*Tạp chí Công nghệ Sinh học* **14**(1): 29-37, 2016

# DNA MÃ VẠCH VÀ ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI CỦA CÁ BÔNG LAU (*PANGASIUS KREMPFI*), CÁ TRA BẦN (*P. MEKONGENSIS*) VÀ CÁ DỨA (*P. ELONGATUS*)

**Dương Thúy Yên, Nguyễn Kiệt, Bùi Sơn Nên, Nguyễn Văn Thường, Nguyễn Bạch Loan, Trần Đắc Định**

*Đại học Cần Thơ*

Ngày nhận bài: 23.7.2015
Ngày nhận đăng: 20.12.2015

TÓM TẮT

Cá bông lau, tra bần và cá dứa là 3 loài cá kinh tế quan trọng trong giống Pangasius. Chúng có đặc điểm bên ngoài giống nhau nên dễ bị nhầm lẫn ở giai đoạn cá nhỏ. Nghiên cứu này nhằm phân biệt 3 loài cá này dựa trên sự khác biệt về DNA mã vạch, gene COI (cytochrome c oxidase subunit I), và những đặc điểm hình thái. Cá được thu với nhiều kích cỡ khác nhau (>90 mẫu/loài) ở vùng hạ lưu sông Mekong. So sánh trình tự COI (15 mẫu, trong đó có 4 mẫu có trình tự riêng biệt với số truy cập ở Genbank từ KT289877 đến KT289880) cho thấy khoảng cách di truyền theo phương pháp "Kimura-2 parameter" giữa 3 loài tương đối lớn, dao động từ 9,33 – 12,10%. Về hình thái, các chỉ tiêu đếm gồm số lượng tia mềm của các vi và số lượng lược mang có khoảng biến động tương đương nhau giữa 3 loài nhưng các chỉ tiêu đo khác biệt có ý nghĩa (P<0,01). Kết quả phân tích thành phần chính dựa trên các chỉ tiêu đo cho thấy 3 loài tách thành nhóm riêng biệt. Điểm nhận dạng của cá dứa là thân hình dài, cuống đuôi dài, mắt to và răng lá mía dạng chữ nhật. Cá tra bần khác cá bông lau ở những đặc điểm của phần đầu. Số lượng thùy, hình dạng và kích thước bóng hơi cũng khác biệt giữa 3 loài. Mối quan hệ loài dựa trên kết quả di truyền và hình thái đều cho thấy bông lau gần với tra bần hơn cá dứa và giữa tra bần - cá dứa có sự khác biệt lớn nhất.

**Từ khóa:** *COI, DNA mã vạch, hình thái, Pangasius, quan hệ giữa các loài*

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá da trơn giống Pangasius (họ Pangasiidae) gồm những loài cá có kích thước lớn, có giá trị kinh tế cao và là đối tượng quan trọng trong khai thác và nuôi thủy sản ở các nước Đông Nam Á (Csavas, 1994). Theo Fishbase (truy cập ngày 16/7/2015), giống này hiện có 21 loài. Tuy nhiên, số loài và tên khoa học của một số loài trong giống Pangasius nói riêng và trong họ Pangasiidae nói chung chưa thống nhất giữa các nhà nghiên cứu trên thế giới (Gustiano *et al*., 2003; Rainboth, 1996; Roberts and Vidthayanon, 1991; Tran *et al*., 2013). Một số loài thiếu thông tin về đặc điểm hình thái, sinh học, phân bố,... (Nguyễn Văn Thường *et al.,* 2009). Vì vậy, việc nghiên cứu về sinh học và hệ thống phân loại của họ Pangasiidae vẫn đang được chú ý và cần thêm nhiều nghiên cứu.

Hiện nay trong nghiên cứu phân loại, bên cạnh phương pháp truyền thống là dựa vào đặc điểm hình thái, người ta còn áp dụng kết hợp với phương pháp di truyền phân tử. Trong một số gene đặc trưng cho loài, gọi là DNA mã vạch, gene COI, cytochrome c oxidase subunit I, trên DNA ti thể được xem là DNA mã vạch đáng tin cậy trong phân loại nhiều lớp ngành khác nhau (Bucklin *et al.,* 2011; Hebert *et al.,* 2003; Ward, 2009; Weitschek *et al.*, 2014), trong đó có lớp cá (Lara *et al*., 2010; Mabragaña *et al*., 2011; Steinke *et al*., 2009; Ward *et al*., 2009; Weigt *et al*., 2012). Đối với các loài thuộc họ cá tra, một số nghiên cứu ứng dụng chỉ thị DNA trong phân loại và nghiên cứu mối quan hệ di truyền đã được công bố, song chưa có nghiên cứu nào sử dụng gene COI (Gustiano and Pouyaud, 2007; Karinthanyakit and Jondeung, 2012; Sriphairoj *et al*., 2010). Ở ngân hàng gene (Genbank), chỉ có vài loài trong giống Pangasius có trình tự gene COI, gồm cá tra, cá hú, ba sa và một vài loài khác phân bố ở Thái Lan.

