

DNA BARCODING OF OTTER CLAM (*Lutraria rhynchaena*) IN VAN DON DISTRICT, QUANG NINH PROVINCE

Trieu Anh Tuan^{1,3*}, Thai Thanh Binh², Nguyen Xuan Viet³

¹Hung Vuong University, ²Fisheries and Technical Economic College

³Hanoi National University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 04/4/2022	Otter clam (<i>Lutraria rhynchaena</i>) is a genus of bivalve mollusk, distributed mainly in Van Don, Quang Ninh province. It is currently being exploited and raised for food use. However, frequent outbreaks of diseases have put the otter clam farming profession at risk of unsustainability. The import of foreign otter clam for consumption in Vietnam is becoming popular. On the other hand, the identification of the otter clam species in Vietnam is not really clear and mainly based on morphology. This study was based on the extraction of the Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences of 5 species of otter clam published on GenBank to build DNA barcodes for taxonomy or quick traceability products on the market today. Evaluation of the similarity of COI gene regions was carried out with BLAST tool, nucleotide sequence comparison was performed by BioEdit program, genetic distance between sequences was determined by MEGA X software. The study has built a phylogenetic tree that separates each studied otter clam species and the evolutionary relationship between them, and at the same time built a DNA barcode from the COI (658 bp) gene region sequence of the otter clam in Vietnam.
Revised: 28/4/2022	
Published: 29/4/2022	
KEYWORDS	
Otter clam	
DNA Barcoding	
Cytochrome oxidase subunit I (COI)	
<i>Lutraria rhynchaena</i>	
Van Don	

MÃ VẠCH DNA CỦA LOÀI TU HẢI (*Lutraria rhynchaena*) Ở HUYỆN VÂN ĐỒN, TỈNH QUẢNG NINH

Triệu Anh Tuấn^{1,3*}, Thái Thanh Bình², Nguyễn Xuân Việt³

¹Trường Đại học Hùng Vương, ²Trường Cao đẳng Kinh tế, Kỹ thuật và Thủy sản

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 04/4/2022	Tu hải (<i>Lutraria rhynchaena</i>) là loài nhuyễn thể hai mảnh vỏ, phân bố chủ yếu tại Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh. Tu hải hiện nay đang được khai thác và nuôi để làm thực phẩm. Nghề nuôi tu hải cũng có nguy cơ thiếu bền vững do dịch bệnh thường xuyên xảy ra. Hiện tượng di nhập tu hải nước ngoài về tiêu thụ tại Việt Nam rất phổ biến. Mặt khác, việc định danh loài tu hải ở Việt Nam còn chưa thật sự rõ ràng và chủ yếu dựa vào hình thái. Nghiên cứu này, dựa trên cơ sở khai thác trình tự vùng gen Cytochrome c oxydase subunit I (COI) của 5 loài tu hải được công bố trên GenBank để xây dựng mã vạch DNA phục vụ công tác phân loại hoặc truy xuất nhanh nguồn gốc các sản phẩm tu hải trên thị trường hiện nay. Đánh giá mức độ tương đồng các trình tự vùng gene COI được thực hiện bằng công cụ BLAST, so sánh trình tự nucleotide được thực hiện bằng chương trình BioEdit, khoảng cách di truyền giữa các trình tự được xác định bằng phần mềm MEGA X. Kết quả nghiên cứu đã xây dựng được cây phát sinh chủng loại phân tách riêng từng loài tu hải nghiên cứu và quan hệ tiến hóa giữa chúng, đồng thời xây dựng được mã vạch DNA từ trình tự vùng gene COI (658 bp) của tu hải Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 28/4/2022	
Ngày đăng: 29/4/2022	
TỪ KHÓA	
Tu hải	
Mã vạch DNA	
Cytochrome c oxidase subunit I (COI)	
<i>Lutraria rhynchaena</i>	
Vân Đồn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5807>

* Corresponding author. Email: tuantrieuanh85@gmail.com

1. Giới thiệu

Tu hải (*Lutraria rhychaena*, Jonas 1844) là động vật thân mềm hai mảnh vỏ, có giá trị kinh tế cao, chúng phân bố ở các vùng bãi triều ở huyện Vân Đồn - Quảng Ninh, Cát Bà - Hải phòng và Nha Trang - Khánh Hòa [1]. Đây là động vật không xương sống có ý nghĩa quan trọng trong tự nhiên, cải tạo môi trường nước, tạo sự phát triển bền vững cho môi trường và là nguồn cung cấp thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao. Hiện nay, do khai thác quá mức nên nguồn lợi tu hải trở nên giảm sút và khu vực phân bố bị thu hẹp [2].

