



SO SÁNH ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ DNA MÃ VẠCH CỦA HAI LOÀI CÁ BÓNG TRÂN *Butis butis* VÀ *Butis humeralis*

Nguyễn Phương Thảo¹ và Dương Thúy Yên¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 22/01/2015

Ngày chấp nhận: 28/10/2015

Title:

Comparing morphological characteristics and DNA barcoding of two goby species *Butis butis* and *Butis humeralis*

Từ khóa:

DNA mã vạch, cá bóng trôn, *Butis butis*, *Butis humeralis*, COI, Eleotridae

Keywords:

DNA barcoding, *Butis butis*, *Butis humeralis*, COI, Eleotridae

ABSTRACT

This study aimed to compare the morphological characteristics and the sequence of cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene of two goby species *Butis butis* and *Butis humeralis* to verify their species identification. Morphological results show that they are similar in body shape, snout, color and texture of the pectoral fin muscles and some measurable parameters. However, they differ in the spots and the color of their eyes, the starting position of dorsal and anal fins, the ratio of head length/distance of two eyes and body depth/caudal fin depth. COI gene sequences of all samples of the two species are highly identical at 99-100%. Genetic distance between two species (0.003 ± 0.001) is equivalent to that within species. Thus, the two goby groups are the same species. This species is different from *B. butis* species reported in GenBank (COI gene sequence with 86% identity), indicating that the classification of *B. butis* species in the world is still unclear and needs to be further studied.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm so sánh đặc điểm hình thái và trình tự gene cytochrome C oxidase subunit I (COI) của hai "loài" cá bóng trôn *Butis butis* và *Butis humeralis* đã được công bố trong các nghiên cứu trước để kiểm chứng việc định danh hai loài. Kết quả về hình thái, chúng giống nhau ở hình dạng thân, mõm, màu sắc và cấu tạo cơ gốc vi ngực và một số chỉ tiêu đo. Tuy nhiên, chúng khác nhau ở vạch và màu sắc của mắt, vị trí bắt đầu của vi lưng và vi hậu môn, tỉ lệ dài đầu/khoảng cách hai mắt và cao thân/cao cuống đuôi. Về trình tự gene COI, các mẫu của hai loài giống nhau ở mức 99-100%. Khoảng cách di truyền giữa 2 loài ($0,003 \pm 0,001$) tương đương với khoảng cách di truyền trong cùng một loài. Như vậy, 2 nhóm cá bóng trôn là cùng một loài. Loài này khác với loài *B. butis* ở Genbank (giống trình tự gene COI ở mức 86%), chứng tỏ việc phân loại loài của cá *B. butis* trên thế giới chưa rõ ràng và cần tiếp tục được nghiên cứu.

1 GIỚI THIỆU

Phân biệt chính xác các loài cá là nhiệm vụ rất quan trọng nhằm phục vụ cho công tác nghiên cứu đa dạng loài và bảo vệ nguồn lợi thủy sản, đặc biệt

là những loài có nguy cơ tuyệt chủng nhưng chưa được định danh rõ ràng (Marko *et al.*, 2004). Việc định danh loài sai có thể dẫn đến ước tính không chính xác trữ lượng đàn cá (Marko *et al.*, 2004), tỉ

lệ khai thác,.. từ đó dẫn đến việc khai thác và quản lý nguồn lợi đối với từng loài không hợp lý.

Khó khăn trong phân loại, định danh xảy ra ở bộ phụ cá bống Gobioidae, có thành phần loài lớn nhất trong lớp cá xương với hơn 2.000 loài, trong đó số lượng họ và giống của bộ phụ này chưa thống nhất (Thacker, 2000; trích bởi Gill và Mooi, 2012). Trong các loài cá bống được khai thác, các loài thuộc họ cá bống đen *Eleotridae* đóng vai trò quan trọng vì một số loài có giá trị kinh tế cao, số khác góp phần vào chức năng sinh thái và sinh học nhờ số lượng chiếm ưu thế (Thacker, 2003). Trước đây, họ cá bống đen có khoảng 35 giống và 155 loài, được tìm thấy chủ yếu ở khu vực nhiệt đới Ấn Độ - Thái Bình Dương (Nelson, 2006). Song Fishbase công bố trên thế giới họ này hiện có 33 giống và 177 loài (cập nhật ngày 06/11/2014). Trong nghiên cứu cá trên sông Mekong ở Campuchia, Rainboth (1996) đã tìm ra họ *Eleotridae* có 6 giống và 6 loài. Theo Trần Đức Định *et al.*, (2013), họ *Eleotridae* được tìm thấy ở Đồng bằng sông Cửu Long có 4 giống và 7 loài. Bên cạnh sự khác biệt về phạm vi và không gian nghiên cứu, kết quả khác nhau giữa các nghiên cứu theo thời gian còn có thể do việc định danh loài không chính xác.

