



ĐỊNH DANH THÀNH PHẦN LOÀI CÁ TỖ BÀ BƯỚM (*Sewellia* spp.) PHÂN BỐ Ở THỪA THIÊN HUẾ DỰA TRÊN ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ DNA MÃ VẠCH

Võ Điều^{1*}, Trần Văn Việt², Phan Đỗ Dạ Thảo¹

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Cần Thơ, 3/2, Cần Thơ, Việt Nam

Tóm tắt: Giống cá Tỳ bà bướm (*Sewellia*) có kích thước nhỏ được khai thác từ tự nhiên phục vụ nhu cầu nuôi cảnh trong nước và quốc tế. Tuy nhiên, việc phân loại thành phần loài thuộc giống cá này dựa trên hình thái ngoài chưa có sự thống nhất giữa các khóa phân loại. Tổng số 32 mẫu thuộc giống *Sewellia* đã được thu tại tỉnh Thừa Thiên Huế từ tháng 2/2017 đến tháng 12/2017. Các chỉ tiêu hình thái ngoài của cá được đo đếm và mô tả để định danh đến loài. Đồng thời, việc định danh các mẫu cá cũng được hỗ trợ bởi phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rDNA và Cytochrome c oxidase I (COI). Phân tích chỉ tiêu hình thái và giải trình tự gen cho thấy hai loài cá thuộc giống *Sewellia* phân bố ở Thừa Thiên Huế là *Sewellia lineolata* (Valenciennes, 1846) và *Sewellia albisuera* Freyhof, 2003. Đây là lần đầu tiên loài *Sewellia albisuera* được ghi nhận phân bố tại tỉnh Thừa Thiên Huế.

Từ khóa: *Sewellia lineolata*, *Sewellia albisuera*, COI, 16S rDNA

1 Đặt vấn đề

Định danh chính xác các loài sinh vật nói chung và cá nói riêng có ý nghĩa quan trọng đối với các nghiên cứu trong lĩnh vực đa dạng sinh học, bảo tồn, khai thác và nuôi trồng thủy sản. Đây là khâu đầu tiên làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc điểm sinh học, nuôi trồng, khai thác, quản lý... Việc định danh loài sai có thể dẫn đến những sai lầm trong đánh giá trữ lượng, mức độ đe dọa... Các nhầm lẫn trong định danh loài cá thường xảy ra ở những loài có đặc điểm hình thái gần giống nhau, hệ thống phân loại còn chưa thống nhất, loài có nhiều tên đồng vật... Một trong những giống cá đang có nhiều điểm chưa thống nhất như thế là *Sewellia* (cá Tỳ bà bướm).

Tỳ bà bướm (*Sewellia*) là giống cá có kích thước nhỏ, không có giá trị về thương phẩm phân bố ở các khe suối đầu nguồn, nơi có dòng chảy mạnh, hàm lượng oxy hòa tan cao. Tuy không có giá trị về thực phẩm, nhưng một số loài của giống này đang có giá trị về nuôi cảnh. Trong đó, loài cá Tỳ bà bướm hổ và Tỳ bà bướm đốm đang được thu gom để xuất khẩu [3]. Qua so sánh định loại các loài thuộc giống này của các tác giả trong nước như Mai Đình Yên, Nguyễn Hữu Dục, Nguyễn Văn Hào [1] với các tài liệu phân loại hiện nay của Kottelat [9, 10]

* Liên hệ: dieuhueuni@gmail.com

và Freyhof [8] có nhiều điểm không tương đồng. Ví dụ, cùng có những đặc điểm hình thái tương đồng với loài *Sewellia lineolata*, nhưng loài phát hiện ở sông Trà Khúc, Quảng Ngãi có tên khoa học là *Sewellia trakhucensis*, trong khi đó loài phát hiện ở Thừa Thiên Huế có tên gọi là *Sewellia songboensis* [1].

Ở Thừa Thiên Huế, các nghiên cứu về đa dạng sinh học đã ghi nhận một số loài thuộc giống *Sewellia*, như *S. songboensis*, *S. brevis*, *S. analus* [1]; *S. brevis*, *S. elongata* và *S. lineolata* [4].

Trong quá trình khảo sát các loài cá khai thác từ tự nhiên tại Thừa Thiên Huế (2015–2016), chúng tôi đã thu được hai loài cá thuộc giống *Sewellia*. Theo mô tả hình thái của Vũ Cẩm Lương [3], hai loài này là Tỳ bà bướm hổ (*Sewellia lineolata*) và Tỳ bà bướm đốm (*Sewellia speciosa*). Tuy nhiên, khi so sánh hình thái phân loại của hai loài trên với các tài liệu phân loại hiện nay như Nguyễn Văn Hào [1] và Kottelat [9] thì có một số điểm không tương đồng, đặc biệt là loài Tỳ bà bướm đốm (*Sewellia speciosa*).

