

XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA *CYTOCHROME B* CỦA HỆ GEN TY THỂ VÀ ĐÁNH GIÁ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ LOÀI CÁ SONG (*EPINEPHELUS* SPP.) NUÔI THẢ TẠI CÁC VÙNG BIỂN VIỆT NAM

Nguyễn Anh, Nguyễn Duy Huy, Đỗ Văn Thu, Nguyễn Bích Nga, Lê Thanh Hòa

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Cá song (*Epinephelus* spp) rất đa dạng về loài và có giá trị cao đạt tiêu chuẩn xuất khẩu. Vùng biển Việt Nam có tới trên 30 loài cá song phân bố ở một số tỉnh duyên hải như: Hải Phòng, Đồng Nai, Nha Trang, Quảng Ninh, Nghệ An, Đà Nẵng, Phú Yên, Khánh Hòa, Vũng Tàu. Tám mẫu cá song nuôi thả ở các bờ biển Việt Nam đã được thu thập, tách chiết DNA, thu nhận gen mã hóa *cytochrome b* của hệ gen ty thể (*cob*) và giải trình tự. Tổng cộng có đến 51 sự sai khác nucleotide nhưng chỉ có 8 sai khác amino acid giữa 8 mẫu nghiên cứu của Việt Nam. Sáu mẫu EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9 và EpS10 có mức độ đồng nhất 100% với các trình tự nucleotide cá song *Epinephelus coicoides* (Trung Quốc), 2 mẫu còn lại EpS3 và EpS8 có chỉ số tương đồng thấp. Các mẫu EpS1, EpS2, EpS5 có sự đồng nhất rất cao, chỉ có 3 sự sai khác nucleotide. Hai mẫu EpS3 và EpS8 chỉ có 1 sự sai khác nucleotide ở vị trí thứ 28, nhưng chúng có mức độ đồng nhất là 89% tương đương với 41 sự sai khác nucleotide với chủng *E. fuscoguttatus*. Phân tích phả hệ cho thấy, 6 mẫu của Việt Nam EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9 và EpS10 thuộc nhóm 1 cùng với loài cá song chấm cam (*E. coicoides*), và 2 mẫu EpS3 và EpS8 nằm trong nhánh phả hệ khác và có thể là loài cá song thuộc giống *E. fuscoguttatus*.

Từ khóa: Cá song, *Epinephelus*, phả hệ, trình tự gen *cob*, tương đồng, ty thể

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, nghề nuôi trồng thủy sản tại các bờ biển đang phát triển mạnh mẽ. Các giống cá song (*Epinephelus*) rất đa dạng, cá song thuộc họ phụ Epinephelinae có 159 loài thuộc 15 giống, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Riêng ở Việt Nam, có tới trên 30 loài cá song, trong đó có 8 loài được ưa chuộng vì giá trị cao đạt tiêu chuẩn xuất khẩu: *Epinephelus brunneus*, *E. merra*, *E. coicoides*, *E. akaara*, *E. megechir*, *E. tauvina*, *E. fuscoguttatus*, *E. heeberi* (Hình 1). Sự lựa chọn con giống qua màu sắc hình thái bên ngoài khó chính xác, mà nguồn cung cấp con giống không giống nhau về cả chủng loại, vùng địa lý, khí hậu, dẫn đến khó thích nghi, phát triển sinh trưởng và sinh sản tốt ở những điều kiện địa lý khí hậu vùng nuôi khác.

Trên thế giới, trong lĩnh vực nuôi thả giống cá biển, đã có những công trình nghiên cứu sử dụng kỹ thuật chỉ thị phân tử để nghiên cứu tính đa hình di truyền, đánh giá, chọn lọc, tạo giống cá biển nói chung và giống cá song nói riêng. DNA là cơ sở vật chất mang thông tin di truyền đặc trưng cho mỗi loài sinh vật nói chung và cá thể nói riêng. Ngày nay, sinh học phân tử thực sự được ứng dụng rộng rãi và

