



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.034

ỨNG DỤNG MARKER PHÂN TỬ DNA BARCODE TRONG ĐỊNH DANH CÁC MẪU *Moina* SPP. PHÂN LẬP TẠI KHU VỰC ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Lê Văn Hậu^{1*}, Lê Lưu Phương Hạnh¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹, Nguyễn Phúc Cẩm Tú² và Nguyễn Quốc Bình¹

¹Phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Văn Hậu (email: levanhauts@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 14/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

The adoption of DNA barcoding for species identification of *Moina* spp. specimens in the Mekong Delta

Từ khóa:

Cytochrome oxidase subunit I (COI), mã vạch DNA, *Moina macrocopa*, *Moina micrura*

Keywords:

Cytochrome oxidase subunit I (COI), DNA barcoding, *Moina macrocopa*, *Moina micrura*

ABSTRACT

Species of the genus *Moina* (Baird, 1850) often dominate the freshwater crustacean communities. Some species of *Moina* are used as food for fish larvae in aquaculture and as biological indicators in toxicological studies in aquatic environments. This study is aimed to investigate the species diversity of *Moina* spp. in the Mekong Delta region (An Giang, Dong Thap, Can Tho, Ben Tre and Long An province) by morphological analysis method and DNA barcoding method based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mtCOI) gene sequence. Fourty eight *Moina* sp. specimens from this study were successfully sequenced their mtCOI genes. Five groups of *Moina* sp. were identified in 48 specimens examined, and the occurrence frequency of *M. micrura* was higher than that of *M. macrocopa*. The results revealed that 4/48 *Moina* sp. specimens belonging to group V showed 99% nucleotide similarity with *M. macrocopa*, whereas 31/48 specimens of group I exhibited 99% nucleotide similarity with *M. micrura*. Meanwhile, the mtCOI gene sequence divergence of group II (8/48 specimens), group III (4/48 specimens) and group IV (1/48 specimen) were more than 10% in comparison with the *Moina* mtCOI sequences published on National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank®.

TÓM TẮT

Trong quần thể giáp xác nước ngọt, các loài thuộc giống *Moina* (Baird, 1850) thường chiếm ưu thế. Hiện nay, một số loài *Moina* spp. được sử dụng làm thức ăn cho ấu trùng cá trong nuôi trồng thủy sản và làm chất chỉ thị sinh học trong các nghiên cứu độc chất học trong môi trường nước. Trong nghiên cứu này, các mẫu *Moina* sp. tại năm tỉnh thành thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Bến Tre và Long An) được định danh bằng hình thái và ứng dụng marker phân tử DNA barcode dựa trên gen ty thể cytochrome oxidase subunit I (mtCOI). Nghiên cứu đã giải trình tự thành công đoạn gen mtCOI của 48 mẫu *Moina* sp. phân lập được. Kết quả phân tích cho thấy loài *M. micrura* hiện diện nhiều nhất, kể đến là loài *M. macrocopa* và các mẫu *Moina* spp. được phân thành năm nhóm di truyền; trong đó, 31/48 mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm I tương đồng 99% với *M. micrura*; 4/48 mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm V, tương đồng 99% với loài *M. macrocopa*; 8/48 mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm II, 4/48 mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm III và 1/48 mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm IV chứa trình tự gen mtCOI có sự tương đồng thấp hơn 90% so với các loài *Moina* đã được công bố trên Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI), Hoa Kỳ nên có thể được ghi nhận là những loài *Moina* mới, chưa có trình tự mtCOI trên ngân hàng gen.

Trích dẫn: Lê Văn Hậu, Lê Lưu Phương Hạnh, Ngô Huỳnh Phương Thảo, Nguyễn Phúc Cẩm Tú và Nguyễn Quốc Bình, 2018. Ứng dụng marker phân tử DNA barcode trong định danh các mẫu *Moina* spp. phân lập tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 36-44.

1 GIỚI THIỆU

Trong nuôi trồng thủy sản, động vật phù sinh là thành phần thức ăn không thể thiếu và có yếu tố quyết định đến sự thành công trong ương nuôi nhiều loại cá, giáp xác và thân mềm, đặc biệt ở giai đoạn phát triển từ cá bột lên cá giống. Ở giai đoạn này kích cỡ miệng cá bột nhỏ, các cơ quan cảm giác (mắt, xúc giác, cơ quan đường bên) và hệ tiêu hóa chưa phát triển hoàn chỉnh, làm hạn chế việc chọn lựa và sử dụng thức ăn thích hợp trong suốt thời kỳ bắt đầu ăn thức ăn ngoài (Vũ Ngọc Út, 2011). Cladocera (gồm hai giống *Daphnia* và *Moina*) là một trong các nhóm phổ biến, có vai trò quan trọng trong mạng lưới thức ăn thủy sinh (Bekker *et al.*, 2016).

