

SPECIES IDENTIFICATION OF LEPTOBOTIA PELLEGRINI FANG, 1936 IN NGHE AN USING DNA BARCODE

Le Dinh Chac^{1*}, Hoang Ngoc Thao¹, Nguyen Thi Yen¹, Ong Vinh An², Le Anh Son³

¹Hong Duc University, ²Vinh University

³Thanh Hoa Department of Education and Training

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 22/10/2023</p> <p>Revised: 29/11/2023</p> <p>Published: 01/12/2023</p>	<p><i>Leptobotia pellegrini</i> Fang, 1936, is an ornamental and high commercial value species. In Vietnam, this species was recorded in 2005 by Nguyen Van Hao in Hong River with the name <i>Leptobotia elongata</i>, and was re-identified as <i>Leptobotia pellegrini</i> (Kottelat: 2012, 2013). In 2022, Hoang et al. Discovered this species in Tuong Duong, Nghe An, described its morphological characteristics, and identified this as a new distribution area of <i>L. pellegrini</i> in Vietnam. In this study, we used molecular taxonomy research methods to obtain ba DNA barcode loci: <i>Cybt</i>, <i>ND2</i> and <i>16S</i> to identify <i>L. pellegrini</i> in Vietnam. The sizes of sequences of the <i>Cybt</i>, <i>ND2</i>, and <i>16S</i> we obtained respectively are <i>Cybt</i> 818 bp, <i>ND2</i> 512 bp and <i>16S</i> 750 bp. Samples of the same species, <i>L. pellegrini</i>, are placed in the same group on the phylogenetic tree with high bootstrap coefficients, from 99%, 100%, and 89% based on <i>Cybt</i>, <i>ND2</i> and <i>16S</i> gene sequences. This has contributed to the analysis, description of morphological characteristics and new records of <i>L. pellegrini</i> species in Vietnam.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Cybt</p> <p>ND2</p> <p>16S</p> <p><i>Leptobotia pellegrini</i></p> <p>Loach</p>	

NHẬN DẠNG LOÀI CÁ CHẠCH LỬA (*LEPTOBOTIA PELLEGRINI* FANG, 1936) Ở NGHỆ AN BẰNG MÃ VẠCH DNA

Lê Đình Chác^{1*}, Hoàng Ngọc Thảo¹, Nguyễn Thị Yên¹, Ông Vĩnh An², Lê Anh Sơn³

¹Trường Đại học Hồng Đức, ²Trường Đại học Vinh

³Sở Giáo dục và Đào tạo Thanh Hóa

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 22/10/2023</p> <p>Ngày hoàn thiện: 29/11/2023</p> <p>Ngày đăng: 01/12/2023</p>	<p>Cá chạch lửa (<i>Leptobotia pellegrini</i> Fang, 1936) là loài có giá trị làm cảnh và thương mại cao. Ở Việt Nam, loài này được ghi nhận (Nguyễn Văn Hào, 2005) tại sông Hồng với tên là <i>Leptobotia elongata</i>, đã được xác định lại là <i>Leptobotia pellegrini</i> (Kottelat, 2012, 2013). Đến năm 2022, (Hoàng Ngọc Thảo và cộng sự, 2022) đã phát hiện loài này ở Tương Dương, Nghệ An, mô tả đặc điểm hình thái và ghi nhận đây là vùng phân bố mới của loài ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp nghiên cứu trong phân loại học phân tử thu nhận được ba locus mã vạch DNA là <i>Cybt</i>, <i>ND2</i>, <i>16S</i> để nhận diện loài <i>L. pellegrini</i> tại Việt Nam. Kích thước các trình tự <i>Cybt</i>, <i>ND2</i>, <i>16S</i> chúng tôi thu được lần lượt là <i>Cybt</i> 818 bp; <i>ND2</i> 512 bp và <i>16S</i> 750 bp. Các mẫu cùng loài <i>L. pellegrini</i> được xếp trong cùng nhóm trên cây phát sinh chủng loại với hệ số tương đồng cao, từ 99%, 100%, 89% dựa trên trình tự gene <i>Cybt</i>, <i>ND2</i> và <i>16S</i>. Điều này đã góp phần khẳng định cho việc phân tích, mô tả đặc điểm hình thái và ghi nhận mới cho loài <i>L. pellegrini</i> tại Việt Nam.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Cybt</p> <p>ND2</p> <p>16S</p> <p><i>Leptobotia pellegrini</i></p> <p>Cá chạch lửa</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9016>