đã trở thành lĩnh vực quan trọng để khám phá hệ gen bên trong nghiên cứu cấu trúc, mối tương quan và biểu hiện gen của đối tượng. Khi phân biệt tính thuần chủng và tổ hợp lai các loài, nếu hoàn toàn dựa vào đặc tính ngoại hình (hình thái) sẽ không đảm bảo cơ sở vững vàng về di truyền học, có nguy cơ sẽ dẫn đến những nguy hại trong những thế hệ tiếp theo nhau (Quyền Đình Thi *et al.*, 2005). Đặc biệt, trong công tác tạo giống và lưu trữ nguồn gen quý hiếm và có giá trị kinh tế nhằm nâng cao chất lượng về các nghiên cứu cơ bản về vấn đề tư liệu hóa các chỉ tiêu di truyền học của các loài động vật đang được lưu trữ, nuôi trồng, nhất là những loài dòng có quan hệ họ hàng rất gần nhau, nhưng lại có sai khác về cấu trúc gen. Tuy nhiên, sự phân loại các đặc điểm hình thái không thể xác định được sự sai khác giữa chúng (Nguyễn Mộng Hùng *et al.*, 2001). Do đó, việc kết hợp ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong việc nghiên cứu tính đa hình di truyền của một số loài cá song có giá trị kinh tế đang được lưu trữ nuôi giống là sự cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn trong giai đoạn hiện nay. Kỹ thuật DNA và kỹ thuật protein mang lại tính chính xác đặc tính di truyền học của cá thể giúp ta có thể xác định tính đa dạng di truyền cũng như lập bản đồ gen của từng khu vực nhất định trong hệ gen của loài. Hệ gen ty thể cung

cấp các chỉ thị di truyền phân tử có giá trị định loại và được ứng dụng rộng rãi trên thế giới, trong đó có giám định, phân loại và phá hệ cá song (*Epinephelus*) sử dụng chỉ thị di truyền gen 16S rDNA (Craig *et al.*, 2001) và *cob* (Ding *et al.*, 2006).

Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu quá trình phân lập, tách dòng và khảo sát thành phần nucleotide và amino acid của gen mã hóa *cytochrome b* hệ gen ty thể của một số loài cá song có giá trị kinh tế cao thu thập tại vùng biển Việt Nam.



Hình 1. Cá song chấm cam (*E. coioides*), một loài có giá trị kinh tế cao được nuôi thả tại Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguyên liệu dùng để tách DNA tổng số là các mẫu thịt và/hoặc gan cá song thu thập ở các tỉnh Hải Phòng, Đồng Nai và Nha Trang.

Tách chiết DNA tổng số, chọn mẫu và PCR

Chúng tôi sử dụng bộ hóa chất QIAamp DNA kit (QIAGEN) để tách chiết DNA tổng số, gồm DNA nhân và DNA ty thể.

Trong phản ứng PCR, chúng tôi thiết kế và sử dụng cặp mồi:

EcobF: 5'- ATGGCHAGCCTTCGHAAA -3'

EcobR: 5'- GATATTTGTCCTCAGGGGAG -3'

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PTC - 100 (MJ Inc, Mỹ) với chu trình nhiệt: 94°C - 5 phút; 40 chu kỳ: (94°C - 1 phút, 54°C - 1 phút, 68°C - 4 phút); 68°C - 10 phút; bảo quản ở 4°C.

Tinh sạch và tách dòng sản phẩm

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ hóa chất QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) và được dòng hóa vào vector pCR2.1TOPO của bộ hóa chất

TA Cloning Kit (Invitrogen Inc). Chọn lọc khuẩn lạc theo phương pháp kháng sinh và chỉ thị màu (Sambrook, Russell, 2001). DNA plasmid tái tổ hợp được tách chiết với các bộ hóa chất QIA Spin Minipreps DNA Kit (QIAGEN). Sản phẩm plasmid tái tổ hợp được cắt bằng enzyme hạn chế *EcoRI*, kiểm tra trên gel 1% agarose.

Giải trình tự và phân tích số liệu

Chuỗi DNA thu được giải trình tự trên máy giải trình tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Mỹ).