Trước đây, các nhà phân loại học nhận dạng Cladocera chủ yếu thông qua hình thái. Tuy nhiên, phương pháp này còn nhiều hạn chế, bởi có thể bỏ sót các hình thái tiềm ẩn, hoặc không thể hiện rõ, hoặc chỉ có biểu hiện trong một giai đoạn sống nào đó. Do đó, trình tự DNA được dùng như “barcodes” để phân loại nhóm (Hebert *et al.*, 2003). Nhiều nghiên cứu đã xác định rằng gen ty thể cytochrome c oxidase subunit I (*mtCOI*) có thể đóng vai trò cốt lõi như một hệ thống xác định sinh học phân loại động vật (Hebert *et al.*, 2003). Các môi “phổ thông” cho gen này rất mạnh, cho phép khuếch đại đoạn trình tự về phía đuôi 5’ của gen *mtCOI*. Ngoài ra, gen *mtCOI* còn có dãy tín hiệu phát sinh loài lớn hơn các gen ty thể khác. Giống như các gen mã hóa protein khác, các nucleotide ở vị trí thứ 3 cho thấy tỉ lệ thay thế cơ bản cao, dẫn đến tỉ lệ tiến hóa phân tử cao gấp ba lần so với rDNA *12S* hoặc *16S* (Knowlton and Weigt, 1998).

Sự tiến hóa của gen *mtCOI* cho phép phân biệt không chỉ giữa các loài gần nhau, mà còn trong cùng một loài (Cox and Hebert, 2001; Wares and Cunningham, 2001). Tác giả Bekker *et al.*, (2016) cũng đã dùng trình tự đoạn gen *mtCOI* để phân tích tính đa dạng của giống *Moina* và công bố 157 đoạn trình tự trên Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (NCBI). Kết quả phân tích cho thấy 160 mẫu đã được phân thành 21 nhóm *Moina*, bao gồm cả những loài được phát hiện lần đầu tiên. Trong đó, *M. branchiate* và *M. micrura* được phân thành bảy nhánh; và *M. macrocopa* phân thành ba nhánh. Kết quả trên cho thấy rằng *Moina* có tính đa dạng loài đứng thứ hai trong bộ Cladocera (Bekker *et al.*, 2016).

Trong nghiên cứu này, bên cạnh phương pháp định danh truyền thống thông qua hình thái, marker phân tử DNA barcode được ứng dụng để định danh các mẫu *Moina* sp. thu thập tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Đây là một trong những

nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xác định chính xác và nhanh chóng các loài *Moina* sp. hiện diện tại các ao nuôi thủy sản. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về sự đa dạng loài trong bộ Cladocera nói chung và giống *Moina* nói riêng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân lập, nhân dòng các mẫu *Moina* spp.

Mẫu nước ao chứa *Moina* spp. được thu tại các ao ương cá Tra vào tháng 04 đến tháng 07 năm 2017 trên địa bàn năm tỉnh thuộc khu vực ĐBSCL gồm: An Giang, Đồng Tháp, Bến Tre, Cần Thơ và Long An. Mẫu được thu ở tầng nước mặt bằng vợt có kích cỡ mắt lưới 50 µm, mỗi ao thu ba điểm, trộn chung chứa trong chai nhựa 5 L có bộ sung 500 mL tảo *Scenedesmus* sp. mật độ 4,5 x 10⁶ tb/mL.

Với mỗi mẫu nước, 10 cá thể *Moina* sp. khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên và bố trí độc lập từng cá thể vào mỗi cốc nhựa 500 mL chứa 200 mL tảo *Scenedesmus* sp. mật độ 4,5 x 10⁶ tb/mL. Sau 7 ngày nuôi, mẫu *Moina* sp. được thu hoạch để dùng cho các bước định danh.

2.2 Định danh hình thái các mẫu *Moina* sp.

Tổng cộng 20 cá thể *Moina* sp. từ mỗi cốc được chuyển vào tube 1,5 mL; cố định mẫu với formol 5% và quan sát hình thái dưới kính hiển vi quang học Axio Vision SE64 (Carl Zeiss) dựa theo phương pháp định danh hình thái *Moina* sp. (Witty, 2004).

2.3 Giải trình tự DNA

Mỗi mẫu *Moina* sp. thu khoảng 80 - 100 cá thể, rửa sạch với nước cất và ly trích DNA bằng Wizard Genomic Kit (Thermo). Vùng gen ty thể cytochrome oxidase subunit I (*mtCOI*) được khuếch đại bằng cặp mồi LCO1490 – 5’ GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3’ và HCO2198 – 5’ TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3’ (Folmer *et al.*, 1994) có kích thước khoảng 710 bp. Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) 25µL gồm: 1 µL DNA; 10,5 µL H₂O; 0,5 µL mồi (10 µM) mỗi loại và 12,5 µL Green master mix 2X (Thermo). Điều kiện khuếch đại vùng gen *mtCOI* gồm một chu kỳ 5 phút ở 95°C; 45 chu kỳ biến tính 30 giây ở 95°C, bắt cặp 30 giây ở nhiệt độ 37°C, 41°C hoặc 51°C, kéo dài 2 phút ở 72°C và cuối cùng kéo dài thêm 10 phút ở 72°C để hoàn thành chu kỳ phản ứng. Sản phẩm PCR được kiểm tra lại bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% có chứa ethidium bromide và đọc kết quả bằng máy Geldoc (Biorad). Tiếp theo, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo) và xác định nồng độ DNA bằng máy Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Khoảng 200-300 ng sản phẩm PCR và

1.6 μ M môi trường ứng được dùng để giải trình tự. Mỗi sản phẩm PCR được giải trình tự hai chiều bằng máy Genetic Analyzer 3500 (Hitachi) với BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Mỹ).