Nhằm khắc phục những khó khăn trong định danh loài bằng phương pháp so sánh hình thái, một phương pháp định danh mới đã và đang được áp dụng hiện nay là phân loại dựa vào trình tự một đoạn DNA đặc trưng cho loài [5, 7, 16]. Phương pháp này cho kết quả phân loại có tính chính xác cao và nhanh [13], trong đó một số gen đặc trưng thường dùng để định danh loài là 16S rDNA và COI.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích phân loại chính xác hai loài cá thuộc giống Tỳ bà bướm (*Sewellia*) phân bố ở Thừa Thiên Huế. Kết quả phân loại này là cơ sở ban đầu cho các nghiên cứu về sinh học, đồng thời góp phần hoàn thiện việc định loại các loài thuộc giống cá Tỳ bà bướm ở Thừa Thiên Huế nói riêng và cả nước nói chung.

2 Phương pháp

2.1 Thời gian, địa điểm và phương pháp thu mẫu

Thời gian thu mẫu: Từ tháng 2/2017 đến tháng 12/2017.

Địa điểm thu mẫu: Các khe suối thuộc địa bàn các huyện Nam Đông và Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Phương pháp thu mẫu: Mẫu cá được thu trực tiếp tại các khe suối thuộc địa bàn nghiên cứu. Mẫu được chuyển về phòng thí nghiệm theo phương pháp vận chuyển hồ bằng xe máy. Trong quá trình thu mẫu, các tác giả đã phát hiện các mẫu cá Tỳ bà bướm thu được có hai nhóm hình thái. Vì vậy, để thuận lợi cho định danh loài, mẫu được ký hiệu theo sự tương đồng về hình thái là TBH và TBD (Hình 1). Tổng số lượng mẫu phân tích hình thái là 32 (16 mẫu TBD và 16 mẫu TBH).

Sau khi phân tích hình thái, mỗi loài (theo chỉ tiêu hình thái) chọn 2 mẫu cá sống để tiến hành phân tích di truyền.



Hình 1. Đối tượng nghiên cứu

2.2 Xác định đặc điểm hình thái

Đặc điểm hình thái được thực hiện theo hướng dẫn của Kottelat (được trích dẫn bởi Freyhof [8] và Kottelat [9]). Có 3 nhóm chỉ tiêu chính gồm:

Chỉ tiêu đo: Thực hiện đo chiều dài, cao, rộng thân; chiều dài, rộng, cao các vi; đường kính mắt bằng thước kẹp palmer điện tử có độ chính xác 0,01 mm.

Chỉ tiêu đếm: Đếm số lượng tia vây các vi, vây đường bên của cá bằng mắt thường và kính lúp.

Chỉ tiêu màu sắc và hình dáng: Thực hiện bằng phương pháp cảm quan.

2.3 Phân tích di truyền

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của các mẫu được tách chiết theo mô tả của Kumar và cộng sự [11] có hiệu chỉnh. Cắt nhỏ 200 mg mẫu cơ cá cho vào ống Eppendorf (1,5 mL) chứa 940 μ L dung dịch phá vỡ tế bào (200 mM Tris-HCl (pH = 8), 100 mM EDTA, 150 mM NaCl), 30 μ L SDS (20%) và 30 μ L proteinase K (10 mg/mL).

Hỗn hợp được ủ lắc ở 55 °C trong 30 phút, sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 300 μ L 7,5 M amonium acetate; trộn mẫu (vortex) trong 15 giây và ủ trong đá lạnh 3 giờ. Hỗn hợp được ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C để thu dịch nổi.

Bổ sung hỗn hợp P.C.I (phenol: chloroform: isoamine alcohol tỉ lệ 25:24:1) vào dịch nổi thu được với tỉ lệ thể tích 1:1; đảo đều; ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C để thu dịch nổi (lặp lại hai lần). Bổ sung ethanol 100% với tỉ lệ thể tích 2:1 và ủ ở -20 °C trong 20 phút. Sau

đó tiến hành ly tâm 5 phút với 14.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4 °C. Loại bỏ dịch nổi, thu kết tủa.

Rửa kết tủa bằng 500 µL ethanol 70%; ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Loại bỏ dịch nổi; sấy kết tủa ở nhiệt độ phòng; sau đó hòa tan kết tủa với 50 µl nước cất vô trùng (DDW); ủ ở 37 °C cho đến khi kết tủa tan hết. Xử lý dịch vừa hòa tan với RNase (bổ sung 5 µL); ủ 37 °C trong 1 giờ.

