

SỬ DỤNG MÃ VẠCH DNA (DNA BARCODES) TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH MẪU CHIM TẠI BẢO TÀNG THIÊN NHIÊN VIỆT NAM

Trần Thị Việt Thanh^{1*}, Vũ Đình Duy^{1,2}, Nguyễn Minh Tâm¹

¹Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *thanhbttvn@gmail.com

²Viện Lâm nghiệp, Trường đại học Khoa học kỹ thuật Nông Lâm Tây Bắc, Thiểm Tây, Trung Quốc

TÓM TẮT: Trên cơ sở sử dụng mã vạch DNA (Cytochrome c oxidase 1-CO1), đã giám định tên loài cho 4 mẫu chim thuộc họ Khướu (Timaliidae): 005_BTTNVN (Khướu màu cổ trắng), 028_BTTNVN (Lách tách đầu đỏm), 045_BTTNVN (Lách tách mày trắng) và 055_BTTNVN (Khướu mặt đen). DNA tổng số được tách từ mẫu máu, sau đó tiến hành phản ứng PCR, tinh sạch sản phẩm PCR và xác định được trình tự nucleotide vùng gen Barcode (CO1) với kích thước khoảng 650 bp cho mỗi mẫu. Kết quả về vùng gen CO1 đã chỉ ra mức độ tương đồng di truyền cao, 99,7% (028_BTTNVN/*Alcippe castaneiceps*), 99,8% (045_BTTNVN/*Alcippe vinipectus*), 99,28% (99,2-99,5%; 055_BTTNVN/*Garrulax affinis*) và mẫu 005_BTTNVN thuộc giống *Yuhina*, được xác định bởi tên loài *Y. diademata* trên GenBank. Các dẫn liệu di truyền thu thập được cho mỗi mẫu đều tương đồng với phân loại bằng hình thái. Bốn trình tự nucleotide vùng gen CO1 của mẫu chim nghiên cứu đã được đăng ký trên GenBank với các mã số: KP768404, KP768405, KP708406, KP768407.

Từ khóa: CO1, DNA Barcode, Khướu màu cổ trắng, Khướu mặt đen, Lách tách đầu đỏm, Lách tách mày trắng.

MỞ ĐẦU

Cho đến nay, phần lớn xác định các loài chim chủ yếu bằng hình thái [5, 13]. Cách nhận biết loài trên cơ sở các đặc điểm hình thái có độ tin cậy không cao, đặc biệt các loài đồng hình. Trong các loài chim Việt Nam, họ Khướu (Timaliidae) có số lượng loài lớn (95 loài), đa dạng và sống theo đàn. Khướu có màu sắc đẹp, giọng hót hay, được ưa thích. Chính vì vậy, nhiều loài khướu là đối tượng săn bắt để nuôi hoặc bán làm chim cảnh, và là đối tượng cần bảo vệ. Bốn loài khướu; Khướu màu cổ trắng (*Yuhina diademata*), Lách tách đầu đỏm (*Alcippe castaneiceps*), Lách tách mày trắng (*Alcippe vinipectus*) và Khướu mặt đen (*Garrulax affinis*) đã được thu thập ở Việt Nam và đang được lưu giữ ở Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, với mã số tương ứng 005_BTTNVN, 028_BTTNVN, 045_BTTNVN và 055_BTTNVN. Để phục vụ công tác bảo tồn, xác định chính xác tên loài là một trong những yêu cầu cấp bách của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam. Xác định chính xác tên loài trên cơ sở trình tự nucleotide của vùng gen ty thể (CO1 ≈ 650bp) đã được áp dụng và đạt hiệu quả cao [1, 2, 6, 7, 14]. Tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam

việc sử dụng vùng gen CO1 giám định mẫu chim được lưu giữ ở bảo tàng đang được tiến hành, nhiều loài đã được hiệu chỉnh, một số loài mới đã được phát hiện, đồng thời cũng xác định được một số loài đặc hữu của Việt Nam. Khởi đầu dự án DNA barcode từ năm 2005 đến 2011 tại trường Đại học Guelph ở Ontario (Canada), Barcode là việc xây dựng hồ sơ mã vạch (CBOL) cho các loài đã biết hoặc chưa biết chính xác tên. Cơ sở của mã vạch barcode được liên kết với cơ sở dữ liệu GenBank (Hoa Kỳ), cơ sở dữ liệu trình tự nucleotide của phòng Lab sinh học phân tử ở châu Âu, châu Á và cơ sở dữ liệu DNA của Nhật Bản. Đã có hơn 23.000 trình tự barcodes được lưu giữ, trong đó có hơn 3.800 loài chim, chiếm 1/3 các loài chim trên thế giới [15]. Hồ sơ (CBOL) đã tạo ra các mã vạch nhằm giúp các nhà nghiên cứu những cách thức mới và linh hoạt hơn để lưu trữ, quản lý, phân tích và hiển thị dữ liệu mã vạch đồng thời giúp các nhà quản lý (Hải quan) thuận tiện, hiệu quả trong kiểm tra giám sát hàng hóa.

Hiện nay, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam (BTTNVN) đang lưu giữ một số lượng mẫu khá lớn (khoảng 40.000 mẫu động thực vật, trong đó chim có khoảng 200-300 mẫu). Tuy nhiên, phần

lớn các mẫu này được phân loại ban đầu dựa trên các đặc điểm hình thái, nhiều loài đồng hình và nhiều loài có kích thước nhỏ rất khó được xác định, vì vậy, đòi hỏi phải áp dụng kỹ thuật DNA. Hơn nữa, các mẫu lưu giữ, trưng bày tại BTTNVN cần phải có dẫn liệu di truyền để đảm bảo độ chính xác cao hơn. Mặt khác, trong các trường hợp quan trọng như giám định loài quý hiếm trong Sách Đỏ Việt Nam 2007 [3] và Nghị định 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ [4], với mẫu vật không còn nguyên vẹn, không thể xác định bằng hình thái, phương pháp DNA là một kỹ thuật hiện đại có thể giải quyết được. Các nghiên cứu này sẽ mang lại hai lợi ích: (1) cung cấp thông tin dữ liệu DNA cho các mẫu vật đang lưu trữ tại BTTNVN; (2) là một phương pháp hiện đại giúp cho thực hiện giám định loài nhanh và chính xác. Trong bài báo này, chúng tôi áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử (DNA barcode) để xác định 4 mẫu chim thuộc họ Khướu hiện đang lưu giữ tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu máu của 4 loài chim thuộc họ Khướu Timaliidae được thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên từ năm 2009 trong chương trình hợp tác giữa BTTNVN và Bảo tàng Lịch sử tự nhiên Thụy Điển và được lưu giữ tại BTTNVN. Mẫu chim được thu thập bằng lưới, sau đó xác định tên loài sơ bộ bằng phương pháp phân loại hình thái (màu sắc, kích thước) đối chiếu với các tài liệu hình thái của Võ Quý (1981) [12], Nguyễn Cử và nnk. (2000) [5]; chụp ảnh lấy mẫu máu và đánh dấu với mã hiệu 005_BTTNVN (Khướu mào cổ trắng/ *Yuhina diademata*), 028_BTTNVN (Lách tách đầu đỏm/*Alcippe castaneiceps*), 045_BTTNVN (Lách tách mày trắng/*A. vinipectus*), 055_BTTNVN (Khướu mặt đen/*Garrulax affinis*) sau đó thả chúng về thiên nhiên. Mẫu máu được bảo quản trong ethanol 70%, giữ mẫu ở nhiệt độ -20°C cho đến khi tiến hành tách chiết DNA.

DNA tổng số được tách chiết từ máu theo quy trình của Lijtmaer et al. (2012) [8] có cải tiến của Phòng Phân loại học thực nghiệm & Đa dạng nguồn gen, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam. Tinh sạch sản phẩm DNA bằng bộ hóa

chất Genomic DNA Purification Kit (#KO512, Fermentas).