2.4 Phân tích kết quả giải trình tự

Trình tự nucleotide đồng nhất giữa trình tự xuôi và ngược của từng mẫu được xác định bằng công cụ Align Sequence trong phần mềm SnapGene[®] 2.3.2 (GSL Biotech; snapgene.com). Các trình tự được so sánh với dữ liệu của ngân hàng gen NCBI bằng công cụ giải thuật so sánh các chuỗi sinh học (Blast) để định danh loài *Moina* sp. Các loài có sự tương đồng về trình tự nucleotide $\geq 97\%$ được xác định là

cùng loài (Hebert *et al.*, 2003). Sau đó, các trình tự gen *mtCOI* được hiệu chỉnh về cùng kích thước 561 bp để xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

3 KẾT QUẢ

3.1 Thu mẫu và phân dòng *Moina* spp.

Mẫu nước có chứa *Moina* spp. được thu ở tám vùng địa lý thuộc năm tỉnh, thành thuộc khu vực ĐBSCL với tổng số 22 mẫu nước thu được (tương ứng 22 ao). Sau khi bố trí theo phương pháp nêu tại 2.1, kết quả thu được gồm 66 mẫu *Moina* sp. được thuần hóa và phát triển đủ số lượng để tiến hành định danh (Bảng 1).

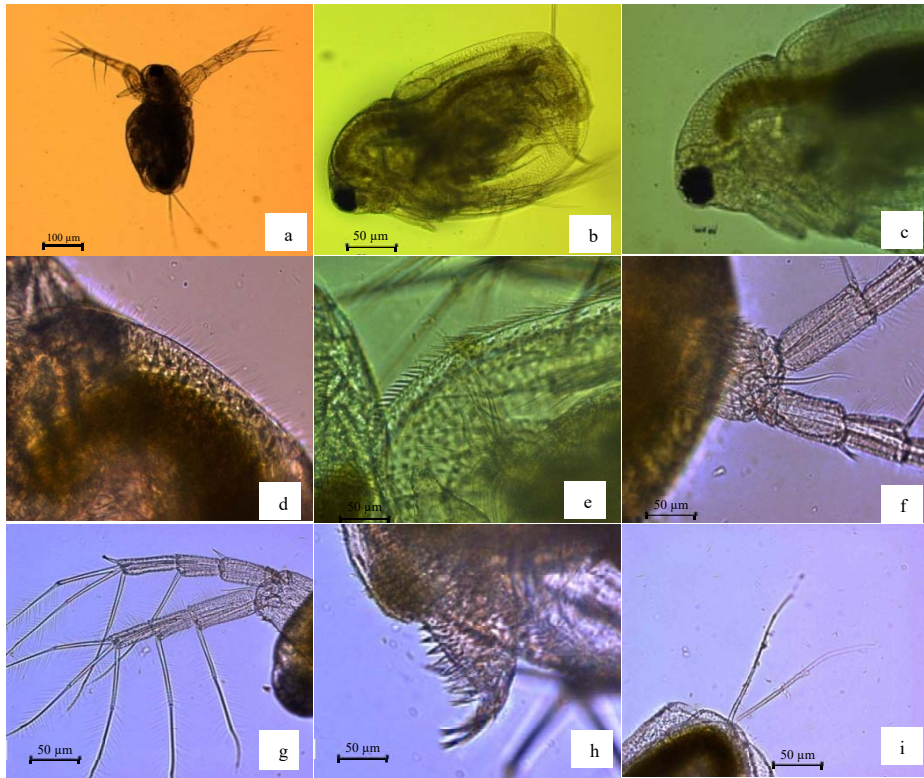
Bảng 1: Địa điểm thu thập các mẫu *Moina* spp.

STT	Vùng địa lý	Số mẫu nước	Ký hiệu mẫu nước (1,2,3: ao 1, 2, 3)	Các mẫu <i>Moina</i> sp. dùng để định danh bằng hình thái và marker phân tử
1	Xã Tân Thạch, huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre	3	BT1; BT2; BT3	BT1.4; BT1.5; BT1.6; BT2.1; BT2.9; BT3.2; BT3.8; BT3.9
2	Phường 6, Tp. Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp	3	CL1; CL2; CL3	CL1.1; CL1.2; CL1.3; CL1.5; CL1.6; CL1.9; CL1.10; CL3.1; CL3.2
3	Xã Phú Thuận, huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp	3	HN1; HN2; HN3	HN1.1; HN1.3; HN1.5; HN1.6; HN1.7; HN1.8; HN1.9; HN1.10; HN2.2; HN2.3; HN2.4; HN2.5; HN2.6; HN2.7; HN2.9; HN3.1; HN3.3; HN3.4; HN3.9;
4	Xã Vĩnh Trạch, huyện Thới Sơn, tỉnh An Giang	3	TS1; TS2; TS3	TS1.1; TS1.3; TS1.6; TS2.5; TS2.7; TS3.1; TS3.3; TS3.9; TS3.10
5	Thị trấn Cái Dầu, huyện Châu Phú, tỉnh An Giang	3	CP1; CP2; CP3	CP1.2; CP1.4; CP1.5; CP2.4; CP2.8; CP3.3; CP3.5; CP3.8
6	Phường Thới An, Q. Ô Môn, Tp. Cần Thơ	2	OM1; OM2	OM1.2; OM1.3; OM1.6; OM2.5; OM2.6
7	Phường Tân Lộc, Q. Thốt Nốt, Tp. Cần Thơ	3	TN1; TN2; TN3	TN1.2; TN1.5; TN1.8; TN2.2; TN2.4; TN3.7
8	Xã Tân Thành, huyện Mộc Hóa, tỉnh Long An	2	LA1; LA2	LA1; LA2

