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', mồi ngược (HCO2198) 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' (Folmer *et al.*, 1994). Thành phần hỗn hợp PCR gồm: 12,5 µl Master mix 2X, 1 µl MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl Taq polymerase 5u/µl, 2 µl DNA tổng số, 2 µl mồi xuôi 10 pM, 2 µl mồi ngược 10 pM, thêm H₂O cho đủ thể tích 25 µl. Kỹ thuật PCR được thực hiện trên máy PCR system 9700 (Mỹ) theo chu trình nhiệt: 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 có pha 10 μ l thuốc nhuộm FloroSafe DNA (1st Base), gel agarose được quan sát dưới tia UV, chụp ảnh bằng hệ thống Clever (Anh). Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng Kit Extraction Gel của QIAGEN được gửi đi giải trình tự tại công ty Macrogen, Hàn Quốc.

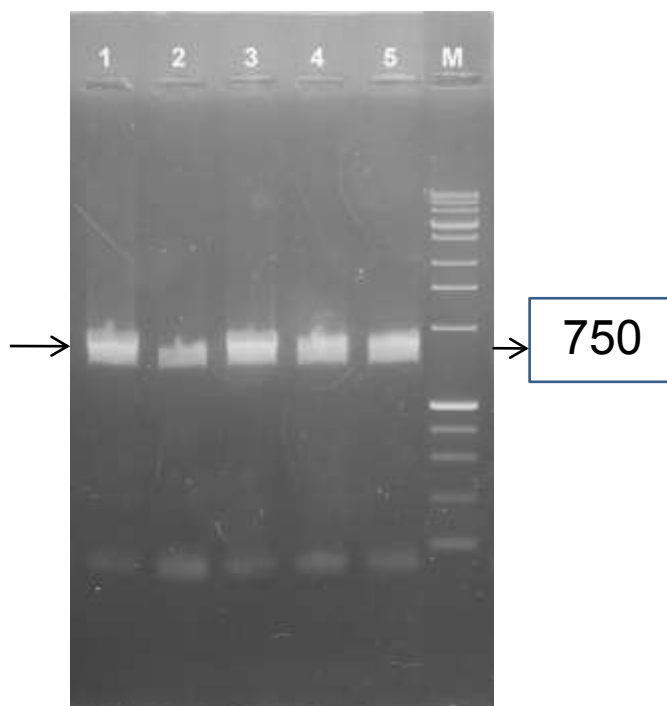
Dữ liệu trình tự nucleotide gen CO1 được chỉnh sửa bằng phần mềm Bioedit. Tìm kiếm và so sánh giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng trên ngân hàng GenBank bằng chương trình BLAST. Sắp xếp các trình tự tương đồng bằng chương trình Clustal W (Thompson *et al.*, 1997). Xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp ML (Maximum likelihood) bằng phần mềm MEGA 5.2.2 (Tamara *et al.*, 2011) với giá trị bootstrap lặp lại (replicate) 1000 lần.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nhân bản đoạn gen đích

DNA tổng số được tách chiết cho chất lượng tốt, hình ảnh điện di cho một băng đậm rõ nét. 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 đủ để thực hiện phản ứng PCR.

Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 1,2% cho thấy xuất hiện 01 vạch DNA rõ ràng, có kích thước khoảng 750 bp, phù hợp với kích thước đoạn DNA được nhân bản cùng cặp mồi được thiết kế (Hình 1).



Hình 1: Sản phẩm PCR của 5 mẫu VNMN1175 (1), VNMN1176 (2), VNMN1177 (3), VNMN1178 (4), VNMN1179 (5), M: marker (1kb) trên gel agarose 1,2%

2. Xác định trình tự nucleotide cho các mẫu

Sau khi chỉnh sửa đoạn DNA đích, kết quả so sánh đã chỉ ra 4/5 mẫu VNMN 1176, VNMN 1177, VNMN 1178, VNMN 1179 không có sự biến đổi vị trí và các nucleotide, nhưng mẫu VNMN 1175 mất 12 nucleotide ở 4 đoạn (tại các vị trí 138-140, 404-408, 525, 561-563) như trình bày trong Bảng 1.