Sắp xếp và đối chiếu trình tự chuỗi nucleotide tương ứng bằng hệ chương trình Assembly LIGN1.9 và MacVector8.2 (Accelrys Inc) trên máy tính Macintosh. Trình tự amino acid được dịch mã theo bảng mã di truyền hệ gen ty thể loài có xương sống được quy định trong GenBank. Chuỗi nucleotide và amino acid được sử dụng truy cập GenBank thông qua chương trình BLAST.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng và thu nhận chuỗi gen *cob* của các loài cá song của Việt Nam

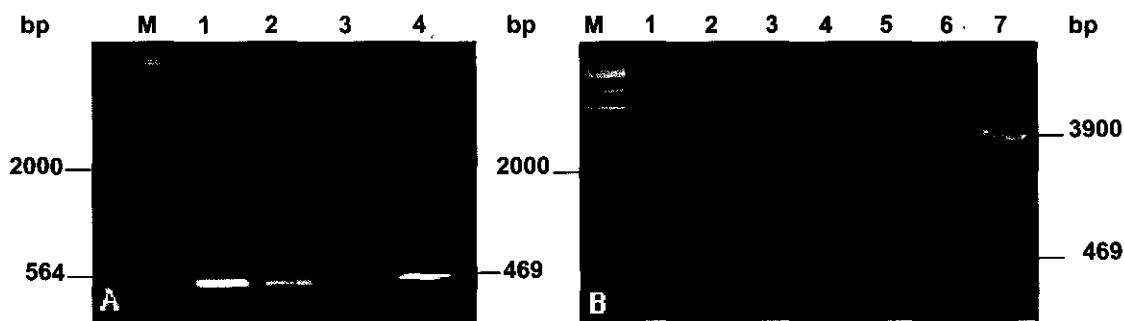
Chúng tôi sử dụng bộ hóa chất của hãng

QIAGEN, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi: EcobF - EcobR.

Sau phản ứng PCR, các sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarose (Hình 2A), kết quả thu được các đoạn DNA có độ dài khoảng 500 bp. Kết quả này hoàn toàn phù hợp lý thuyết.

Như vậy, bằng phương pháp tách chiết DNA sử dụng bộ kit QIAamp DNA kit (QIAGEN) chúng tôi đã tách chiết thành công DNA của các mẫu cá song của Việt Nam. Sản phẩm PCR được tinh sạch và

được dòng hóa vào vector pCR2.1TOPO, sau đó chuyển nạp vào tế bào *E. coli* INV-F'. Tế bào này được nuôi cấy trên môi trường agar giàu dinh dưỡng (SOC) có bổ sung kanamycin và X-gal. Sau khi ủ lắc qua đêm, chúng tôi chọn lọc khuẩn lạc đơn dòng. Sau khi tinh sạch các plasmid được cắt bằng enzyme hạn chế *EcoRI* để kiểm tra đoạn chèn. Kết quả tách dòng các khuẩn lạc của vi khuẩn tái tổ hợp chứa 2 đoạn gen được trình bày ở Hình 2B. Sản phẩm PCR của gen *cob* của tất cả các chủng cá song của Việt Nam có độ dài khoảng 500 bp.



Hình 2. Điện di sản phẩm đoạn gen *cob* (A) và DNA plasmid tái tổ hợp (B) của một số mẫu cá song của Việt Nam. 1: EpHp, 2: EpS1, 3: EpS2, 4: EpS3, 5: EpS5, 6: EpS8, 7: EpS9, M: DNA marker.

Phân tích so sánh trình tự nucleotide đoạn gen *cob* giữa các chủng

Chuỗi gen *cob* (gồm 368 nucleotide) của 16 mẫu cá song khác trên thế giới (Bảng 1), bao gồm các loài của Trung Quốc (7 mẫu), Italy (3 mẫu), Mỹ (3 mẫu), Tây Ban Nha (3 mẫu) được thu thập từ Ngân hàng gen và so sánh với 8 mẫu cá song của Việt Nam. Trình tự so sánh nucleotide của đoạn gen *cob* các loài *Epinephelus* spp. được trình bày ở hình 3. Tỷ lệ tương đồng về thành phần nucleotide được thể hiện ở bảng 2.