3.2 Định danh *Moina* spp. bằng phương pháp hình thái

Kết quả định danh hình thái cho thấy có hai loài *Moina* sp. hiện diện phổ biến, bao gồm *Moina macrocopa* và *Moina micrura*. Trong đó, 5/66 mẫu có hình thái tương tự *M. macrocopa* như phần đầu tròn, có nhiều lông tơ mảnh trên đầu, mắt sát với chóp đầu (Straus, 1980) (Hình 1); 56/66 mẫu có hình

thái tương tự *M. micrura* như phần đầu lõm không có lông tơ, chóp đầu hơi nhô cao, mắt to và cách xa chóp đầu (Kurz, 1874) (Hình 2) và 5/66 mẫu còn lại không xác định được loài do đặc điểm hình thái có sự tương đồng giữa loài *M. macrocopa* và loài *M. micrura*, cụ thể như phần đầu tròn không có lông tơ, mắt nhỏ và sát chóp đầu hoặc phần đầu lõm và có lông tơ, mắt và chóp đầu sát nhau (Hình 3).



Hình 1: Đặc điểm hình thái *Moina macrocopa* (Straus, 1980)

a. Toàn bộ cơ thể nhìn từ mặt lưng; b. Toàn bộ cơ thể nhìn từ phần bên; c. Phần đầu và mắt; d. Lông tơ ở phần đầu; e. Gai bụng; f. Phần chẻ đôi râu; g. Đôi râu và lông tơ trên râu; h. Gai chân nhảy; i. Phần đuôi.



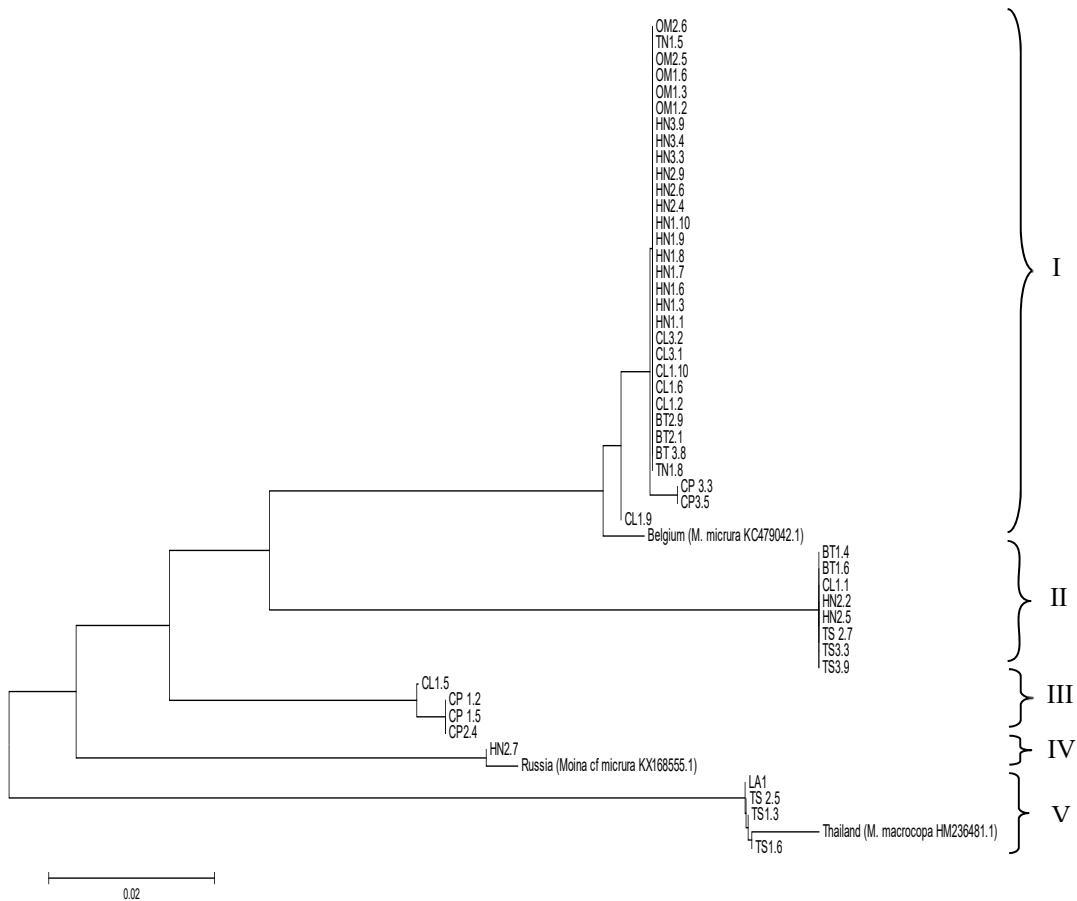
Hình 2: Đặc điểm hình thái *Moina micrura* (Kurz, 1874)

a. Toàn bộ cơ thể nhìn từ mặt lưng; b,c. Cá thể *Moina micrura* nhìn từ mặt bên; d. Đầu không có lông tơ, đồng thời có mắt to; e. Phần chẻ đôi râu; f. Bào tử; g. Gai bụng; h. Gai chân nhảy; i. Phần đuôi.



