Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2024.306

BẰNG CHỨNG PHÂN TỬ VỀ SỰ XUẤT HIỆN CON LAI GIỮA HAI LOÀI CÁ BÔNG LAU VÀ TRA BẦN NUÔI Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Dương Thúy Yên[1*] và Trần Thị Ngọc Hân[2]
[1]*Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ*
[2]*Ngành nuôi trồng thủy sản chương trình tiên tiến, Khóa 45, Trường Đại học Cần Thơ*
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): thuyyen@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 13/11/2023
Sửa bài (Revised): 10/03/2024
Duyệt đăng (Accepted): 11/06/2024

Title: *Molecular evidence of hybrids between Pangasius krempfi and Pangasius mekongensis cultured in the Mekong Delta*

Author(s): *Duong Thuy Yen* and Tran Thi Ngoc Han*

Affiliation(s): *Can Tho University*

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm kiểm chứng có hay không con lai giữa cá bông lau và tra bần đang được nuôi ở một số nông hộ. Mẫu cá của hai loài và bốn mẫu cá giống từ một số hộ dân được phân tích gen ty thể Cytochrome C oxidase subunit I (COI) và gen trong nhân Rhodopsin (Rho). Kết quả dựa trên COI cho thấy có 3 mẫu cá nghi ngờ (L1, L2 và L3) có mẹ là tra bần và một mẫu (L4) có mẹ là bông lau với mức độ tương đồng với loài mẹ 100%. Gen Rho có bảy vị trí khác biệt (trong 766 bp) giữa bông lau và tra bần. Bốn mẫu con lai đều có hai nucleotide của hai loài trùng lắp nhau ở bảy vị trí trên, chứng tỏ chúng là con lai của hai loài. Kết quả kết hợp từ hai gen chứng tỏ L1, L2 và L3 là con lai ♀ tra bần x ♂ bông lau, L4 là con lai ♀ bông lau x ♂ tra bần. Như vậy, việc lai tạo giữa hai loài cá đang xảy ra và vấn đề này cần được nghiên cứu để đánh giá tác động của con lai đến nguồn lợi thủy sản.

Từ khoá: *Cá da trơn, chỉ thị phân tử, giải trình tự, Pangasius, xác định con lai*

ABSTRACT

This study was aimed to verify whether or not hybrids between Pangasius krempfi (Pk) and Pangasius mekongensis (Pm) are being raised in some farms. Fish samples of two species and four fingerlings from several households were analyzed for the mitochondrial gene Cytochrome C oxidase subunit I (COI) and the nuclear gene Rhodopsin (Rho). Results based on COI showed that there were three suspect fish samples (L1, L2 and L3) whose mother was Pm and one sample (L4) whose mother was Pk with 100% similarity to the maternal species. The Rho gene had seven variable sites (among 766 bp) between Pk and Pm. The four hybrid samples had two nucleotides of the two species overlapping in the above seven sites, proving that they were hybrids of the two species. The combination results from the two genes showed that L1, L2 and L3 were hybrids ♀ Pm x ♂ Pk, L4 was a hybrid ♀ Pk x ♂ Pm. Thus, artificial hybridization between the two fish species is occurring and this issue needs to be further studied to evaluate the impacts of hybrids on aquaculture and aquatic resources.

Keywords: *Catfish, hybrid identification, molecular markers, Pangasius, sequence chromatogram*

1. GIỚI THIỆU

Cá bông lau (*Pangasius krempfi* Fang & Chaux, 1949) và cá tra bần (*Pangasius mekongensis* Gustiano et al., 2003) là hai loài cá có giá trị kinh tế, thuộc họ Pangasiidae. Trong đó, cá bông lau có chất lượng thịt ngon và có giá bán thương phẩm trên thị trường cao nhất trong các loài cá cùng họ (Quyền & Yên, 2018). Cả hai loài đều có tập tính di cư sinh sản lên vùng thượng nguồn sông Mekong và phần lớn vòng đời sinh sống ở vùng nước lợ, mặn vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) (Roberts & Baird, 1995; Baird, 1996; Hogan et al., 2007; Vu et al., 2020). Về mặt hình thái, hai loài có hình dạng bên ngoài tương đối giống nhau nhưng có thể nhận diện dựa vào sự khác biệt ở phần đầu: đầu cá tra bần sần sùi, có hai rãnh sâu ở đỉnh đầu (thóp trán) và có vết sần hình cánh quạt ở trên nắp mang; cá bông lau có phần đầu trơn lán, rãnh cạn ở đỉnh đầu và vài đường sần trên nắp mang không có dạng hình cánh quạt rõ ràng (Yên et al., 2016). Tuy nhiên, những đặc điểm trên rất khó phân biệt khi cá ở giai đoạn nhỏ.