Đặc điểm chung của các loài trong họ cá bống đen là có thân hơi dài, phủ vây nhỏ và vừa. Hai vây bụng rời nhau. Vây lưng thứ nhất thường gồm 6 gai tách rời hoặc dính nhau ở gốc vây lưng thứ hai. Miệng cân đối, răng yếu (Mai Đình Yên *et al.*, 1992). Tuy nhiên, 2 loài cá bống trên *B. butis* và *B. humeralis* rất khó phân biệt do chúng giống nhau về hình dạng đầu, mõm, thân, kích thước và sự phân bố của vây, chúng khác nhau ở chiều cao cuống đuôi, các đốm quanh mắt và vị trí khởi điểm vi hậu môn (Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993; Trần Đức Định *et al.*, 2013; Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng, 2013). Những đặc điểm hình thái khác biệt nhỏ và rất khó nhận biết này có thể dẫn đến sự nhầm lẫn trong phân loại. Trong khi đó, hầu như chưa có công trình nào công bố về việc sử dụng chỉ thị phân tử để phân loại 2 loài cá này.

Hiện nay, phương pháp phân loại dựa vào trình tự một đoạn DNA đặc trưng cho loài (được gọi là DNA barcoding) được áp dụng, giải quyết được những khó khăn trong phân loại nếu chỉ dựa vào hình thái. Phương pháp này cho kết quả phân loại nhanh và chính xác cao (Steinke *et al.*, 2009a). Một số gene trong ti thể được dùng trong định danh loài như cytochrome b (Cyt b), cytochrome c oxidase

subunit I (COI),... Trong đó, gene COI được xem như một mã vạch DNA đặc trưng cho các loài động vật (Hebert *et al.*, 2003; 2004; Kartavtsev and Lee, 2006). Gene này được nhiều tác giả công nhận là có hiệu quả cao trong phân loại loài, như nghiên cứu về các loài cá biển ở Úc (Ward *et al.*, 2005), cá nước ngọt ở Canada (Hubert *et al.*, 2008) hay các loài cá cảnh kinh tế ở Bắc Mỹ (Steinke *et al.*, 2009b).

Nghiên cứu này nhằm xác định mối quan hệ giữa hai loài (tạm gọi là “loài”, theo các nghiên cứu trước, như Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993; Trần Đức Định *et al.*, 2013; Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng, 2013) cá bống trên thông qua việc kết hợp so sánh đặc điểm hình thái và DNA mã vạch di truyền của chúng, từ đó góp phần hoàn chỉnh việc định danh hai loài cá này nói riêng và họ cá bống đen *Eleotridae* nói chung.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu mẫu

Mẫu được thu hàng tháng từ tháng 6 đến tháng 11 với các kích cỡ khác nhau bằng việc thu mua ở các chợ địa phương thuộc hai tỉnh Trà Vinh và Sóc Trăng. Mẫu sau khi thu được rửa sạch, bảo quản lạnh. Sau đó, mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích. Tổng số mẫu thu của loài *B. humeralis* là 26 mẫu và loài *B. butis* là 120 mẫu. Trong quá trình thu mẫu loài *B. humeralis* còn gặp nhiều khó khăn, do số cá thể của loài này ngoài tự nhiên không nhiều nên có sự chênh lệch số lượng mẫu giữa hai loài.

2.2 Phương pháp phân tích các đặc điểm hình thái

Mẫu được nhận diện, định danh ban đầu dựa vào mô tả phân loại của Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương (1993), Trần Đức Định *et al.* (2013). Theo các tác giả, cơ sở phân biệt hai loài cá bống trên là: loài *B. butis* có cuống đuôi tương đối thon, xung quanh mắt có các đốm đen xếp tỏa tròn, khởi điểm vây hậu môn sau khởi điểm vây lưng thứ hai nhưng điểm cuối của gốc vây hậu môn ngang với điểm cuối của gốc vây lưng thứ hai. Trong khi đó, cuống đuôi ở loài *B. humeralis* tương đối cao, không có các đốm đen xếp tỏa tròn quanh mắt, khởi điểm vây hậu môn ngang với khởi điểm vây lưng thứ hai.

Các chỉ tiêu hình thái được mô tả và phân tích trên mẫu cá tươi. Các chỉ tiêu đếm được xác định bao gồm: tia vi đuôi (C), tia vi lưng (D), tia vi ngực (P), tia vi bụng (V), tia vi hậu môn (A). Các chỉ tiêu đo được tính tỉ lệ gồm: chiều dài chuẩn/chiều

dài đầu, chiều dài chuẩn/chiều cao thân, chiều dài đầu/đường kính mắt, chiều dài đầu/khoảng cách hai mắt, chiều dài đầu/chiều dài mõm, chiều dài cuống đuôi/chiều cao cuống đuôi, chiều cao thân/chiều cao cuống đuôi (Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993; Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng, 2013).