Kiểm tra chất lượng DNA bằng cách chạy điện di trên gel agarose 0,8% với đệm TAE 1X (Tris-acetate 40 mM + EDTA 1 mM) ở 100 V khoảng 20 phút. Gel được nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide (EtBr) với nồng độ 0,5 µg/mL trong 15 phút. Gel được quan sát bằng hệ thống phân tích hình ảnh Gel Documentation [11].

Phương pháp PCR

Tiến hành định danh các mẫu cá TBH và TBD đã phân lập bằng cách khuếch đại trình tự 16S rDNA và trình tự gen COI với cặp mồi đặc hiệu lần lượt là:

16S-TBF: CGGCCGCGGTATTTTGACCG và 16S-TBR: TCGTTGAACAAACGAACCCTT;

COI-F: CGAATAAATAANATAAGCTTTTG và COI-R: GAAGTTTATATTCTTATTMTKCCCGG

(N = T: *S. albisuera* và N = C: *S. lineolata*; M = C: *S. albisuera* và M = T: *S. lineolata* và K = G: *S. albisuera* và K = A: *S. lineolata*).

Hai cặp mồi đặc hiệu được thiết kế bằng phần mềm Primer3Plus dựa trên mã số của hai loài cá này là AP011292 và AP011293 được công bố trên ngân hàng gen NCBI. Thành phần phản ứng: 50 ng DNA tổng số, 10 pmol mồi xuôi, 10 pmol mồi ngược, 5 µL đệm PCR (10X), 10 pmol dNTP, 5 U Enzyme *pfu* và bổ sung nước cất vô trùng cho đủ thể tích 50 µL. Khuếch đại PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt (MJ-Mini™ Persanol Thermal Cycle, Bio-Rad) theo chu trình như sau: 95 °C/5 phút; tiếp đến là 30 chu kỳ: 95 °C/45 giây, 51 °C/30 giây, và 72 °C/1 phút; cuối cùng là 72 °C/7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 2% với đệm được sử dụng là TAE 1X (Tris-acetate 40 mM + EDTA 1 mM) và nhuộm màu bằng chất nhuộm EtBr 0,5 µg/L. Gel được quan sát bằng hệ thống phân tích hình ảnh Gel Documentation [11].

Giải trình tự DNA

Sản phẩm PCR của các mẫu cá TBH và TBD được giải trình tự tại công ty Macrogen, Hàn Quốc với cặp mồi 16S-TBF/16S-TBR và COI-F/COI-R theo phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm Bioedit. Trình tự nucleotide hoàn chỉnh được đối chiếu (BLAST) trên ngân hàng gen (NCBI) để đánh giá mức độ tương đồng của vùng gen 16S rDNA và vùng gen COI, từ đó tìm ra loài tương đồng nhất với trình tự cần nghiên cứu bằng phần mềm Megar 7.0.

Xây dựng cây phả hệ

Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega 7.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đặc điểm hình thái phân loại

Chỉ tiêu đo

Trong quá trình nghiên cứu, do chưa định danh chính xác hai loài cá thuộc giống Tỳ bà bướm (*Sewellia*) nên chúng được ký hiệu là TBD và TBH. Chỉ tiêu hình thái của hai loài này được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các chỉ tiêu đo hai loài cá Tỳ bà bướm ở Thừa Thiên Huế ($n = 16$)