Tu hải là đối tượng được nuôi phổ biến tại Vân Đồn, Quảng Ninh và một số tỉnh thành ven biển khác, tuy nhiên việc định danh loài tu hải còn chưa thật sự rõ ràng, dễ nhầm lẫn [3], phương pháp phân loại chủ yếu dựa vào hình thái. Hiện nay, kỹ thuật phân tử phát triển nên các kỹ thuật di truyền được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về đa dạng di truyền, quan hệ phát sinh loài, đặc biệt được ứng dụng trong xây dựng mã vạch DNA, với mục đích củng cố, hỗ trợ cho việc nhận dạng và định danh loài. Mã vạch DNA lý tưởng trong các nghiên cứu phải đảm bảo 4 yêu cầu: (1) Trình tự DNA được sử dụng làm chỉ thị phải đủ độ biến thiên để phân biệt giữa các loài nhưng cũng phải không khác nhau quá mức giữa các cá thể trong cùng loài; (2) Việc định danh bằng DNA phải được chuẩn hóa, với cùng một vùng DNA có thể được sử dụng cho các nhóm phân loại khác nhau; (3) Đoạn DNA chỉ thị cần chứa đủ thông tin phát sinh loài để có thể dễ dàng định danh loài vào các nhóm phân loại (Chi, họ, bộ); (4) Khả năng áp dụng với các vùng gen có tính bảo thủ cao, dễ dàng tách DNA, khuếch đại và đọc trình tự DNA. Do đó, các đoạn DNA sử dụng trong nghiên cứu phải có kích thước ngắn để khi nhân bản DNA không bị sai lệch [4]. Đoạn gen nằm trên vùng DNA ty thể (COI, 16S), được coi là mã vạch DNA trong phân loại động vật rất hữu hiệu [3], sự biến đổi nhanh làm xuất hiện những sai khác trong trình tự nucleotide [5].

Mã vạch COI được sử dụng để định danh đối với nhiều loại động vật, do ở vùng gene này có các đoạn trình tự dễ bị thay thế làm khả năng tiến hóa, phát sinh loài cao hơn các vùng gen ty thể khác [6]. Ở các loài nhuyễn thể, mã vạch DNA đã được sử dụng trong phân loại đối với ốc hương [7], định danh các loài nhuyễn thể ở bờ biển Canada [8] và định danh các loài ốc ở châu Phi [9]. Với tu hải hiện nay chưa có bất kỳ nghiên cứu nào về mã vạch, kết quả tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu DNA vùng gene COI của các loài tu hải đã được công bố trên GenBank. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự vùng gene COI của tu hải (*Lutraria rhychaena*) thu tại Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh làm cơ sở để xây dựng mã vạch DNA cho tu hải ở Việt Nam, đồng thời bổ sung thêm phương pháp định loại cho hệ thống phân loại tu hải góp phần bảo tồn và quản lý các sản phẩm tu hải cho thị trường tiêu thụ trong nước và xuất khẩu.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Xác định trình tự gene của các giống *Lutraria*

Trình tự các vùng gene COI của các giống *Lutraria* được khai thác dữ liệu trên GenBank, trình tự gene của loài *L. rhychaena* được khai thác từ hệ gene ty thể của tu hải Việt Nam đã được đăng ký trên GenBank (Mã HG799089.1) và 4 loài tu hải khác, trình tự vùng gene COI của loài *Spisula solida* mã GenBank MG934910.1 được dùng làm đối chứng. Việc truy xuất các trình tự gene được thực hiện bằng chương trình BLAST.

2.2. Phân tích và xây dựng cây phát sinh loài

Các trình tự vùng gene COI của các loài tu hải đã được đóng hàng bằng chương trình MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) [10]. Ước lượng khoảng cách tiến hóa giữa các loài và trong cùng một loài được ước tính bằng phương pháp khoảng cách tối thiểu (*p-distance*), khoảng cách *p* là thước đo sự khác biệt di truyền giữa các loài hoặc giữa các quần thể trong một loài. Khoảng cách *p* giữa các cặp trình tự được tính toán dựa trên phần mềm MEGA X [11]. Ước lượng khoảng cách tiến hóa là tỷ lệ (*p*) của các vị trí nucleotide mà tại đó hai trình tự được so sánh là khác nhau. Nó được xác định bằng cách chia số nucleotide khác nhau cho tổng số nucleotide được so sánh [12].