Gần đây, phong trào nuôi cá bông lau phát triển ở một số tỉnh ven biển như Bến Tre, Tiền Giang, Trà Vinh, Sóc Trăng,… Nguồn giống ban đầu chủ yếu được khai thác từ tự nhiên. Song, nguồn lợi tự nhiên ngày càng suy giảm (Quyền & Yên, 2018) trong khi nhu cầu con giống tăng. Một số nơi có thể đã thành công trong việc sản xuất con giống nhân tạo nhưng chưa công bố. Trên thực tế, người dân nuôi cá không biết chính xác nguồn gốc con giống, vì vậy, đã xảy ra tranh cãi giữa người nuôi với thương lái bán giống và thương lái mua cá thương phẩm. Người nuôi mua cá giống được cho là "bông lau" nhưng khi bán cá thương phẩm thì thương lái cho rằng cá tra bần hoặc con lai nên mua giá thấp. Một số hộ dân đã gửi mẫu đến phòng thí nghiệm Di truyền thủy sản, Trường Thủy sản, yêu cầu xác định tên loài. Tại đây, phương pháp phân tích gen ty thể Cytochrome C oxidase subunit I (COI) được sử dụng cho mục đích định danh loài. Gen COI được xem là DNA mã vạch trong định danh các loài cá và các lớp động vật có xương sống khác (Hebert et al., 2003; Steinke et al., 2009; Ward, 2009; Lara et al., 2010; Bucklin et al., 2011).

Kết quả định danh dựa trên gen COI chỉ xác định được loài mẹ nhưng không xác định được con lai bởi vì gen ty thể di truyền theo con mẹ. Để có thể phân biệt con lai với loài mẹ cần phân tích kết hợp với gen trong nhân. Trong số ít gen trong nhân đã được công bố đoạn mồi phổ biến dùng cho nhiều loài cá như gen Rho (Rhodopsin), RAG-1 (recombination activating gene-1), parvalbumin, nhóm gen EGR (early growth response gene family) (Chen et al., 2008; Rehbein, 2013), gen Rho thể hiện sự khác biệt giữa hai loài trong họ cá chép cao nhất (0,160) so với các gen trong nhân khác, dao động trong khoảng 0,081– 0,139 (Chen et al., 2008). Dựa trên mức độ khác biệt về gen trong nhân giữa hai loài bố mẹ, bước tiếp theo xác định con lai có thể dựa trên nhiều phương pháp khác nhau. Khi hai loài có sự khác biệt lớn, phương pháp PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) thường được áp dụng cho nhiều loài cá (Hashimoto et al., 2010, 2013; Gigliarelli et al., 2013; Duong et al., 2017; Sriphairoj et al., 2018). Tuy nhiên, nếu sự khác biệt di truyền về gen trong nhân của hai loài thấp thì không thể áp dụng phương pháp này vì không thể tìm ra enzym cắt giới hạn đặc trưng cho mỗi loài (Hashimoto et al., 2010). Khi đó, phương pháp giải trình tự gen để xem xét biểu đồ giải trình tự được sử dụng (Yun et al., 2009; Song et al., 2017). Kết quả biểu đồ giải trình tự con lai sẽ thể hiện tính trung gian của hai loài bố mẹ ở tất cả vị trí khác biệt trình tự (SNP, single nucleotide polymorphism) của hai loài bố mẹ. Phương pháp này có độ chính xác cao nhưng cần nhiều thời gian cho khâu giải trình tự. Một phương pháp khác đơn giản hơn đó là dùng ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) dựa trên cơ sở nghiên cứu trước đã tìm ra sáu chỉ thị ISSR cho kết quả khác biệt giữa hai loài (Tran & Duong, 2019). Tuy nhiên, kết quả khuếch đại với chỉ thị ISSR đôi khi không ổn định.

Để tìm phương pháp phân biệt được con lai và ứng dụng vào thực tế xác định có hay không con giống lai giữa hai loài cá bông lau và tra bần đang được nuôi ở ĐBSCL, nghiên cứu này phân tích gen COI trong ty thể và gen Rho trong nhân của cá bông lau, tra bần và một số mẫu được người nuôi gửi định danh loài. Thông tin này rất cần thiết cho các cơ quan quản lý thủy sản cũng như cho các nghiên cứu tiếp theo về lai tạo, chọn giống hai loài cá bông lau và tra bần.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu cá

Cá bông lau và tra bần là mẫu cá trưởng thành, được thu năm 2018-2019, trong đề tài cấp Bộ "Nghiên cứu đa dạng di truyền và đặc điểm sinh học sinh sản cá bông lau (*Pangasius krempfi*) và cá tra bần (*Pangasius mekongensis*) – Mã số B2017-TCT-22ĐT (Yên, 2019). Năm mẫu mỗi loài được sử dụng trong nghiên cứu này. Mẫu cá kiểm tra con lai (tạm gọi là mẫu cá nghi ngờ), gồm bốn mẫu (ký hiệu L1, L2, L3 và L4) giai đoạn cá giống, chiều dài từ 12 cm

đến 40 cm (Hình 1) được lấy từ mẫu người dân gửi định danh loài. Vi cá từ mỗi cá thể được giữ trong ethanol 96% để phân tích di truyền.

2.2. Phương pháp phân tích di truyền

Các bước trong phân tích di truyền gồm tách chiết DNA, khuếch đại (PCR, polymerase reaction chain) gen COI và Rho, điện di và giải trình tự.