Hình 3: Đặc điểm hình thái của nhóm *Moina* spp. không xác định được loài

a,b,c. Hình thái tương tự *M. macrocopa*, phần đầu tròn, mắt và chóp đầu sát nhau nhưng lại không có lông tơ ở phần đầu; d,e. Phần đầu giống *M. micrura* nhưng lại không lõm sâu, mắt với chóp đầu sát nhau, có lông tơ ở phần đầu; f. *M. macrocopa* (trên) và *M. micrura* (dưới)



Hình 4: Mối quan hệ phát sinh loài giữa các mẫu *Moina* sp. thu thập trong nghiên cứu này được mô tả bằng cây NJ (Neighbour - joining) dựa trên trình tự 561 bp của gen *mtCOI* *Moina* sp.

3.3 Định danh *Moina* spp. bằng marker phân tử

Trong tổng số 66 mẫu *Moina* sp. sau khi được ly trích DNA chỉ có 48 mẫu *Moina* sp. được khuếch đại thành công gen *mtCOI* bằng cặp mồi LCO1490/HCO2198 để giải trình tự. Kết quả phân tích mối quan hệ phát sinh loài đưa ra năm nhóm trình tự *mtCOI* tương đương với năm nhóm *Moina* sp. (Hình 4). Sự khác nhau giữa các nhóm *Moina* sp. đã phân lập được thể hiện thông qua sự khác nhau giữa các vị trí nucleotide trên vùng trình tự 561 bp của gen *mtCOI* (Bảng 2).

Các mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm I bao gồm: hai mẫu ở Thốt Nốt (Cần Thơ), năm mẫu Ô Môn (Cần

Thơ) 13 mẫu ở Hồng Ngự (Đồng Tháp), sáu mẫu ở Cao Lãnh (Đồng Tháp), ba mẫu ở Châu Thành (Bến Tre) và hai mẫu ở Châu Phú (An Giang). Các mẫu này có mối quan hệ di truyền gần với loài *M. micrura* (KC479042.1) được phân lập ở Bi năm 2013. Blast trên ngân hàng gen NCBI cho thấy chúng tương đồng đến 99%. Hầu hết các mẫu *Moina* sp. trong nhóm I đều có trình tự gen tương đồng với nhau, riêng ba mẫu CP3.3, CP3.5 và CL1.9 có những khác biệt về các nucleotide ở vị trí 33, 225, 462, 543 (Hình 5). Tuy nhiên, những sai khác này là không đáng kể nên chúng vẫn được xếp cùng một nhóm.

Original Sequence	AGTTTTATTGGTGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'
CL1.2	AGTTTTATTGGTGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'
HN1.3L	AGTTTTATTGGTGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'
OM1.2	AGTTTTATTGGTGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'
TN1.5	AGTTTTATTGGTGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'
CL1.9	AGTTTTATTGGTGATGACCAAATTTA'AACTtTaTTATTAGTAGGAGGGGC'TACaGCATTACTtCTtTtCaTTCTT'
CP 3.3LCO	AgtTTTATTGGAGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'
CP3.5LCO	AgtTTTATTGGAGATGACCAAATTTA'AACTTTATTATTGGTAGGAGGGGC'TACAGCGTTACTTCTTTTCATTTTT'

Hình 5: So sánh sự tương đồng trình tự gen *mtCOI* giữa 3 mẫu CL1.9, CP3.3, CP3.5 với các mẫu *M. micrura* khác thuộc nhóm I

Các mẫu *Moina* sp. nhóm II bao gồm: 2 mẫu ở huyện Hồng Ngự (Đồng Tháp); 1 mẫu ở huyện Cao Lãnh (Đồng Tháp); 2 mẫu ở huyện Châu Thành (Bến Tre) và 3 mẫu ở huyện Thoại Sơn (An Giang). Trình tự gen của nhóm II chỉ tương đồng 85% với loài *M. micrura* phân lập tại Bi năm 2013 (KC479042.1).

Bốn mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm III gồm: một mẫu ở Cao Lãnh (Đồng Tháp), ba mẫu ở Châu Phú

(An Giang) có trình tự gen *mtCOI* không tương đồng với bốn loài *Moina* sp. (*M. micrura*, *M. macrocopa*, *M. brachiata* và *M. affinis*) đã được công bố trên NCBI. Trong nhóm này, vị trí nucleotide 27, 36, 49, 53 trên gen *mtCOI* của 3 mẫu *Moina* sp. phân lập ở Châu Phú (An Giang), có khác biệt so với mẫu *Moina* sp. CL1.5 phân lập ở Cao Lãnh (Đồng Tháp) (Hình 6).

