



SO SÁNH TRÌNH TỰ MỘT SỐ GENE MÃ VẠCH CỦA CÁ RÔ ĐẦU VUÔNG VÀ CÁ RÔ ĐỒNG TỰ NHIÊN (*ANABAS TESTUDINEUS* BLOCH, 1792)

Dương Thúy Yên¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 23/12/2013

Ngày chấp nhận: 26/02/2014

Title:

Sequence comparison of DNA barcoding genes between new phenotype and wild strains of climbing perch (*Anabas testudineus* BLOCH, 1792)

Từ khóa:

Cá rô đồng, *Anabas testudineus*, DNA mã vạch, phân loại loài, COI, Rhodopsin, Cytochrome b

Keywords:

Climbing perch, *Anabas testudienus*, DNA barcoding, species taxonomy, COI, Rhodopsin, Cytochrome b

ABSTRACT

A previous study of the same author on morphological characteristics of climbing perch (*Anabas testudineus*) strains suggested that morphological differences between square-head climbing perch (SHCP) and wild strains could be within-species diversity. This study aimed to test this hypothesis based on sequence comparison of three DNA barcoding genes in mitochondrial (Cytochrom C oxidase subunit 1, COI, and Cytochrome b, Cyt b) and nuclear DNA (Rhodopsin, Rho) between SHCP and wild climbing perch strains sampled in different provinces in the Mekong delta. Three haplotypes of COI (15 samples), three of Cyt b (21 samples), and only one haplotype of Rho (7 samples) were found. Sequence alignment showed very high degree of identity (99 – 100%) in three genes of SHCP and wild strains. COI and Cyt b sequences of climbing perch samples in the study were >99% identical to those of *Anabas testudineus* available in Genbank and BOLD system (www.boldsystem.org). These results proved that square head and normal climbing perch phenotypes are the same species.

TÓM TẮT

Một nghiên cứu trước đây của tác giả về hình thái của các dòng cá rô đồng (*Anabas testudineus*) cho thấy sự khác biệt về hình thái giữa cá rô đầu vuông và cá rô tự nhiên có thể là sự đa dạng trong cùng một loài. Nghiên cứu này nhằm kiểm tra giả thiết trên dựa vào sự so sánh trình tự 3 gene mã vạch trong ti thể (Gene Cytochrom C oxidase subunit 1, COI, và Cytochrome b, Cyt b) và trong nhân (Gene Rhodopsin, Rho) giữa cá rô đầu vuông và cá rô tự nhiên thu ở các tỉnh khác nhau. Kết quả tìm thấy 3 dạng trình tự của gene COI (trong 15 mẫu), 3 dạng của gene Cyt b (21 mẫu) và 1 dạng gene Rho (7 mẫu) trong các mẫu nghiên cứu. So sánh trình tự các gene cho thấy mức độ tương đồng của các mẫu cá rô đạt rất cao, 99 -100%. Trình tự gene COI và Cyt b của cá rô trong nghiên cứu này tương đồng trên 99% với cá rô *Anabas testudineus* có sẵn ở cơ sở dữ liệu của Genbank và hệ thống BOLD (www.boldsystem.org). Kết quả này chứng tỏ cá rô đầu vuông cùng loài với cá rô đồng thường.

1 GIỚI THIỆU

Cá rô “đầu vuông” là tên gọi của một kiểu hình cá rô được phát hiện ở Hậu Giang vào năm 2009. So với cá rô đồng thường, cá rô đầu vuông có

những đặc điểm khác biệt: kích thước tối đa lớn hơn, tốc độ tăng trưởng nhanh hơn và hình dạng đầu hơi vuông. Vì vậy, câu hỏi về hệ thống phân loại của cá rô đầu vuông đã được đặt ra.

Nghiên cứu về hình thái cho thấy cá rô đầu vuông giống với cá rô tự nhiên về khoảng biến động của các chỉ tiêu đếm như số lượng đốt sống, số lượng các gai và tia mềm của các vi, số lượng vây bên trên và bên dưới đường bên, vây quanh cuống đuôi,... Tuy nhiên, chúng rất khác nhau ($p < 0,01$) về tỉ lệ các số đo, đặc biệt là các số đo về hình dạng đầu, độ rộng miệng và tỉ lệ chiều dài ruột/chiều dài chuẩn (Dương Thúy Yên và Trương Ngọc Trinh, 2013). Từ kết quả trên, nhóm tác giả đề xuất giả thiết rằng sự khác biệt về hình thái giữa cá rô ĐV và cá rô tự nhiên có thể là sự đa dạng trong cùng một loài. Giả thiết này cần được kiểm chứng.