2.2.1. Tách chiết DNA

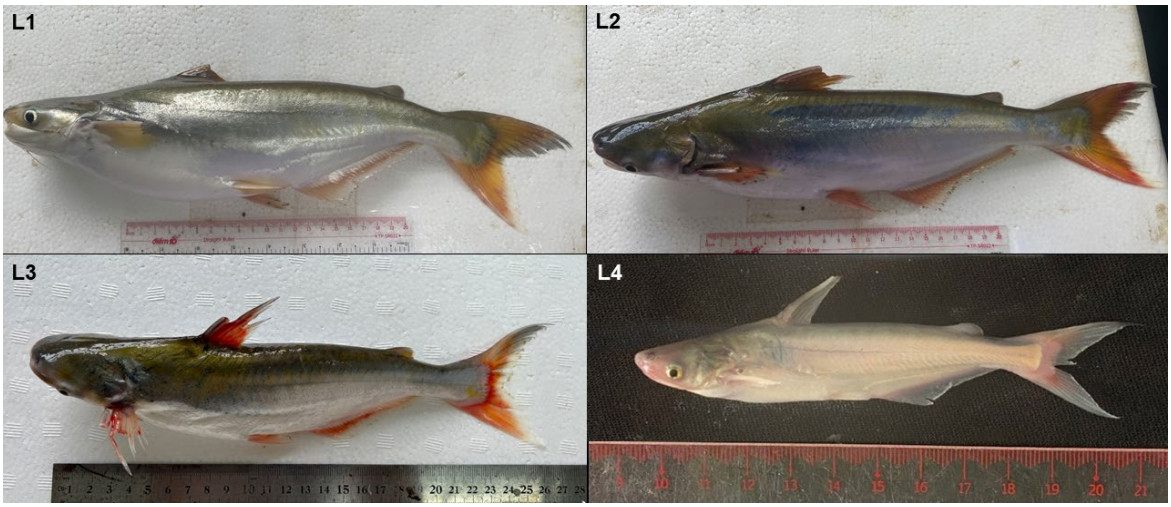
DNA trong vi cá được tách chiết bằng phương pháp Ammonium acetate (Saporito-Irwin et al., 1997). Tóm tắt qui trình như sau: thủy phân 15-20 mg mẫu trong 650 µL dung dịch ly trích và 10 µL proteinase-K ở nhiệt độ 55ºC từ 12-15 giờ. Tiếp theo, protein được loại bỏ bằng 240 µL dung dịch Amonium Acetat ủ ở 4ºC trong 30 phút, sau đó ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Dung dịch phía trên (640 µL) được chuyển sang ống mới và thêm 700 µL ethanol 100% lạnh, giữ ống ở 4ºC ít nhất một giờ, sau đó ly tâm lạnh (10.000 vòng/phút ở 5ºC trong 10 phút) để thu DNA kết tủa. DNA được rửa 2 lần trong 500 µL ethanol lạnh 70%. Ống được làm khô trong không khí hoặc sấy ở 40ºC. Sau đó, DNA được hòa tan với 100 µL TE và bảo quản DNA ở 4ºC.

Nồng độ và chất lượng DNA được đo bằng máy Nanodrop One (Hoa Kỳ). Nồng độ DNA dùng cho các phản ứng PCR trong khoảng 50 – 100 ng/µL.

2.2.2. Khuếch đại gen COI và Rhodopsin

Gen COI được khuếch đại bằng hai cặp mồi Fish F2-t1/ Fish R2-t1 và VF2-t1/ FR1d-t1 (Ward et al., 2005; Ivanova et al., 2007) và gen Rho với cặp mồi RH193F/ RH1039R (Chen et al., 2003). Trình tự các mồi được trình bày ở Bảng 1.

Thể tích PCR chung là 25 µL với thành phần các chất và chu kỳ nhiệt của phản ứng được trình bày ở Bảng 2 và Bảng 3.



Hình 1. Hình dạng bên ngoài của bố mẫu cá kiểm tra con lai

Bảng 1. Trình tự đoạn mồi khuếch đại gen COI trên ty thể

Tên mồi	Trình tự 5' – 3'
Fish F2-t1 (F)	TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC
Fish R2-t1 (R)	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA
VF2-t1(F)	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FR1d-t1 (R)	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA
RH193F	CNTATGAATAYCCTCAGTACTACC
RH1039R	TGCTTGTTCATGCAGATGTAGA

Bảng 2. Thành phần và thể tích (µL) các chất trong phản ứng PCR khuếch đại gen COI và Rho

Thành phần	Nồng độ ban đầu	Thể tích µL	
		COI	Rho
1. Nước tinh sạch	-	8,36	8,0
2. Gotaq Master Mix*	2X	12,5	12,5
3. $MgCl_2$	25M	1,0	1,0

Thành phần	Nồng độ ban đầu	Thể tích µL	
		COI	Rho
4. Mồi F	10 pmol	0,32	0,5
5. Mồi R	10 pmol	0,32	0,5
6. DNA khuôn mẫu	50-100 ng/µL	2,5	2,5

(*)Thành phần gồm Taq DNA polymerase và dung dịch đệm (pH 8,5), 400 µM (dATP + dGTP + dCTP +dTTP) và 3 mM $MgCl_2$

Bảng 3. Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR khuếch đại gen COI và Rho

Các bước	COI		Rho		Số chu kỳ
	Nhiệt độ	Thời gian	Nhiệt độ	Thời gian	
1. Duỗi xoắn ban đầu	95°C	2 phút	95°C	4 phút	1
2. Duỗi xoắn	94°C	30 giây	94°C	40 giây	
3. Gắn mồi	52°C	30 giây	55°C	40 giây	35
4. Nối dài	72°C	1 phút	72°C	1 phút	
5. Nối dài cuối cùng	72°C	10 phút	72°C	7 phút	1

2.2.3. Điện di và giải trình tự

Kết quả PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% ở điều kiện 90 V, trong 20 phút. Sau đó, gel được ngâm trong dung dịch ethidium bromide (0,5 µg/mL) trong 20 phút. Đọc kết quả gel bằng hệ thống chụp gel (GelStudio PLUS, Hoa Kỳ).