So sánh trình tự vùng gen CO1 của 05 mẫu rái cá VNMN 1175, VNMN1176, VNMN1177, VNMN1178 và VNMN1179

	10	20	30	40	50	
VNMN 1175	CTGCTAGGGG	TATGACCAA	TTTACAAC	TGTTATTG	TTCACG	CGCCACGCA
VNMN 1176	CTGCTAGGGG	TATGACCAA	TTTACAAC	TGTTATTG	TTCACG	CGCCACGCA
VNMN 1177	CTGCTAGGGG	TATGACCAA	TTTACAAC	TGTTATTG	TTCACG	CGCCACGCA
VNMN 1178	CTGCTAGGGG	TATGACCAA	TTTACAAC	TGTTATTG	TTCACG	CGCCACGCA
VNMN 1179	CTGCTAGGGG	TATGACCAA	TTTACAAC	TGTTATTG	TTCACG	CGCCACGCA

	60	70	80	90	100	
VNMN 1175	TTTGTAATA	TTTTCTTC	ATAGTC	ATCATG	ATCATG	GAGGGTTGG
VNMN 1176	TTTGTAATA	TTTTCTTC	ATAGTC	ATCATG	ATCATG	GAGGGTTGG
VNMN 1177	TTTGTAATA	TTTTCTTC	ATAGTC	ATCATG	ATCATG	GAGGGTTGG
VNMN 1178	TTTGTAATA	TTTTCTTC	ATAGTC	ATCATG	ATCATG	GAGGGTTGG
VNMN 1179	TTTGTAATA	TTTTCTTC	ATAGTC	ATCATG	ATCATG	GAGGGTTGG

	110	120	130	140	150	
VNMN 1175	AAACTGACT	GTACCCCT	TAATTGG	TGCACCCG	ACCCGAC	GATGGATAGCATT
VNMN 1176	AAACTGACT	GTACCCCT	TAATTGG	TGCACCCG	ACCCGAC---	GGATAGCATT
VNMN 1177	AAACTGACT	GTACCCCT	TAATTGG	TGCACCCG	ACCCGAC---	GGATAGCATT
VNMN 1178	AAACTGACT	GTACCCCT	TAATTGG	TGCACCCG	ACCCGAC---	GGATAGCATT
VNMN 1179	AAACTGACT	GTACCCCT	TAATTGG	TGCACCCG	ACCCGAC---	GGATAGCATT

	160	170	180	190	200	
VNMN 1175	CCCACGAAT	AATAACAT	AAGCTT	TCTGACT	TTTACCT	CCGTCCTTCCTTC
VNMN 1176	CCCACGAAT	AATAACAT	AAGCTT	TCTGACT	TTTACCT	CCGTCCTTCCTTC
VNMN 1177	CCCACGAAT	AATAACAT	AAGCTT	TCTGACT	TTTACCT	CCGTCCTTCCTTC
VNMN 1178	CCCACGAAT	AATAACAT	AAGCTT	TCTGACT	TTTACCT	CCGTCCTTCCTTC
VNMN 1179	CCCACGAAT	AATAACAT	AAGCTT	TCTGACT	TTTACCT	CCGTCCTTCCTTC

	210	220	230	240	250	
VNMN 1175	TCCTCCTG	ACTCCT	CTATAG	TAGAAC	GCGGTGC	CAGGGTGA
VNMN 1176	TCCTCCTG	ACTCCT	CTATAG	TAGAAC	GCGGTGC	CAGGGTGA
VNMN 1177	TCCTCCTG	ACTCCT	CTATAG	TAGAAC	GCGGTGC	CAGGGTGA
VNMN 1178	TCCTCCTG	ACTCCT	CTATAG	TAGAAC	GCGGTGC	CAGGGTGA
VNMN 1179	TCCTCCTG	ACTCCT	CTATAG	TAGAAC	GCGGTGC	CAGGGTGA

	260	270	280	290	300	
VNMN 1175	GTATACCCC	CTCTAGCA	TAGAGG	AAACCT	GGAGCAC	ATGCAGGAGCATC
VNMN 1176	GTATACCCC	CTCTAGCA	TAGAGG	AAACCT	GGAGCAC	ATGCAGGAGCATC
VNMN 1177	GTATACCCC	CTCTAGCA	TAGAGG	AAACCT	GGAGCAC	ATGCAGGAGCATC
VNMN 1178	GTATACCCC	CTCTAGCA	TAGAGG	AAACCT	GGAGCAC	ATGCAGGAGCATC
VNMN 1179	GTATACCCC	CTCTAGCA	TAGAGG	AAACCT	GGAGCAC	ATGCAGGAGCATC