Trong giống Pangasius, có hai loài mới được định danh gần đây là loài cá tra bần *Pangasius mekongensis* (Gustiano *et al*., 2003) và cá dứa *Pangasius elongatus* (Pouyaud *et al*., 2002). Những thông tin về hai loài này mới chỉ có những mô tả sơ lược một số đặc điểm hình thái, phân bố và đặc điểm dinh dưỡng (Tran *et al.,* 2013) (Nguyễn Văn Thường

*et al.,* 2009). Về hình dạng, cá tra bần và cá dứa tương đối giống với cá bông lau *Pangasius krempfi*. Ba loài này đều là những loài di cư sinh sản và sống ở vùng nước lợ, trừ cá dứa sống trong nước ngọt và lợ (Nguyễn Văn Thường *et al.,* 2009). Việc phân loại 3 loài bông lau, tra bần và cá dứa đã được đề cặp, song chưa thống nhất và chưa có những nghiên cứu so sánh chỉ tiêu hình thái đồng thời của 3 loài. Vì vậy, trên thực tế, chúng khó phân biệt, đặc biệt là giai đoạn cá nhỏ.

Nghiên cứu này nhằm tìm ra những điểm khác biệt về hình thái và DNA mã vạch dựa trên gene COI của ba loài bông lau, cá dứa và cá tra bần, góp phần bổ sung thông tin đáng tin cậy trong việc nhận dạng, phân loại 3 loài cá này cũng như trong nghiên cứu mối quan hệ giữa các loài trong họ Pangasiidae.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Thu mẫu cá

Cá được thu ở các nơi đánh bắt cá trên sông Hậu và vùng cửa sông ven biển ở các tỉnh Cần Thơ, Sóc Trăng, Trà Vinh và Cà Mau. Thời gian thu mẫu từ tháng 4 – 12/2014. Mẫu cá thu được có các kích cỡ khác nhau với số lượng là 90 mẫu cá tra bần, 104 mẫu cá dứa và 108 mẫu cá bông lau. Mẫu cá sau khi thu được ghi nhãn, quan sát các đặc điểm bên ngoài và chụp hình, sau đó được bảo quản lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản- trường Đại học Cần Thơ.

### Phương pháp phân tích các đặc điểm hình thái

Mẫu được định danh ban đầu dựa trên các đặc điểm phân loại đã được mô tả bởi Rainboth (1996), Tran Dac Dinh *et al*., (2013). Các chỉ tiêu đếm gồm: số tia của vi lưng (D), vi ngực (P), vi hậu môn (A), vi đuôi (C), số lược mang bên phải và bên trái. Chỉ tiêu cân, đo như khối lượng tổng (W), chiều dài tổng, chiều dài chuẩn (SL) và các chỉ tiêu khác được nêu ở bảng 2. Bên cạnh đó, một số chỉ tiêu bên trong được khảo sát như chiều dài ruột, hình dạng và chiều dài các thùy của bóng hơi.

### Phương pháp phân tích gene COI

DNA được tách chiết từ mẫu vi cá bằng phương pháp phenol-chloroform (Taggart *et al*., 1992). Chất lượng DNA được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel aragrose 1%. Những mẫu DNA có vạch sáng rõ được dùng để phân tích tiếp theo.

Gene COI được khuếch đại với cặp mồi FishF2-t1 và FishR2-t1 (Ivanova *et al*., 2007; Ward *et al*., 2005). Phản ứng khuếch đại (PCR) với thể tích 30 µL có chứa 1X dung dịch đệm, 0,2mM dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$ và 6 pmol mỗi loại đoạn mồi FishF2-t1 và FishR2-t1, 1,25 U Taq polymerase (Fermentas) và ~ 100 ng DNA. Chu kỳ nhiệt PCR gồm 1 vòng duỗi xoắn ban đầu ở 95$^o$C trong 2 phút, 35 vòng lặp lại với 94$^o$C trong 30 giây, 52$^o$C trong 40 giây và 72$^o$C trong 1 phút. Vòng kéo dài cuối cùng ở 72$^o$C trong 10 phút (Ivanova *et al*., 2007). Sản phẩm PCR được kiểm tra lại bằng điện di và những mẫu có kết quả tốt (1 vạch sáng, kích thước ~700 bp) được giải trình tự 2 chiều tại công ty Nam Khoa (Tp. Hồ Chí Minh) và First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia). Mẫu PCR trước khi giải trình tự được tinh sạch theo qui trình của mỗi công ty phân tích trình tự. Mỗi loài cá được giải trình tự 5 mẫu.

### Phương pháp phân tích số liệu

#### *Số liệu hình thái*

Các chỉ tiêu đếm được tính giá trị xuất hiện nhiều nhất (mode) và khoảng biến động. Các chỉ tiêu đo được tính tỉ lệ so với dài chuẩn hoặc dài đầu (Bảng 2). Sự khác biệt về tỉ lệ số đo giữa 3 loài cá được kiểm định bằng phương pháp ANOVA và phép thử Tukey HSD. Các số liệu hình thái đếm và logarit của tỉ lệ số đo của 3 loài cá tiếp tục được kiểm tra bằng phương pháp phân tích thành phần chính (principle component analysis, PCA) để tìm những nhóm đặc điểm đặc trưng thể hiện sự khác biệt giữa 3 loài. Việc xử lý số liệu được thực hiện bằng chương trình R (R Core Team, 2014).