Original Sequence	TCTAAGTATACTAATTCGTGTTGAATTAGCCCaAGCTGGAAGTTTTATTGGTGATGATCAAATTTACAATGTAAT
CP 1.2LCO	TCCAAATATACGAATTCGTGTTGAGTTAAACCCCTTTCTGGAAGTTTTATTGGAGATGATCAAATTTACAATGTAAT
CP 1.5LCO	TCCAAATATACGAATTCGTGTTGAGTTAAACCCCTTTCTGGAAGTTTTATTGGAGATGATCAAATTTACAATGTAAT
CP2.4LCO	TCCAAAGTATACTAATTCGTGTTGAGTTAAACCCCaAGCTGGAAGTTTTATTGGAGATGATCAAATTTACAATGTAAT

Hình 6: So sánh sự tương đồng trình tự gen *mtCOI* giữa mẫu CL1.5 với 3 mẫu CP1.2, CP1.5, CP2.4

Nhóm IV chỉ có duy nhất mẫu *Moina* sp. HN2.7 được phân lập ở Hồng Ngự (Đồng Tháp). Kết quả Blast cho thấy trình tự gen *mtCOI* của mẫu *Moina* HN2.7 không tương đồng với trình tự *mtCOI* của bốn loài *Moina* sp. (*M. micrura*, *M. macrocopa*, *M. brachiata* và *M. affinis*) đã được công bố trên NCBI nhưng lại tương đồng đến 99% với trình tự loài

Moina cf micrura được phân lập ở Nga (2011) (KX168555.1).

Bốn mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm V gồm: một mẫu ở Mộc Hóa (Long An) và ba mẫu ở Thoại Sơn (An Giang) có trình tự gen *mtCOI* tương đồng nhau và tương đồng 99% với dòng *M. macrocopa* (HM236481.1) phân lập ở Thái Lan (2016).

Bảng 2: Các vị trí sai khác nucleotide trên vùng trình tự *mtCOI* (561 bp) giữa 48 mẫu *Moina* sp. sử dụng trong nghiên cứu này

Haplotype	Vị trí nucleotide																				
	5 5	9 5	1 1	1 3	2 1	2 6	2 9	3 1	3 2	3 6	3 8	3 1	4 3	4 1	4 5	4 8	5 0	5 1	5 3	5 4	5 6
Trình tự tương đồng	T	T	A	T	T	C	A	T	G	T	C	A	G	C	A	C	T	A	A	T	
I	BT2.1	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	BT2.9	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	BT3.8	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CL1.2	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CL1.6	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CL1.9	C	A	.	.	A	A	.	.	A	C
	CL1.10	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CL3.1	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CL3.2	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CP3.3	G	A	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	CP3.5	G	A	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	HN1.1	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	HN1.3	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	HN1.6	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	HN1.7	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	HN1.8	.	.	G	.	C	A	.	.	A	A	.	.	A	T	G
	HN1.9	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN1.10	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN2.4	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN2.6	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN2.9	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN3.3	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN3.4	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	HN3.9	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	OM1.2	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	OM1.3	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	OM1.6	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	OM2.5	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	OM2.6	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	TN1.5	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
	TN1.8	.	.	G	.	C	A	.	.	A	.	.	.	A	T	G
II	BT1.4
	BT1.6
	CL1.1
	HN2.2
	HN2.5
	TS2.7
	TS3.3
	TS3.9
III	CL1.5	.	.	.	C	.	T	.	A	A	.	T	T	A	T	G	.
	CP1.2	.	A	.	C	.	T	.	A	A	.	T	T	A	T	G	.
	CP1.5	.	A	.	C	.	T	.	A	A	.	T	T	A	T	G	.
	CP2.4	G	A	.	C	.	T	.	A	A	.	T	T	A	T	G	.
IV	HN2.7	.	A	.	T	.	A	G	A	A	A	T	G	A	.	.	.	C	.	.	C
V	LA1	G	A	.	A	C	T	.	A	A	.	T	.	A	C
	TS1.3	G	A	.	A	C	T	.	A	A	.	T	.	A	C
	TS1.6	G	A	.	A	C	T	.	A	A	.	T	.	A	C
	TS2.5	G	A	.	A	C	T	.	A	A	.	T	.	A	C

Các vị trí nucleotide giống nhau được mô tả bằng dấu chấm.

3.4 So sánh kết quả định danh *Moina* sp. bằng phương pháp hình thái và marker phân tử

Trong nghiên cứu này, 48 mẫu *Moina* sp. đã định

định bằng cả hai phương pháp: thông qua hình thái và marker phân tử. Kết quả định danh của hai phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: So sánh kết quả định danh phương pháp hình thái và marker phân tử

Hình thái	Marker phân tử
39/48 <i>M. micrura</i>	31/48 <i>M. micrura</i> (nhóm I) 8/48 <i>Moina</i> sp. (nhóm II)
5/48 Không xác định	4/48 <i>Moina</i> sp. (nhóm III) 1/48 <i>Moina</i> sp. (nhóm IV)
4/48 <i>M. macrocopa</i>	4/48 <i>M. macrocopa</i> (nhóm V)