So sánh thành phần nucleotide của các mẫu cho thấy: Ngoại trừ 2 chủng EpS3 và EpS8 có mức độ sai khác biến thiên khá lớn, 6 chủng cá song còn lại của Việt Nam EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9 và EpS10 có mức độ tương đồng rất cao với chủng cá song *E. coicoides* của Trung Quốc. Cụ thể, kết quả cho thấy, tổng cộng có đến 51 sự sai khác nucleotide và chỉ có 8 sai khác về amino acid giữa 8 chủng nghiên cứu của Việt Nam. Sáu chủng của Việt Nam EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9 và EpS10 có mức độ đồng nhất 100% với các trình tự nucleotide với cá song *E. coicoides* (Trung Quốc) và có 4 sự sai khác amino acid với 2 chủng EpS3 và EpS8, 2 chủng còn

lại (EpS3 và EpS8) có chỉ số tương đồng thấp. Các chủng EpS1, EpS2, EpS5 có sự đồng nhất rất cao, giữa chúng có 3 sự sai khác nucleotide. Chỉ có 1 sự sai khác về thành phần nucleotide ở vị trí thứ 28 giữa 2 chủng EpS3 và EpS8 nhưng không tìm thấy sự sai khác về amino acid, chúng có mức độ đồng nhất là 89% và có tới 41 sự sai khác nucleotide với chủng *E. fuscoguttatus* (đánh số 16, Bảng 1).

Phân tích mối quan hệ phả hệ giữa các loài cá song của Việt Nam và thế giới

Phả hệ của 24 chủng cá song thuộc các loài khác nhau, trong đó có 8 chủng của Việt Nam do chúng tôi thu nhận (liệt kê ở Bảng 1) được trình bày ở hình 5.

Các chủng cá song chia làm thành 2 nhánh riêng biệt:

Nhánh 1: Bao gồm các chủng EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9, EpS10. Thành phần nucleotide của các chủng này có mức độ tương đồng nhất 100% với cá song Trung Quốc (Ding *et al.*, 2006). Trong nhánh này, lại phân thành 2 nhóm phụ:

i) Nhóm 1 bao gồm 3 chủng EpHP, EpS9,

EpS10, giữa chúng chỉ có 1 sự sai khác nucleotide (vị trí thứ 9) (Hình 3). Kết quả này cho thấy, các chủng cá song của Cát Bà (Hải Phòng) và Nha Trang có cùng nguồn gốc di truyền.

ii) Nhóm II: Có 3 chủng EpS1, EpS2, EpS5. Mức độ đồng nhất về thành phần nucleotide giữa chúng rất cao (99%).

Nhánh 2: Chủng EpS3 và EpS8 (Hải Phòng),

giữa chúng chỉ có 1 sự sai khác nucleotide cho thấy chúng có độ đồng nhất cao so với chủng *E. fuscoguttatus*.

Như vậy, một số mẫu cá song Việt Nam ở Hải Phòng, Đồng Nai, Nha Trang đều thuộc về loài *E. coicoides* và nằm trong nhóm cá song của Trung Quốc. Hai chủng EpS3 và EpS8 (Hải Phòng) có thể thuộc loài *E. Fuscoguttatus*.

Bảng 1. Danh sách các loài *Epinephelus* sử dụng để phân tích gen *cob* giữa các chủng Việt Nam và thế giới.

Đánh số	Ký hiệu	Nguồn gốc	Độ dài gen (bp)	Năm phân lập	Đăng ký trong GenBank
1	EpHP	Hải Phòng, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
2	EpS1	Hải Phòng, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
3	EpS2	Đồng Nai, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
4	EpS3	Hải Phòng, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
5	EpS5	Hải Phòng, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
6	EpS8	Hải Phòng, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
7	EpS9	Hải Phòng, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
8	EpS10	Nha Trang, Việt Nam	368	2007	đang đăng ký
9	Ecoi1	Biển phía Nam Trung Quốc	368	2006	AY738240
10	Ecoi2	Trung Quốc	368	2006	DQ448043
11	Ecoi3	Trung Quốc	368	2006	DQ448044
12	Ecoi	Trung Quốc	368	2006	DQ448045
13	Ecan	Biển Địa Trung Hải (Italy)	368	2001	AJ420204
14	Edru	Biển Trung Mỹ (Mỹ)	368	2004	AY313997
15	Efar	Biển phía Nam Trung Quốc	368	2006	DQ486930
16	Efus	Biển phía Nam Trung Quốc	368	2006	DQ486929
17	Ehai	Biển Địa Trung Hải (Italy)	368	2001	AJ420207
18	Elab	Biển Trung Mỹ (Mỹ)	368	2004	AY426255
19	Emal	Biển phía Nam Trung Quốc	368	2006	AY738244
20	Emar1	Tây Ban Nha	368	2004	AB179760
21	Emar3	Tây Ban Nha	368	2004	AB179761
22	Emar4	Tây Ban Nha	368	2004	AB179762
23	Emar	Biển Địa Trung Hải (Italy)	368	2001	AJ420205
24	Emul	Biển Trung Mỹ	368	2004	AY426254