* Corresponding author. Email: ledinhchac@hdu.edu.vn

1. Giới thiệu

Giống *Leptobotia* Bleeker là nhóm cá Chạch, gồm nhiều loài có hình dạng, màu sắc hoa văn đẹp, phân bố ở Nam Trung Quốc và miền Bắc Việt Nam [1]. Hiện nay, giống *Leptobotia* trên thế giới có 17 loài [2]; trong đó có một số loài mới được công bố gần đây (*Leptobotia bellacauda* [3]; *Leptobotia micra* [4]), cũng như được mô tả lại (*Leptobotia citraurata* [5]). Loài Cá chạch lửa (*Leptobotia pellegrini* Fang, 1936) lần đầu tiên được công bố bởi Fang năm 1936 [6] trên các mẫu vật thu tại khu vực thượng nguồn sông Dương Tử (Yangtze) thuộc tỉnh Tứ Xuyên (Szechuan), Tây Nam Trung Quốc. Đây là loài cá nước ngọt có giá trị để nuôi làm cá cảnh rất được ưa chuộng, do đó, loài cá này còn có giá trị thương mại cao. Tuy nhiên, tại Việt Nam loài cá này chưa được nghiên cứu nhiều. Ngoài mô tả ban đầu của Fang năm 1936, hầu như không có thêm các mô tả khác về loài *Leptobotia pellegrini*. Năm 2001, Kottelat là người đầu tiên đã thu được mẫu của loài này ở sông Lô (phụ lưu của sông Hồng) [7]. Năm 2005, Nguyễn Văn Hào [8], đã phát hiện và ghi nhận *Leptobotia elongata* có ở sông Gâm (phụ lưu của sông Lô) thuộc tỉnh Tuyên Quang; mẫu này, sau đó đã được xác định lại là loài *L. pellegrini* [1], [9]. Năm 2022, Hoàng Ngọc Thảo và cộng sự đã phát hiện và ghi nhận phân bố của loài này ở khu vực khe Kiền, huyện Tương Dương, Nghệ An [10], các mẫu này đã được mô tả hình thái và xác định đây là khu vực phân bố mới của loài ở Việt Nam. Như vậy cho đến nay, ở Việt Nam, loài *L. pellegrini* được ghi nhận có phân bố tại sông Hồng và khe Kiền (huyện Tương Dương, Nghệ An). Trong nghiên cứu này, chúng tôi cung cấp các dẫn liệu được phân tích từ các mẫu cá thu ở khe Kiền để xác định loài *L. pellegrini* dựa trên phân tích quan hệ di truyền của ba locus mã vạch DNA *Cybt*, *ND2*, *16S*, chúng tôi thu được với các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* đã công bố trên GenBank.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Có 25 mẫu cá thu tại Khe Kiền, huyện Tương Dương, Nghệ An, Việt Nam được sử dụng để phân tích hình thái, mẫu cơ được lấy từ các mẫu này để phân tích DNA. Thời gian thu mẫu: 15/9/2019. Tọa độ thu mẫu: 19°13'55,51"N, 104°17'10,95"E, độ cao 255 m so với mực nước biển.

Nơi lưu giữ mẫu: Phòng thí nghiệm Động vật học, Trường Đại học Hồng Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân tích hình thái cá theo Kottelat (1990) [11].

DNA hệ gen phân lập từ mô cơ, mô này đã được bảo quản trong 95% ethanol, sau đó tiến hành tách chiết DNA bằng quy trình sau:

Một lượng nhỏ mô cơ 5 mg được làm khô và chuyển vào 500 μ l dung dịch đệm chiết xuất bao gồm 1% SDS, 0,4 mg/ml proteinase K, 10 mM Tris HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, sau đó ủ ở 56°C trong 2 giờ (đảo ngược ống 15 phút một lần), tiếp theo tiến hành ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong một phút. Thu 450 μ l phần nổi phía trên được chuyển vào ống 1,5 ml mới, trong đó bổ sung thêm 50 μ l dung dịch natri axetat 3M và 500 μ l isopropanol, trộn đều và ly tâm lần nữa ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút, phần nổi phía trên được loại bỏ và trầm tích DNA được rửa bằng 500 μ l etanol 70%. Sau khi loại bỏ etanol, DNA tổng số được làm khô ở 50°C trong 8 phút và sau đó được tiếp tục lại với 50 μ l TE.