Khi những kết quả định danh, phân loại loài dựa trên hình thái chưa đủ thuyết phục, phân tích trình tự gene được xem là một công cụ hỗ trợ hữu hiệu và chính xác (Palumbi and Cipriano, 1998; Janzen *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2009). Một số gene nằm trên DNA ti thể (mtDNA) được xem như những DNA mã vạch trong phân loại động vật như gene Cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) (Hebert *et al.*, 2003; Ward, 2009; Puckridge *et al.*, 2013), Cytochrome b (Sevilla *et al.*, 2007), 16s rRNA (Vences *et al.*, 2005),... Trong đó, gene COI được sử dụng phổ biến nhất cho nhiều ngành động vật. Đối với cá, đến năm 2009 có trên 5.000 loài đã được giải trình tự gene COI (Ward *et al.*, 2009) và hiện nay (truy cập tại Fish Barcode of Life (<http://www.fishbol.org>) ngày 19/12/2013) là trên 10.000 loài. Bên cạnh những ích lợi của chỉ thị mtDNA nói chung và gene COI nói riêng, một số tác giả cho rằng phân loại loài chỉ dựa trên trình tự 1 gene có thể có sai sót (Moritz and Cicero, 2004; Krück *et al.*, 2013). Sự kết hợp cùng một lúc các gene càng làm tăng độ tin cậy của kết quả định danh (Dasmahapatra and Mallet, 2006; Krück *et al.*, 2013). Dasmahapatra and Mallet (2006) khuyến cáo nên kết hợp gene mã vạch trong ti thể và trong nhân. Gene Rhodopsin (Rho) trong nhân cũng được xem là DNA mã vạch (Sevilla *et al.*, 2007).

Nghiên cứu này nhằm góp phần xác định hệ thống phân loại của cá rô đầu vuông dựa trên việc so sánh trình tự gene COI và Cytochrome b trên DNA ti thể và gene Rhodopsin (Rho) trong nhân giữa cá rô đầu vuông và cá rô tự nhiên ở các vùng sinh thái khác nhau.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu mẫu

Mẫu cá rô đầu vuông được thu ở xã Vĩnh

Thuận Tây, huyện Vị Thủy, tỉnh Hậu Giang, nơi phát hiện cá rô đầu vuông. Mẫu cá rô tự nhiên được thu ở 3 nơi, gồm Rừng U Minh Hạ - Cà Mau, vườn quốc gia Tràm Chim, Tam Nông - Đồng Tháp và Châu Thành A - Hậu Giang. Một phần vi đuôi (~ 0,1-0,3g) được thu từ mỗi cá thể và bảo quản trong ethanol 95%, để ở nhiệt độ phòng đến khi phân tích. Số mẫu thu của mỗi dòng cá là 40 mẫu.

2.2 Phương pháp ly trích DNA

DNA trong vi đuôi cá được ly trích bằng phương pháp Phenol-Chloroform (Taggart *et al.*, 1992) có hiệu chỉnh. Vi đuôi cá được cắt nhỏ và nghiền nát bằng cối, chày nhỏ trong 600 μ L dung dịch ly trích (100 mM NaCl; 50 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-HCL) và 200 μ L dung dịch CTAB (21,6 g Tris-HCl, 11 g acid Boric, 8 ml EDTA 0,5M). Cho mẫu đã nghiền vào ống eppendorf 1,5 mL cùng với 50 μ L proteinase K (20 mg/mL). Trộn đều mẫu (máy Vortex Mixer SA8) và ủ mẫu trong 12 giờ ở 65°C bằng máy ủ nước (WiseBath WSB-30). Tách protein trong mẫu bằng 600 μ L dung dịch Chloroform: isoamyl alcohol (24:1), ly tâm 13000 vòng/phút ở 25°C trong 10 phút. Dung dịch phía trên trong ống eppendorf được chuyển qua một ống mới và thêm vào 600 μ L dung dịch Phenol: Chloroform: Isoamyl (25:24:1). Ly tâm và lặp lại bước rửa với Chloroform: isoamyl alcohol như trên. Kết tủa DNA bằng 400 μ L ethanol 100% lạnh và ly tâm 13000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút. DNA được rửa bằng 600 μ L ethanol 70% (2 lần) và để khô ở điều kiện phòng ít nhất 2 giờ. Hòa tan DNA bằng 100 μ L dung dịch TE và bảo quản DNA ở âm 20°C.

2.3 Phương pháp khuếch đại chuỗi DNA (Polymerase chain reaction, PCR) và giải trình tự

Để phân biệt sự khác biệt di truyền ở mức độ loài giữa cá rô đầu vuông với cá rô tự nhiên, gene mtDNA được chọn trước tiên là gene cytochrome C oxydase subunit 1 (COI) và được khuếch đại bằng cặp mồi Fish F2-t1/ Fish R2-t1 (Ward *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2007) (Bảng 1). Sau đó, sự khác biệt di truyền giữa các dòng cá được tiếp tục xem xét dựa vào gene cytochrome b (Cyt b) trong ti thể, sử dụng cặp mồi L14841 và H15149 (Kocher *et al.*, 1989) và trên gene Rhodopsin trong nhân với cặp mồi Rod-F2w và Rod-R4n (Sevilla *et al.*, 2007).