#### *Số liệu di truyền*

Trình tự gene COI được phân tích bằng chương trình Finch TV 1.4.0 (http://www.geospiza.com/), MEGA 6 (Tamura *et al*., 2013), PAUP* 4.0 (Swofford, 2002) và BLAST (Basis Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Chương trình Finch TV và MEGA 6 được dùng để kiểm tra giá trị chất lượng (Q) giải trình tự 2 chiều của mỗi mẫu. Trong trường hợp những vị trí nucleotide không giống nhau giữa 2 chiều, thường xảy ra ở 2 đầu của gene, thì chọn nucleotide có giá trị Q cao hơn. Sau khi được chỉnh sửa, gene COI có cùng kích thước (656 bp) của 3 loài được kiểm tra sự khác biệt về thành phần các nucleotide bằng kiểm định $\chi^2$ và được thực hiện qua chương trình PAUP* 4.0. Sau đó, chúng được sắp xếp hàng cùng nhau (alignment) bằng công cụ ClustalW, thông qua chương trình MEGA 6, sau đó được tính khoảng cách di truyền

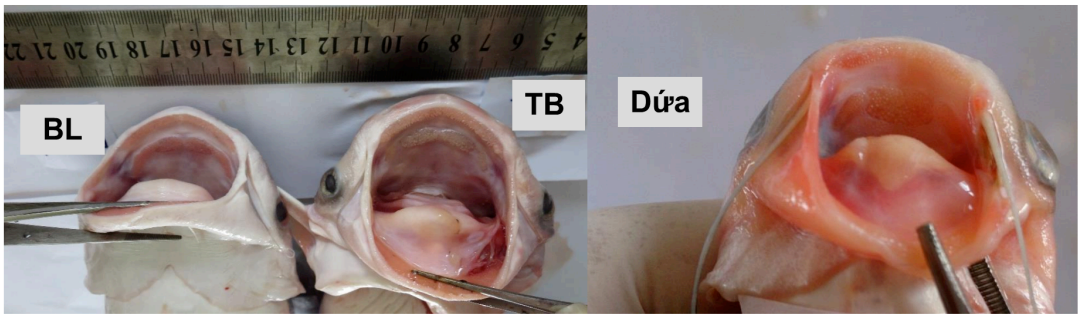
theo "Kimura -2 parameter" trong cùng và giữa các loài. Cây di truyền được tính theo phương pháp Neighbor-Joining và được kiểm tra bootstrap với 1000 lần lặp lại. Trình tự đặc trưng của mỗi loài được so sánh với cơ sở dữ liệu của Genbank với công cụ BLAST.

## KẾT QUẢ

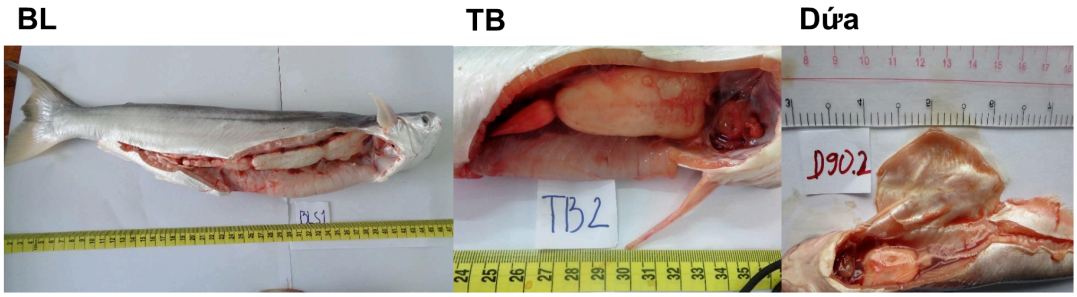
### So sánh đặc điểm hình thái của 3 loài Pangasius

Hình dạng cơ thể và màu sắc bên ngoài khi cá còn sống ở giai đoạn trưởng thành có thể phân biệt được 3 loài. Cá dứa có kích thước nhỏ và thân hình dài, đầu trơn lán. Cá bông lau và tra bần có hình dạng gần giống nhau và có màu vàng hoặc đỏ ở vi đuôi nên chúng dễ bị nhầm lẫn. Tuy nhiên, chúng khác nhau ở phần đầu. Cá tra bần có đầu sần sùi, có 2 rãnh sâu, rõ ràng ở đỉnh đầu và có vết sần hình cánh quạt hiện rõ ở trên nắp mang. Đầu của cá bông lau trơn lán, có rãnh cạn và không có hình cánh quạt rõ ràng. Ngoài ra, vị trí lỗ mũi sau của hai loài cũng khác nhau. Ở cá tra bần, lỗ mũi trước và sau gần như nằm trên một đường thẳng song song với trục thân, trong khi 2 lỗ mũi của cá bông lau thì nằm trên đường nghiêng với trục thân. Ở giai đoạn cá nhỏ (< 50 g), những đặc điểm đặc trưng của cá tra bần có thể nhận biết nhưng rất khó phân biệt giữa cá bông lau và cá dứa nếu chỉ dựa vào hình dáng bên ngoài.

Đặc điểm tiếp theo để phân biệt 3 loài là hình dạng và cấu tạo răng vòm miệng. Cá bông lau có răng vòm miệng gồm: răng lá mía mọc thành một đám, đám răng này có thể tách rời hoặc dính liền với đám răng khẩu cái ở hai bên tạo thành hình hình vòng cung tròn ngược với răng hàm dưới. Hình dạng răng vòm miệng của cá tra bần tương đối giống với cá bông lau, chỉ khác là răng khẩu cái ngắn hơn và thường tách rời với răng lá mía. Khác với 2 loài trên, cá dứa có 2 răng lá mía dính với nhau tạo thành dạng hình chữ nhật, một số ít cá thể có răng lá mía tách rời, dạng hơi tròn. Răng lá mía cá dứa có thể gắn liền hay tách rời với răng khẩu cái (Hình 1).