		*	20	*	40	*	60	*	80	*																			
EphP	:	GC	ACTAGT	TG	CACTCC	CAGCAC	CCCTCC	CAACATT	TC	CAATTG	ATGAAATTC	CGGCTCG	CTACTCG	GACTCT	CGCCTT	ATTGCT	CAAAATTC	CTCACA	:	93									
Eps1	:	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Eps2	:	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Eps3	:	.	.	.	A	.	C	.	G	.	AG	C	.	C	.	AT	.	CT	.	C	:	93							
Eps5	:	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Eps8	:	.	.	.	A	.	C	.	.	AG	C	.	C	.	AT	.	CT	.	C	:	93								
Eps9	:	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Eps10	:	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Ecoi	:	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Ecoi (I)	:	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Ecoi (II)	:	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Ecoi (III)	:	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	:	93								
Ecan	:	.	.	.	A	T	.	C	.	.	GG	C	G	.	T	.	A	.	A	.	C	G	T	:	93				
Edru	:	.	.	.	A	.	.	C	T	.	C	GG	C	.	T	.	C	C	T	G	.	CT	G	T	G	:	93		
Efar	:	.	.	.	A	.	T	C	.	.	AG	C	.	G	C	T	T	A	.	A	.	A	C	G	:	93			
Efus	:	.	.	.	C	.	.	C	.	.	AG	C	.	C	T	.	A	.	.	T	CGC	.	C	:	93				
Ehai	:	.	.	.	A	T	T	.	C	.	GG	C	G	.	C	T	.	A	C	.	CT	C	T	:	93				
Elab	:	.	.	.	T	.	A	.	C	.	C	GG	C	G	.	C	T	.	A	.	C	C	C	C	T	:	93		
Emal	:	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	T	.	A	.	.	T	.	C	:	93					
Emar1	:	.	.	.	A	.	.	C	.	.	AG	C	.	T	T	A	T	G	.	T	.	C	.	T	:	93			
Emar3	:	.	.	.	A	.	.	C	.	.	AG	C	.	T	T	A	T	G	.	T	.	C	.	T	:	93			
Emar4	:	.	.	.	A	.	.	C	.	.	AG	C	.	T	T	A	C	G	.	T	.	C	.	T	:	93			
Emar	:	.	.	.	A	.	.	C	.	.	AG	C	.	T	T	A	C	G	.	T	.	C	.	T	:	93			
Emul	:	.	.	.	T	.	A	.	C	.	T	.	AG	C	.	G	.	T	.	A	G	A	.	C	A	G	C	:	93

	100	*	120	*	140	*	160	*	180	
EpHP	:	GGCCTATTCTAGCCATACATTACATCAGACATCGCCACAGCCTTCTCATCCGTTGCCCATATTTGCCGAGACGTA	:	AACTACGGCTGACTC	:	186				
EpS1	:		:	T.....	:	186				
EpS2	:		:		:	186				
EpS3	:	T.....	:	T.T.....	:	186				
EpS5	:		:	T.CA.....	:	186				
EpS8	:		:	C.T.G.T.....	:	186				
EpS9	:		:	G.T.T.....	:	186				
EpS10	:		:	T.....	:	186				
Ecoi	:		:	T.CA.....	:	186				
Ecoi (I)	:		:	C.T.G.T.....	:	186				
Ecoi (II)	:		:	G.T.T.....	:	186				
Ecoi (III)	:		:		:	186				
Ecan	:	C.....	:		:	186				
Edru	:	C.G.....	:	G.T.T.....	:	186				
Efar	:	C.....	:	G.....	:	186				
Efus	:	T.CT.....	:	T.....	:	186				
Ehai	:	C.....	:	C.....	:	186				
Elab	:	CT.....	:	T.....	:	186				
Emal	:	T.....	:	A.....	:	186				
Emar1	:	G.C.....	:	C.....	:	186				
Emar3	:	G.C.....	:	C.....	:	186				
Emar4	:	G.C.....	:	C.....	:	186				
Emar	:	G.C.....	:	C.....	:	186				
Emul	:	C.....	:	T.....	:	186				