Phản ứng nhân gen được thực hiện trong thể tích 25 µl với các thành phần: Master mix 2X (Hãng QIAGEN): 12,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 1 µl; Taq polymerase 5 u/µl: 0,5 µl; DNA mẫu: 2 µl; Mỗi xuôi 10 pM: 1,25 µl, Mỗi ngược 10 pM: 1,25 µl, thêm H₂O cho đủ thể tích 25 µl. BirdF1: 5'-TTC TCC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' và BirdR1: 5'-ACG TGG GGG ATA ATT CCA AAT CCT G-3', với kích thước 648 bp [9] được sử dụng để xác định trình tự nucleotide vùng gen.

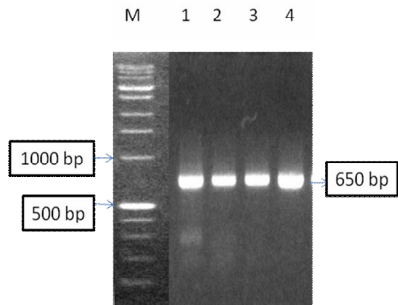
Chu trình nhiệt của mỗi phản ứng PCR: 95°C 10 phút, sau đó là 35 chu kỳ lặp lại: 95°C 30 giây; 55°C 40 giây; 72°C 50 giây. Cuối cùng là 72°C trong 10 phút để kết thúc phản ứng và giữ mẫu ở 4°C. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR system 9700. Sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%, nhuộm gel bằng ethidium bromide và chụp ảnh trên hệ thống máy ảnh a UV Transilluminator camera (Cleaver Sci. Ltd.). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Hãng QIAGEN). Đọc trình tự nucleotide vùng gen CO1 được xác định với kit BigDye Terminator v.3.1 và máy đọc trình tự ABI 3700 genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại công ty Macrogen, Hàn Quốc. Mỗi xuôi và mỗi ngược đều được sử dụng để giải mã vùng gen CO1.

So sánh sự khác nhau về vị trí các nucleotide giữa các cặp loài dùng ClustalW [11] và GeneDoc2.5 [16]. Phần mềm MEGA 5.2.2 [10] được sử dụng để phân tích dữ liệu. Trình tự nucleotide vùng gen CO1 của 24 loài chim và phân loài bao gồm JQ176667, EU447058, JQ176670, HM140301, JQ176672, KJ013268, JQ173949, JQ173945, KJ013268, JQ173953, KJ013268, JQ173962, JQ173952, JQ173953, EU447030, EU447029, GJQ174912, FJ661093, EU447031, EU447021, EU447024, EU447044, HM601624 và JQ174913 [15] được sử dụng trong bài báo này.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sản phẩm PCR của 4 mẫu chim nghiên cứu rõ nét, phù hợp với kích thước của vùng gen CO1 cần giải mã, khoảng 650bp (hình 1). Sau

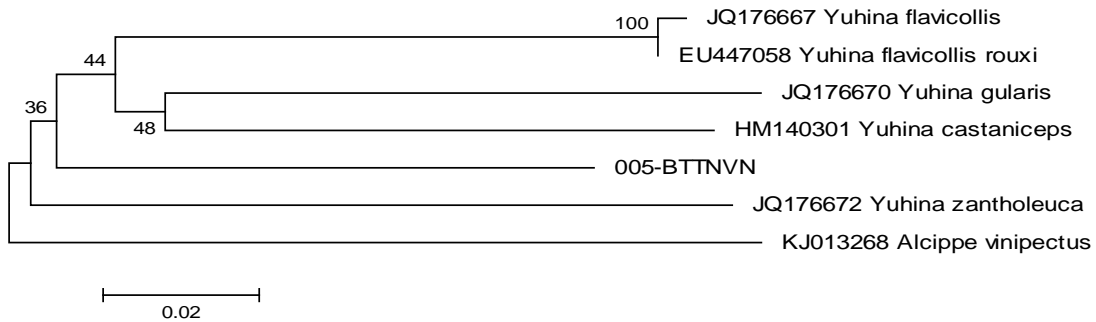
khi loại bỏ các đoạn gen bị nhiễu, chúng tôi đã xác định vùng gen CO1 cho 4 mẫu chim lần lượt là 594bp (005_BTTNVN), 652bp (028_BTTNVN), 652bp (045_BTTNVN) và 605bp (055_BTTNVN). Trên cơ sở kết quả giải mã vùng gen CO1 cho 4 mẫu chim nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được tên loài.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR 04 mẫu nghiên cứu khi phân tích với cặp mồi CO1 điện di trên gel agarose 1,5%. (Giếng 1-4 lần lượt là các mẫu 005_BTTNVN, 028_BTTNVN, 045_BTTNVN và 055_BTTNVN; M: marker phân tử 1 kb).