Chỉ tiêu (mm)	TBD				TBH			
	S1	TB	Max	Min	S2	TB	Max	Min
Chiều dài chuẩn (SL)	43,5	47,2 ± 8,1	64,6	38,1	46,5	42,8 ± 4,2	48,7	31,5
<i>Tỷ lệ (%) với chiều dài chuẩn (SL)</i>								
Chiều dài đầu	26,5	26,2 ± 3,2	31,9	22,2	30,3	28,0 ± 1,2	29,9	25,7
Chiều dài đầu đến gốc vây ngực	24,8	24,2 ± 1,2	26,1	22,3	25,1	23,9 ± 1,1	25,5	22,2
Chiều dài trước vi lưng	49,0	49,3 ± 2,4	52,3	46,2	51,5	47,8 ± 2,1	50,3	44,7
Chiều dài trước vây ngực	16,6	17,0 ± 2,0	19,6	14,6	–	–	–	–
Chiều dài trước vây bụng	44,4	42,6 ± 6,1	47,4	22,2	49,2	48,7 ± 1,8	51,4	46,1
Chiều dài trước vây hậu môn	75,4	81,3 ± 6,9	85,6	56,3	86,0	78,0 ± 1,8	80,9	74,9
Chiều dài trước hậu môn	83,5	74,9 ± 3,1	81,3	71,0	75,6	70,6 ± 0,5	71,6	69,7
Chiều cao thân ngang vây lưng	16,1	15,8 ± 1,9	18,7	13,4	16,9	12,6 ± 0,9	14,2	11,3
Chiều cao cuốn đuôi	11,1	11,2 ± 0,8	12,4	10,2	11,0	10,7 ± 1,0	11,9	8,5
Chiều dài cuốn đuôi	9,8	10,0 ± 1,5	12,7	7,9	10,9	10,8 ± 1,3	12,6	8,8
Chiều rộng thân ở gốc vây lưng	25,9	26,3 ± 2,4	30,2	23,2	28,6	28,7 ± 0,8	30,8	27,7
Chiều rộng thân ở gốc vây hậu môn	7,9	9,0 ± 1,7	11,0	4,6	6,9	6,5 ± 0,2	7,0	6,1
Chiều cao vây lưng	20,0	20,2 ± 2,7	23,7	16,1	18,8	18,4 ± 1,2	20,3	16,8
Chiều cao vây đuôi	26,2	26,4 ± 2,9	30,2	22,8	–	15,0 ± 0,4	15,6	14,2
Chiều dài vây hậu môn	17,0	17,0 ± 0,9	18,4	14,9	16,4	15,8 ± 1,4	18,0	14,0

Chỉ tiêu (mm)	TBD				TBH			
	S1	TB	Max	Min	S2	TB	Max	Min
Chiều dài vây ngực	40,1	41,2 ± 1,6	44,1	39,5	45,5	41,7 ± 1,7	43,5	38,9
Chiều dài vây bụng	44,6	43,9 ± 1,7	46,6	41,2	39,4	36,8 ± 1,9	38,9	34,0
	<i>Tỷ lệ (%) với chiều dài đầu (HL)</i>				<i>Tỷ lệ (%) với chiều dài chuẩn (SL)</i>			
Chiều cao thân ở điểm mắt	42,9	42,0 ± 3,1	48,8	38,2	11,2	8,8 ± 0,9	10,2	7,6
Chiều rộng giữa hai mắt	40,7	40,2 ± 3,0	45,4	36,3	10,8	9,2 ± 0,6	10,2	8,4
Đường kính mắt	18,4	18,6 ± 2,2	23,1	15,2	6,1	6,4 ± 0,5	7,0	5,6
Độ rộng miệng	16,5	15,3 ± 2,2	18,7	10,7	5,8	5,1 ± 0,7	6,0	4,1
Chiều cao thân qua trán	52,0	51,2 ± 3,9	58,7	46,5	14,2	13,9 ± 0,3	14,3	13,5
Chiều dài trước mũi	52,1	51,6 ± 2,8	56,6	46,6	14,1	18,1 ± 6,2	28,7	14,3
Chiều rộng tối đa của đầu	104,9	100,9 ± 9,4	114,7	86,8	31,5	30,6 ± 1,4	32,3	28,4
Chiều rộng khi mở của mang	9,2	8,5 ± 1,5	11,2	6,5	–	2,0 ± 0,1	2,2	1,9

Ghi chú: S1 là chỉ tiêu hình thái loài *Sewellia albisuera* theo Freyhof [4]; S2 là chỉ tiêu hình thái loài *Sewellia lineolata* theo Kottelat [6].

So sánh kết quả phân tích các chỉ tiêu đo về hình thái của hai loài cá nghiên cứu với chỉ tiêu hình thái phân loại của Freyhof [8], Kottelat [9, 10] cho thấy các chỉ tiêu của mẫu TBH tương đồng với loài *Sewellia lineolata* (Tỳ bà bướm hổ) và mẫu TBD tương đồng với loài *Sewellia albisuera* (Tỳ bà bướm đốm).

Các chỉ tiêu đếm

Các chỉ tiêu đếm của hai loài cá thuộc giống *Sewellia* được xác định bao gồm vi lưng, ngực, bụng, hậu môn, đuôi và đường bên (Bảng 2).

Bảng 2. Một số chỉ tiêu đếm ($n = 16$)

Chỉ tiêu	TBD	TBH	Tỳ bà bướm đốm (<i>Sewellia albisuera</i>)		Tỳ bà bướm hổ (<i>Sewellia lineolata</i>)	
			Nguyễn Văn Hào, 2005	Freyhof, 2003	Nguyễn Văn Hào, 2005	Kottelat, 1994
Vi lưng (D)	III.8	IV.6	III.9	III.8	II.7	IV.8
Vi hậu môn (A)	II.4	II.4	I.5	II.4	I.3	II.4
Vi bụng (V)	I.19-20	I.17-18	1, 19	I.20-21	I.17-18	I.17-18
Vi ngực (P)	I.21	I.21-22	1, 23	I.20-21	I.20-21	I.21-22
Vi đuôi (C)	16+2	7+7	16+2	7+7	12+2	7+7
Vây đường bên		45-46	53	49-54+2	65-73	45-46
Vây trên/dưới đường bên		05/1/05	8/1/5	05/1/05	13-14/1/6-7	05/1/05

Về chỉ tiêu đếm, loài TBH cũng khá tương đồng với loài *Sewellia lineolata* [9] và loài TBD khá tương đồng với loài *Sewellia albisuera* [8].