Ba locus bao gồm: *Cybt*, *ND2*, *16S*, được khuếch đại bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymerase sợi kép (PCR) với các cặp mồi đặc hiệu (bảng 1), trong các điều kiện sau: 1,0 μ l DNA bộ gen (10–30 μ g), 1,0 μ l sơn lót sợi nhẹ (nồng độ 10 μ M), sơn lót sợi nặng 1,0 μ l (nồng độ 10 μ M), 15 μ l Master Mix 2x (CW BIO, Trung Quốc) và 12 μ l H₂O siêu tinh khiết. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy quay nhiệt độ dốc Bio-Rad T100™ trong các điều kiện sau: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là biến tính cục bộ ở 94°C trong 60 giây, bám mồi ở 50°C trong 60 giây, tổng hợp ở 72°C trong 60 giây, trong 35 chu kỳ với bước kéo dài cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Để khuếch đại, chúng tôi sử dụng các đoạn mồi tại bảng 1. Tất cả các sản

phẩm PCR được tiến hành điện di trên gel agarose 1,0% và được tinh chế bằng kỹ thuật chiết xuất gel. Các sản phẩm PCR thành công được gửi đến Phòng thí nghiệm trọng điểm Quốc gia về Công nghệ gen (Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ, Việt Nam) để đọc trình tự bằng cách sử dụng các đoạn mồi tương tự tại bước khuếch đại.

Trình tự nucleotide của các đoạn gen được xác định bởi máy giải trình tự ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu. Sau đó, các trình tự nói trên được phân tích, so sánh và lập cây phát sinh chủng loại bằng các chương trình BioEdit, BLAST [12], MEGA XI.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi đặc hiệu sử dụng để thực hiện phản ứng PCR

Primer name	sequence 5'-3'	gen
Cytl14910 (forward)*	GACCTGTGATMTGAAAACCAAYCGTTGT	<i>Cytl</i>
CytlH16064 (reverse)	CTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTA	
Metf1 forward)*	AAGCTTTCGGGCCCATACC	<i>ND2</i>
CO1R1 (reverse)	AGRGTGCCAATGTCTTTGTGRTT	
L2021 (forward)	CCTACCGAGCTTAGTAATAGCTGGTT	<i>16S</i>
16SH1 (reverse)*	CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGG	