Mẫu Khướu mào cổ trắng (005_BTTNVN): Kích thước vùng gen CO1 thu được có độ dài là 594 nucleotide. Trên cơ sở dữ

liệu của 5 loài giống *Yuhina* và 1 loài giống *Alcippe* (outgroup), đã xác định 594 vị trí có giá trị được sử dụng cho phân tích. Trong đó 158 vị trí Variable, giá trị Pi (Parsimony informative) chiếm 90 vị trí. Mức độ tương đồng trung bình dao động trong giống *Yuhina* dao động từ 85% (*Y. zantholeuca/Y. gularis*) đến 99,7% (*Y. flavicollis/Y. flavicollis rouxi*). Mức độ tương đồng di truyền cao nhất (99,7%) đều cùng loài *Y. flavicollis*. Mẫu của Bảo tàng, ký hiệu 005_BTTNVN có giá trị tương đồng di truyền dao động từ 86,5% đến 88,2%, trung bình 87,5%, ứng với 5 loài và phân loài giống *Yuhina*, và thấp nhất 86,4% so với giống *Alcippe* (bảng 2). Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra các loài cùng giống *Yuhina* đều hình thành một nhóm (hình 2). Kết quả này chỉ ra mẫu 005_BTTNVN là một loài thuộc giống *Yuhina*. Theo đặc điểm hình thái mẫu này liên quan mật thiết với loài *Y. dianemata*. Do loài Khướu mào cổ trắng (005_BTTNVN) là loài đặc hữu của Việt Nam và chưa có dẫn liệu CO1 của loài này trên ngân hàng GenBank, chúng tôi đã gửi kết quả sequences lên ngân hàng GenBank, các chuyên gia trong lĩnh vực này của GenBank đã kiểm tra mẫu 005_BTTNVN của Việt Nam và xác định đây là loài *Yuhina diademata*.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại của loài Khướu mào cổ trắng tại BTTNVN (005_BTTNVN) với 5 loài thuộc giống *Yuhina*. Loài *Alcippe vinipectus* được xác định là loài ngoài nhóm

Bảng 1. Kích thước lý thuyết của các cặp mồi dùng trong nghiên cứu

Đối tượng	Kí hiệu mồi	Gen khuếch đại	Kích thước (bp)	Gen	Nguồn
Chim	Bird F1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	648bp	CO1	Lohman et al., 2009 [9]
	Bird R1	ACGTGGGGGATAATTCCAATCCTG			

Bảng 2. Mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền của một số loài giống *Yuhina*

STT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7
1	005_BTTNVN		87,9	86,9	86,5	88,0	88,2	86,4
2	<i>Yuhina flavicollis</i> (JQ176667)	13,4		86,0	87,9	87,9	99,7	85,7
3	<i>Yuhina zantholeuca</i> (JQ176672)	14,5	15,6		85,0	85,9	86,2	85,0
4	<i>Yuhina gularis</i> (JQ176670)	15,0	13,6	16,8		88,2	88,2	85,7
5	<i>Yuhina castaneiceps</i> (HM140301)	13,2	13,6	15,8	13,1		88,2	85,4
6	<i>Yuhina flavicollis rouxi</i> (EU447058)	13,0	0,3	15,3	13,1	13,2		85,7
7	<i>Alcippe vinipectus</i> (KJ013268)	15,3	16,1	16,8	16,0	16,6	16,1	