**Hình 1.** Hình dạng răng miệng của cá bông lau (BL), tra bần (TB) và cá dứa.




**Hình 2.** Hình dạng bóng hơi của cá bông lau (BL), tra bần (TB) và cá dứa.

Ba loài cá cũng khác nhau về hình dạng và kích thước bóng hơi (Hình 2). Ở cá tra bần, bóng hơi có 2 thùy, thùy thứ nhất to và dài gấp ~ 4 lần so với thùy thứ hai, tổng chiều dài bóng hơi bằng 27,8 ± 4% SL. Khác với cá tra bần, bóng hơi của cá dứa và cá bông lau dài (tương ứng 49,1±9,7% và 57,3±12,3% SL) và

chia làm 3 thùy. Ở cá dứa, thùy thứ I phình rộng gần hết chiều ngang xoang bụng, hai thùy kia thon nhỏ. Thùy thứ hai ngắn nhất. Tỉ lệ chiều dài của 3 thùy là 29,3±5,6%, 9,3 ± 3,4% và 61,4 ± 7,2%. Ở cá bông lau, bóng hơi thon dài, trong đó, thùy thứ 3 thon và dài nhất, chiếm 53,3±10,2%. Tỉ lệ thùy 1 (25,5±6,1%) và thùy 2 (21,3±5,5%) tương đương nhau. Một số nghiên cứu trước có đề cập số thùy bóng hơi của cá bông lau (Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993; Nguyễn Văn Thường và ctv., 2009), song chưa có tài liệu nào định lượng tỉ lệ của các thùy bóng hơi.

Về các chỉ tiêu đếm, số lượng tia mềm của các vi và số lượng lược mang giữa 3 loài tương đương nhau về giá trị xuất hiện nhiều nhất và khoảng biến động (Bảng 1). Phân tích thành phần chính dựa trên 6 chỉ tiêu đếm cho kết quả các mẫu của 3 loài không tách biệt nhau. Do đó, không thể phân biệt 3 loài chỉ dựa vào chỉ tiêu đếm.

**Bảng 1 .** Giá trị xuất hiện nhiều nhất (khoảng biến động) của một số chỉ tiêu đếm của 3 loài cá.

| Chỉ tiêu | Cá bông lau N=69 | Cá dứa N=98 | Tra bần N = 90 |
|---|---|---|---|
| **Vi bụng** | **6** | **6** | **6** |
| Vi lưng | 8 | 8 | 8 (7 – 8) |
| Vi ngực | 12 (10 – 13) | 12 (10 – 13) | 11 (10 – 12) |
| Vi hậu môn | 33 (30 – 34) | 32 (30 – 37) | 32 (28 – 34) |
| Lược mang trái | 21 (18 – 22) | 19 (17 – 21) | 17 (15 – 23) |
| Lược mang phải | 20 (18 – 22) | 17 (17 – 22) | 17 (16 – 23) |

**Bảng 2.** Tỉ lệ (trung bình ± ĐLC) của 1 số chỉ tiêu đo so với chiều dài chuẩn và chiều dài đầu của 3 loài cá.

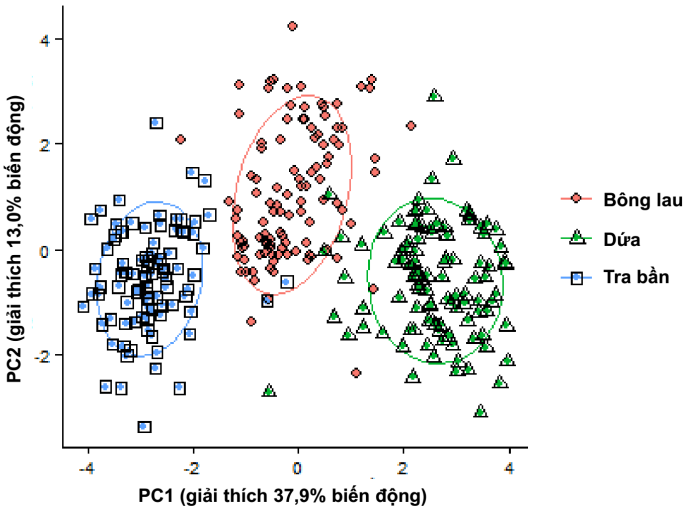
| | *Chỉ tiêu* | Bông lau N = 108 | Dứa N = 104 | Tra bần N = 90 |
|---|---|---|---|---|
| Khối lượng, g (khoảng biến động) | | 269,6 (1,8 – 1.834) | 26,3 (6,8 – 70,8) | 136,9 (20,7 – 1.451) |
| Chiều dài, cm (khoảng biến động) | | 20,8 (5,5 – 52,0) | 12,3 (7,8 – 18,3) | 18,0 (10,2 – 41,6) |
| ***So với chiều dài chuẩn (SL)*** | | | | |
| 1 | Chiều dài đầu (HL) | 0,230 ± 0,026$^{b}$ | 0,218 ± 0,013$^{a}$ | 0,249 ± 0,014$^{c}$ |
| 2 | Chiều cao thân (BD) | 0,214 ± 0,021$^{a}$ | 0,229 ± 0,022$^{b}$ | 0,223 ± 0,015$^{b}$ |
| 3 | Chiều dài cuống đuôi | 0,155 ± 0,014$^{a}$ | 0,187 ± 0,028$^{b}$ | 0,150 ± 0,008$^{a}$ |
| 4 | Chiều cao cuống đuôi | 0,078 ± 0,005$^{b}$ | 0,085 ± 0,006$^{c}$ | 0,075 ± 0,004$^{a}$ |
| 5 | Chiều dài vi lưng (DL) | 0,181 ± 0,015$^{a}$ | 0,182 ± 0,023$^{a}$ | 0,209 ± 0,025$^{b}$ |
| 6 | Chiều dài vi ngực | 0,177 ± 0,024$^{a}$ | 0,173 ± 0,020$^{a}$ | 0,191 ± 0,020$^{b}$ |
| 7 | Chiều dài vi bụng | 0,115 ± 0,009$^{a}$ | 0,115 ± 0,008$^{a}$ | 0,146 ± 0,014$^{b}$ |
| 8 | Chiều dài vi đuôi | 0,328 ± 0,027$^{a}$ | 0,327 ± 0,032$^{a}$ | 0,397 ± 0,036$^{b}$ |
| 9 | Chiều dài vi hậu môn | 0,312 ± 0,027$^{ab}$ | 0,318 ± 0,027$^{b}$ | 0,307 ± 0,022$^{a}$ |
| ***So với chiều dài đầu (HL)*** | | | | |
| 10 | Rộng đầu (HW) | 0,765 ± 0,049$^{b}$ | 0,720 ± 0,057$^{a}$ | 0,838 ± 0,062$^{c}$ |
| 11 | Cao đầu (HD) | 0,614 ± 0,071$^{a}$ | 0,675 ± 0,064$^{b}$ | 0,615 ± 0,047$^{a}$ |
| 12 | Khoảng cách 2 mắt (OO) | 0,701 ± 0,043$^{b}$ | 0,625 ± 0,049$^{a}$ | 0,749 ± 0,061$^{c}$ |
| 13 | Đường kính mắt (O) | 0,163 ± 0,027$^{b}$ | 0,220 ± 0,037$^{c}$ | 0,144 ± 0,014$^{a}$ |
| 14 | Độ rộng miệng (GW) | 0,532 ± 0,028$^{b}$ | 0,465 ± 0,032$^{a}$ | 0,558 ± 0,042$^{c}$ |