(*): Các mồi được sử dụng

3. Kết quả và thảo luận

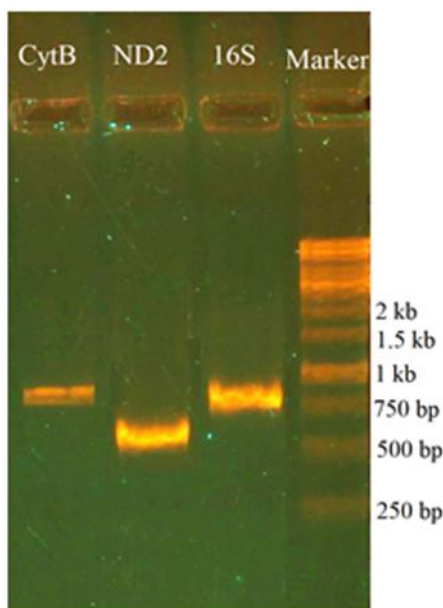
3.1. Kết quả phân tích hình thái

Chúng tôi tiến hành phân tích đặc điểm hình thái theo phương pháp của Kottelat (1990) [7] đối với 25 mẫu cá chạch lửa thu được tại Khe Kiên, huyện Tương Dương, Nghệ An. Kết quả cho thấy đặc điểm hình thái của 25 mẫu nói trên đều phù hợp với mô tả của Fang (1936) [6], cụ thể: D 2, 8; A 2, 5,5; V 1, 7-8; P 1, 12-13; C 1,17,1. Mắt trung bình, đường kính mắt bằng 2,59-3,24 lần chiều dài thân; gai trên ổ mắt đơn, đạt đến mép sau của mắt. Cột sống có 4+35 đốt. Dài trước vây lưng bằng 53,44-57,50% chiều dài tiêu chuẩn. Vây lưng ngắn, tia vây dài nhất ngắn hơn chiều dài đầu; vây bụng ngắn, mút không đạt đến vây hậu môn; vây đuôi khỏe; hậu môn ở giữa gốc vây hậu môn và gốc vây bụng. Vây hậu môn đạt đến 1/2 khoảng cách giữa gốc vây hậu môn và vây đuôi khi dẹp xuống. Vây lưng với hai vạch đứng màu đen, một ở gốc vây và một ở gần mút tia vây. Thân màu cam, với 6-8 vết đen ngang thân, từ cằm đến gốc đuôi. Do đó, có thể khẳng định các mẫu cá chạch lửa thu được tại Khe Kiên, huyện Tương Dương, Nghệ An là loài *Leptobotia pellegrini* Fang, 1936 [6]. Tuy nhiên, ngoài các dẫn liệu hình thái, chúng tôi tiếp tục phân tích quan hệ chủng loài của loài *L. pellegrini* dựa trên ba trình tự mã vạch DNA là *Cytl*, *ND2*, *16S* làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả phân tích di truyền

3.2.1. Kết quả nhân bản trình tự *Cytl*, *ND2*, *16S*

Sau khi thực hiện PCR, sản phẩm PCR sẽ được tiến hành điện di trên gel agarose và được chụp ảnh, kết quả được thể hiện trên hình 1. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR chúng tôi phân lập được với các cặp mồi *Cytl* F/R; *ND2* F/R; *16S* F/R đặc hiệu được thể hiện với kích thước các trình tự *Cytl*, *ND2*, *16S* lần lượt vào khoảng 800bp; 500bp và 800bp (Hình 1). Kết quả này phù hợp với trình tự các cặp mồi tương ứng, đủ độ tin cậy làm cơ sở cho chúng tôi tiến hành thực hiện việc đọc trình tự *Cytl*, *ND2*, *16S* để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả PCR 3 mẫu với cặp mồi *Cybt*, *ND2*, *16S*

3.2.2. Kết quả đọc trình tự ba gen *Cybt*, *ND2*, *16S* của các mẫu thu được

Sau khi điện di, chúng tôi tiến hành đọc trình tự 3 gen *Cybt*, *ND2*, *16S* thu được trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, sử dụng bộ Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing với cặp mồi đặc hiệu, kết quả thu được như sau:

Trình tự *Cybt* thu được

GCATTAGTTGATCTACCAGCCCCCTCAAACATTTTCAGTATGATGAACTTTGGATCCTTACTA
GGTCTATGTTTAAATTACCCAAATCTTAACAGGATTATTCCTAGCCATGCACTACACCTCAGATAT
CTCAACCGCCTTCTCCTCCGTTACCCACATCTGGTTCGAGACGTTAATTACGGCTGACTCATCCGC
AACATTACGCCAACGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATTTATATACATATTGCTCGAGGACT
ATATTATGGCTCCTACCTCTACAAAGAAACCTGAAATATCGGTGTAATCCTCCTCCTCCTAGTAA
TAATAACAGCCTTTGTAGGCTACGTCCCTTCCCTGGGGACAAATATCTTTCTGAGGCGCCACAGTA
ATTACCAACCTCTTATCTGCAGTCCCCTATGCAGGAGACGCACTAGTTCAATGAATTTGAGGCGG
ATTCTCAGTAGATAATGCAACCCTGACACGATTCTTCGCCTTCCACTTCCACTACTACCATTTCGTAA
TTGCCGACGCAACCATCCTACACCTCCTATTTCTACACGAAACAGGATCAAACAACCCAATAGGA
CTTAATTCTGACGCAGACAAAATCACCTTCCACCCATATTTCTCGTACAAGGACCTACTAGGATT
TGTAGCAATACTTCTAGGTCTCACATGCCTCGCCCTATTTCTCCCCAACCTCCTAGGAGACCCAG
AAAACCTTACACCCGCAAACCCCTTAGTCACACCTCCCCACATCAAACCCGAGTGATACTTCCTA
TTTGCCTACGCTATTCTACGATCAATTCCCAAC