Mẫu Lách tách đầu đỏm (028_BTTNVN): Kích thước vùng gen CO1 thu được có độ dài là 652 nucleotide. Trên cơ sở dữ liệu của 4 loài giống *Alcippe* và 1 loài giống *Yuhina* (out group), đã xác định 652 vị trí có giá trị được sử dụng cho phân tích. Mức độ tương đồng trung bình dao động trong giống *Alcippe* dao động từ 83,3% (*A. vinipectus*) đến 99,7% (*A. castaneiceps*). Mức độ tương đồng di truyền cao nhất (99,7%) là loài *A. castaneiceps* (bảng 3). Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra các loài cùng giống *Alcippe* đều hình thành một nhóm

(hình 3). Kết quả này chỉ ra, mẫu 028_BTTNVN là một loài thuộc giống *Alcippe*. Theo đặc điểm hình thái mẫu 028_BTTNVN liên quan mật thiết với loài *A. castaneiceps*. Mẫu của BTTNVN, ký hiệu 028_BTTNVN giá trị tương đồng di truyền dao động từ 83,3% đến 99,7%, trung bình 88,2%; ứng với 4 loài và phân loài giống *Alcippe*. Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra các loài nghiên cứu 028_BTTNVN cùng nhóm với loài *A. castaneiceps* (bootstrap 100%) (hình 3). Kết quả này khẳng định mẫu 028_BTTNVN là loài *Alcippe castaneiceps*.

Hình 3. Mối quan hệ di truyền mẫu 028_BTTNVN với các loài thuộc giống *Alcippe*Bảng 3. Mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền của một số loài giống *Alcippe*

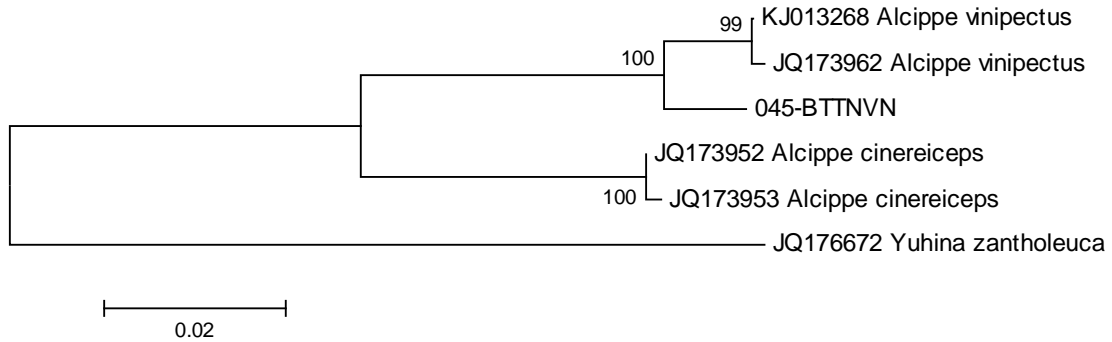
STT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6
1	028_BTTNVN		99,7	86,3	83,3	83,6	83,6
2	<i>Alcippe castaneiceps</i> (JQ173949)	0,3		86,5	83,3	83,6	83,6
3	<i>Alcippe brunnea</i> (JQ173945)	15,2	15,0		83,1	83,9	86,2
4	<i>Alcippe vinipectus</i> (KJ013268)	19,1	19,1	19,1		92,8	85,3
5	<i>Alcippe cinereiceps</i> (JQ173953)	18,7	18,7	18,1	7,7		86,0
6	<i>Yuhina zantholeuca</i> (JQ176672)	18,6	18,6	15,3	16,5	15,5	

Mẫu Lách tách màu trắng (045_BTTNVN): Kích thước vùng gen CO1 thu được có độ dài là 652 nucleotide. Trên cơ sở dữ

liệu của 4 loài giống *Alcippe* và 1 loài giống *Yuhina* (out group), đã xác định 652 vị trí có giá trị được sử dụng cho phân tích. Mức độ tương