Hình dáng, màu sắc

Nhóm chỉ tiêu thứ ba phục vụ định danh hai loài cá nghiên cứu thuộc giống *Sewellia* ở Thừa Thiên Huế là hình dáng và màu sắc (Bảng 3).

Bảng 3. Một số chỉ tiêu hình dáng, màu sắc hai loài cá Tỳ bà bướm nghiên cứu ($n = 16$)

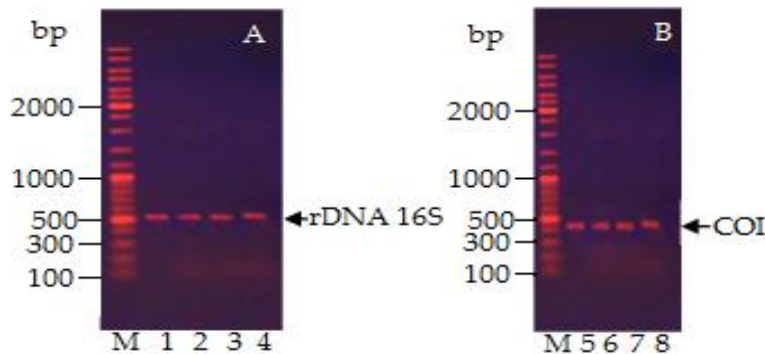
Chi tiêu	TBD	TBH
Hình dạng thân	Đẹp lưng bụng. Thân được phủ bởi các vảy có kích thước nhỏ, vảy mềm, da mỏng.	Đẹp lưng bụng. Thân được phủ bởi các vảy có kích thước nhỏ, vảy hơi cứng, da khá dày.
Miệng	Miệng dưới, nhỏ, hình vòng cung, hàm trên tạo thành phiến. Có nhiều nốt sần và mấu lồi quanh miệng.	Miệng dưới, nhỏ, hình vòng cung, hàm trên tạo thành phiến. Có nhiều nốt sần và mấu lồi quanh miệng.
Mũi	Hai lỗ mũi nằm ở mặt trên của đầu, trước mắt.	Hai lỗ mũi nằm ở mặt trên của đầu, trước mắt.
Mang	Mang có kích thước nhỏ nằm ở mặt trên của hai bên đầu, sau mắt.	Mang có kích thước nhỏ nằm ở mặt trên của hai bên đầu, sau mắt.
Màu sắc	Lưng cá có màu nâu đen điểm các đốm nhỏ màu trắng hoặc vàng nâu, bụng cá màu trắng. Ở gốc vây lưng có một chấm màu vàng. Trên các vây có các vạch màu đen.	Lưng có màu vàng có các đốm và các vạch đen rõ nét. Hai bên thân có 3 đường sọc đen chạy dọc theo cơ thể, Dưới bụng có màu trắng. Trên các vây có các vạch màu đen.

Về hình dáng thân, miệng, mũi, mắt, mang và màu sắc, loài TBH tương đồng với loài *Sewellia lineolata* (Valenciennes) [9] và loài TBD tương đồng với loài *Sewellia albisuera* Freyhof [8].

3.2 Định danh loài bằng DNA mã vạch

Kết quả khuếch đại PCR

Một khoảng 506 nucleotide từ gen mã hóa cho rRNA 16S và một khoảng 464 nucleotide của tiểu đơn vị Cytochrome c oxidase I đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR với hai cặp mồi đặc hiệu cho giống cá này và được xác định trình tự. Đã thu được một băng duy nhất, đặc hiệu, rõ nét ứng với các đoạn gen có kích thước tương ứng như tính toán lý thuyết ban đầu 506 bp (đoạn gen 16S) và 464 bp (COI) (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh điện di DNA tổng số tách chiết từ các mẫu nghiên cứu (kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 2%)

Giếng M: Thang chuẩn DNA 100–10.000 bp; Giếng 1, 2, 3 và 4 lần lượt là sản phẩm PCR ở đoạn gen rDNA 16S từ DNA tổng số tách chiết của mẫu cá nghiên cứu ký hiệu TBD-1, TBD-2, TBH-1 và TBH-2; Giếng 5, 6, 7 và 8 lần lượt là sản phẩm PCR ở đoạn gen COI từ DNA tách chiết của mẫu cá nghiên cứu ký hiệu TBD-1, TBD-2, TBH-1 và TBH-2.