Những sản phẩm PCR có vạch rõ được gửi đến dịch vụ tinh sạch và giải trình tự (bằng phương pháp Sanger) tại Apical Scientific Sdn. Bhd., Malaysia.

2.2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Chất lượng trình tự (thể hiện qua hệ số chất lượng Q) được kiểm tra bằng chương trình Finch TV 1.4.0 (http://www.geospiza.com/). Hệ số Q của mỗi nucleotide là thông số cho biết xác suất sai số (e) của trình tự đó với công thức $Q = -10\log_{10}(e)$ (Ewing & Green, 1998). Trình tự các mẫu sau khi kiểm tra được sắp xếp cùng nhau (alignment) bằng công cụ ClustalW của chương trình MEGA11 (Tamura et al., 2021). Chương trình này cũng được sử dụng để tính khoảng cách di truyền theo số nucleotide khác nhau và Kimura 2-parameter (K2P) trong cùng và giữa các loài (sai số ước tính theo phương pháp bootstrap với 1.000 lần lặp lại), đồng thời xây dựng cây di truyền theo phương pháp Neighbor-Joining số lần bootstrap lặp lại 1.000 lần. Trình tự gen COI của cá bông lau và tra bần cũng được so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank (GB) bằng công cụ BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3. KẾT QUẢ

3.1. So sánh trình tự gen COI của mẫu cá nghi ngờ với cá bông lau và tra bần

Trình tự gen COI sử dụng trong phân tích này có chiều dài 591 bp. Trình tự giống nhau giữa năm mẫu cá bông lau từ 99,8% (khác nhau ở một vị trí) đến 100% và giữa năm mẫu cá tra bần là 100%. Kết quả so sánh trình tự với GB cho thấy chúng giống với trình tự gen COI cùng loài là 100%. Gen COI của cá bông lau và tra bần khác nhau ở 52 – 53 vị trí, tương ứng với khoảng cách di truyền K2P là 9,74% ± 1,58%.

Trong bốn mẫu cá nghi ngờ, trình tự gen COI của một mẫu (L4) giống 100% so với cá bông lau trong nghiên cứu và trình tự đã công bố trên GB (mã số KT289877) và ba mẫu (L1, L2 và L3) giống cá tra bần 100% (mã số GB là KT289880 và NC_065096) (Bảng 4). Kết quả này cũng được thể hiện qua cây di truyền (Hình 2A). Ba mẫu cá kiểm tra cùng nhánh với cá tra bần và mẫu còn lại thuộc nhánh cá bông lau. Như vậy, kết quả định danh dựa trên gen ty thể COI cho thấy mẫu L1 có mẹ là cá bông lau và ba mẫu L1, L2 và L3 có mẹ là cá tra bần.

Bảng 4. Mức độ giống nhau về trình tự mẫu cá nghi ngờ với cá bông lau và tra bần

Mẫu cá kiểm tra	Bông lau	Tra bần
L1	90,3%	**100%**
L2	90,3%	**100%**
L3	90,3%	**100%**
L4	**100%**	90,4%

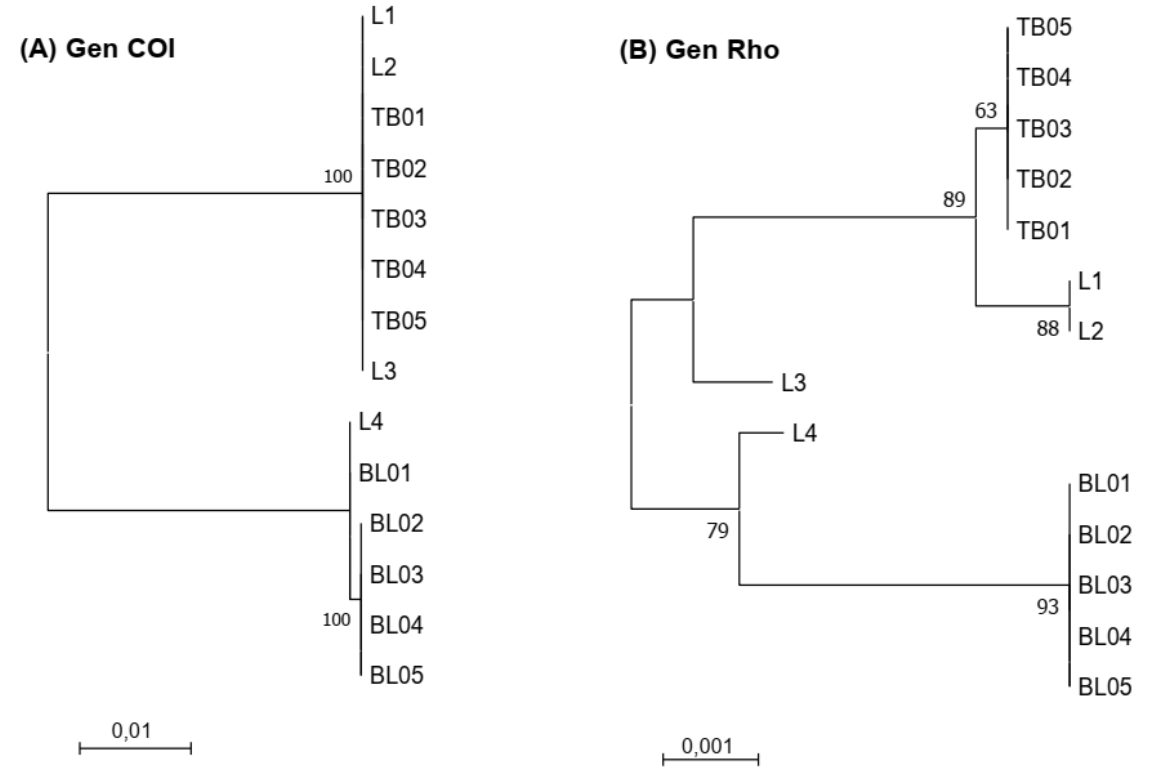
3.2. So sánh trình tự và biểu đồ trình tự gen Rho của cá bông lau, tra bần và cá nghi ngờ