TIÊU BAN TÀI NGUYÊN SINH VẬT

```

310 320 330 340 350
VNMN 1175 GGTAGACCTG ACAATTTTTT CTCTCCACTT AGCAGGTGTC TCATCCATCC
VNMN 1176 GGTAGACCTG ACAATTTTTT CTCTCCACTT AGCAGGTGTC TCATCCATCC
VNMN 1177 GGTAGACCTG ACAATTTTTT CTCTCCACTT AGCAGGTGTC TCATCCATCC
VNMN 1178 GGTAGACCTG ACAATTTTTT CTCTCCACTT AGCAGGTGTC TCATCCATCC
VNMN 1179 GGTAGACCTG ACAATTTTTT CTCTCCACTT AGCAGGTGTC TCATCCATCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
360 370 380 390 400
VNMN 1175 TAGGGGCCAT CAACTATTAT TACTACCATT ATCAATATAA AACCCCTGC
VNMN 1176 TAGGGGCCAT CAACTATTAT TACTACCATT ATCAATATAA AACCCCTGC
VNMN 1177 TAGGGGCCAT CAACTATTAT TACTACCATT ATCAATATAA AACCCCTGC
VNMN 1178 TAGGGGCCAT CAACTATTAT TACTACCATT ATCAATATAA AACCCCTGC
VNMN 1179 TAGGGGCCAT CAACTATTAT TACTACCATT ATCAATATAA AACCCCTGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
410 420 430 440 450
VNMN 1175 AATGATTG GC ATCACAATGA ACCAAACTCC CCTGTTTGTG TGATCTGTCC
VNMN 1176 AAT-----GC ATCACAATGA ACCAAACTCC CCTGTTTGTG TGATCTGTCC
VNMN 1177 AAT-----GC ATCACAATGA ACCAAACTCC CCTGTTTGTG TGATCTGTCC
VNMN 1178 AAT-----GC ATCACAATGA ACCAAACTCC CCTGTTTGTG TGATCTGTCC
VNMN 1179 AAT-----GC ATCACAATGA ACCAAACTCC CCTGTTTGTG TGATCTGTCC

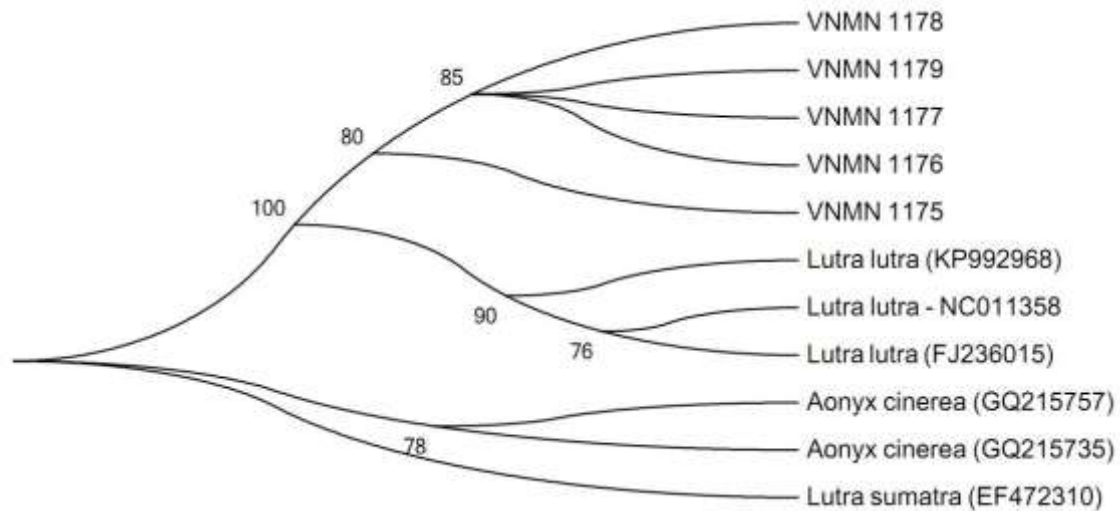
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
460 470 480 490 500
VNMN 1175 TAATCACAGC CGTACTCTTA CTCTTATCTC TACCAGTCCT GGCAGCCGGA
VNMN 1176 TAATCACAGC CGTACTCTTA CTCTTATCTC TACCAGTCCT GGCAGCCGGA
VNMN 1177 TAATCACAGC CGTACTCTTA CTCTTATCTC TACCAGTCCT GGCAGCCGGA
VNMN 1178 TAATCACAGC CGTACTCTTA CTCTTATCTC TACCAGTCCT GGCAGCCGGA
VNMN 1179 TAATCACAGC CGTACTCTTA CTCTTATCTC TACCAGTCCT GGCAGCCGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
510 520 530 540 550
VNMN 1175 ATTACCATGC TACTCACAGA TCGA AACCT GAACACCACC TTTTTTGATC
VNMN 1176 ATTACCATGC TACTCACAGA TCGA-AACCT GAACACCACC TTTTTTGATC
VNMN 1177 ATTACCATGC TACTCACAGA TCGA-AACCT GAACACCACC TTTTTTGATC
VNMN 1178 ATTACCATGC TACTCACAGA TCGA-AACCT GAACACCACC TTTTTTGATC
VNMN 1179 ATTACCATGC TACTCACAGA TCGA-AACCT GAACACCACC TTTTTTGATC

....|....| ....|....| ....|....| ..
560 570 580
VNMN 1175 CGGCTGGAGC TCCGAGGAGA CCAACCATTC TG
VNMN 1176 CGGCTGGAGC ---GAGGAGA CCAACCATTC TG
VNMN 1177 CGGCTGGAGC ---GAGGAGA CCAACCATTC TG
VNMN 1178 CGGCTGGAGC ---GAGGAGA CCAACCATTC TG
VNMN 1179 CGGCTGGAGC ---GAGGAGA CCAACCATTC TG