Bảng 1: Trình tự đoạn mỗi khuếch đại một số gene trên ti thể và trong nhân

Gene	Tên cặp môi	Trình tự 5' – 3'	Nguồn tham khảo
COI	Fish F2-t1	TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGAT	Ward <i>et al.</i> 2005; Ivanova <i>et al.</i> 2007
	Fish R2-t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAG AATCAGAA	
Cyt b	L14841	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATCAAA	Kocher <i>et al.</i> 1989
	H15149	AAACTGCACCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	
Rho	Rod-F2w	AGCAACTTCCGCTTCGGTGAGAA	Sevilla <i>et al.</i> 2007
	Rod-R4n	GGAAGCTGCTTGTTTCATGCAGATGTAGAT	

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Swift™ Maxpro với thể tích PCR là 30 µL. Thành phần và chu kỳ phản ứng PCR được trình bày ở Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2: Thành phần* và nồng độ cuối cùng các chất trong phản ứng PCR (30 µL) khuếch đại các gene

Thành phần PCR	COI	Cyt b	Rho
1. Dung dịch đệm	1X	1X	1X
2. MgCl ₂	2,5 mM	1,5 mM	2,5 mM
3. dNTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
4. Đoạn môi F (hoặc L với Cyt b)	2,5 pmoles	7,5 pmoles	5 pmoles
5. Đoạn môi R (hoặc H với Cyt b)	2,5 pmoles	7,5 pmoles	5 pmoles
6. Taq polymerase	1,25 U	1,25 U	1,25 U
7. DNA khuôn mẫu	100 ng	100 ng	100 ng

Ghi chú: *Thành phần hóa chất trong phản ứng PCR thuộc hiệu Fermentas; Đoạn môi được cung cấp bởi hãng SIGMA

Bảng 3: Chu kỳ phản ứng PCR khuếch đại các gene

Các bước	COI		Cyt b		Rho		Số chu kỳ
	Nhiệt độ	Thời gian	Nhiệt độ	Thời gian	Nhiệt độ	Thời gian	
1. Duỗi xoắn ban đầu	95°C	2 phút	94°C	4 phút	95°C	2 phút	1
2. Duỗi xoắn	94°C	30 giây	94°C	1 phút	94°C	30 giây	
3. Gắn môi	52°C	30 giây	55°C	1 phút	60°C	30 giây	35
4. Nối dài	72°C	1 phút	72°C	2 phút	72°C	45 giây	
5. Nối dài cuối cùng	72°C	10 phút	72°C	5 phút	72°C	10 phút	1

Số mẫu phân tích: gene COI được khuếch đại thành công trên 15 mẫu gồm 5 mẫu mỗi dòng Cà Mau và đầu vuông, 3 mẫu Hậu Giang và 2 mẫu Đồng Tháp. Gene Cyt b được phân tích 5 mẫu cho mỗi dòng, trừ đầu vuông 6 mẫu (tổng cộng 21 mẫu). Đối với gene Rho, 2 mẫu trên mỗi dòng được khuếch đại (tổng cộng 8 mẫu).

Các mẫu sau khi PCR được điện di (gel agarose 1,4%) để kiểm tra kết quả. Tất cả các đều đạt kết quả và được gửi đi giải trình tự 2 chiều tại công ty Nam Khoa (Tp Hồ Chí Minh). Tại đây, việc giải trình tự được thực hiện trên máy ABI 3100.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Các gene COI, Cyt b và Rho được áp dụng cùng phương pháp phân tích trình tự. Đầu tiên, trình tự gene được kiểm tra chất lượng (thông qua giá trị chất lượng Q) bằng chương trình FINCH TV

1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Trình tự hai chiều của mỗi mẫu được so sánh với nhau bằng chương trình MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) và những vị trí không trùng khớp giữa hai chiều trình tự được điều chỉnh bằng cách chọn nucleotide có giá trị Q cao. Sau bước điều chỉnh này, trình tự của các mẫu được so sánh một lượt với nhau bằng chương trình MEGA 5.2. Những mẫu có trình tự khác nhau được so sánh với ngân hàng gene tại Genbank bằng cách dùng chương trình BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) và cơ sở dữ liệu COI của BOLD system (<http://www.boldsystems.org>) để xác định mức độ khác biệt về trình tự giữa mẫu cá rô trong nghiên cứu với mẫu cá rô có trong các ngân hàng gene trên. Chương trình MEGA 5.2 cũng được dùng để ước tính khoảng cách di truyền, đa dạng di truyền và vẽ cây di truyền theo phương pháp UPGMA (Unweighted Pair Group Method

with Arithmetic Mean). Các giá trị trên được ước lượng dựa trên mô hình “Maximum Composite Likelihood” và phương sai được ước lượng bằng phương pháp Bootstrapping với 1000 lần lặp lại.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Trình tự gene COI