4 THẢO LUẬN

Căn cứ vào trình tự gen *mtCOI*, 48 mẫu *Moina* sp. thu thập trong nghiên cứu này được phân thành năm nhóm, trong đó 31 mẫu ở nhóm I (64,6%) thuộc loài *M. micrura*, bốn mẫu ở nhóm V (8,3%) có quan hệ di truyền gần với loài *M. macrocopa*, 8 mẫu thuộc nhóm II, bốn mẫu thuộc nhóm III và một mẫu thuộc nhóm IV (27,1%) chưa xác định được chính xác loài. Theo giả thuyết, các mẫu *Moina* sp. có sự khác biệt về trình tự gen *mtCOI* lớn hơn 3% được xem là khác loài (Hebert *et al.*, 2003). Do đó, các mẫu *Moina* sp. thuộc nhóm II, III có thể là loài *Moina* khác với bốn loài *Moina* sp. (*M. micrura*, *M. macrocopa*, *M. brachiata* và *M. affinis*) đã được công bố trên NCBI. Riêng mẫu *Moina* HN2.7 trong nghiên cứu này và mẫu *Moina* cf *micrura* phân lập tại Nga năm 2011 (KX168555.1) có sự tương đồng cao (99%) về trình tự *mtCOI* nên chúng được xác định là cùng loài. Tuy nhiên, nhóm tác giả tại Nga chỉ mới so sánh trình tự *Moina* sp. KX168555.1 với loài *M. micrura* và chưa xác định được chính xác tên loài *Moina* sp. này.

Trong nghiên cứu này, có 18/66 mẫu *Moina* sp. không được giải trình tự, lý do là chưa khuếch đại được đoạn gen *mtCOI* với cặp mồi LCO1490/HCO2198 vì không tìm được nhiệt độ bắt cặp phù hợp cho các mẫu *Moina* sp. này. Vấn đề này cũng được tác giả Bekker *et al.* (2016) đề cập trong nghiên cứu của mình.

Việc định danh *Moina* sp. thông qua hình thái còn nhiều hạn chế, do các hình thái tiềm ẩn có thể bị bỏ sót, hoặc một số hình thái không thể hiện rõ hoặc chỉ biểu hiện trong một giai đoạn sinh trưởng nào đó của *Moina*. Trong khi đó việc sử dụng marker phân tử cho kết quả rõ ràng và dễ phân tích hơn so với việc quan sát hình thái, vốn là một phương pháp đòi hỏi sự tỉ mỉ và giàu kinh nghiệm của người thực hiện. Điều này được ghi nhận trong nghiên cứu hiện tại, mặc dù kết quả định danh loài *Moina* sp. giữa hai phương pháp (quan sát hình thái và sử dụng marker phân tử) tương đối giống nhau nhưng sự khác nhau ở một số mẫu vẫn được ghi nhận. Cụ thể như các mẫu *Moina* sp. nhóm II được xác định thuộc loài *M. micrura* căn cứ vào hình thái, tuy nhiên, khi định danh bằng marker phân tử thì trình tự gen *mtCOI* của các mẫu này chỉ tương đồng 85% với *M.*

micrura Bi (KC479042.1) nên có thể xem nhóm này là loài *Moina* sp. mới, chưa được công bố trên ngân hàng NCBI.

Sự phân bố địa lý của các nhóm *Moina* sp. cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Các nhóm *Moina* sp. không phân bố đều ở các tỉnh, thành thu mẫu. Kết quả cụ thể như sau, *M. micrura* nhóm I có mặt ở hầu hết các vùng địa lý đã thu mẫu ở khu vực ĐBSCL. Trong các mẫu nước thu ở Mộc Hóa (Long An) không thấy xuất hiện *M. micrura*. Trong khi đó, mật độ xuất hiện của loài *M. macrocopa* thấp, chỉ hiện diện ở 2/8 vùng địa lý khảo sát là Thoại Sơn (An Giang) và Mộc Hóa (Long An). Các nhóm *Moina* sp. chưa xác định chính xác loài (nhóm II, III và IV) được tìm thấy ở 3/5 tỉnh thành: An Giang, Đồng Tháp, Bến Tre. Một số mẫu *Moina* sp. thuộc ba nhóm này được phát hiện trong cùng một ao nuôi với *M. micrura* (mẫu HN 2.2, HN 2.5, CL 1.1, CL 1.5) hoặc *M. macrocopa* (mẫu TS 2.7). Điều này cho thấy tùy theo điều kiện môi trường ao nuôi ở mỗi vùng địa lý, loài *Moina* sp. phù hợp thường chiếm ưu thế. Kết quả nghiên cứu này sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu về đa dạng loài *Moina* sp. tại từng địa phương, góp phần chọn ra những dòng *Moina* sp. tăng trưởng tốt và giàu dinh dưỡng phục vụ cho quy trình ương nuôi giống thủy sản.