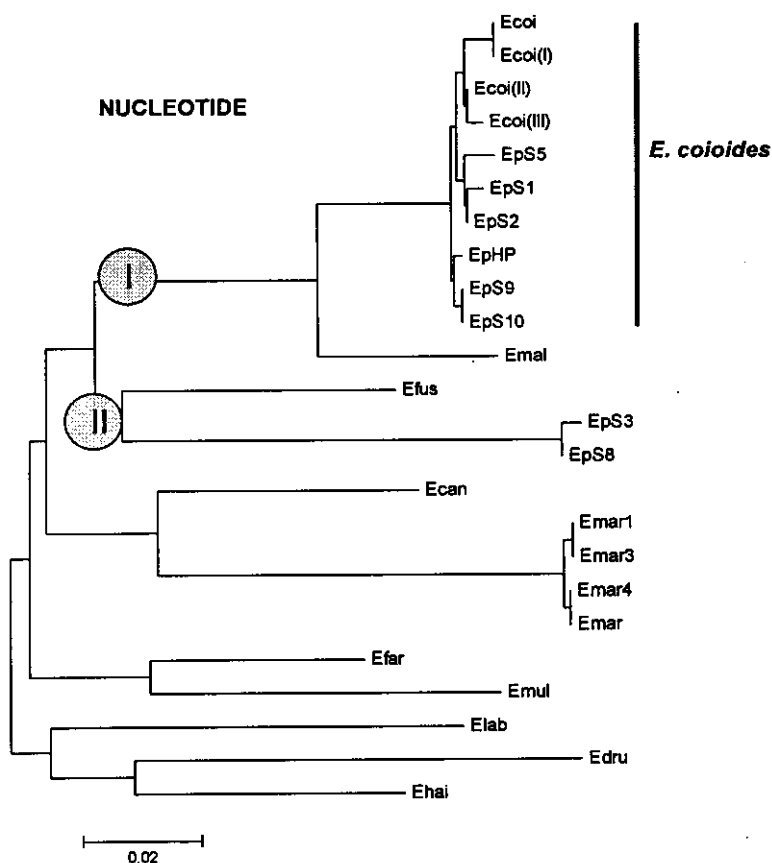
	* 200	* 220	* 240	* 260	* 28
EpHP	: ATCCGCAACATACATGCCAACGGCGCCTCCTTCTTCTTTATTGTATTATGCCACATTGACGAGGGCTTTACTACGGCTCTTACCTTTAC	: 279			
EpS1	:	: 279			
EpS2	:	: 279			
EpS3	: . . . T . . . A . . . C . . . T . C . . . CT . A . C . . . C . . . A . . . T . C . T . C . .	: 279			
EpS5	: T	: 279			
EpS8	: . . . T . . . A . . . C . . . T . C . . . CT . A . C . . . C . . . A . . . T . C . T . C . .	: 279			
EpS9	:	: 279			
EpS10	:	: 279			
EcoI	:	: 279			
EcoI (I)	:	: 279			
EcoI (II)	:	: 279			
EcoI (III)	:	: 279			
Ecan	: C . . . G . . . C . C . . . T . T . . . C . . . C . C . T .	: 279			
Edru	: . . T . T . T . . C . . . A . . . C . C . C . . T . C . . . C . . . C . . .	: 279			
Efar	: . . . T . T . . . T . A . . . C . . . C . C . C . . C . . . A . . . T . C . . .	: 279			
Efus	: . . . A . . . A . . . C . C . . . C . . . A . . . A . . . C . C . C . T .	: 279			
Ehai	: . . . T . T . . . T . G . . . T . . . C . C . . . C . . . A . C . . . C . . .	: 279			
Elab	: . . . T . T . G . . T . T . G . . T . . . C . C . C . C . A . . . A . C . T . . C . C . T .	: 279			
Emal	: G . . . T . . . C . . . C . . . A . . . T . . . C . . . C . T .	: 279			
Emar1	: . . . T . G . C . . G . . . C . C . . . C . T . T . . C . . . T . T . C . .	: 279			
Emar3	: . . . T . G . C . . G . . . C . C . . . C . T . T . . C . . . T . T . C . .	: 279			
Emar4	: . . . T . G . C . . G . . . C . C . . . C . T . T . . C . . . T . T . C . .	: 279			
Emar	: . . . T . G . C . . G . . . C . C . . . C . T . T . . C . . . T . T . C . .	: 279			
Emul	: . . . T . T . . . T . A . . . T . . . C . C . C . C . T . . C . . . A . C . . . C . C . T .	: 279			