2.3 Phương pháp phân tích di truyền

2.3.1 Phương pháp thu mẫu phân tích và ly trích DNA

Mẫu phân tích di truyền được thu từ mẫu phân tích hình thái. Thu ở mỗi cá thể một lượng nhỏ khoảng 0,1 – 0,2 g vi đuôi (hoặc cơ). Mẫu được giữ trong tuýp 1,5 mL chứa ethanol 95% đến khi phân tích di truyền. Số lượng mẫu ly trích DNA ở hai loài *B. butis* và *B. humeralis* lần lượt là 57 và 20 mẫu.

Tiến hành ly trích DNA trong vi đuôi cá bằng phương pháp Phenol Chloroform có hiệu chỉnh (Duong Thúy Yên, 2014). Mẫu vi đuôi cá được nghiền nhỏ trong 650 μ L dung dịch ly trích cùng với 200 μ L dung dịch CTAB 2% và 10 μ L proteinase K (20mg/mL). Sau khi ủ mẫu qua đêm ở 60°C, mẫu được rửa để tách protein và các chất khác ra khỏi DNA bằng dung dịch Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) và Phenol : Chloroform : Isoamyl (25 : 24 : 1). DNA sau đó được kết tủa bằng 600 μ L Ethanol 100% lạnh và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Rửa DNA kết tủa với Ethanol 70% (2 lần) và Ethanol 100% (1 lần). DNA được phơi khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó hòa tan DNA với 80 μ L dung dịch TE và bảo quản ở -20°C.

2.3.2 Phương pháp khuếch đại chuỗi DNA (Polymerase Chain Reaction, PCR) và giải trình tự

DNA mẫu cá được khuếch đại gene COI. Sử dụng cặp mồi Fish F2 – t1/R2-t1 (Ward *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2007):

5'-TGTAACGACGGCCAGTCGACTAAT CATAAAGATATCGGCAC-3'/5'CAGGAAACA GCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATC AGAA-3' để khuếch đại gene COI. Mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 30 μ L hỗn hợp với thành phần các chất và nồng độ trong phản ứng như sau: 1X Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, nước cất (thể tích còn lại), 1,25U taq polymerase, 100 ng DNA và 2,5 pmoles mỗi mồi. Chu trình nhiệt trong phản ứng PCR khuếch đại gene COI gồm 5 bước: bước 1 là đun xoắn ban đầu được thực hiện trong thời gian 2 phút ở 95°C. Ba bước tiếp theo là đun xoắn, gắn mồi và nối dài

gồm 39 chu kì, thực hiện trong thời gian và nhiệt độ lần lượt là 30 giây ở 94°C, 40 giây 52°C và 1 phút 30 giây ở 72°C. Bước 5 là bước nối dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút.

2.3.3 Điện di

Chất lượng của DNA sau khi ly trích và kết quả của sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di sản phẩm trên gel agarose 1%. Gel được đặt vào trong môi trường điện di (TBE 1X với dòng điện 70V trong 24 phút) trước khi cho hỗn hợp DNA (5 μ L) và Loading dye (2,5 μ L) vào mỗi giếng gel. Kết quả điện di được chụp hình khi đặt gel dưới tia UV sau khi gel được ngâm trong Ethidium bromide (0,5 μ g/mL) ít nhất 15 phút. Mẫu PCR có kết quả tốt (vạch rõ và sáng) được gửi giải trình tự. Việc giải trình tự được thực hiện bằng máy DNA Sequencer AB 3100 tại Công ty Nam Khoa (Thành phố Hồ Chí Minh).

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

2.4.1 Số liệu hình thái

Các chỉ tiêu đếm được tính khoảng biến động, trung bình, giá trị xuất hiện nhiều nhất (Mode) và tần số xuất hiện của giá trị này. Các chỉ tiêu đo được tính tỉ lệ so với chiều dài chuẩn hoặc chiều dài đầu. Tỉ lệ các chỉ tiêu hình thái đo của hai loài cá này được so sánh bằng phương pháp ANOVA một nhân tố. Việc xử lý số liệu được thực hiện bằng chương trình Excel và SPSS 16.0.