```

Trên cây phát sinh chủng loại (hình 2) được xây dựng theo phương pháp ML (Maximum likelihood) sử dụng trình tự gen CO1 được xác định ở trên cho thấy: các mẫu VNMN 1175, VNMN1176, VNMN1177, VNMN1178, VNMN1179 cùng với 3 mẫu trên GenBank của loài *Lutra lutra* hình thành một nhóm với giá trị bootstrap rất cao (100%). Trong nhóm này 5 mẫu của Việt Nam tập hợp thành 1 nhóm phụ với giá trị bootstrap 80%. Ba mẫu trên GenBank hình thành một nhóm phụ riêng với bootstrap 90%.



Hình 2 : Cây phát sinh chủng loại của 05 mẫu VNMN 1175, VNMN1176, VNMN1177, VNMN1178, VNMN1179 với các mẫu loài khác trên GenBank

Mức độ tương đồng nucleotide 05 mẫu nghiên cứu với các mẫu thuộc loài *Lutra lutra* và một số loài khác đã được công bố trên GenBank rất cao (99,78 và 99,88%). Trong khi đó hệ số này thấp hơn nhiều so với các loài khác như *Lutra sumatra* và *Aonyx cinerea* (Bảng 2). Khoảng cách di truyền thấp được tìm thấy giữa 05 mẫu Rái cá Việt Nam với 03 mẫu Rái cá thường (*L. lutra*) và lớn giữa mẫu rái cá Việt Nam với 02 loài rái cá khác *L. sumatra* và *A. cinerea*.

Bảng 2

Mức độ tương đồng nucleotide (tam giác trên) và khoảng cách di truyền (tam giác dưới) của mẫu Việt Nam với 6 mẫu loài *L. sumatra* và *A. cinerea*

STT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>Lutra lutra</i> (NC011358)		100.0	100.0	98.80	99.81	98.21	99.87	99.88	99.88	99.88	99.88
2	<i>Lutra lutra</i> (FJ236015)	0.00		100.0	98.80	99.81	98.21	99.87	99.88	99.88	99.88	99.88
3	<i>Lutra lutra</i> (KP992968)	0.00	0.00		98.78	99.81	98.24	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88
4	<i>Aonyx cinerea</i> (GQ215757)	1.20	1.20	1.22		99.31	98.28	98.79	98.77	98.77	98.77	98.77
5	<i>Aonyx cinerea</i> (GQ215735)	1.19	1.19	1.19	0.69		98.07	98.84	98.83	98.83	98.83	98.83
6	<i>Lutra sumatra</i> (EF472310)	1.79	1.79	1.76	1.72	1.93		98.36	98.36	98.36	98.36	98.36
7	VNMN_1175	0.13	0.13	0.12	1.21	1.16	1.64		100.0	100.0	100.0	100.0
8	VNMN_1176	0.12	0.12	0.12	1.23	1.17	1.64	0.00		100.0	100.0	100.0
9	VNMN_1177	0.12	0.12	0.12	1.23	1.17	1.64	0.00	0.00		100.0	100.0
10	VNMN_1178	0.12	0.12	0.12	1.23	1.17	1.64	0.00	0.00	0.00		100.0
11	VNMN_1179	0.12	0.12	0.12	1.23	1.17	1.64	0.00	0.00	0.00	0.00	