đồng trung bình dao động trong giống *Alcippe* dao động từ 93,1% (*A. cinereiceps*) đến 98,2% (*A. vinipectus*). Mức độ tương đồng di truyền cao nhất (98,2%) là loài *A. vinipectus* (bảng 4). Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra các loài cùng giống *Alcippe* đều hình thành một nhóm (hình 4). Kết quả này chỉ ra, mẫu 045_BTTNVN là một loài thuộc giống *Alcippe*. Theo đặc điểm hình thái mẫu này liên quan mật thiết với loài

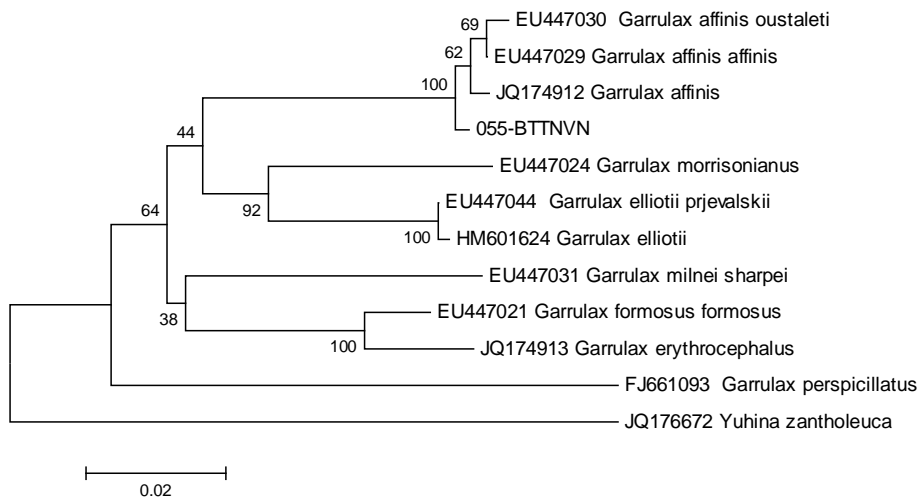
A. vinipectus. Mẫu của Bảo tàng, ký hiệu 045_BTTNVN có giá tương đồng di truyền dao động từ 93,1% đến 98,2%, trung bình 95,6%; ứng với 4 loài và phân loài giống *Alcippe*. Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra các loài nghiên cứu 045_BTTNVN cùng nhóm với loài *A. vinipectus* (bootstrap 100%) (hình 4). Kết quả này khẳng định mẫu 045_BTTNVN là loài *A. vinipectus*.



Hình 4. Mối quan hệ di truyền giữa mẫu 045_BTTNVN với các loài thuộc giống *Alcippe*

Bảng 4. Mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền của một số loài giống *Alcippe*

STT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6
1	045-BTTNVN		98,2	98,0	93,3	93,1	85,1
2	<i>Alcippe vinipectus</i> (KJ013268)	1,9		99,8	92,9	92,8	85,3
3	<i>Alcippe vinipectus</i> (JQ173962)	2,0	0,2		92,8	92,6	85,3
4	<i>Alcippe cinereiceps</i> (JQ173952)	7,2	7,5	7,7		99,8	86,2
5	<i>Alcippe cinereiceps</i> (JQ173953)	7,3	7,7	7,9	0,2		86,0
6	<i>Yuhina zantholeuca</i> (JQ176672)	16,6	16,5	16,5	15,3	15,5	



Hình 5. Mối quan hệ di truyền mẫu 055_BTTNVN với một số loài thuộc giống *Garrulax*

Mẫu Khướu mặt đen (055_BTTNVN): Kích thước vùng gen CO1 thu được có độ dài là 605 nucleotide. Trên cơ sở dữ liệu của 10 loài giống *Garrulax* và 1 loài giống *Yuhina* (out group), đã xác định 605 vị trí có giá trị được sử dụng cho phân tích. Mức độ tương đồng trung bình dao động trong giống *Garrulax* dao động từ 88,9% (*G. perspicillatus*) đến 99,3% (*Garrulax affinis oustaleiii*). Mức độ tương đồng di truyền cao nhất (98,2%) là loài *Garrulax affinis oustaleiii*. Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra mẫu 055_BTTNVN nằm cùng nhóm với 3 loài cùng giống *Garrulax* (hình 5). Kết