2.4.2 Số liệu di truyền

Chương trình Finch TV 1.4.0 (<http://www.geospiza.com>) được sử dụng kết hợp với chương trình MEGA 6.0 (Tamura và *ctv.*, 2013) để kiểm tra chất lượng và trình tự 2 chiều của mỗi gene cho mỗi mẫu. Từ đó, những vị trí không trùng khớp được chỉnh sửa bằng cách chọn nucleotide có giá trị chất lượng (Q) lớn hơn. Mỗi quan hệ loài được tính dựa trên thuật toán “Maximum Composite Likelihood” với độ lặp lại (Bootstrapping) 1000 lần và được thực hiện bằng chương trình MEGA 6.0. Sau đó, trình tự gene của hai loài cá bóng trôn được so sánh với cơ sở dữ liệu của Genbank thông qua chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3 KẾT QUẢ

3.1 Đặc điểm hình thái của hai loài bóng trôn

Hình thái bên ngoài của hai loài có một số đặc điểm giống nhau. Chúng đều có thân dạng trụ, mắt tròn to. Mõm nhọn, hàm trên ngắn hơn hàm dưới. Miệng rộng và xiên. Cơ gốc vi ngực phát triển, có 1 đốm đen ở giữa và 2 đốm đỏ (đôi khi vàng ở loài

B. humeralis) bao quanh, vi ngực có màu trắng. Hai vi lưng tách biệt nhau. Vi đuôi màu đen. Thân cá có các đốm nhỏ màu đỏ hoặc màu trắng vàng. Vây nhỏ phân bố khắp thân.

Tuy nhiên, chúng khác nhau ở màu sắc phần đầu và vị trí các vi. Ở phần đầu, loài *B. butis* có 3 vạch màu đen xuất phát từ phần dưới của mắt đến phần dưới cùng của xương nắp mang, giữa mắt có màu đen đậm, xung quanh được bao bọc bởi viền vàng đậm. Trong khi đó, loài *B. humeralis* không có các vạch đen này và viền mắt màu trắng nhạt, bên trong mắt không có màu đen đậm và giữa mắt có một vệt trắng. Trong nghiên cứu của Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng (2013) điểm khác biệt giữa hai loài về các vạch xuất phát từ phần dưới của mắt không được đề cập. Về vị trí các vi, điểm bắt đầu của vi lưng thứ hai ở loài *B. butis* trước điểm bắt đầu của vi hậu môn nhưng ở loài *B.*

humeralis hai điểm này ngang nhau. Cả hai loài đều có điểm kết thúc của vi lưng thứ hai và vi hậu môn ngang nhau. Điểm khác biệt về vị trí vi lưng và vi hậu môn của loài *B. butis* phù hợp với nghiên cứu của Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương (1993). Khác với kết quả nghiên cứu này, Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng (2013) nhận thấy điểm bắt đầu vi hậu môn của loài *B. humeralis* nằm sau điểm bắt đầu của vi lưng thứ hai.

Các chỉ tiêu đếm ở hai loài không có sự khác biệt (Bảng 1). Các vi lưng, vi bụng và vi hậu môn đều có 1 tia vi cứng và số lượng tia mềm dao động trong khoảng giống nhau. Chúng chỉ khác nhau ở giá trị xuất hiện nhiều nhất (Mode) và giá trị trung bình ở số lượng tia mềm của vi lưng và vi ngực. Số lượng tia vi ngực ở *B. humeralis* có 18 tia vi, xuất hiện ở 85% số mẫu, trong khi đó *B. butis* có 16 tia vi ngực với tần suất xuất hiện 62%.

Bảng 1: So sánh các chỉ tiêu đếm của hai loài cá bống trôn

Chỉ tiêu	Giá trị	Nghiên cứu này		Nghiên cứu trước (**)	
		<i>B. butis</i>	<i>B. humeralis</i>	<i>B. butis</i>	<i>B. humeralis</i>
1. Tia vi lưng mềm	GTXHNN*(%)	8 (73%)	9 (85%)		
	TB	8,14± 0,52	8,81 ± 0,40		
	KBĐ	7 – 9	8 – 9	9	9
2. Tia vi ngực	GTXHNN*(%)	16 (62%)	18 (85%)		
	TB	16,41±1,07	18,22 ± 0,51		
	KBĐ	15 – 20	18 – 20	18-19	18-19
3. Tia vi hậu môn mềm	GTXHNN*(%)	9 (44%)	9 (88%)		
	TB	8,09 ± 0,92	8,81 ± 0,48		
	KBĐ	6 – 9	7 – 9	9	8
4. Tia vi đuôi	GTXHNN*(%)	15 (78%)	15 (62%)		
	TB	14,86 ± 0,47	15,67 ± 0,55		
	KBĐ	14 – 16	15 – 17	19	-

Ghi chú: (*) GTXHNN: giá trị xuất hiện nhiều nhất (phần trăm của giá trị xuất hiện nhiều nhất), TB: trung bình, KBĐ: Khoảng biến động

(**) Nghiên cứu của Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng (2013)

So với các nghiên cứu trước Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương(1993), Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng (2013) thì các chỉ tiêu đếm trong

nghiên cứu này có kết quả tương tự, ngoại trừ số tia vi đuôi.