3.1.1 So sánh trình tự gene COI giữa các dòng cá rô

Một phần của gene COI đã được phân tích có tỉ lệ các loại nucleotide như sau: Adenine (A) chiếm 22,5%, Thymine (T) chiếm 31,5%, Cytosine (C) có 29,2% và Guanine (G) là 16,8%. Trong chiều dài của đoạn gene gồm 622 bp (basepair) có 4 vị trí thay đổi trình tự nucleotide đã được tìm thấy, chiếm 0,64 tổng chiều dài đoạn gene (Bảng 4). Xu hướng thay đổi trình tự nucleotide trong cùng nhóm (purine, A và G, hay pyrimidine, T và C) cao hơn so với thay đổi giữa các nhóm (Bảng 5).

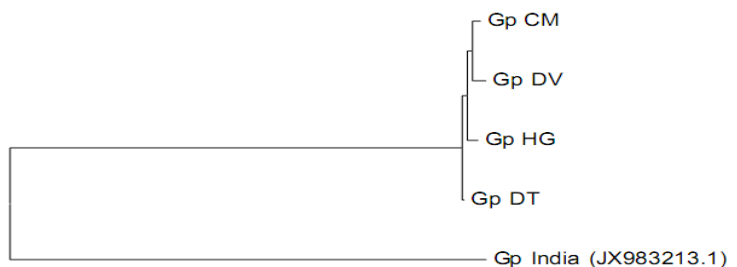
Bảng 4: Tóm tắt trình tự một phần của gene COI (622 bp, từ vị trí 84 đến 704) ở những đoạn thể hiện sự đa hình giữa các mẫu

Vị trí nucleotide	177	399	609	633
Ký hiệu mẫu				
Cà Mau (CM) 08	A	C	T	T
CM09
CM10
CM11	G	T	.	.
CM12
Đầu vuông (DV) 14
DV15	G	T	.	.
DV16	.	.	A	G
DV19
DV20
Đồng Tháp (DT) 57	G	.	.	.
DT58
Hậu Giang (HG) 09
HG19	G	T	.	.
HG22	G	T	.	.

Ghi chú: Điểm chấm (.) là ký hiệu nucleotide giống với nucleotide ở hàng trên cùng (Mẫu CM08)

Hình 1: Cây di truyền dựa trên trình tự gene COI của các dòng cá rô nghiên cứu và cá rô Ấn Độ

Ghi chú: Gp CM: cá rô Cà Mau; Gp DV: cá rô đầu vuông; Gp HG: cá rô Hậu Giang; Gp DT: cá rô Đồng Tháp; Gp India, cá rô Ấn Độ với số truy cập Genbank: JX983213.1



Bảng 5: Tỉ lệ thay đổi trình tự nucleotide của đoạn gene COI ở cá rô

	A	T	C	G
A	-	4,77	4,42	19,16
T	3,4	-	12	2,54
C	3,4	12,94	-	2,54
G	25,66	4,77	4,42	-

Ghi chú: Tỉ lệ trên được ước lượng dựa vào phương pháp Maximum Composite Likelihood, thực hiện bằng chương trình MEGA5.2. Số in đậm thể hiện tỉ lệ thay đổi trong cùng nhóm và in nghiêng là tỉ lệ thay đổi giữa các nhóm bazơ

Bốn sự thay đổi nucleotide đã tạo nên 3 dạng trình tự COI khác nhau trong 15 mẫu cá rô (Bảng 4) đã được gửi lên ngân hàng gene với số truy cập (accession number) là KF752454, KF752455 và KF752456. Như vậy, trong mỗi dạng trình tự nêu trên đều có đại diện của các dòng cá. Mức độ tương đồng về trình tự giữa 3 dạng trên là 99%, hay nói cách khác, mức độ giống nhau các mẫu (không kể dòng) rất cao, từ 99 – 100%. Do đó, khoảng cách di truyền của từng cặp dòng (Bảng 6) và tính chung cho các dòng cá rô là rất nhỏ (trung bình ± SE: 0,002 ± 0,001). Đa dạng nucleotide tính chung cho các dòng là 0,002. Khoảng cách di truyền nhỏ giữa các dòng cá rô được thấy rõ hơn khi so sánh chúng với mẫu cá rô có nguồn gốc từ Ấn Độ với số truy cập Genbank JX983213.1 (Hình 1).