quả này chỉ ra mẫu 055_BTTNVN là một loài thuộc giống *Garrulax*. Theo đặc điểm hình thái mẫu này liên quan mật thiết với loài *Garrulax affinis*. Mẫu của Bảo tàng 055_BTTNVN có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 88,9% đến 99,3%, trung bình 94,1% (bảng 5); ứng với 10 loài và phân loài giống *Garrulax*. Cây phát sinh phả hệ cũng chỉ ra các loài nghiên cứu 055_BTTNVN cùng nhóm với 3 loài thuộc giống *Garrulax* (bootstrap 100%) (hình 5). Kết quả này chúng tôi cho rằng mẫu 055_BTTNVN là loài *Garrulax affinis*.

Bảng 5. Mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền của một số loài giống *Garrulax*

STT	Tên mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	055-BTTNVN <i>Garrulax affinis oustaleti</i>		99,3	99,2	99,2	88,9	91,7	92,5	92,7	93,2	93,0	91,2	87,0
2	(EU447030) <i>Garrulax affinis affinis</i>	0,7		99,5	99,2	88,6	91,1	92,2	92,0	92,5	92,4	90,9	86,5
3	(EU447029) <i>Garrulax affinis</i>	0,7	0,3		99,3	88,8	91,2	92,4	92,2	92,7	92,5	91,1	86,5
4	(JQ174912) <i>Garrulax perspicillatus</i>	0,8	0,8	0,5		88,9	91,2	92,4	92,5	93,0	92,8	91,1	86,7
5	(FJ661093) <i>Garrulax milnei sharpie</i>	12,1	12,5	12,1	12,1		88,8	89,1	87,6	88,5	88,3	89,1	84,6
6	(EU447031) <i>Garrulax formosus</i>	9,0	9,8	9,4	9,6	12,3		92,7	91,5	92,4	92,5	92,4	86,0
7	<i>formosus</i> (EU447021) <i>Garrulax morrisonianus</i>	8,0	8,4	8,1	8,2	11,9	7,9		92,0	92,7	92,5	97,6	86,3
8	(EU447024) <i>Garrulax elliotii</i>	7,8	8,6	8,2	8,0	13,7	9,2	8,6		94,6	94,5	92,5	85,9
9	<i>prjevalskii</i> (EU447044) <i>Garrulax elliotii</i>	7,3	8,0	7,7	7,5	12,7	8,2	7,8	5,6		99,8	93,3	86,2
10	(HM601624) <i>Garrulax erythrocephalus</i>	7,5	8,2	7,8	7,6	12,9	8,0	8,0	5,8	0,2		93,2	86,0
11	(JQ174913) <i>Yuhina zantholeuca</i>	9,6	10,0	9,6	9,8	11,9	8,2	2,5	8,0	7,1	7,3		86,0
12	(JQ176672)	14,4	15,0	14,8	14,8	17,4	15,6	15,2	15,7	15,3	15,5	15,6	

KẾT LUẬN

Giải trình tự vùng DNA barcode và so sánh kết quả giải trình tự với dữ liệu đã công bố trên ngân hàng gen (Genbank), chúng tôi đã xác định được chính xác tên cho 4 mẫu chim thuộc họ Khướu Timaliidae thu tại Vườn quốc gia Hoàng Liên với các mã hiệu 005_BTTNVN (Khướu mào cổ trắng, *Yuhina diademata*, 028_BTTNVN (Lách tách đầu đỏm, *Alcippe castaneiceps*), 045_BTTNVN (Lách tách mày trắng, *Alcippe vinipectus*), 055_BTTNVN

(Khướu mặt đen, *Garrulax affinis*), đúng như các kết luận nhận dạng bằng hình thái ban đầu.