Bảng 2: Trung bình (± độ lệch chuẩn) tỉ lệ số đo của hai loài cá bống trôn

Tỉ lệ	<i>B. butis</i>	<i>B. humeralis</i>
1. Dài đầu/khoảng cách hai mắt	6,54 ± 2,05 ^a	5,33 ± 1,15 ^b
2. Cao thân/cao cuống đuôi	2,48 ± 0,32 ^a	2,32 ± 0,32 ^b
3. Dài chuẩn/dài đầu	3,51 ± 0,24 ^a	3,45 ± 0,29 ^a
4. Dài đầu/dài mõm	3,80 ± 0,48 ^a	3,76 ± 0,40 ^a
5. Dài chuẩn/cao thân	5,94 ± 0,9 ^a	5,96 ± 0,91 ^a
6. Dài cuống đuôi/cao cuống đuôi	3,69 ± 0,5 ^a	3,48 ± 0,45 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng có cùng chữ cái thì khác biệt nhau không có ý nghĩa ($p > 0,05$)

Cùng với các chỉ tiêu đếm, các chỉ tiêu đo giữa hai loài cũng được so sánh. Kết quả (Bảng 2) cho thấy ở hai loài cá này khác biệt không có ý nghĩa ($p>0,05$) ở các tỷ lệ: dài chuẩn/dài đầu, dài chuẩn/cao thân, dài đầu/dài mõm và dài cuống đuôi/cao cuống đuôi. Tuy nhiên, tỷ lệ dài đầu/khoảng cách hai mắt và cao thân/cao cuống đuôi loài *B. humeralis* lớn hơn có ý nghĩa ($p<0,05$) so với loài *B. butis*. Kết quả này phù hợp với

nghiên cứu của Trần Đắc Định và ctv. (2013).

3.2 So sánh trình tự gene COI của hai loài bống trên *B. butis* và *B. humeralis*

Đoạn gene COI được chọn để phân tích có chiều dài là 662 bp. Tỷ lệ các loại nucleotide ở hai loài này đều tương đương nhau (Bảng 3). Trong đó, Thymine (T) chiếm tỷ lệ cao nhất (trung bình 30,6%) thấp nhất là Guanine (trung bình 18,7%).

Bảng 3: Tỷ lệ (%) các loại nucleotide của đoạn gene COI và khoảng cách di truyền (\pm SE) trong cùng một loài

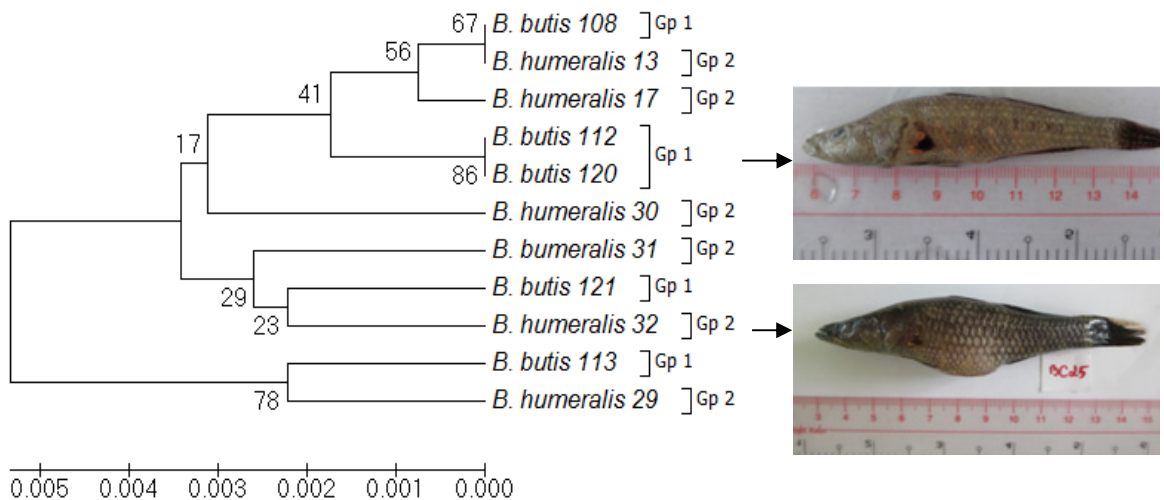
Loài	T	C	A	G	Khoảng cách di truyền*
<i>Butis butis</i>	30,5	26,7	24,2	18,6	0,003 \pm 0,001
<i>B. humeralis</i>	30,6	26,7	24,0	18,7	0,004 \pm 0,002