Chiều dài đoạn gen Rho có chất lượng cao sau khi xử lý là 766 bp. Trong cùng một loài, trình tự giữa các mẫu hoàn toàn giống nhau, nghĩa là khoảng cách di truyền trong cùng loài của cá bông lau và cá tra bần đều bằng 0. Khi so sánh giữa hai loài này, chúng khác nhau ở bảy vị trí SNP thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Bảy vị trí khác biệt (SNP) giữa cá bông lau và tra bần trong tổng số 766 bp đoạn gen Rho

Loài cá	Vị trí của 7 SNP*						
	40	196	409	451	527	616	747
Bông lau	**C**	**T**	**C**	**T**	**T**	**T**	**G**
Tra bần	T	C	T	C	A	C	A
L1	T	C	T	C	A	*	A
L2	T	C	T	C	A	*	A
L3	*	C	T	*	A	C	*
L4	T	*	*	*	A	C	*

(*) thể hiện nucleotide giống với cá bông lau ở cùng vị trí

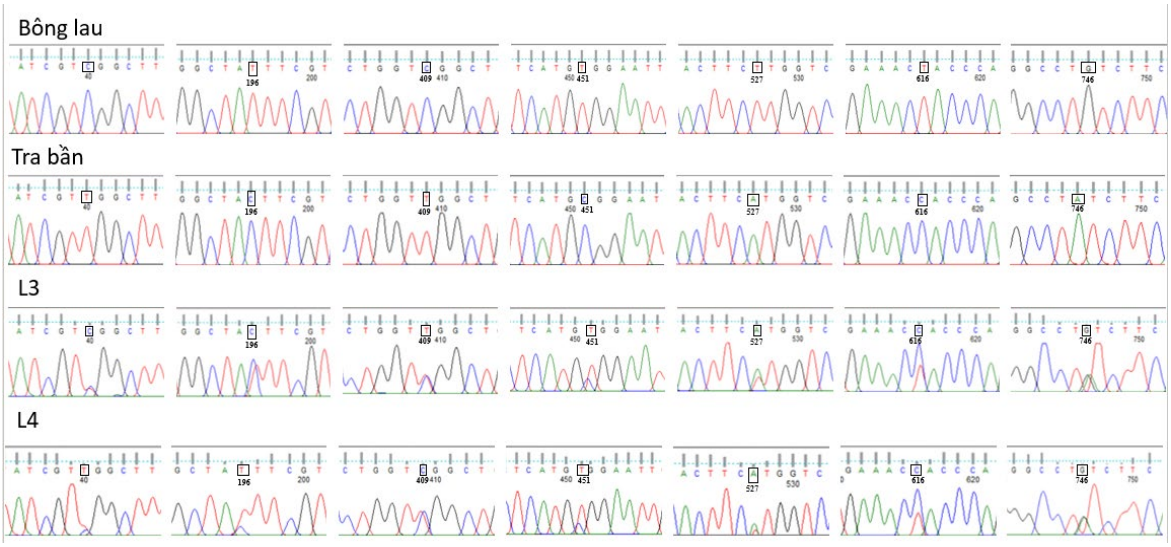


Hình 2. Cây di truyền dựa trên gen COI và Rho của các mẫu cá bông lau (BL), tra bần (TB) và con lai nghi ngờ (L1, L2, L3 và L4)

Bốn mẫu cá nghi ngờ có trình tự hoặc giống bông lau, hoặc giống tra bần ở bảy vị trí trên Bảng 5 nhưng không giống hoàn toàn một trong hai loài, khác với kết quả gen COI (mỗi mẫu cá nghi ngờ giống hoàn toàn với một trong hai loài). Điều này thể hiện qua cây di truyền ở Hình 2B. Mẫu L1 và L2 giống nhau và chúng có khoảng cách di truyền với cá tra bần nhỏ hơn so với L3 – Tra bần. Ba mẫu này cùng nhánh với cá tra bần. Trong khi đó, mẫu L4 có khoảng cách di truyền nhỏ nhất với cá bông lau và cùng nhánh với loài này. Kết hợp với kết quả so sánh dựa trên gen COI ở trên, trình tự gen Rho của các mẫu cá nghi ngờ giống với loài cá mẹ nhiều hơn so với loài cá cha. Nếu chỉ dừng lại ở kết quả so sánh trình tự và cây di truyền thì mới chỉ đưa ra dự đoán các mẫu cá nghi ngờ là con lai giữa hai loài bông lau và tra bần nhưng chưa biết được chính xác. Vì vậy, biểu đồ trình tự gen tiếp tục được xem xét.