Kết quả nghiên cứu là cơ sở để giám định các mẫu chim theo phương pháp sử dụng các trình tự DNA ngắn (DNA barcode) và khả năng có thể sử dụng mã vạch DNA (Cytochrome c oxidase 1-CO1) trong việc định loại mẫu động vật tại BTTNVN. Mã vạch DNA barcoding thực sự là công cụ hữu hiệu hỗ trợ cho việc giám định những mẫu động vật và bổ sung hiệu quả cho việc định loại hình thái.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài cơ sở 2015 “Giải mã vùng gen Barcoding (Cytochrome c oxidase 1-CO1) cho một số mẫu chim của Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aliabadian M., Kabodi M., Nijman V., Vences M., 2009. Molecular identification of birds: performance of distance based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. *Plos.One*4: e4119.doc 10.1371/Journal.pone.004119.
2. Avise J. C., 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conser Biol.*, 9 (3): 686-690;
3. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam, phần động vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
4. Chính phủ nước CHXHCNVN, 2006. Nghị Định số 32/2006/NĐ-CP, ngày 30/3/2006, của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm.
5. Nguyễn Cử, Lê Trọng Trái, Karen Phillipps, 2000. Chim Việt Nam. Nxb. Lao động và xã hội, Hà Nội.
6. Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., Francis C. M., 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology* 2, e312.
7. Kerr K. C. R., Stoeckle M. Y., Dove C. J., Weight L. A., Francis C. M., Hebert P. D. N., 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Mol. Ecol. Notes*. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01670x.
8. Lijtmaer D. A., Kerr K. C., Stoeckle M. Y., Tubaro P. L., 2012. DNA barcoding birds: from field collection to data analysis in: Kress W. J, Erickson D. L (Eds) *DNA barcodes Methods and Protocol*, Springer NY: 127-153.
9. Lohman D. J., Prawiradilaga D. M., Meier R., 2009. Improved CO1 barcoding primers for Southeast Asian perching birds (Aves: Passeriformes). *Mol. Ecol. Res.* DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02221x.
10. 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.
11. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
12. Võ Quý, 1981. Chim Việt Nam hình thái và phân loại. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
13. Võ Quý, Nguyễn Cử, 1995. Danh mục chim Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
14. Yoo H. S., Eah J. Y., Kim J. S., Kim Y. J., Min M. S., Paek W. K., Lee H., Kim C. B., 2006. DNA barcoding Korea birds. *Mol.Cells*, 22(3): 323-327.
15. [Http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). (3/2015)
16. [Http://www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc). (3/2015)

**ASSESS THE POSSIBILITY OF USING DNA BARCODES
IN THE IDENTIFICATION OF BIRD SPECIMENS IN VIETNAM
NATIONAL MUSEUM OF NATURE**

Tran Thi Viet Thanh¹, Vu Dinh Duy^{1,2}, Nguyen Minh Tam¹

¹Vietnam National Museum of Nature, VAST

²College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, P.R China

SUMMARY

Based on determining DNA barcode sequences (CO1 gene sequences of the mitochondrial genome), four bird samples of family Timaliidae, viz. 005_BTTNVN, White collared Yuhinas; 028_BTTNVN, Rufous winged fulvetta; 045_BTTNVN, White-browed fulvetta and 055_BTTNVN, Black-faced Laughingthrush were identified. Total DNA was extracted from samples of blood, then proceed with polymerase chain reaction (PCR), purification and sequencing using pairs of primers Barcode program CO1 DNA Barcoding BirdF1-BirdR1. The results have identified DNA sequence fragment about 650bp. Analysis by computer software Mega 5.2.2 and the program BLAST on the international genbank shows the specimens with the genus have exactly the name as identification by morphology. The DNA sequences were registered in GenBank with code: KP768404, KP768405, KP708406, KP768407. Our results showed that successful use of primers BirdF1-BirdR1 for identification of assessment for birds can serve multiple samples exhibited at the Vietnam National Museum of Nature, while contributing to the protection of genetic resources of Vietnam quarter, integration with the world Barcoding Project.

Keywords: *Alcippe castaneiceps*, *Alcippe vinipectus*, *Garrulax affinis*, *Yuhina diademata*, DNA, Cytochrome c oxidase 1 (CO1).

Ngày nhận bài: 21-4-2015