	0	*	300	*	320	*	340	*	360		
EpHP	:	AAAGAAACCTGAAATATTGGAGTCATCCTCCTCCTCTAGTAATAATAACAGCCTTCGTTGGCTACGTTCTCCCTGAGGACAAATATC									: 368
EpS1	:	C.....									: 368
EpS2	:	C.....									: 368
EpS3	:	G.T.T.....T.....T.....C.....									: 368
EpS5	:	C.....									: 368
EpS8	:	G.T.T.....T.....T.....C.....									: 368
EpS9	:										: 368
EpS10	:										: 368
Ecoi	:	C.C.....									: 368
Ecoi (I)	:	C.C.....									: 368
Ecoi (II)	:	C.....									: 368
Ecoi (III)	:	C.....									: 368
Ecan	:	G.....C.G.T.T.....AT.....G.....T.....T.....C.....									: 368
Edru	:	C.....G.GG.T.T.G.....G.G.....G.....T.A.T.T.C.....									: 367
Efar	:	G.T.T.....									: 368
Efus	:	T.....T.....T.T.....C.....G.....									: 368
Ehai	:	G.....C.....T.....A.....G.....G.T.T.C.....									: 368
Elab	:	C.....G..G.....A.T.C.....T.....T.....									: 368
Emal	:	C.....G.T.....T.....G.....T.....T.....									: 368
Emar1	:	C.TG.T.T.T.AT.....T.T.C.....									: 368
Emar3	:	C.TG.T.T.T.AT.....T.T.C.....									: 368
Emar4	:	C.TG.T.T.T.AT.....T.T.C.....									: 368
Emar	:	C.TG.T.T.T.AT.....T.T.C.....									: 368
Emul	:	C.....T.T.T.T.....G.....T.T.C.....									: 368

Hình 3. So sánh trình tự nucleotide gen *cob* của 24 mẫu cá song thuộc các loài khác nhau. Ghi chú: Dòng trên cùng là trình tự nucleotide của cá song chủng EpHP; các dòng còn lại là của các chủng cá song của Việt Nam và thế giới; dấu (.) biểu thị giống nucleotide; sai khác về nucleotide so với EpHP được biểu hiện bằng chính chữ cái ký hiệu nucleotide đó.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	
EpHP	:	ALVILEPNSIWNFGSLIGCLIAQLILIGLEAFAMHISDIAPFSSVHICRWANGULRMANGASSEFICIVAHIGGLYAGSYLYKEINIGVILLIAMINAFVGLVHGM											: 122
EpS1	:												: 122
EpS2	:												: 122
EpS3	:	F.....T.....S.....L.....											: 122
EpS5	:	C.....TG.T.T.T.AT.....T.T.C.....											: 122
EpS8	:	F.....T.....S.....L.....											: 122
EpS9	:												: 122
EpS10	:												: 122
Ecoi	:												: 122
Ecoi (I)	:												: 122
Ecoi (II)	:												: 122
Ecoi (III)	:												: 122
Ecan	:												: 122
Echu	:	S.....											: 122
Efar	:												: 122
Efus	:	A.....											: 122
Ehai	:	S.....											: 122
Elab	:												: 122
Emal	:												: 122
Emar1	:												: 122
Emar3	:												: 122
Emar4	:												: 122
Emar	:												: 122
Emul	:												: 122

Hình 4. So sánh trình tự amino acid gen *cob* của 24 mẫu cá song thuộc các loài khác nhau. Ghi chú: Dòng trên cùng là trình tự amino acid của cá song chủng EpHP; các dòng còn lại là của các chủng cá song Việt Nam và thế giới; dấu (.) biểu thị giống amino acid; sai khác về amino acid so với EpHP được biểu hiện bằng chính chữ cái ký hiệu amino acid đó.