**Ghi chú:** Các giá trị trong cùng 1 dòng có cùng ký tự thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

Tỉ lệ 14 chỉ tiêu đo (Bảng 2) khác biệt có ý nghĩa giữa 3 loài cá (P<0,01). Những điểm khác biệt được thấy rõ qua phân tích PCA (Hình 3). Ba loài có đường xác suất 68% thể hiện đặc điểm chung của mỗi loài riêng biệt nhau. Thành phần chính 1 (PC1) và PC2 giải thích 37,9% và 13,0% sự khác biệt về các tỉ lệ số đo giữa các mẫu cá của 3 loài trong nghiên cứu. Một số chỉ tiêu đóng góp quan trọng trong PC1 bao gồm đường kính mắt/dài đầu (HL) (cá dứa > bông lau > tra bần); dài cuống đuôi/dài chuẩn (SL) (cá dứa > bông lau và tra bần); cao cuống đuôi/SL (cá dứa > bông lau > tra bần); cao đầu (cá dứa > bông lau và tra bần); dài vi hậu môn (cá dứa > bông lau và tra bần). Những chỉ tiêu này ở cá dứa khác biệt rất có ý nghĩa (P<0,01) và dễ nhận biết so với 2 loài cá còn lại (Hình 4). Riêng chỉ tiêu cao thân/SL của cá dứa tương đương với cá tra bần và lớn hơn cá bông lau (P<0,05).

Những chỉ tiêu quan trọng trong PC2 thể hiện sự gần nhau giữa cá dứa và bông lau, khác hơn so với cá trần (P<0,05), gồm chiều dài của vi lưng, vi ngực, vi bụng và vi đuôi so với SL. Ngoài ra, độ rộng miệng và rộng đầu (so với HL) của cá tra bần cũng lớn hơn cá bông lau và cả hai loài đều lớn hơn cá dứa (P<0,05).

Như vậy, giá trị các tỉ lệ số đo của cá bông lau nằm trung gian giữa cá dứa và cá tra bần.




**Hình 3.** Đồ thị 2 chiều phân tích thành phần chính (PC) từ 14 tỉ lệ số đo (Bảng 2) của 3 loài cá. Đường tròn ellipse thể hiện xác suất 68% của mỗi loài.

**So sánh trình tự DNA mã vạch COI của 3 loài Pangasius**

Đoạn gene COIcủa 3 loài được phân tích trong nghiên cứu này có chiều dài 656 bp. Trong 15 mẫu phân tích, có 4 mẫu có trình tự riêng biệt có số truy cập KT289877 - KT289880. Thành phần các nucleotide của 3 loài cá tương đồng nhau ($\chi^2$= 3,62, df = 42, P = 1), với tỉ lệ T, C, A, G tương ứng là 29,6 ± 0,3%; 26,1 ± 0,4%; 26,4 ± 0,6%; 17,9 ± 0,5%. So với kết quả nghiên cứu trên 143 loài cá xương ở Úc (Ward *et al*., 2005) thì tỉ lệ T và G tương tự, chỉ khác ở thành phần C và A (cá ở Úc, C chiếm 28,75 ± 0,15 và A 23,58 ± 0,09%). Tỉ lệ GC chung chiếm 44,0 ± 0,8%. Tuy nhiên, GC ở vị trí codon thứ 3, vị trí thường có GC% dao động lớn giữa các đơn vị phân vị phân loại (Ward *et al*., 2005), khác nhau giữa 3 loài, ở cá bông lau là 32,4%, cá dứa 28,7% và tra bần 31,%.