Ghi chú: Khoảng cách di truyền được ước lượng dựa trên "Kimura 2-parameter" và phương pháp bootstrapping với 1.000 lần lặp lại

Tỷ lệ thay đổi trình tự nucleotide trong cùng nhóm (Thymine và Cytosine, Adenine với Guanine) (9,02 – 25,58) cao hơn so với sự thay đổi giữa các nhóm (3,25 – 5,47). Khoảng cách di truyền trong cùng một loài ở loài *B. butis* là 0,003 \pm 0,001 và ở loài *B. humeralis* là 0,004 \pm 0,002 (Bảng 3). Trong khi đó, khoảng cách di truyền giữa hai loài là 0,003 \pm 0,001. Như vậy, khoảng cách di truyền giữa hai loài tương đương với khoảng cách trong cùng một loài. Trình tự gene COI của hai loài *B. butis* và *B. humeralis* có mức độ giống nhau đến

99 – 100%.

Cây di truyền thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các cá thể của 2 loài (Hình 1). Hai loài cá bống trên không tách thành hai nhánh riêng biệt mà các mẫu của chúng nằm xen kẽ nhau trong cùng những nhánh nhỏ. Đó là do những vị trí nucleotide khác biệt giữa các mẫu không cố định trong cùng một nhóm loài. Điều này chứng tỏ gene COI của hai loài này rất giống nhau và chúng là cùng một loài.



Hình 1: Cây di truyền của hai loài cá bống trên

Khi so sánh trình tự gene của chúng với cơ sở dữ liệu trên Genbank thì cả hai loài đều giống với trình tự của loài *B. butis* (Số truy cập KF714900.1) ở mức 86%.

4 THẢO LUẬN

Về đặc điểm hình thái, hai loài *B. butis* và *B. humeralis* giống nhau ở hình dạng cơ thể, các chỉ tiêu đếm và một số tỷ lệ số đo. Tuy nhiên, chúng khác nhau ở vạch và màu sắc của mắt, vị trí bắt đầu

của vi lung và vi hậu môn và tỉ lệ số đo... Sự khác biệt này có thể là do sự đa dạng hình thái trong cùng một loài. Một số nhà nghiên cứu cho rằng môi trường là nhân tố lớn nhất trong việc hình thành sự khác biệt hình thái giữa các quần thể (Norton *et al.*, 1995; Wainright, 1996). Trabelsi *et al.*, (2004) nhận thấy, ở hệ sinh thái nước lợ thường có sự thay đổi lớn về các thông số môi trường, các nhân tố này tác động mạnh lên quá trình chọn lọc ở các sinh vật. Điều này có thể lý giải cho sự khác biệt về đặc điểm hình thái của một số cá thể thuộc nhóm cá bóng trôn, loài phân bố rộng, chúng có thể sống ở cả vùng ngọt, lợ, mặn nhưng chủ yếu sống ở môi trường nước lợ. Cá bóng trôn sống ở các khu vực có điều kiện môi trường khác nhau có thể chịu tác động lên việc hình thành các đặc điểm hình thái khác nhau.

Giả thiết dựa trên kết quả hình thái rằng hai loài *B. butis* và *B. humeralis* có thể cùng một loài phù hợp với kết quả so sánh trình tự gene COI, chúng giống nhau ở mức 99-100%. Mức độ khác biệt giữa 2 loài này ($0,003 \pm 0,002$) tương đương với sự khác biệt trong cùng một loài (Bảng 3) và rất nhỏ so với sự khác biệt trung bình giữa các loài cùng một giống thuộc bộ phụ cá bóng 22,2% (Viswambharan *et al.*, 2013) hay 9,93% ở nhiều loài cá ở Úc (Ward *et al.*, 2005). Sự khác biệt giữa những cá thể cùng loài có thể khác nhau tùy theo giống loài, nhưng thường ở mức thấp (~ 1%) như ở các loài cá bóng ở Ấn Độ là 1,2% (Viswambharan *et al.*, 2013), cá ở Úc là 0,39% (Ward *et al.*, 2005). Khoảng cách này giữa 2 nhóm bóng trôn (0,3%) chứng tỏ chúng khác nhau trong phạm vi đa dạng của cùng một loài. Khi so trình tự gene COI của các mẫu cá trong nghiên cứu với cơ sở dữ liệu ở Genbank, kết quả cho thấy chúng giống 86% với trình tự gene của loài *B. butis* được báo cáo ở Genbank (Số truy cập KF714900.1, tác giả: Juguilon *et al.*, 2014, địa điểm: Philippines). Sự khác biệt lớn này chứng tỏ loài *B. butis* được định danh ở các tài liệu ở Việt Nam (Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993; Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng, 2013; Trần Đắc Định *et al.*, 2013) khác loài với *B. butis* trên Genbank. Như vậy, việc phân loại loài của cá *B. butis* trên thế giới chưa rõ ràng và cần tiếp tục được nghiên cứu trên phạm vi quốc tế để thống nhất trong cách định danh và hệ thống phân loại của các loài cá bóng đen.