Bảng 6: Khoảng cách di truyền giữa các dòng cá rô

	Cà Mau	Đầu vuông	Đồng Tháp	Hậu Giang
Cà Mau	-	0,001	0,001	0,001
Đầu vuông	0,002	-	0,001	0,001
Đồng Tháp	0,001	0,002	-	0,001
Hậu Giang	0,002	0,003	0,002	-

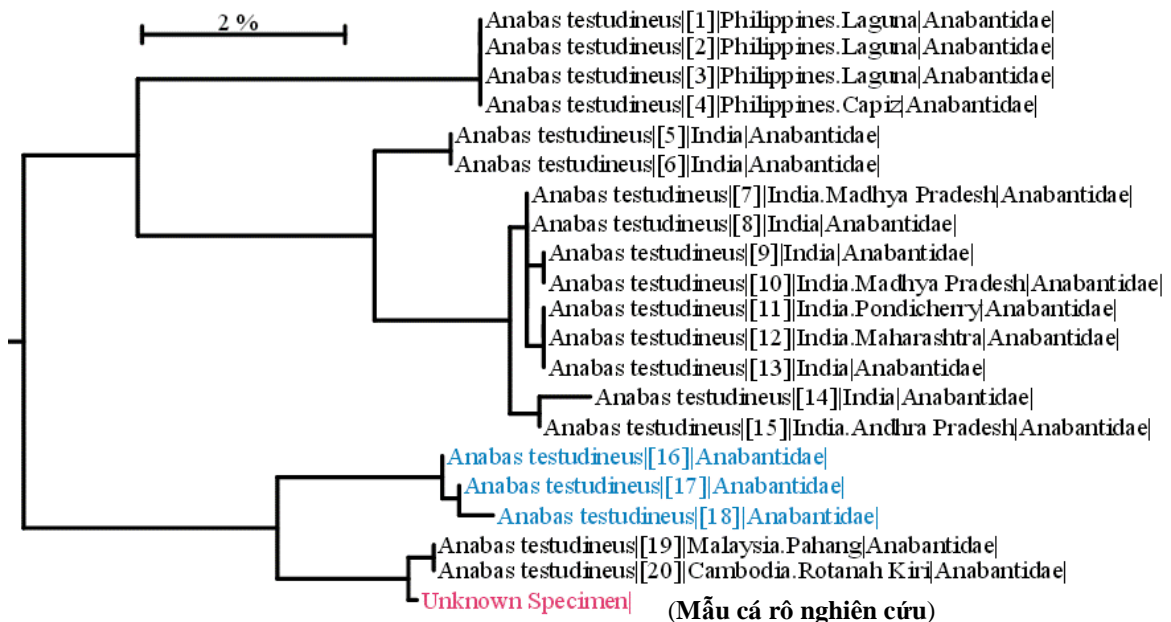
Ghi chú: Giá trị trung bình ở dưới đường chéo và sai số chuẩn (SE) ở trên đường chéo

3.1.2 So sánh trình tự gene COI của các dòng cá rô với cơ sở dữ liệu của BOLD system và Genbank

Ba dạng trình tự gene COI trong các mẫu cá rô (trong đó có cá rô đầu vuông) được so sánh với trình tự gene trong cơ sở dữ liệu của hệ thống BOLD (www.boldsystem.org). Kết quả cho thấy trong tổng số 20 trình tự COI của cá rô *Anabas testudineus* sẵn có trên hệ thống, có 2 trình tự (10%) giống ở mức 99,7%; 3 trình tự (15%) giống ở mức 96,5 – 96,8% và 15 trình tự (75%) giống ở mức 91,1 – 92,0% (Truy cập ngày 29/11/2013). Ngoài dữ liệu của loài này, mức độ giống gần nhất của trình tự COI của mẫu cá rô với loài *Alepes*

melanoptera, thuộc họ Carangidae, cùng bộ Perciformes với cá rô là 84,9%. Hệ thống BOLD cũng cho biết xác suất xác định mẫu cá rô đầu vuông thuộc loài cá rô *Anabas testudineus* đạt 100%.

Dựa vào hệ thống BOLD, mẫu cá rô trong nghiên cứu được so sánh để xác định mối quan hệ di truyền với mẫu cá rô có trên hệ thống có nguồn gốc từ các nước khác nhau (Hình 2), cá rô trong nghiên cứu có quan hệ di truyền gần nhất với cá rô ở Campuchia và Malaysia và xa hơn với cá rô có nguồn gốc từ Ấn Độ và Philippines. Ba dạng trình tự gene COI của mẫu cá rô (Bảng 4) đều có vị trí giống nhau trong cây di truyền.