Sử dụng trình tự vùng gene COI của loài *Spisula solida* (Mã MG439410.1) làm đối chứng trong xây dựng cây phát sinh loài. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng hai phương pháp là suy luận Bayes (Bayesian Inference, BI) và Maximum Likelihood (ML). Phân tích ML được thực hiện sử dụng chương trình RAxML 8.2.10 [13], [14] với mô hình chạy tốt nhất là GTR + I + G model cho khối dữ liệu phân tử được xác định từ phần mềm jModelTest 2.1.6 [15]. Chỉ số ủng hộ (bootstrap) của phân tích ML được thực hiện với 1000 lần lặp lại. Trong khi đó, phương pháp Bayesian inference được thực hiện bằng phần mềm MrBayes 3.1.2 [16] với mô hình chạy tốt nhất giống với phương pháp ML là GTR + I + G model. Thuật toán MCMC (Markov chain Monte Carlo) của phân tích BI được cài đặt để chạy trong 10.000.000 thế hệ và mỗi một cây phát sinh được chọn sau 1000 thế hệ khác nhau. Việc kiểm tra mức độ ảnh hưởng và chất lượng của cây phát sinh sau khi phân tích kết thúc được thực hiện bằng phần mềm Tracer 1.6 [17], với các thông số đảm bảo lớn hơn 200. Cây phát sinh phù hợp nhất cùng với chỉ số ủng hộ (posterior probabilities (PP)) được xác định và được đọc bằng Figtree 1.4.

2.3. Phân tích trình tự vùng gen COI của tu hài ở Việt Nam

Các trình tự vùng gene COI của các loài tu hài sau khi đóng hàng bằng chương trình MAFFT được tiến hành so sánh trình tự bằng chương trình BioEdit để tìm kiếm các vị trí sai khác nucleotide [18].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. So sánh trình tự nucleotide vùng gene COI tu hài ở Việt Nam với dữ liệu trên GenBank

Từ trình tự bộ gene ty thể của loài *L. rhynchaena* mẫu thu tại Vân Đồn, với độ dài 16927 bp được tiến hành BLAST để truy vấn trình tự vùng gene COI, kết quả xác định được độ dài trình tự vùng gen của loài *L. rhynchaena* dài 658 bp.

Đối với trình tự gene COI của các loài tu hài khác, nhận dạng bằng Megablast cho kết quả 5 loài thuộc giống *Lutraria*, điển hình như loài *L. maxima* (MF784266.1) có nguồn gốc tại Trung Quốc với mức 87,18%, *L. australis* (JN674600.1), *L. arcuata* (JN674601.1) và *L. lutraria* (BNAGB212-14). Trình tự gene COI của các loài *Lutraria* với chiều dài 624-658 nucleotide với mức độ giống nhau từ 86,73 - 100% và độ che phủ (query cover) đạt trên 96% trở lên. Sau khi so sánh và đóng hàng trình tự 615 bp của đoạn gene COI mtDNA đã được sử dụng để so sánh và tiến hành phân tích.

Kết quả so sánh trình tự DNA vùng gene COI của tu hài ở Việt Nam (*L. rhynchaena*) so với trình tự DNA của 5 loài tu hài đã được công bố trên GenBank được mô tả trong Bảng 1.

Bảng 1. So sánh mức tương đồng trình tự gene COI của loài tu hài Việt Nam (*L. rhynchaena*) với các loài được công bố trên GenBank

STT	Tên loài	Mức độ tương đồng (%)	Giá trị E	Mã số GenBank
1	<i>Lutraria rhynchaena</i>	100,0	0,0	HG799089.1
2	<i>Lutraria australis</i>	99,84	0,0	JN674600.1
3	<i>Lutraria maxima</i>	87,18	0,0	MF784266.1
4	<i>Lutraria arcuata</i>	86,99	0,0	JN674601.1
5	<i>Lutraria lutraria</i>	86,73	0,0	BNAGB212-14

Qua Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ tương đồng trình tự của loài tu hài *L. rhynchaena* so với trình tự của loài *L. australis* A1 tương đối cao (99,84%), tỷ lệ tương đồng giữa loài *L. rhynchaena* so với các loài còn lại đạt từ 86,73 – 87,18%, bước đầu cho thấy có thể định danh đến mức độ loài. Từ kết quả định loại bằng phân tử và cùng với định loại hình thái thì sử dụng mã vạch DNA có thể phân loại chính xác các loài tu hài trong chi *Lutraria*.

Theo Stackebrandt và Ebers [19], khi sử dụng công cụ BLAST trên ngân hàng GenBank, để so sánh trình tự DNA của một loài bất kỳ cần phân tích số liệu trình tự trên GenBank nếu chỉ số

giống nhau lớn hoặc bằng 97% được coi là cùng một loài và ngược lại nếu chỉ số phân tích nhỏ hơn 97% được coi là khác loài [19]. Điều này khẳng định tu hải ở Việt Nam *L. rhynchaena* và loài tu hải *L. australia* (Australia) là cùng một loài. Kết quả phân tích trong nghiên cứu này cũng giống với kết quả nghiên cứu của tổ chức CSIRO - Australia đã công bố loài tu hải có tên khoa học là *L. rhynchaena*, có tên gọi ở Australia là *L. australis*.