3.2 Giải trình tự và định danh loài

Kết quả giải trình tự các mẫu TBH và TBD cho thấy đoạn gen 16S rDNA có 506 nucleotide. So sánh trình tự nucleotide của 16S rDNA phân lập được từ các mẫu TBH và TBD với các đoạn trình tự nucleotide trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy có số nucleotide tương đồng cao, nhưng chưa có sự khác biệt rõ ràng giữa các loài. Mức độ tương đồng giữa các mẫu cá nghiên cứu (TBD-1, TBD-2 và TBH-1, TBH-2) đều đạt 99,01%. Điều này cho thấy chưa thể định danh hai loài cá này bằng đoạn gen 16S rDNA (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 16S rDNA của các mẫu cá Tỳ bà bướm nghiên cứu và dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

Tỷ lệ sai khác trình tự Nucleotide giữa các cá thể (%)	Tỷ lệ tương đồng về trình tự nucleotide giữa các cá thể (%)						Mã số truy cập
	1	2	3	4	5	6	
**	95,80	99,41	99,41	98,42	98,42	1	<i>Sewellia albisuera</i> -AP011293.1
4,20	**	99,01	99,01	100	100	2	<i>Sewellia lineolata</i> -AP011292.1
0,59	0,99	**	100	99,01	99,01	3	TBD-1
0,59	0,99	0	**	99,01	99,01	4	TBD-2
1,58	0	0,99	0,99	**	100	5	TBH-1
1,58	0	0,99	0,99	0	**	6	TBH-2

Để định danh chính xác hai loài cá nêu trên, chúng tôi đã tiến hành phân tích đoạn gen COI. Hiện nay, đoạn gen COI được coi là đoạn gen chuẩn (mã vạch DNA) để nhận dạng loài và được tổ chức barcode quốc tế công nhận [15]. Nhiều nghiên cứu đã xác định rằng gen ty thể cytochrome c oxidase subunit I (COI) có thể đóng vai trò cốt lõi như một hệ thống xác định sinh học phân loại động vật [2]. Kết quả giải trình tự các mẫu TBH và TBD cho thấy đoạn gen COI có 464 nucleotide. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen COI của các mẫu nghiên cứu với các loài thuộc giống cá Tỳ bà bướm (*Sewellia*) công bố trên NCBI cho thấy tỷ lệ tương đồng trên 95% ở tất cả các loài. Đặc biệt, loài TBD tương đồng 100% với loài *Sewellia albisuera* và loài TBH tương đồng 100% với loài *Sewellia lineolata*. Đồng thời kết quả cũng cho thấy mức độ tương đồng giữa hai mẫu TBD và TBH chỉ đạt 95,26% (Bảng 5 và Hình 2)

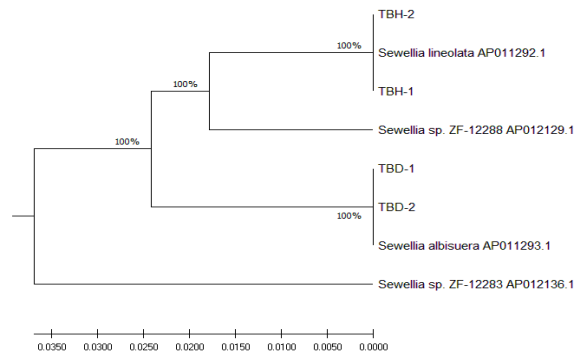
Bảng 5. So sánh trình tự nucleotide đoạn gen COI của các mẫu cá Tỳ bà bướm nghiên cứu và dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI

Tỷ lệ tương đồng về trình tự Nucleotide giữa các cá thể (%)								
Tỷ lệ sai khác trình tự Nucleotide giữa các cá thể (%)	1	2	3	4	5	6	Mã số truy cập	
	**	95,26	100	100	95,26	95,26	1	<i>Sewellia albisuera</i> -AP011293.1
	4,74	**	95,26	95,26	100	100	2	<i>Sewellia lineolata</i> -AP011292.1
	0	4,74	**	100	95,26	95,26	3	TBD-1
	0	4,74	0	**	95,26	95,26	4	TBD-2
	4,74	0	4,74	4,74	**	100	5	TBH-1
	4,74	0	4,74	4,74	0	**	6	TBH-2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
738 bits(818)	0.0	442/464(95%)	0/464(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGAATAAATAATATAAGCTTTTGA	CTCCTCCCTCCTCCTTACTATTAGCCTCA		60
Sbjct 1	CGAATAAATAACATAAGCTTTTGA	CTCCTACCCCATCCTCCTTACTATTAGCCTCA		60
Query 61	TCTGGOGITGAGGCCGAGCCGGACAGS	ATGACTGTTTATCCCCCACTAGCAGGAAAT		120
Sbjct 61	TCTGGOGITGAGGCCGAGCCGGACAGS	ATGACTGTTTATCCCCCTTAGCAGGAAAT		120
Query 121	CTACCCACAGCAGGAGCATCCGTAGAT	TTAACCACTTTTCCTTACACTAGCAGGAGTA		180
Sbjct 121	CTACCCACAGCAGGAGCATCCGTAGAT	TTAACCACTTTTCCTTACACTAGCAGGAGTA		180
Query 181	TGCTCTATCTTAGGGCAATTAATTTT	ATACACCAACAATTAATAAGAACCCCCAGCC		240
Sbjct 181	TCATCTATTTTAGGGCAATTAATTTT	ATACACCAACAATTAATAAGAACCCCCAGCC		240
Query 241	ATCTCAGTATCAACACCCTTATTTG	TATGAGCGGCTTGGTTACTGCTGTTCTTCTT		300
Sbjct 241	ATCTCAGTATCAACACCCTTATTTG	TATGAGCGGCTTGGTTACTGCTGTTCTTCTT		300
Query 301	CTCCTGCCCCACAGTATTAGCAGCCG	GCATTACAATGTTATTACAGACCCGAAOCTA		360
Sbjct 301	CTCCTGCCCCACAGTATTAGCAGCCG	GCATTACAATGCTTTACAGACCCGAAOCTA		360
Query 361	AACACACATCTCTCGACCCCGGGCC	GGGAGACCAATTTTATATCACATCTGTTC		420
Sbjct 361	AACACACATCTCTCGACCCCGGGCC	GGGAGACCAATTTTATATCACATCTGTTC		420
Query 421	TGATTTTCGGCACCCCGAGTTTATAT	TCTTATTTACCCGG 464		
Sbjct 421	TGATTTTCGGCACCCCGAGTTTATAT	TCTTATTTACCCGG 464		

Hình 3. So sánh trình tự nucleotide đoạn gen COI của TBD1 và TBH1

Sự tương quan về di truyền giữa các mẫu nghiên cứu (TBH-1, TBH-2, TBD-1, TBD-2) với các loài thuộc giống cá *Sewellia* được công bố trên ngân hàng gen cũng cho thấy chúng có quan hệ di truyền gần gũi với nhau, cụ thể là *Sewellia albisuera* (TBD-1 và TBD-2) và *Sewellia lineolata* (TBH-1 và TBH-2) (Hình 3).



Hình 4. Cây di truyền đối với đoạn gen COI

Kết quả phân tích chỉ tiêu hình thái ở Mục 3.1 và kết quả giải trình tự gen định danh loài ở Mục 3.2 cho thấy loài TBH phân bố ở Thừa Thiên Huế có tên khoa học là *Sewellia lineolata* (Valenciennes, 1846); và loài TBD là *Sewellia albisuera* Freyhof, 2003.

Theo tài liệu phân loại mới nhất về họ cá bóm đá nói chung và giống Tỳ bà bướm nói riêng của Kottelat, loài *Sewellia lineolata* có các tên đồng vật là *Sewellia songboensis* Nguyen và Nguyen; loài *Sewellia albisuera* có tên đồng vật là *Parasewellia tetralobata* Nguyen và Nguyen [10].

Như vậy, có thể kết luận loài cá Tỳ bà bướm hồ (*Sewellia lineolata*) phân bố ở Thừa Thiên Huế đã được Nguyễn Văn Hào và Nguyễn Hữu Dực phát hiện với tên gọi là *Sewellia songboensis* [1]. Loài cá Tỳ bà bướm đốm (*Sewellia albisuera*) phân bố ở Thừa Thiên Huế cũng đã được Nguyễn Văn Hào và Nguyễn Hữu Dực phát hiện ở Quảng Nam với tên gọi là *Parasewellia tetralobata* [1]. Mặt khác, kết quả xác định loài TBD là Tỳ bà bướm đốm có tên khoa học *Sewellia albisuera* cho thấy đây là lần đầu tiên loài cá này được phát hiện tại Thừa Thiên Huế.

Cũng từ kết quả trên có thể khẳng định hai loài cá Tỳ bà bướm đang được thu gom xuất khẩu làm cảnh phổ biến của Việt Nam hiện nay theo Vũ Cẩm Lương là *Sewellia lineolata* (Tỳ bà bướm hồ) và *Sewellia albisuera* (Tỳ bà bướm đốm) [3].