Trình tự *ND2* thu được

TTTCTCCTGTCCAGCCTAGGACTAGGCACCACTCTAACCTTTGCCAGCTCCCACTGACTGCTTG
CCTGAATAGGCCTAGAAATCAACACCCTAGCAATCATCCCACTCATAGCACAACATCATCACCCA
CGAGCAGTTGAAGCAACAACCAAGTATTTCTTAACCCAAGCAACCGCAGCAGCAATAATTCTCTT
CGCAAGCACTACAAATGCATGAATTACGGGAGAATGAGACATTAACAACATATCCCACCCACTAG
CCAGCACCATAACCATAAAGTGCCTAGCACTAATAAATCGGCCTAGCACCAATACACTTCTGAATA
CCAGAAGTCCCTCAAGGACTTGACCTTTTAAACAGGGTTAATCATATCCACCTGACAAAAACTAGC
CCATTTCGCACTAATTATTCAAGTAGCCCCACCATTGACCCCGCACTACTCACATCACTGGGTC
TCTTATCAACCCTTATTGGAGGCTGAGGAGGACTCAACCAAACCCAGCTGCGAAAAATC

Trình tự *16S* thu được

CTTCTCCCGGCACAAGTGTAACCAGATCGGACCAACCACTGGAAATTAACGAACCCAAAACA
AGAGGGCAATGCGAACAACAAAAAATCAAGAAAAACCCACAACATCCACAATCGTTAACCCAC
ACTGGAGTGCCACCCAGGAAAGACCAAAAAGAAAAGGAAGGAAGTGGCAAACACAAGCCTCGCCT

GTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGCAAACACCTAAGTATAGGAGGTCCAGCCTGCCCAGTACTA
 CAAGTTCAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTTAAATGAA
 GACCTGTATGAATGGCTAAACGAGGGCTTAGCTGTCTCCCCTTTCCAGTCAGTGAAATGATCTC
 CCCGTGCAGAAGCGGGCATATAATTACAAGACGAGAAGACCCTTTGGAGCTTAAGGTACAAATCC
 AACCACGTTAAGCAACTAATTA AAAAGCACAAACCTAATGGACAATGGCATT TTTACCTTCGGTTG
 GGGCGACCACGGAGAAAAAAGATCCTCCGAGTGGACTGGGACAAAAACCTAAAACCAAGAAAGA
 CATTTCCAAGCCACAGAAAAATCTGACCAATCATGATCCGGCCCCCAGGCCGATCAACGAACCAAG
 TTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTCCAGAGTCCATATCGACGAGGGGGTTTACGACCTC
 GATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCCCGT

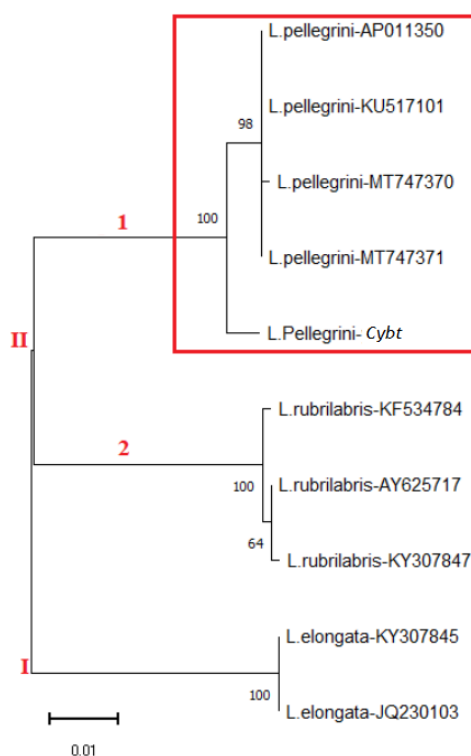
Kết quả trên cho thấy, ba trình tự *Cybt*, *ND2* và *16S* thu được từ việc phân lập các mẫu cá chạch lura, trình tự nhận được của *Cybt* là 818 bp; trình tự *ND2* có kích thước là 512 bp; trình tự *16S* là 750 bp. Các kết quả này đều phù hợp với các cặp mồi đặc trưng. Tiếp theo, chúng tôi so sánh với trình tự gen *Cybt*, *ND2*, *16S* đã công bố trên GenBank để làm cơ sở tiến hành phân tích quan hệ di truyền của các trình tự *Cybt*, *ND2* và *16S* thu được và các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* đã công bố trên GenBank (Bảng 2).