Xem xét chất lượng giải trình tự ở bảy vị trí SNP cho thấy cá bông lau và tra bần đều có chất lượng cao (Q > 50, nghĩa là xác suất sai số $=10^{-5}$), trong khi đó, bảy vị trí nucleotide trên bốn mẫu cá nghi ngờ đều có chất lượng thấp (Q < 20) do có hai nucleotide trùng nhau (hai đỉnh), thể hiện ở Hình 3. Tại mỗi vị trí SNP, hai nucleotide trùng nhau trên mẫu cá nghi ngờ khớp với nucleotide của cá bông

lau và tra bần. Theo nguyên lý di truyền của gen trong nhân (như Rho), con lai sẽ thừa hưởng một alen của loài cha và một alen của loài mẹ. Như vậy, cả bốn mẫu nghi ngờ là con lai giữa hai loài bông lau và tra bần. Kết hợp kết quả phân tích dựa trên trên gen ty thể COI và gen trong nhân Rho chứng tỏ mẫu L1, L2 và L3 là con lai giữa ♀ tra bần x ♂ bông lau, mẫu L4 là con lai giữa ♀ bông lau x ♂ tra bần.



Hình 3. Bảy vị trí khác biệt trên biểu đồ giải trình tự gen Rho của cá bông lau, tra bần và con lai nghi ngờ L3 và L4 (L1 và L2 thể hiện tương tự)

4. THẢO LUẬN

4.1. Sự khác biệt trình tự gen ty thể và gen trong nhân và giữa cá bông lau và tra bần

Gen COI và Rho của cá bông lau và tra bần khác nhau rõ ràng với mức độ khác biệt ở gen COI (52 – 53 SNP, tương ứng với K2P là 9,74% ± 1,58%) lớn hơn so với gen Rho (7 SNP, K2P là 0,9%). Kết quả này phù hợp với xu hướng chung trên nhiều loài động vật là gen ty thể có tỷ lệ đột biến cao hơn so với gen trong nhân (Ballard & Whitlock, 2004). Với tính bảo thủ cao của gen trong nhân, gen Rho của năm cá thể trong mỗi loài giống nhau hoàn toàn, vì vậy, bảy SNP khác biệt giữa hai loài là SNP đặc hiệu để phân biệt hai loài.

Khác biệt gen Rho của cá bông lau và cá tra bần (K2P = 0,9%) nằm trong khoảng K2P của một số loài thuộc họ cá chép, từ 0,2% đến 4,1% (Collins et al., 2012) nhưng nhỏ hơn với một số giống cá khác. Trong giống *Clarias*, gen Rho của cá trê vàng và cá trê phi khác nhau 2,7% (Duong et al., 2017). Một số loài cá bống cát thuộc họ Gobiidae khác nhau ở 79 SNP, chiếm 11% chiều dài đoạn gen Rho (Larmuseau et al., 2010). Sự khác biệt gen Rho giữa cá bông lau và tra bần thấp nhưng ổn định nên gen này vẫn sử dụng được để phân biệt hai loài. Khi đó, độ tin cậy không phải thể hiện ở giá trị khác biệt di truyền (K2P) mà ở 7 SNP đặc hiệu. Khi sử dụng gen này để phân biệt loài con lai, phương pháp giải trình tự để xem xét biểu đồ trình tự là phù hợp và có độ chính xác cao.

4.2. Xác định con lai giữa hai loài cá bông lau và tra bần dựa trên gen COI và Rhodopsin

Hình dạng bên ngoài của bốn mẫu cá nghi ngờ rất khó nhận biết loài. Chúng không có những đặc điểm riêng biệt của loài bông lau hay tra bần như đã được mô tả trước đây (Yên và ctv., 2016; Nagao Natural Environment Foundation, 2021). Trong nghiên cứu này, việc kết hợp phương pháp phân tích trình tự gen ty thể COI và gen trong nhân Rho đã xác định được con lai hai chiều giữa cá bông lau và tra bần, trong đó có ba mẫu L1, L2 và L3 là con lai giữa ♀ tra bần x ♂ bông lau và mẫu L4 là con lai giữa ♀ bông lau x ♂ tra bần. Gen COI giúp xác định được loài mẹ và gen Rho cung cấp thông tin kiểu gen mang alen của loài cha và loài mẹ. Việc phân tích trình tự để xác định con lai không chỉ dựa vào kết quả so sánh trình tự (như Bảng 5) mà còn phải dựa vào biểu đồ giải trình tự (Hình 3). Khi so sánh trình tự gen Rho, mức độ tương đồng của con lai so với loài mẹ cao hơn so với loài bố (Hình 2B) và tùy thuộc vào mỗi mẫu con lai. Tuy nhiên, chênh lệch về mức độ tương đồng giữa các con lai với cá bông lau (99,2 – 99,6%) và cá tra bần (99,5 – 99,9%) thì nhỏ nên khó kết luận là con lai dựa trên số liệu này. Trong khi đó, so sánh biểu đồ giải trình tự của các

mẫu con lai cho thấy tất cả bảy vị trí khác biệt giữa hai loài bố mẹ đều xuất hiện cả hai nucleotide của hai loài, chứng tỏ độ tin cậy 100%. Phương pháp này cũng được sử dụng trong xác định cá trê lai giữa cá trê vàng và cá trê phi (Duong, 2015). Một số nghiên cứu khác áp dụng phương pháp tương tự với gen trong nhân RAG-1 để phân biệt con lai một số con lai thuộc họ cá chép (Yun et al., 2009; Song et al., 2017).