Trong các mô hình mô tả xu hướng thay thế các nucleotide của 3 loài cá thì mô hình Kimura 2-parameter là 1 trong 2 model có giá trị BIC (Bayesian Information Criterion) nhỏ nhất, thể hiện đây là phương pháp tốt nhất mô tả xu hướng thay thế các nucleotide. Theo mô hình này, tỉ lệ thay thế các nuceotide cùng loại (A với G hoặc T với C) là 23,39%, gấp 29 lần so với tỉ lệ thay thế khác loại (0,80%).

Trong 5 mẫu COI của mỗi loài thì chỉ có ở cá dứa có sự khác biệt về trình tự COI trong cùng một loài và ở tại một vị trí nucleotide, do đó, khoảng cách di truyền dựa trên Kimura-2 paramter rất nhỏ (±

SE) 0,01 ± 0,01%. Trong khi đó, khoảng cách di truyền giữa 3 loài lớn, từ 9,33 – 12,1% (Bảng 3). Chúng khác nhau ở 98 (98/656) nucleotide.

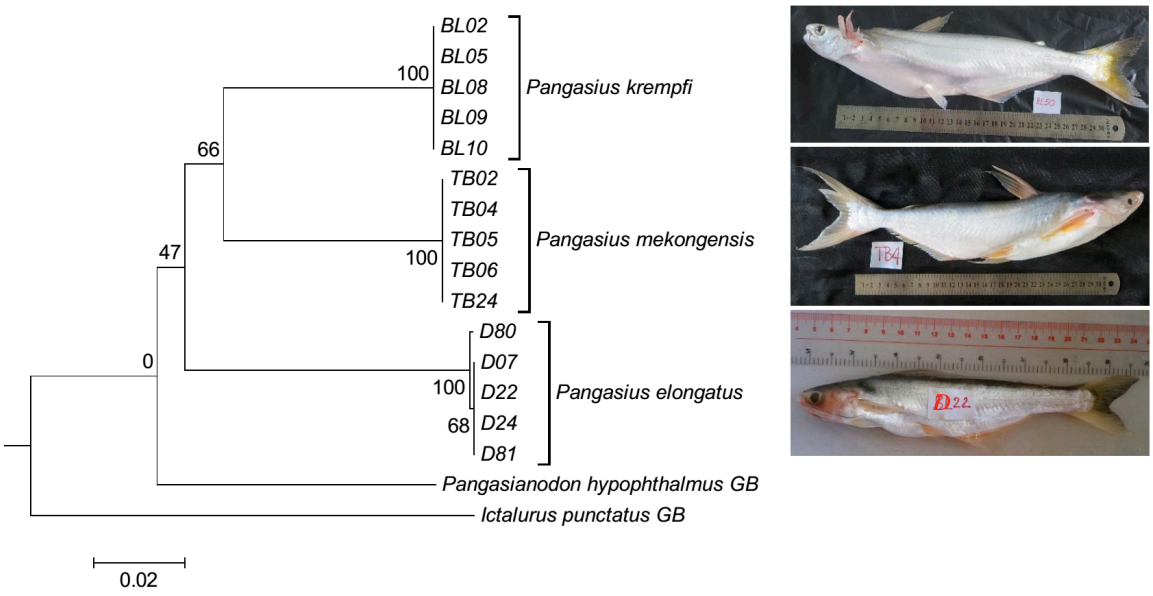
Trình tự gene COI của 3 loài trong nghiên cứu hoàn toàn mới, chưa được công bố trên Genbank, do đó, không thể so sánh với dữ liệu COI cùng loài phân bố ở những nơi khác trên thế giới. Khi so với một số loài khác trong họ Pangasiidae, mức độ tương đồng trình tự gene COI của 3 loài này so với cá tra (số truy cập KF604671.1) là từ 88 - 89%, so với cá hú (số truy cập EF609426.1) từ 92 - 93%, chứng tỏ mức độ khác biệt giữa các loài tương đối lớn. Mối quan hệ di truyền của 3 loài được phân tích cùng với 1 loài khác trong cùng họ Pangasiidae, cá tra *Pangasianodon hypophthalmus,* và 1 loài khác họ, *Ictalurus punctatus* thuộc họ Ictaluridae, thể hiện ở hình 4.

Cây di truyền (Hình 4) cho thấy cá bông lau có mối quan hệ gần với cá tra bần hơn so với cá dứa. Ba loài này tạo cùng một nhánh, khác với nhánh của cá tra, giống *Pangasianodon*, trong họ Pangasiidae. Khoảng cách di truyền của cá tra so với 3 loài trong nghiên cứu dao động từ 12,0 – 13,3% (tương ứng với mức độ tương đồng về trình tự gene COI từ 88% - 89%). Cá nheo Mỹ nằm ở 1 nhánh riêng, thể hiện sự khác biệt giữa 2 họ, khoảng cách di truyền so với các loài họ Pangasiidae từ 17,7 (so với cá tra) – 19,3 (so với cá dứa).

**Bảng 3.** Khoảng cách di truyền dựa trên Kimura-2 paramter giữa 3 loài cá.

| | Bông lau | Dứa | Tra bần |
|---|---|---|---|
| Bông lau | - | 1,48 | 1,21 |
| Dứa | 11,67 | - | 1,48 |
| Tra bần | 9,33 | 12,10 | - |

**Ghi chú:** Giá trị trung bình ở phía dưới đường chéo và sai số chuẩn (SE) ở phía trên đường chéo.




**Hình 4.** Cây di truyền của ba loài cá (bông lau, cá dứa, tra bần) nghiên cứu so với cá tra (Số truy cập GB KF604671.1) và cá nheo Mỹ (HQ024944.1) từ Genbank (GB). Các chữ viết tắt là số ID của mẫu. Cây di truyền được ước tính theo phương pháp Neighbor-Joining. Giá trị bootstrap bên cạnh nhánh phân loại.