Hình 2: Cây di truyền chỉ mối quan hệ giữa mẫu cá rô trong nghiên cứu với mẫu cá rô ở các nước khác nhau dựa trên trình tự gene COI (www.boldsystem.org)

3.2 So sánh trình tự gene cytochrome b

Một phần của gene Cyt b của các dòng cá rô đồng được giải trình tự gồm có 315 bp, trong đó tỉ lệ các loại nucleotide là A = 27,88%, T = 26,11%, C = 16,35% và G = 29,67%. Trong 21 mẫu phân tích xuất hiện 5 vị trí thay đổi nucleotide (1,59% tổng chiều dài đoạn gene), nhưng chỉ xảy ra ở 2 mẫu cá rô Cà Mau và Đồng Tháp. Như vậy, có 3 dạng trình tự gene Cyt b trong các mẫu nghiên cứu.

Tương tự như kết quả về gene COI, trình tự gene Cyt b giữa các mẫu cá rô giống nhau từ 99 – 100%. Do đó, khoảng cách di truyền giữa các dòng rất nhỏ và giá trị khác biệt di truyền chung

giữa các dòng khác 0 không có ý nghĩa (trung bình ±SE = 0,001 ± 0,001).

Kết quả so sánh trình tự gene Cyt b của mẫu cá rô nghiên cứu với dữ liệu của Genbank cho thấy, trong số 3 trình tự hiện có (truy cập ngày 29/11/2013), mẫu cá rô nghiên cứu giống 99% với 2 trình tự (Số truy cập Genbank: AB822525.1, mẫu cá rô ở Nhật và AY763727.1, mẫu cá rô ở Tây Ban Nha) và 96% so với 1 trình tự còn lại (AF012791, mẫu ở Singapore). Ví dụ, so với mẫu cá rô ở Nhật, trình tự gene Cyt b của cá rô trong nghiên cứu chỉ khác ở 2 vị trí nucleotide 318 và 321 (Hình 3).

Anabas testudineus mitochondrial cytb gene for cytochrome b, complete cds
Sequence ID: [dbj|AB822525.1](#) Length: 1143 Number of Matches: 1

Range 1: 97 to 425 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
585 bits(648)	8e-164	327/329(99%)	0/329(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTTGGCTCTCTCCTAGGACTTTGCCTAGCTGCCAGATCGTCACAGGTTTATTCCTTGCA			60
Sbjct 97			156
Query 61	ATACACTATACGGCAGACACCACAACAGCCTTCTCATCTGTAGCCACATCTGTGCGAGAC			120
Sbjct 157			216
Query 121	GTAAACTACGGCTGACTCATCCGAAACCTTCATGCCAACGGCGCATCCTTTTTCTTCATC			180
Sbjct 217			276
Query 181	TGCATCTACCTCCACATTGGACGGGGTCTTTATTACGGCTCTTACCTATACAAAGAAACA			240
Sbjct 277			336
Query 241	TGAAACACCGGGTTATTCTTTACTCCTAGTTATAATGACTGCTTTCGTAGGCTACGTC			300
Sbjct 337			396
Query 301	CTCCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGG	329		
Sbjct 397 G..C	425		

Hình 3: Kết quả so sánh trình tự của mẫu cá rô đồng với cơ sở dữ liệu gene Cytochrome b có ở Genbank

Ghi chú: Query: Mẫu cá rô nghiên cứu; Sbjct: Mẫu cá rô ở Nhật với Số truy cập Genbank AB822525.1
 Điểm chấm (.) là ký hiệu nucleotide ở hàng Sbjct giống với nucleotide tương ứng ở hàng Query

3.3 So sánh trình tự gene Rhodopsin (Rho)

Trong 8 mẫu thuộc 4 dòng cá rô nghiên cứu gửi đi giải trình tự gene Rho có một mẫu không đạt yêu cầu. Trong 7 mẫu còn lại, gene Rho được giải trình tự một phần, bao gồm 468 bp với thành phần các loại nucleotide như sau: 18,62% A, 29,70% T, 23,72% C và 27,96% G.

Kết quả so sánh trình tự của các mẫu cho thấy chúng giống nhau 100%. Khi so với cơ sở dữ liệu của Genbank, chưa có trình tự gene Rho của cá rô được công bố. So với các loài khác, mẫu cá rô nghiên cứu có trình tự gene Rho giống 94% với loài *Ctenopoma sp* (Số truy cập Genbank AY141278.1), 93% với cá lóc đen *Channa striata* (AY141277.1) và < 92% với các loài cá khác.