4.3. Vấn đề lai tạo giữa hai loài cá bông lau và tra bần trong nuôi trồng và quản lý thủy sản

Mặc dù việc sản xuất con lai giữa hai loài cá bông lau và tra bần chưa được công bố và cũng chưa thể xác định trại sản xuất, song với bằng chứng trên chứng tỏ việc này đang diễn ra ở ĐBSCL. Vấn đề này cần được các cơ quản lý thủy sản các cấp quan tâm, đồng thời các Viện/Trường cần nghiên cứu lai tạo và đánh giá biểu hiện cũng như tác động của con lai đến nghề nuôi cá bông lau và tra bần. Trong một nghiên cứu trước, Yên (2017) báo cáo chưa tìm thấy cá đực bông lau thành thục ở giai đoạn III trong cá thu mẫu ngoài tự nhiên. Vì vậy, con lai ♀ bông lau x ♂ tra bần có thể được sản xuất do khó khăn về nguồn cá đực bông lau. Tuy nhiên, việc xuất hiện con lai ♀ tra bần x ♂ bông lau cho thấy khả năng cá đực bông lau thành thục trong điều kiện nuôi. Một câu hỏi khác được đặt ra: tại sao lại sản xuất con lai ♀ tra bần x ♂ bông lau trong khi cá bông lau có giá trị kinh tế cao hơn cá tra bần? Có thể cá đực và cái của mỗi loài này lệch pha thành thục, song cũng có thể con lai có những biểu hiện tốt hơn về tăng trưởng hoặc/và tỉ lệ sống so với cá bông lau thuần ở giai đoạn ương giống. Do đó, các vấn đề này cần được nghiên cứu.

Việc sản xuất con lai khác loài không được kiểm soát mang lại nhiều lo ngại cho vấn đề quản lý, bảo tồn nguồn gen các loài cá bản địa nếu con lai có khả năng sinh sản và lai tạo lại với loài cá bố hoặc cá mẹ (Bohling, 2016). Ngược lại, nếu con lai không có khả năng sinh sản, đồng thời có những đặc điểm tốt cho nghề nuôi thì sẽ là một công thức lai thành công và có triển vọng ứng dụng trong nghề nuôi. Vì vậy, những nghiên cứu tiếp theo về các vấn đề trên của con lai giữa hai loài bông lau và tra bần cần được tiến hành để đánh giá những tác động của con lai đối với nghề nuôi và nguồn lợi thủy sản.

5. KẾT LUẬN

Bằng chứng dựa trên gen ty thể COI và gen trong nhân Rhodopsin cho thấy có sự xuất hiện con lai hai chiều giữa cá bông lau và tra bần đang được nuôi ở ĐBSCL. Trình tự gen ty thể của con lai giống 100% so với loài mẹ, trong khi con lai thể hiện hai nucleotide đặc trưng của loài cha và loài mẹ tại bảy vị trí trên gen Rhodopsin khác biệt giữa hai loài bông lau và tra bần. Độ tin cậy của việc xác định con lai của hai loài cá bông lau và tra bần dựa trên gen COI và Rhodopsin là 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Baird, I. (1996). Khone falls fishers. *Catch and Culture: Mekong Fisheries Network*, *2*(2), 1–3. http://www.mekonginfo.org/assets/midocs/0001824-biota-khone-falls-fisheries.pdf.

Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, *13*(4), 729–744. https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x

Bohling, J. H. (2016). Strategies to address the conservation threats posed by hybridization and genetic introgression. *Biological Conservation*, *203*, 321–327. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.10.011

Bucklin, A., Steinke, D., & Blanco-Bercial, L. (2011). DNA barcoding of marine metazoa. *Annual Review of Marine Science*, *3*, 471–508. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-080950

Chen, W.-J. J., Miya, M., Saitoh, K., & Mayden, R. L. (2008). Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: the order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. *Gene*, *423*(2), 125–134. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.07.016

Chen, W. J., Bonillo, C., & Lecointre, G. (2003). Repeatability of clades as a criterion of reliability: A case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *26*(2), 262–288. https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00371-8

Collins, R. A., Armstrong, K. F., Meier, R., Yi, Y., Brown, S. D. J., Cruickshank, R. H., Keeling, S., & Johnston, C. (2012). Barcoding and border biosecurity: Identifying cyprinid fishes in the aquarium trade. *PLoS One*, *7*(1), e28381. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028381

Duong, T. Y., Scribner, K. T., Kanefsky, J., & Na-Nakorn, U. (2017). Lack of introgressive hybridization by North African catfish (*Clarias gariepinus*) in native Vietnamese bighead catfish (*Clarias macrocephalus*) populations as revealed

by novel nuclear and mitochondrial markers. *Aquaculture*, *473*, 468–477. https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.007

Duong, T. Y. (2015). Differentiation of two Clarias species (*Clarias macrocephalus* and *C. gariepinus*) and their hybrids based on PCR-RFLP analysis. *Journal of Sciences & Development*, *13*(6), 904–912.

Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, *8*(3), 186–194. https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186

Fitzgibbon, J., Hope, A., Slobodyanyuk, S. J., Bellingham, J., Bowmaker, J. K., & Hunt, D. M. (1995). The rhodopsin-encoding gene of bony fish lacks introns. *Gene*, *164*(2), 273–277. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00458-I

Gigliarelli, L., Caldelli, A., Morozzi, G., Giannetto, D., Panara, F., Lorenzoni, M., & Lucentini, L. (2013). Nuclear PCR-RFLP detects the brook chub, *Squalius lucumonis* (Leuciscinae: Cyprinidae), and related hybrids with other cyprinid species. *Italian Journal of Zoology*, *80*(3), 462–465. https://doi.org/10.1080/11250003.2013.787462

Hashimoto, D. T., Prado, F. D. Do, Senhorini, J. A., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2013). Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: Approaches for genetic management in aquaculture. *Aquaculture Research*, *44*(6), 876–884. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03092.x

Hashimoto, Mendonça, Fernandes, Senhorini, Bortolozzi, Oliveira, D., Foresti, F., Porto-Foresti, Hashimoto, D. T., Mendonça, F. F., Senhorini, J. A., Bortolozzi, J., de Oliveira, C., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2010). Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture*, *298*(3–4), 346–349. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.015

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R., & DeWaard, and J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *270*(1512), 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Hogan, Z. S., Baird, I. G., Radtke, R., & Vander Zanden, M. J. (2007). Long distance migration and marine habitation in the tropical Asian catfish, *Pangasius krempfi*. *Journal of Fish Biology*, *71*(3), 818–832. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01549.x

Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, *7*(4), 544–548. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x

Lara, A., Ponce de León, J. L., Rodríguez, R., Casane, D., Côté, G., Bernatchez, L., & García-Machado, E. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, *10*, 421–430. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02785.x

Larmuseau, Larmuseau, M. H. D., Huyse, T., Vancampenhout, K., Van Houdt, J. K. J., & Volckaert, F. A. M. (2010). High molecular diversity in the rhodopsin gene in closely related goby fishes: A role for visual pigments in adaptive speciation? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *55*(2), 689–698. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.007

Nagao Natural Environment Foundation. (2021). *Fishes of the Indochinese Mekong*. Nagao Natural Environment Foundation, Tokyo, Japan.

Quyền, L. D. N., & Yên, D. T. (2018). Hiện trạng khai thác cá bông lau (*Pangasius krempfi*) và cá tra bần (*Pangasius mekongensis*) ở cửa sông Tiền. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, *54*(9), 82–87. https://doi.org/54(9), 82-87. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.184

Rehbein, H. (2013). Differentiation of fish species by PCR-based DNA analysis of nuclear genes. *European Food Research and Technology*, *236*(6), 979–990. https://doi.org/10.1007/s00217-013-1961-6

Roberts, T. R., & Baird, I. G. (1995). Traditional Fisheries and Fish Ecology on the Mekong River at Khone Waterfalls in Southern Laos. *The Natural History Bulletin of the Siam Society*, *43*, 219–262. https://doi.org/10.1007/s00167-014-3496-1

Saporito-Irwin, S. M., Geist, T., & Gutmann, D. H. (1997). Ammonium acetate protocol for the preparation of plasmid DNA suitable for mammalian cell transfections. *BioTechniques*, 23(3), 424–427. https://doi.org/10.2144/97233bm16

Song, H. Y., Kim, J. H., Seo, I. Y., & Bang, I. C. (2017). Species and hybrid identification of genus Coreoleuciscus species in Hwnag-ji Stream, Nakdong River Basin in Korea. *Korean Journal of Ichthyology*, *29*(1), 1–12.

Sriphairoj, K., Na-Nakorn, U., & Klinbunga, S. (2018). Species identification of non-hybrid and hybrid Pangasiid catfish using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Agriculture and Natural Resources*, *52*(1), 99–105. https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.014

Steinke, D., Zemlak, T. S., Boutillier, J. A., & Hebert, P. D. N. (2009). DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. In *Marine Biology* (Vol. 156, pp. 2641–2647). https://doi.org/10.1007/s00227-009-1284-0

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120

Tran, T. M. L., & Duong, T.Y. (2019). Differentiation of two Pangasius species , *Pangasius krempfi* and *Pangasius mekongensis* using inter- simple sequence repeat markers. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, *7*(4), 116–120.

Vu, A. V, Baumgartner, L. J., Mallen-Cooper, M., Howitt, J. A., Robinson, W. A., So, N., & Cowx, I. G. (2020). Diadromy in a large tropical river, the Mekong: more common than assumed, with greater implications for management. *Journal of Ecohydraulics*, 1–13. https://doi.org/10.1080/24705357.2020.1818642

Ward, R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 1077–1085. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02541.x

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*(1462), 1847–1857. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716

Yên, D. T. (2019). Nghiên cứu đa dạng di truyền và đặc điểm sinh học sinh sản cá bông lau (*Pangasius krempfi*) và cá tra bần (*Pangasius mekongensis*). Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ (Mã số B2017-TCT-22ĐT), Trường Đại học Cần Thơ.

Yên, D. T., Kiệt, N., Nên, B. S., Thường, N. V., Loan, N. B., & Định, T. Đ. (2016). DNA mã vạch và đặc điểm hình thái của cá bông lau (*Pangasius krempfi*), cá tra bần (*P. mekongensis*) và cá dứa (*P. elongatus*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, *14*, 29–37. https://doi.org/10.15625/1811-4989/14/1/9289

Yun, Y.-E., Lee, I.-R., Park, S.-Y., Kang, E.-J., Kim, E.-O., Yang, S.-K., Nam, Y.-K., & Bang, I.-C. (2009). Genetic Identification of Hybrids between Rhodeus uyekii and R. notatus by Sequence Analysis of RAG-1 Gene. *Journal of Aquaculture*, *22*(1), 79–82.