Đối với loài *B. humeralis*, trên hệ thống phân loại Fishbase chưa có thông tin về đặc điểm phân loại và hình ảnh của loài này. Sự phân bố của

chúng chỉ được báo cáo ở 3 nước Indonesia, Thái Lan và Papua New Guinea (Fishbase.org, truy cập ngày 5/7/2015). Từ kết quả trong nghiên cứu và sự thiếu thông tin của loài *B. humeralis* trên thế giới, có thể có 2 khả năng xảy ra: (1) sự khác biệt về hình thái giữa 2 nhóm cá bóng trôn ở Đồng bằng sông Cửu Long là do sự đa dạng kiểu hình trong cùng một loài; hoặc (2) có 2 loài khác nhau, nhưng quá trình thu mẫu chỉ thu được 1 loài, các đặc điểm hình thái sử dụng để phân chia thành 2 nhóm cá không chính xác.

Một số loài cá khác cũng thể hiện sự đa dạng về hình thái trong cùng một loài được kiểm chứng bằng trình tự COI. Ví dụ, cá rô đầu vuông và cá rô đồng tự nhiên khác nhau về hình dạng đầu và nhiều chỉ tiêu hình thái đo nhưng có cùng trình tự gene COI (Đương Thúy Yên và Trương Ngọc Trinh, 2013; Đương Thúy Yên, 2014). Một ví dụ khác là ở cá hồi *Oncorhynchus mykiss*, loài này có 2 dòng với 2 tên gọi khác nhau, cá hồi vân rainbow trout và cá hồi búa steelhead. Chúng có hình dạng bên ngoài ở giai đoạn trưởng thành và đặc điểm vòng đời khác nhau (cá hồi búa di cư từ sông ra biển để sinh sản, hồi vân sống trong nước ngọt) nhưng đều cùng một loài (Docker & Heath 2003, Pearse *et al.*, 2009). Kết quả phân tích trình tự một số gene ti thể gồm 16S, Cytochrome b genes và D-loop sequences cho thấy 2 dòng chỉ khác nhau 1 – 2 vị trí nucleotide và không cố định giữa 100 mẫu quan sát (Docker and Heath 2003). Ngược lại, một số loài có hình dạng bên ngoài giống nhau nhưng sự khác biệt di truyền dựa trên gene COI cho thấy chúng khác loài. Ở Châu Phi, một nhóm cá được gọi là loài “Acará” được phân tích gene COI và gene 12S rRNA cho thấy chúng gồm 7 loài khác nhau (Ardura *et al.*, 2010). Kết quả nghiên cứu trên hai nhóm cá bóng trôn cùng những ví dụ nêu trên càng chứng tỏ những trường hợp định danh loài bằng phương pháp hình thái chưa thuyết phục cần kết hợp với ứng dụng phương pháp DNA mã vạch. Có thể 2 hay nhiều gene mã vạch cần được kiểm tra trong những trường hợp khó như cá bóng trôn.

5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1 Kết luận

Tuy có một vài đặc điểm hình thái khác nhau nhưng hai nhóm cá bóng trôn đã được xem là 2 loài *B. butis* và *B. humeralis* được thu trong nghiên cứu này giống nhau về hình dạng cơ thể, màu sắc, các chỉ tiêu đếm và có trình tự gene COI tương đồng đến 99-100%. Kết quả này chứng tỏ 2 nhóm cá trong nghiên cứu này là cùng một loài.

5.2 Đề xuất

Tiếp tục thu mẫu cá bống trôn với số lượng nhiều hơn và việc định danh hình thái cần có sự tham gia của một số chuyên gia phân loại cá. Đồng thời, mở rộng phạm vi nghiên cứu các nhóm cá bống trôn ở trong khu vực Đông Nam Á để xác định chính xác loài *B. butis* và loài *B. humeralis* cũng như xác định thành phần loài họ *Eleotridae*. Áp dụng đồng thời 2 hay nhiều gene mã vạch đối với các nhóm cá bống trôn có đặc điểm hình thái khác nhau.