Hình 5. Phân tích mối quan hệ di truyền phả hệ của một số loài cá song của Việt Nam và trên thế giới.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xác định được trình tự gen *cob* hệ gen ty thể của 8 loài cá song có giá trị kinh tế của Việt Nam và phân tích tỷ lệ tương đồng và mối quan hệ phả hệ với 16 chủng của thế giới thuộc nhiều loài khác nhau. Tám chủng nghiên cứu của Việt Nam phân thành 2 nhánh: nhánh 1 bao gồm các mẫu ở Hải Phòng, Nha Trang và Đồng Nai (EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9, EpS10) có độ đồng nhất 100% với các chủng cá song Trung Quốc, thuộc loài *E. coioides*. Hai mẫu cá song Hải Phòng EpS3 và EpS8 thuộc nhánh 2 có thể không phải loài *E. coioides*.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Craig MT, Pondella DJ, Franck JPC, Hafner JC (2001) On the status of the serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based on 16S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 19(1):121-130.
- Ding S, Zhuang X, Guo F, Wang J, Su Y, Zhang Q, Li Q (2006) Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences. *Sci China C Life Sci* 49(3): 235-242.
- Matthew T, Craig MT, Philip A (2004) Speciation in the Central American Seaway: the importance of taxon sampling in the identification of trans-isthmian geminate pairs. *Biography* (2004) 51: 1095 - 2001.
- Nguyễn Mộng Hùng, Võ Thương Lan, Nguyễn Dương Dũng (2000) Nghiên cứu DNA của cá trắm cỏ và cá mè

trắng. *Tuyển tập báo cáo khoa học 2001* - Viện nuôi trồng thủy sản I: 33-39.

Palumbi S (1999) Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *Molecular systematics* (ed. By Hillis DM, Mortiz C, Mable BK): 205-248. Sinauer, Sunderland.

Pondella DJ, Craig MT, Frank JPC (2004) The phylogeny of Paralabax (Perciformes; Serranidae) and allied taxa inferred from partial 16S and 12S

mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 29: 176-184.

Quyền Đình Thi, Phạm Anh Tuấn (2005) Bài tổng quan: Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chọn giống cá rô phi. *Hội thảo toàn quốc về nghiên cứu và ứng dụng khoa học công nghệ trong nuôi trồng thủy sản*: 841-855.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Cold Spring Haror Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

DETERMINING THE MITOCHONDRIAL *CYTOCHROME B* GENE SEQUENCES AND ASSESSING THE HEREDITARY RELATIONSHIP OF GROUPERS (*EPINEPHELUS* SPP.) CULTURED IN VIETNAM TERRITORIAL WATER

Nguyen Anh*, Nguyen Duy Huy, Do Van Thu, Nguyen Bich Nga, Le Thanh Hoa

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Groupers (*Epinephelus*) are divers and have high commercial value achieved expert standard. The Vietnam territorial water has about 30 *Epinephelus* species, distributed in nearshore reef as: Hai Phong, Quang Ninh, Nghe An, Phu Yen, Khanh Hoa, Vung Tau, etc. Eight samples of *Epinephelus* cultured in Vietnam territorial water were collected and the total DNA was extrated, the mitochondrial *cytochrome b* (*cob*) gene was cloned and its sequence was determined. There were total 51 differences of nucleotides and 8 amino acids. Six species of Vietnam EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9 and EpS10 showed 100% similarity with sequences of *E. coicoides* of China, while two species, EpS3 and EpS8, were of low similarity. EpS1, EpS2, EpS5 were of high similarity with 3 nucleotide differences between them. There was 1 difference of nucleotide at position 28 between EpS3 and EpS8, while they had 89% similarity with 41 nucleotide differences as compared to *E. fuscoguttatus*. Analysing family tree showed that six species of Vietnam, EpHP, EpS1, EpS2, EpS5, EpS9 and EpS10, are *E. coicoides*, while EpS3 and EpS8 at other line of family tree and might be *E. fuscoguttatus*.

Keywords: *Cytochrome b* (*cob*), *Epinephelus*, grouper, mitochondria

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7564832; Fax: 84-4-8363144; E-mail: NguyenAnh-IBT@yahoo.com