Mặc dù trong nghiên cứu này, sự tồn tại đồng thời của hai loài *M. micrura* và *M. macrocopa* trong cùng một ao nuôi chưa được ghi nhận, nhưng một số mẫu nước ao có sự hiện diện cùng một lúc của ba nhóm *Moina* sp. khác nhau, như *M. micrura* nhóm I (CL1.2, CL1.6, CL1.10) và *Moina* sp. nhóm III (CL1.5) và *Moina* sp. nhóm II (CL1.1) trong mẫu nước ao CL1 thu ở Cao Lãnh (Đồng Tháp) hoặc *Moina* sp. nhóm II (HN2.2, HN 2.5), *M. micrura* nhóm I (HN 2.4, HN2.6 và HN 2.9) và *Moina* sp. nhóm IV (HN2.7) trong mẫu nước ao HN2 thu ở Hồng Ngự (Đồng Tháp). Kết quả này cho thấy những nhận định chính xác về loài *Moina* mang tính đặc hữu của từng vùng địa lý chưa được thể hiện rõ trong nghiên cứu này. Tương tự, sau khi phân tích 160 mẫu *Moina* sp., Bekker *et al.*, (2016) nhận thấy ranh giới địa lý chính xác của các loài/nhóm *Moina* sp. vẫn chưa rõ ràng, đặc biệt loài *M. branchiate* có thể phân bố rộng rãi từ miền Nam đến miền Bắc Trung Quốc. Có thể với lượng mẫu lớn hơn, các dòng/ loài *Moina* sp. đặc hữu cho một số vùng địa lý sẽ được ghi nhận (Bekker *et al.*, 2016).

5 KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp định danh *Moina* sp. bằng marker phân tử DNA barcode đã được ứng dụng trên 48 mẫu *Moina* sp. thu thập tại năm tỉnh, thành thuộc khu vực ĐBSCL và đã xác định được sự hiện diện của năm nhóm *Moina* sp.

Trong đó, nhóm I thuộc loài *M. micrura* có tần suất cao (64,58%), nhóm V thuộc loài *M. macrocopa*. (chiếm 8,33%); nhóm II (16,67%), III (8,33%) và IV (0,02%) có thể là những loài *Moina* sp chưa được công bố trình tự *mtCOI* trên NCBI.

Để có thể đánh giá đầy đủ hơn tính đại diện của các loài *Moina* sp. trong khu vực cũng như tìm được nhóm/dòng *Moina* sp. có ưu thế về sức tăng trưởng và hàm lượng dinh dưỡng để chọn lọc và thuần hóa phục vụ cho công tác ương nuôi động vật thủy sản cần triển khai việc thu thập thêm mẫu *Moina* spp. ở các vùng địa lý khác và ở các mốc thời gian khác nhau. Ngoài ra, đối với các nhóm *Moina* sp. mới chưa được công bố trên ngân hàng gen NCBI, những thông tin thêm về hình thái lẫn di truyền cần được bổ sung để có thể định danh loài một cách chính xác. Hiện nay, các cặp mồi PCR đặc hiệu dùng để định danh các loài *Moina* sp. chưa được công bố. Do đó, dựa trên sự khác biệt của trình tự gen *mtCOI* giữa các nhóm/loài *Moina* sp., các cặp mồi đặc hiệu cho từng nhóm/loài cần được thiết kế để định danh nhanh và chính xác hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bekker, E. I., Karabanov, D. P., Galimov Y. R. and Kotov A. A., 2016. DNA barcoding reveals high cryptic diversity in the North Eurasian *Moina* species (Crustacea: Cladocera). PLoS One, 11(8): e0161737. doi:10.1371/journal.pone.0161737.
- Cox, A. J. and Hebert, P. D. N., 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. Molecular Ecology, 10(2): 371-386.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5): 294-299.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the royal society B: Biological sciences. 270(1512): 313-321.
- Islam, M. R., Hassan, M. R., Begum, M., Punom, N. J., Begum, M. K., Sultana, N. and Rahman, M. S., 2017. Effects of feeding zooplankton, *Moina macrocopa* (Straus, 1820) on the growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 52(2): 81-88.
- Knowlton, N. and Weigt, L. A., 1998. New dates and new rates for divergence across the isthmus of Panama. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 265(1412): 2257-2263.
- Kotani, T., Imari, H., Miyashima, A. and Fushimi, H., 2016. Effects of feeding with frozen freshwater cladoceran *Moina macrocopa* on the performance of red sea bream *Pagrus major* larviculture. Aquaculture International, 24(1): 183-197.
- Olojo, E. A. A., Olurin, K. B. and Osikoya, O. J., 2003. Food and feeding habits of *Synodontis nigrita* from the Osun river, South West Nigeria, Naga. Worldfish Center Quarterly, 26(4): 21-24.
- Rottmann, R. W., Graves, J. S., Watson, C. and Yanong, R. P. E., 2003. Culture techniques of *Moina*: The ideal *Daphnia* for feeding to freshwater fish fry. CIR 1054/FAO24, pp. 2-9.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12): 2725-2729.
- Vũ Ngọc Út, 2011. Vai trò của thức ăn tự nhiên trong nuôi trồng thủy sản, truy cập ngày 18 tháng 07 năm 2017. Địa chỉ: <http://uv-vietnam.com.vn/NewsDetail.aspx?newsId=775>.
- Vũ Ngọc Út và Dương Thị Hoàng Oanh., 2013. Giáo trình động và thực vật thủy sinh. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ, 342 trang.
- Wares, J. P. and Clifford W. C., 2001. Phylogeography and historical ecology of the north atlantic intertidal. Evolution, 55(12): 2455-2469.
- Witty. L. M., 2004. Practical guide to identifying freshwater crustacean zooplankton, second edition. Canada, 60 pages.