3.4 Thảo luận chung

So sánh trình tự các gene trong ti thể (COI và Cyt b) và trong nhân (Rho) giữa các dòng cá rô đều cho kết quả giống nhau: mức độ tương đồng giữa các dòng cá rô đạt 99 – 100% và giữa cá rô trong nghiên cứu với mẫu cá rô ở các nước Malaysia, Campuchia, Nhật, ... đạt ≥99%. Kết quả thống nhất từ 3 gene mã vạch khẳng định cá rô đầu vuông cùng loài với cá rô đồng, *Anabas testudineus*. Kết quả này phù hợp với kết quả so sánh các chỉ tiêu

hình thái đếm giữa cá rô đầu vuông và cá rô tự nhiên thu ở các vùng khác nhau, chúng có cùng khoảng biến động về các chỉ tiêu đếm (Đương Thúy Yên và Trương Ngọc Trinh, 2013).

Việc định danh loài chỉ dựa vào gene COI đã cho kết quả chính xác 98 – 100% đối với nhiều loài động vật như các loài chim ở Bắc Mỹ (Hebert *et al.*, 2004), các loài cá ở Úc (Ward *et al.*, 2005), cá ở Mexico và Guatemala (Valdez-Moreno *et al.*, 2009),... Gene Cyt b cũng cho kết quả tương tự nhưng mức độ phân loại chậm hơn so với gene COI (Page and Hughes, 2010). Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào một gene có thể có sai sót trong định danh dù ở tỉ lệ rất thấp (< 2%). Vì vậy, một số tác giả đề xuất phải có sự kết hợp của một số gene mã vạch, đặc biệt là sự kết hợp giữa gene trong nhân và trong ti thể (Dasmahapatra and Mallet, 2006; Krüick *et al.*, 2013) bởi vì tính chất di truyền của chúng khác nhau (mtDNA di truyền theo con mẹ, trong khi gene trong nhân di truyền theo cả cha và mẹ). Mặc dù phân loại dựa trên gene mã vạch rất hiệu quả và chính xác cao, song nhiều nghiên cứu về phân loại, mối quan hệ giữa các loài,... vẫn kết hợp phương pháp sinh học phân tử và phương pháp hình thái (Ahrens *et al.*, 2013; Cowart *et al.*, 2013).

Kết hợp kết quả nghiên cứu trình tự các gene và đặc điểm hình thái của các dòng cá rô không chỉ cho kết luận chính xác về hệ thống phân loại của cá rô đầu vuông mà còn cho chúng ta hiểu thêm về khả năng thích nghi, thay đổi kiểu hình và một số đặc điểm sinh học của cá trong điều kiện nuôi dưới những tác động của con người. Cá rô đầu vuông rất khác với cá rô tự nhiên ở các tỉ lệ số đo về hình dáng cơ thể, hình dạng đầu, độ rộng miệng, tỉ lệ chiều dài ruột/chiều dài chuẩn (Dương Thúy Yên và Trương Ngọc Trinh, 2013), đặc biệt là tốc độ tăng trưởng nhanh (Dương Thúy Yên và Dương Nhật Long 2013; Dương Thúy Yên, 2013) và kích thước tối đa lớn. Sự khác biệt này có thể là kết quả của nhiều tác động của con người như thuần hóa, chọn lọc, lai chéo (việc cho sinh sản cá rô có nguồn gốc khác nhau), các yếu tố kỹ thuật (mật độ, thức ăn công nghiệp,...) trong điều kiện nuôi. Ví dụ về tính trạng tăng trưởng, Dunham (2011) cho rằng phần lớn các loài cá nuôi đều tăng trưởng tốt hơn cá tự nhiên và một số loài thể hiện tăng trưởng nhanh chỉ sau một vài thế hệ thuần hóa. Chẳng hạn, tốc độ tăng trưởng của cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) tăng từ 3 – 6% sau mỗi thế hệ thuần hóa (Dunham, 2011). Cá rô đồng ở Hậu Giang có thể đã được thuần hóa qua 8 – 9 thế hệ tính từ khi bắt đầu phong trào nuôi đến thời điểm cá rô đầu vuông xuất hiện. Bên cạnh đó, sự tăng trưởng nhanh của cá rô đầu vuông còn có thể do sự thay đổi nội tại của cá như đột biến. Mặc dù các đột biến không thể hiện ở ba gene nghiên cứu nhưng có thể xảy ra ở những gene liên quan đến tăng trưởng. Để kiểm tra giả thiết này cần dùng những kỹ thuật hiện đại như microarray, giải trình tự thế hệ mới,... để tìm hiểu sự biểu hiện một lúc của rất nhiều gene trên những cá thể có tốc độ tăng trưởng khác nhau, từ đó tìm ra mối liên hệ giữa tăng trưởng và các gene điều khiển tăng trưởng.