Mở rộng khả năng ứng dụng chỉ thị phân tử vào việc định danh các loài cá nói chung và các loài cá còn lại thuộc họ *Eleotridae* nói riêng, nhằm hoàn chỉnh hệ thống phân loại của họ cá bống đen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ardura, A., Ana, R.L., Josino, C.M. and Eva, G.V., 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation* 143, 1438 – 1443.
- Docker, M. F., and Heath, D. D., 2003. Genetic comparison between sympatric anadromous steelhead and freshwater resident rainbow trout in British Columbia, Canada. *Conservation Genetics* 4, 227–231.
- 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 29, 86-95.
- Dương Thúy Yên, 2014. So sánh trình tự một số gene mã vạch của cá rô đầu vuông và cá rô đồng tự nhiên (*Anabas testudineus* Bloch, 1792). *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ*. Số 30, 29-36.
- Fishbase. Truy cập tại www.fishbase.org, ngày 5/7/2015.
- Gill, A.C., and Mooi, A.D., 2012. Thalasseleotrididae, new family of marine gobioid fishes from New Zealand and temperate Australia, with a revised definition of its sister taxon, the Gobiidae (Teleostei: Acanthomorpha). *Zootaxa* 3266: 41-52.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 313-321.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., Burrige, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J., and Bernatchez, L., 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos ONE* 3, e2490-2490.
- Ivanova, N.V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., and Hebert, P.D.N., 2007. Universal Primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. 7, 544-548.
- Kartavtsev, Y.P., Lee, J.S., 2006. Analysis of nucleotide diversity at genes Cyt-b and Co-1 on population, species and genera levels. Applicability of DNA and allozyme data in genetics of speciation. *Russ. J. Genet.* 42, 341-362.
- Mai Đình Yên, Nguyễn Văn Trọng, Nguyễn Văn Thiện, Lê Hoàng Yên và Hứa Bạch Loan, 1992. Định loại các loài cá nước ngọt Nam Bộ. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội. 347 trang.
- Marko, P.B., Lee, S.C., Rice, A.M., Gramling, J.M., Fitzhenry, T.M., McAlister, J.S., Harper, G.R. and Moran, A.L., 2004. Fisheries: Mislabeled of a depleted reef fish. *Nature* 430, 309-310.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, fourth ed. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.
- Norton, S.F., Luczkovich, J.J., Motta, P.J., 1995. The role of ecomorphological studies in the comparative biology of fishes. *Environment. Biology. Fish.* 44, 287-304.
- Pearse, D.E., Hayes, S. A., Bond, M. H., Hanson, C.V., Anderson, E.C., MacFarlane, R.B. and Garza, J.C., 2009. Over the falls? Rapid evolution of ecotypic differentiation in steelhead/rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Heredity* 100, 515–525.
- Rainboth, W.J., 1996. *Fishes of the Cambodian Mekong*. Food and agriculture organization of the united nations, Rome. 194-196.
- Steinke, D., Zemlak, T.S., Boutillier, J.A., and Hebert, P.D.N., 2009a. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar Biol.* 156, 2641-2647.
- Steinke, D., Zemlak, T.S., and Hebert, P.D.N., 2009b. Barcoding Nemo: DNA-Based

- identifications for the ornamental fish Trade. Plos ONE 4, e6300.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S., 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*. 30, 2725-2729.
- Thacker, C. E., 2003. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:354–368.
- Trabelsi, M., Maamouri, F., Quignard, J.-P., Boussaid, M., Faure, E., 2004. Morphometric or morpho-anatomical and genetic investigations highlight allopatric speciation in Western Mediterranean lagoons within the *Atherina lagunae* species (Teleostei, Atherinidae). *Estuar. Coast. Shelf Sciences*. 61,713-723.
- Trần Đắc Định, Shibukawa Koichi, Nguyễn Thanh Phương, Hà Phước Hùng, Trần Xuân Lợi, Mai Văn Hiếu và Utsugi Kenzo, 2013. Mô tả định loại cá Đòng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Đại học Cần Thơ*. 174 trang.
- Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993. Định loại các loài cá nước ngọt vùng Đòng bằng sông Cửu Long. *Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ*. 361 trang.
- Viswambharan, D., Pavan-Kumar, A., Singh, P.D., Jaiswar, A.K., Chakraborty, S.K., Nair, J.R., Lakra, W.S., 2013. DNA barcoding of gobiid fishes (Perciformes, Gobioidae). *Mitochondrial DNA*, 1-5.
- Võ Thành Toàn và Hà Phước Hùng, 2013. Thành phần loài và mức độ phong phú của các loài cá bống thuộc họ Eleotridae trên sông Hậu. *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ*. Số 29, 86-95.
- Wainwright, P.C., 1996. Ecological explanation through functional morphology: the feeding biology of sunfishes. *Ecology* 77, 1336-1343.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., and Hebert, B.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*. 360, 1847-1857.