Bảng 2. Danh mục các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* đã công bố trên GenBank sử dụng để so sánh với các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* thu được

Tên loài	Mã số trên GenBank		
	<i>Cybt</i>	<i>ND2</i>	<i>16S</i>
<i>L. pellegrini</i>	AP011350		
	KU517101		
	MT747370		
	MT747371		
	KF534784		
<i>L. rubrilabris</i>	AY625717		
	KY307847		
	KY307845		
<i>L. elongata</i>	JQ230103		
<i>L. pellegrini</i>		AP011350	
<i>L. rubrilabris</i>		KY307847	
		KF534784	
<i>L. taeniops</i>		KM386686	
		AP013304	
<i>L. microphthalma</i>		KC865424	
		KY307846	
		JX155734	
<i>L. elongata</i>		JQ230103	
<i>L. pellegrini</i>			AP011350
<i>L. taeniops</i>			AP103304
			KM386686
<i>L. microphthalma</i>			KY307846
<i>L. punctata</i>			MH644033
<i>L. rubrilabris</i>			KY307847
			KF534784
<i>L. elongata</i>			JX155734

3.2.3. Kết quả phân tích trình tự *Cybt*

Sau khi thu được trình tự *Cybt*, tiến hành phân tích, so sánh và xác định quan hệ di truyền của các trình tự *Cybt* thu được và trình tự *Cybt* đã được công bố trên GenBank. Mối quan hệ di truyền này được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Sơ đồ cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự *Cytb* thu được với các trình tự *Cytb* đã công bố trên GenBank bằng phần mềm MEGA XI

Kết quả trên hình 2 cho thấy, cây phát sinh chia làm 2 nhánh, trong đó nhánh II được chia làm hai nhóm: Nhóm thứ nhất có các trình tự *Cytb* của mẫu cá chạch lửa thu được tại Khe Kiền, huyện Tương Dương, Nghệ An, Việt Nam có quan hệ di truyền cùng loài *Leptobotia pellegrini* với các trình tự *Cytb* mã số AP011350; MT747370; KU517101; MT747371; Nhóm thứ hai gồm các trình tự mang mã số KF534784; AY625717; KY307847 có quan hệ di truyền cùng loài *Leptobotia rubrilabris*. Tại nhánh I, các trình tự *Cytb* mang mã số KY307845 và JQ230103 có quan hệ cùng loài *Leptobotia elongata*.

Điều này cho thấy, khi sử dụng DNA Barcode *Cytb* trong việc xác định quan hệ di truyền của mẫu nghiên cứu so với các mẫu đã công bố trên GenBank có độ tin cậy cao. Để khẳng định điều này, quan hệ di truyền của một số trình tự *ND2*, *16S* tiếp tục được phân tích. Kết quả cụ thể như sau:

3.2.4. Kết quả phân tích trình tự *ND2*

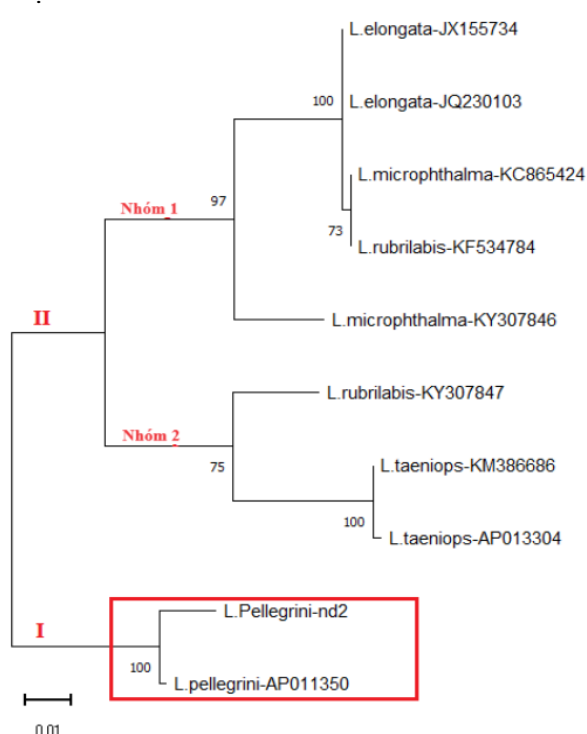
Sau khi thu được trình tự *ND2*, tiến hành phân tích, so sánh và xác định quan hệ di truyền của các trình tự *ND2* thu được với các trình tự *ND2* đã được công bố trên GenBank (Hình 3). Kết quả tại hình 3 cho thấy, cây phát sinh chia làm 2 nhánh, trong đó kết quả tại nhánh 1 thể hiện trình tự *ND2* của các mẫu cá chạch lửa tại Khe Kiền, huyện Tương Dương, Nghệ An, Việt Nam có quan hệ di truyền cùng loài *L. pellegrini* với trình tự *ND2* đã công bố trên GenBank mã số AP011350. Tại nhánh II có sự quan hệ di truyền về trình tự *ND2* khá đa dạng và được chia làm hai nhóm, trong đó mỗi nhóm có quan hệ di truyền của các trình tự *ND2* khá phong phú. Tuy nhiên, quan hệ di truyền của các loài tại nhánh II đều khác loài với *L. pellegrini* ở Việt Nam. Kết quả này đã khẳng định khi sử dụng trình tự *ND2* để xác định quan hệ di truyền đối với các mẫu cá chạch lửa *L. pellegrini* là đáng tin cậy.

3.2.5. Kết quả phân tích trình tự *16S*

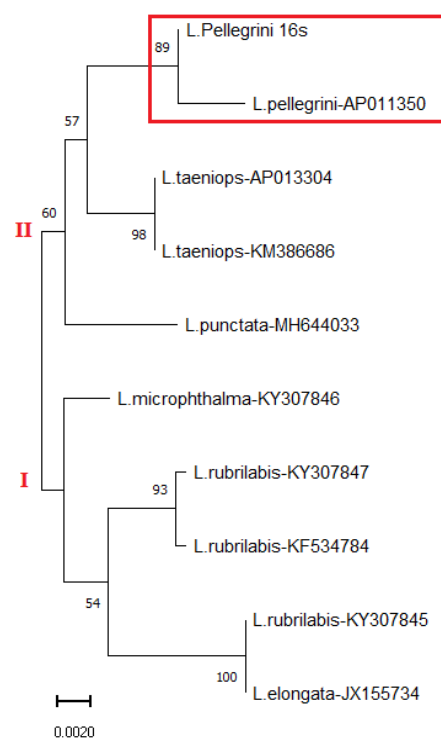
Sau khi thu được trình tự *16S*, tiến hành phân tích, so sánh và xác định quan hệ di truyền của các trình tự *16S* thu được với các trình tự *16S* đã được công bố trên GenBank, kết quả này được thể hiện trên hình 4.

Kết quả tại hình 4 cho thấy, cây phát sinh chia làm 2 nhánh, cả 2 nhánh đều có sự đa dạng về quan hệ di truyền trình tự *16S*. Tại nhánh II có sự quan hệ di truyền của các trình tự *16S* ở một số loài khác nhau, trong đó trình tự *16S* của mẫu cá chạch lửa thu được tại Khe Kiền, huyện Tương Dương, Nghệ An, Việt Nam có quan hệ di truyền gần gũi với loài *L. pellegrini* với trình tự *16S* đã công bố trên GenBank mã số AP011350. Trong khi đó, tại nhánh I có sự quan hệ di truyền về trình tự *16S* của 4 nhóm loài khác nhau là *L. taeniops*, *L. microphthalmalma*, *L. punctata* và *L. elongata*, các loài này đều khác loài với *L. pellegrini*.

Như vậy, qua việc phân tích di truyền của ba locus *Cybt*, *ND2*, *16S* của mẫu Cá chạch lửa thu được tại Khe Kiền, huyện Tương Dương, Nghệ An, Việt Nam với các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* đã công bố trên GenBank cho thấy đây là loài *L. pellegrini*. Đây là kết quả mới về loài *L. pellegrini* tại Việt Nam.