## THẢO LUẬN

Nghiên cứu này đã bổ sung số liệu hình thái dựa trên số mẫu lớn và cung cấp trình tự gene COI chưa được nghiên cứu trước đó của 3 loài cá kinh tế quan trọng: bông lau, cá dứa và tra bần. Dựa trên kết quả này, 3 loài cá có thể phân biệt được bằng phương pháp hình thái dựa trên những đặc điểm đặc trưng của loài, hoặc bằng chỉ thị DNA mã vạch COI trong những trường hợp mẫu không còn nguyên hình dạng

hay ở giai đoạn cá nhỏ. Qua việc so sánh các chỉ tiêu hình thái cho thấy các chỉ tiêu đếm không phải là đặc điểm phân biệt giữa 3 loài này. Song với những loài khác cùng giống Pangasius, số lược mang, số tia vi hậu môn khác biệt giữa cá ba sa, cá hú, vồ đém,...(Rainboth, 1996). Điểm dễ nhận biết của cá dứa khác so với bông lau và tra bần (và cũng so với các loài còn lại trong cùng giống Pangasius, theo Pouyaud *et al*., (2002)) là thân hình dài, cuống đuôi dài, mắt to và hình dạng răng miệng. Cá tra bần khác cá bông lau ở những đặc điểm của phần đầu.

Khoảng cách di truyền tính theo Kimura-2 paramter (K2P) dựa trên gene COI của 3 loài cá trên tương đối lớn so với những loài cá khác. Cùng phương pháp này, Ward *et al*., (2005) khi nghiên cứu trên 145 loài cá xương ở Úc cho biết giữa các loài khác nhau từ 0 – 20,63%, trung bình 9,93%. Trường hợp 0% chỉ xuất hiện ở 1 cặp loài thuộc giống *Pristiophorus* và 1 cặp thuộc giống *Plectropomus*. Trung bình K2P giữa các loài tìm thấy ở 80 loài cá ở Canada là (±SE) 8,37 ± 0,03% (Hubert *et al*., 2008) hay ở 115 loài cá biển Ấn Độ là 6,60 ± 0,085% (Lakra *et al*., 2011). Do sự khác biệt K2P trên gene COI lớn giữa cá bông lau, tra bần và cá dứa nên 3 loài này có thể được định danh chính xác bằng trình tự gene COI ngay cả khi mẫu hình thái không nguyên vẹn. Kết quả này rất quan trọng không những trong ngành quản lý nguồn lợi thủy sản mà còn có khả năng ứng dụng trong những lĩnh vực khác như trong thương mại – xác định tên loài cá của sản phẩm chế biến (Nicolè *et al*., 2012; Wong *et al*., 2011).

Mức độ khác biệt về hình thái của 3 loài phù hợp với mức độ khác biệt về khoảng cách di truyền dựa trên gene COI, theo đó, cá bông lau nằm giữa sự khác biệt giữa tra bần và cá dứa. Sự thống nhất giữa kết quả dựa trên hình thái và dựa trên trình tự gene COI thể hiện sự phản ánh chính xác về mối quan hệ giữa các loài (Stepien and Kocher, 1997). Đặc biệt, khi so sánh mối quan hệ giữa 3 loài với cá tra (giống *Pangasianodon,* họ Pangasiidae) và cá nheo Mỹ (họ Ictaluridae) cho thấy cây di truyền phù hợp với hệ thống phân loại giữa 5 loài này trong bộ Siluriformes. Một nghiên cứu khác sử dụng kết hợp 3 gene ti thể cytochrome b, 12S- rRNA, 16S-rRNA và 1 gene trong nhân RAG1 (recombination-activating gene 1) cũng cho kết quả tương tự về sự khác biệt rõ ràng giữa 2 giống *Pangasius* và *Pangasianodon* (11 loài Pangasiidae nhưng không có cá tra bần và cá dứa) cũng như giữa 2 họ Pangasiidae và Ictaluridae (Karinthanyakit and Jondeung, 2012). Những kết quả trên chứng tỏ việc sử dụng các gene DNA mã vạch là rất quan trọng trong việc kiểm tra, xác định lại hệ thống phân loại của nhiều bộ, họ cá chưa rõ ràng.

## KẾT LUẬN

Những đặc điểm hình thái quan trọng để phân biệt 3 loài cá bông lau, tra bần và cá dứa là hình dạng đầu, cơ thể, chiều dài cuống đuôi, đường kính mắt, hình dạng răng vòm miệng và bóng hơi. Trình tự gene COI của 3 loài cá khác biệt nhau từ 9,33 – 12,1%. Mối quan hệ loài dựa theo hình thái và gene COI đều cho kết quả cá bông lau gần với cá tra bần hơn cá dứa và giữa tra bần – cá dứa có sự khác biệt lớn nhất (tra bần – bông lau – cá dứa).

**Lời cảm ơn:** *Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Ks. Phạm Thị Trang Nhung đã hỗ trợ việc phân tích ở phòng thí nghiệm và cảm ơn Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài (Mã số T2015-96).*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bucklin A, Steinke D, Blanco-Bercial L (2011) DNA barcoding of marine metazoa. *Ann Rev Mar Sci* 3: 471–508.

Csavas I (1994) Status and perspectives of culturing catfishes in East and South-East Asia. *FAO Aquac Newsl* 8: 2–10.

Fishbase.org. Scientific Names where Genus Equals Pangasius. Truy cập tại http://fishbase.org ngày 16/07/2015.