4 KẾT LUẬN

Mức độ tương đồng về trình tự các gene mã vạch COL, Cyt b và Rho giữa các dòng cá rô rất cao, từ 99 – 100% và giống với trình tự gene COI và Cyt b của cá rô ở một số nước trên hệ thống Genbank và BOLD trên 99%. Như vậy, cá rô đầu vuông chính là loài cá rô *Anabas testudineus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một nội dung trong đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ (Mã số B2012-16-15) được tài trợ của Bộ Giáo dục và Đào tạo. Tác giả chân thành cảm ơn các em Trương Ngọc Trinh, học viên Cao học K18 và Phạm Hoàng Yến, Lớp

nuôi trồng thủy sản tiên tiến K35 đã tham gia phân tích mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahrens, D., Fabrizi, S., Sipek, P., Lago, P.K., 2013. Integrative analysis of DNA phylogeography and morphology of the European rose chafer (*Cetonia aurata*) to infer species taxonomy and patterns of postglacial colonisation in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69, 83-94.
- Cowart, D.A., Huang, C.Y., Arnaud-Haond, S., Carney, S.L., Fisher, C.R., Schaeffer, S.W., 2013. Restriction to large-scale gene flow vs. regional panmixia among cold seep *Escarpia* spp. (Polychaeta, Siboglinidae). *Molecular Ecology* 22, 4147-4162.
- Dasmahapatra, K.K., Mallet, J., 2006. Taxonomy: DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97, 254-255.
- Dunham, R., 2011. Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. CABI Publishing.
- Dương Thúy Yên, 2013. Ảnh hưởng của nguồn gốc cá bố mẹ đến sinh trưởng của cá rô (*Anabas testudineus* Bloch, 1792) giai đoạn nuôi cá thịt. *Tạp chí Nông nghiệp*, số 18/2013, 78 – 83.
- Dương Thúy Yên và Dương Nhật Long, 2013. Ảnh hưởng của nguồn gốc cá bố mẹ đến tăng trưởng và tỉ lệ sống của cá rô (*Anabas testudineus* Bloch, 1792) giai đoạn ương từ cá bột lên cá giống. *Tạp chí Nông nghiệp*, số 6/2013, 66 – 72.
- Dương Thúy Yên và Trương Ngọc Trinh, 2013. So sánh đặc điểm hình thái của cá rô đầu vuông và cá rô đồng tự nhiên (*Anabas testudineus*). *Tạp chí Khoa học Đại Học Cần Thơ*, số 29b, 86-95.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., Francis M, C., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes PLoS *Biology* 10, 1657-1663.

10. Ivanova, N.V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7, 544-548.
11. Janzen, D.H., Hallwachs, W., Blandin, P., Burns, J.M., Cadiou, J.-M., Chacon, I., Dapkey, T., Deans, A.R., Epstein, M.E., Espinoza, B., Franclemont, J.G., Haber, W.A., Hajibabaei, M., Hall, J.P.W., Hebert, P.D.N., Gauld, I.D., Harvey, D.J., Hausmann, A., Kitching, I.J., Lafontaine, D.O.N., Landry, J.-F., Lemaire, C., Miller, J.Y., Miller, J.S., Miller, L.E.E., Miller, S.E., Montero, J., Munroe, E., Green, S.R., Ratnasingham, S., Rawlins, J.E., Robbins, R.K., Rodriguez, J.J., Rougerie, R., Sharkey, M.J., Smith, M.A., Solis, M.A., Sullivan, J.B., Thiaucourt, P., Wahl, D.B., Weller, S.J., Whitfield, J.B., Willmott, K.R., Wood, D.M., Woodley, N.E., Wilson, J.J., 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9, 1-26.
12. Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 6196-6200.
13. Krück, N.C., Tibbetts, I.R., Ward, R.D., Johnson, J.W., Loh, W.K.W., Ovenden, J.R., 2013. Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (Sillago). *Fisheries Research* 143, 39-46.
14. Moritz, C., Cicero, C., 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology* 2, 1529-1531.
15. Page, T.J., Hughes, J.M., 2010. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology* 77, 2093-2122.
16. Palumbi, A., Cipriano, F., 1998. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity* 89, 459-464.
17. Puckridge, M., Andreakis, N., Appleyard, S.A., Ward, R.D., 2013. Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13, 32-42.
18. Sevilla, R.G., Diez, A., NorÉN, M., Mouchel, O., JÉRÔMe, M., Verrez-Bagnis, V., Van Pelt, H., Favre-Krey, L., Krey, G., Consortium, T.F., Bautista, J.M., 2007. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes* 7, 730-734.
19. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
20. Valdez-Moreno, M., Ivanova, N.V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S., Hebert, P.D.N., 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* 74, 377-402.
21. Vences, M., Thomas, M., van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D., 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2, 5.
22. Ward, R.D., 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources* 9, 1077-1085.
23. Ward, R.D., Hanner, R., Hebert, P.D.N., 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74, 329-356.
24. Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1847-1857.