Hình 3. Sơ đồ cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự *ND2* thu được với các trình tự *ND2* đã công bố trên GenBank bằng phần mềm MEGA XI



Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự *16S* thu được với các trình tự *16S* đã công bố trên GenBank bằng phần mềm MEGA XI

Các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* đã công bố trên GenBank với các mã số lần lượt là: OM417048 (*Cybt*); OM417049 (*ND2*) và OM417046 (*16S*)

4. Kết luận

Các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* thu được có kích thước lần lượt là 818 bp; 512 bp; 750 bp. Các mẫu chạch lửa cùng loài *L. pellegrini* được xếp trong cùng nhóm trên cây phát sinh chủng loại với hệ số tương đồng cao 99%, 100%, 89%. Các trình tự *Cybt*, *ND2*, *16S* là ứng viên mã vạch DNA tiềm năng trong việc nhận diện loài *L. Pellegrini*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] M. Kottelat, "Conspectus Cobitidum: An inventory of the loaches of the world (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei)," *The Raffles Bulletin of Zoology*, no. 26, pp. 1-199, 2012.
- [2] R. Froese and D. Pauly (Editors), "FishBase," 2023 [Online]. Available: <http://www.fishbase.org>. [Accessed Oct. 15, 2023].
- [3] J. Bohlen and V. Šlechtová, "*Leptobotia bellacauda*, a new species of loach from the lower Yangtze basin in China (Teleostei: Cypriniformes: Botiidae)," *Zootaxa*, vol. 4205, no. 1, pp. 065-072, 2016.
- [4] J. Bohlen and V. Šlechtová, "*Leptobotia micra*, a new species of loach (Teleostei: Botiidae) from Guilin, southern China," *Zootaxa*, vol. 4250, no. 1, pp. 090-100, 2017.
- [5] D-M. Guo and E. Zhang, "Re-description of the loach species *Leptobotia citraurata* (Teleostei, Botiidae), with the description of *L. brachycephala* from southern Zhejiang Province, China," *ZooKeys*, vol. 1017, pp. 89-109, 2021.
- [6] P. W. Fang "Study on the botiid fishes of China," *Sinensia*, vol. 7, no. 1, pp. 1-49, 1936.
- [7] M. Kottelat, "Freshwater fishes of northern Vietnam," *A preliminary checklist of the fishes known or expected to occur in northern Vietnam with comments on systematics and nomenclature*. The World Bank, Washington, p. 50, 2001.
- [8] V. H. Nguyen, *Freshwater fishes of Vietnam*, vol. 2, Agriculture Publishing House, Hanoi, pp. 205-206, 2005.
- [9] M. Kottelat, "The fishes of the inland waters of Southeast Asia: a catalogue and core bibliography of the fishes known to occur in freshwaters, mangroves and estuaries," *The Raffles Bulletin of Zoology*, vol. 27, pp. 1-663, 2013.
- [10] N. T. Hoang, V. A. Ong, A. T. Ho, X. Q. Hoang, and X. K. Nguyen, "A new record of *L. pellegrini* Fang, 1936 (Teleostei, Cypriniformes, Botiidae) from the Western Nghe An Biosphere Reserve, Vietnam," *Check List*, vol. 18, no. 4, pp. 919-923, 2022.
- [11] M. Kottelat, "Indochinese nemacheilines. A revision of nemacheiline loaches," (*Pisces: Cypriniformes*) of *Thailand, Burma, Laos, Cambodia, and southern Viet Nam*. Pfeil, Munich, Germany, p. 262, 1990.
- [12] www.DNAbarcodeoflife.org; www.NCBI.nlm.nih.gov
- [13] F. T. Burbrink, R. Lawson, and J. B. Slowinski, "Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept," *Evolution*, vol. 54, no. 6, pp. 2107-2118, 2000.
- [14] J. R. Macey, A. Larson, N. B. Ananjeva, Z. Fang, and T. J. Papenfuss, "Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 14, pp. 91-104, 1997.
- [15] A. Tominaga, M. Matsui, K. Nishikawa, and S. Tanabe, "Phylogenetic relationships of *Hynobius naevius* (Amphibia: Caudata) as revealed by mitochondrial 12S and 16S rRNA genes," *Mol Phylogenet Evol.*, vol. 38, pp. 677-684, 2006.
- [16] S. B. Hedges and L. R. Maxson, "A molecular perspective on lissamphibian phylogeny," *Herpetol Monogr*, vol. 7, pp. 27-42, 1993.