4 Kết luận

Hai loài cá Tỳ bà bướm (giống *Sewellia*) phân bố ở Thừa Thiên Huế là Tỳ bà bướm hồ có tên khoa học là *Sewellia lineolata* (Valenciennes, 1846) và Tỳ bà bướm đốm có tên khoa học là *Sewellia albisuera* Freyhof, 2003.

Lần đầu tiên loài *Sewellia albisuera* (Tỳ bà bướm đốm) được phát hiện ở Thừa Thiên Huế.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Văn Hào (2005), *Cá nước ngọt Việt Nam, tập II*, Nxb. Nông nghiệp Hà Nội, Hà Nội.
2. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003), Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the royal society B: Biological sciences*, 270, 313–321.
3. Vũ Cẩm Lương (2008), *Cá cảnh nước ngọt*, Nxb. Nông Nghiệp, TP. Hồ Chí Minh.
4. Võ Văn Phú và Nguyễn Duy Thuận (2009), Cấu trúc thành phần loài cá ở hệ thống sông Ô Lâu, tỉnh Thừa Thiên Huế, *Tạp chí khoa học Đại học Huế*, 55, 61–71.
5. 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 Trường Đại học Cần Thơ*, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ sinh học, 40(2), 23–30.
6. Bingpeng X., L. Heshan, Z. Zhilan, W. Chunguang, W. Yanguo, and W. Jianjun (2018), DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait, *PLOS ONE*, 13(6), 1–13.
7. Boidya P., W. Haque and Md. Mizanur Rahman (2015), *Molecular identification and phylogenetic assessment of some marine catfishes of the bay of Bengal*, *International Journal of Pure and Applied Zoology*, 3(4), 279–286.
8. Freyhof J. (2003), *Sewellia albisuera* a new balitorid loach from Central Vietnam (Cypriniformes: Balitoridae), *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14(3), 225–230.
9. Kottelat M. (1994), Rediscovery of *Sewellia lineolata* in Annam, Viet Nam (Teleostei: Balitoridae), *Zoologische Mededelingen*, 68(11), 109–112.
10. Kottelat M. (2012), *Conspectus cobitidum: an inventory of the loaches of the world* (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei), *The Raffles Bulletin of Zoology, Suppl*, 26, 1–199.
11. Kumar R., P. J. Singh, N. S. Nagpure, B. Kushwaha, S. K. Srivastava and W. S. Lakra (2007), A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales, *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 992–997.
12. Lakra W. S., M. Singh, M. Goswami, A. Gopalakrishnan, K. K. Lal, V. Mohindra, U. K. Sarkar, P. P. Punia, K. V. Singh, J. P. Bhatt and S. Ayyappan (2015), DNA barcoding Indian freshwater fishes, *Mitochondrial DNA*, 27(6), 1–8.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
14. Steinke, D., Zemplak, T.S., Boutillier, J. A., and Hebert, P.D.N. (2009), DNA barcoding of Pacific Canada's fishes, *Marine Biology*, 156, 2641–2647.

15. Dương Văn Tăng, Vũ Đình Duy, Trần Thị Việt Thanh (2014), Đánh giá khả năng sử dụng mã vạch COI trong việc định loại động vật tại bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(4), 631–638.
16. Zhang J. and Hanner R. (2012), Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea, *PLoS ONE*, 7(2), 1–9.

EMPLOYING MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND DNA BARCODING FOR SPECIES IDENTIFICATION OF HILLSTREAM LOACH (*Sewellia* spp.) DISTRIBUTED IN THUA THIEN HUE

Vo Dieu^{1*}, Tran Van Viet², Phan Do Da Thao¹

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

² Can Tho University, 3/2 St., Can Tho, Vietnam

Abstract: Hillstream Loach (*Sewellia* spp.) is a small fish caught from the wild to meet the demand of domestic and international aquarium trade. However, the species identification of the *Sewellia* genus on the basis of morphological characteristics is inconsistent between identification keys. A total of 32 specimens of *Sewellia* genus were sampled in Thua Thien Hue province from February to December 2017. The morphological characteristics of specimens were recorded for species identification. Additionally, species identification of these specimens was performed using nucleotide sequences analysis of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) and 16S rDNA. The specimens were morphologically and genetically identified as *Sewellia lineolata* (Valenciennes, 1846) and *Sewellia albisuera* Freyhof, 2003. This is the first record of the distribution of *Sewellia albisuera* species in Thua Thien Hue province.

Keywords: *Sewellia lineolata*, *Sewellia albisuera*, COI, 16S rDNA