III. KẾT LUẬN

Phân tích trình tự ADN của vùng gen CO1 (Cytochrome c oxidase 1) từ 05 mẫu Rái cá lưu giữ tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam (VNMN 1175; VNMN 1176; VNMN 1177; VNMN 1178 ; VNMN 1179) đã khẳng định 05 mẫu nghiên cứu là cùng một loài Rái cá thường với tên khoa học *Lutra lutra*. Mẫu VNMN 1175 trước đây được định tên là Rái cá lông mượt (*Aonyx cinerea*) bằng đặc điểm hình thái là chưa chính xác.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ bởi Nhiệm vụ thu thập mẫu vật của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam (theo công văn 611/TTg-NN ngày 16/5/2007 của Thủ tướng Chính phủ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., Waard J. R.,** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313–321.
2. **Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W.,** 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.
3. Web: www.barcodeoflife.org;
4. **Avise J. C.,** 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conser biol*, 9 (3): 686-690.
5. **Gill F. B., Slikas B.,** 1992. Patterns of mitochondrial DNA divergence in North American crested titmice. *Condor* 94: 20–28.
6. **Banks R.C., Cicero C., Dunn J. L., Kratter A.W., Ouellet H.,** 2000. Forty-second supplement to the Ornithologists' Union checklist of North American birds. *Auk*. 117:847–858.
7. **Banks R. C., Cicero C., Dunn J. L., Kratter A. W., Rasmussen P. C.,** 2002. Forty-third supplement to the Ornithologists' Union checklist of North American birds. *Auk*. 119: 897–906.
8. **Banks R. C., Cicero C., Dunn J. L., Kratter A. W., Rasmussen P. C.,** 2003. Forty-fourth supplement to the Ornithologists' Union checklist of North American birds. *Auk*. 120:923–931.
9. **Đặng Huy Huynh, Cao Văn Sung, Lê Xuân Cảnh, Phạm Trọng Ảnh, Nguyễn Xuân Đăng, Hoàng Minh Khiêm, Nguyễn Minh Tâm,** 2008. Động vật chí Việt Nam (tập 25- Lóp thú). Nxb. KH & KT: 362 trang.
10. **Hillis D. M., Moritz C., Mable B. K.,** 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. Second edition.
11. **Folmer O. M., Black W., Hoen R., Lutz R., Vrijenhoek R.,** 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
12. **Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D .G.,** 1997. The CLUSTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.

13. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA 5.2.2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 2731–2739.

**USING CO1 GENE TO IDENTIFY THE EURASIAN OTTER SPECIMENS
IN VIETNAM NATIONAL MUSEUM OF NATURE**

Tran Thi Viet Thanh, Phan Ke Long, Nguyen Minh Tam

SUMMARY

This study is to evaluate the possibility of using Cytochrome c oxidase 1 (CO1) for identifying the animal species. Five samples are kept at the Vietnam National Museum of Nature (VNMN) with its code of VNMN1175, VNMN1176, VNMN1177, VNMN1178, VNMN1179, which were initially morphologically identified. These samples were named Oriental Small-clawed Otter (*Aonyx cinerea* - VNMN1175) and Eurasian Otter (*Lutra lutra* - VNMN1176, VNMN1177, VNMN 1178, VNMN 1179). DNA was isolated from muscle tissue of samples, then proceeded by PCR. PCR products were purified by Qiagen Gel Extraction kit and then sequentially identified by using primers Barcode LCO1490/HCO2198 of the DNA Barcoding program. The result of CO1 gene segment was amplified, of which the size were 605 bp, 688 bp, 671 bp, 685 bp and 689bp. Computerized Mega software version 5.2.2 and BLAST program were then used for analyzing and reconciled with data from international gene banks. The result showed that the 5 samples of VNMN1175, VNMN1176, VNMN1177, VNMN1178, VNMN1179 belong to the same species *Lutra lutra*.