Gustiano R, Pouyaud L (2007) Taxonomy and genetic relationships of Pangasiidae, Asian catfishes, based on morphological and molecular analyses. *Indones Aquac J* 2: 107–112.

Gustiano R, Teugels GG, Pouyaud L (2003) Revision of the Pangasius kunyit catfish complex, with description of two new species from South-East Asia (Siluriformes; Pangasiidae). *J Nat Hist* 37: 357–376.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270: 313–321.

Hubert N, Hanner R, Holm E *et al.* (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE* 3: e2490.

Ivanova N V., Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes* 7: 544–548.

Karinthanyakit W, Jondeung A (2012) Molecular phylogenetic relationships of pangasiid and schilbid catfishes in Thailand. *J Fish Biol* 80: 2549–2570.

Lakra WS, Verma MS, Goswami M *et al.* (2011) DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol Ecol Resour* 11: 60–71.

Lara A, Ponce de León JL, Rodríguez R *et al.* (2010) DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Mol Ecol Resour* 10: 421–430.

Mabragaña E, de Astarloa JMD, Hanner R, Zhang J, Castro M (2011) DNA barcoding identifies argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS ONE* 6: e28655.

Nguyễn Văn Thường, Tô Công Tâm, Nguyễn Văn Lành, Nguyễn Bạch Loan (2009) Khảo sát thành phần loài cá trơn họ Pangasiidae ở Đồng bằng sông Cửu Long. Đề tài cấp bộ-Mã số đề tài: B2006-16-14, 80 trang.

Nicolè S, Negrisolo E, Eccher G *et al.* (2012) DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technol Biotechnol* 50: 387–398.

Pouyaud L, Gustiano R, Teugels GG (2002) Systematic revision of Pangasius polyuranodon (Siluriformes; Pangasiidae) with description of two new species. *Inst Rech pour le Développement:* 243–252.

R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

Rainboth WJ (1996) *Fishes of the Cambodian Mekong*. FAO species identification field guide for fishery purposes.

Roberts TR, Vidthayanon C (1991) Systematic Revision of the Asian Catfish Family Pangasiidae, with Biological Observations and Descriptions of 3 New Species. *Proc Acad Nat Sci Philadelphia* 143: 97–144.

Sriphairoj K, Klinbu-nga S, Kamonrat W, Na-Nakorn U (2010) Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and closely related species using SSCP markers. *Aquaculture* 308 (SUPPL.1): S47-S50.

Steinke D, Zemlak TS, Boutillier JA, Hebert PDN (2009) DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar Biol* 156: 2641–2647.

Stepien C, Kocher T (1997) Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: *Molecular systematics of fishes.*(T. D. Kocher and C. A. Stepien, Eds.), pp. 1–11. Academic Press, San Diego.

Swofford, DL (2002) PAUP*- Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taggart JB, Hynes RA, Prodöuhl PA, Ferguson A (1992) A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J Fish Biol* 40: 963–965.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.

Tran DD, Shibukawa K, Nguyen TP *et al.* (2013) *Fishes of the Mekong Delta, Viet Nam*. Cantho University Publishing House.

Trương Thủ Khoa, Trần Thị Thu Hương (1993) *Định loại các loài cá nước ngọt vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long*. Trường Đại học Cần Thơ.

Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol Ecol Resour* 9: 1077–1085.

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol* 74: 329–356.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1847–1857.

Weigt LA, Driskell AC, Baldwin CC, Ormos A (2012) DNA barcoding fishes. *Methods in Mol Biol* 858: 109–126.

Weitschek E, Fiscon G, Felici G (2014) Supervised DNA barcodes species classification: analysis, comparisons and results. *BioData Min* 7: 4.

## DNA BARCODES AND MORPHOLOGY OF *P. KREMPFI, P. MEKONGENSIS,* AND *P. ELONGATUS*

**Duong Thuy Yen✉, Nguyen Kiet, Bui Son Nen, Nguyen Van Thuong, Nguyen Bach Loan, Tran Dac Dinh**

*Can Tho University*

SUMMARY

Three *Pangasius* species including *P. krempfi, P. elongatus* and *P. mekongensis*, are economically

✉*Author for correspondence:* E-mail: thuyyen@ctu.edu.vn

important. They can be mis-identified due to similar external appreance at small sizes. This study aimed to distinguish these species based on their differences in DNA barcode, COI (cytochrome c oxidase subunit I) gene, and morphological characteristics. Fish with various sizes (>90 samples/species) were sampled at the lower Mekong delta region. Kimura-2 parameter genetic distances based on COI sequences of three species (15 samples, in which, 4 unique sequences were assigned Genbank accession numbers from KT289877 to KT289880) are relatively high, ranging 9.33 – 12.10 %. Morphological measurements show that coutanble traits including numbers of fin rays and the first gill rakers vary in similar ranges but ratios of metric traits are significantly different among three species (P<0.01). Principle component analysis using metric traits sets three species apart. *P. elongatus* is characterized by elongated body, long caudal preduncle, large eyes, and retangle palatine tooth plates. *P. krempfi* differs from *P. mekongesis* in characteristics on their head. The number of sections, shape and length of barbel are different among three species. Phylogenetic relationship of three species based on morphology and COI sequences indicate that *P. krempfi* is closer to *P. mekongenis* rather than *P. elongatus*, and that the distance between *P. mekongenis* and *P. elongatus* is the largest.

***Keywords:*** *COI, DNA barcode, morphology, Pangasius, phylogeny*