3.2. Khoảng cách di truyền và mối quan hệ di truyền giữa các loài tu hải

3.2.1. Khoảng cách di truyền

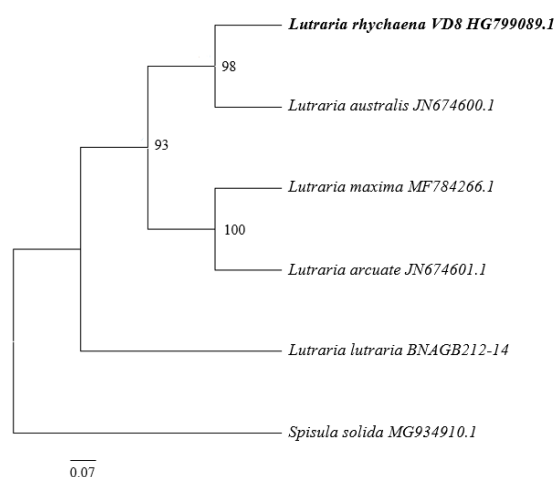
Khoảng cách di truyền phản ánh mối quan hệ di truyền giữa loài tu hải nghiên cứu, khoảng cách di truyền càng thấp thì mối quan hệ di truyền càng gần và ngược lại khoảng cách di truyền càng cao thì mối quan hệ di truyền càng xa. Từ dữ liệu phân tích trình tự gene COI của các loài tu hải trong nghiên cứu này bằng chương trình MEGA X, kết quả thu được khoảng cách di truyền giữa các mẫu nghiên cứu được mô tả tại Bảng 2.

Bảng 2. Ước lượng khoảng cách tiến hóa (*p*-distance) giữa loài tu hải Việt Nam và các loài tu hải được công bố trên GenBank

Tên loài	<i>L. rhynchaena</i>	<i>L. australis</i>	<i>L. maxima</i>	<i>L. arcuata</i>
<i>L. rhynchaena</i>				
<i>L. australis</i>	0,0016			
<i>L. maxima</i>	0,1282	0,1298		
<i>L. arcuata</i>	0,1300	0,1317	0,0016	
<i>L. lutraria</i>	0,1834	0,1850	0,1682	0,1707

Khoảng cách di truyền được phân tích từ các trình tự COI của các mẫu loài *Lutraria* nằm trong khoảng từ 0,0016 đến 0,1850, trong đó khoảng cách di truyền thấp nhất là 0,0016 khi so sánh giữa *L. rhynchaena* và *L. australis*, *L. maxima* với *L. arcuata*. Như vậy, các loài này có mối quan hệ tương đối gần nhau. Khoảng cách di truyền cao nhất khi so sánh giữa *L. australis* và *L. lutraria*, trong khi đó khoảng cách giữa *L. rhynchaena* và các loài còn lại dao động từ 0,0016 - 0,1834.

3.2.2. Cây phát sinh loài

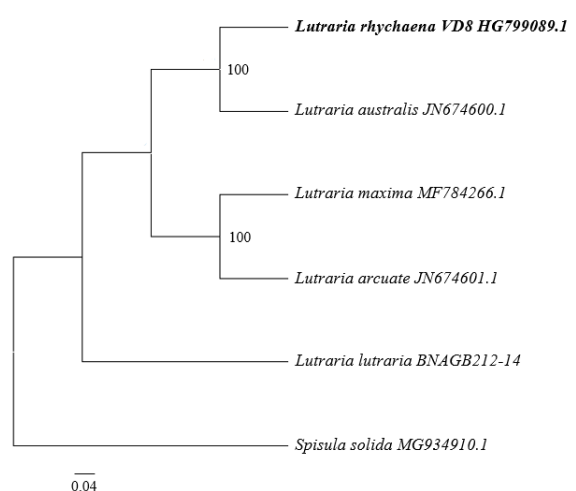


Hình 1. Mối quan hệ tiến hóa giữa các loài *Lutraria* dựa vào phân tích trình tự gene COI sử dụng thuật toán ML thuật toán Maximum likelihood nhờ sử dụng mô hình tiến hóa Kimura two-parameter (K2P) (Kimura 1980)

Kết quả xây dựng cây phát sinh loài bằng thuật toán ML đối với trình tự vùng gene COI cho thấy, 5 loài thuộc giống *Lutraria* nằm trong cùng một nhóm lớn của cây phát sinh loài (Hình 1),

nhánh còn lại là loài đối chứng *S. solida*. Ở nhánh thứ nhất của cây phát sinh gồm hai phân nhóm, phân nhóm một gồm hai nhóm nhỏ, nhóm thứ nhất gồm loài *L. rhynchaena* và *L. australis*, nhóm thứ hai gồm *L. arcuate* và *L. maxima*, hai nhóm này có mối quan hệ gần gũi với nhau, phân nhánh còn lại là *L. lutraria*.

Kết quả phân tích BI cho trình tự vùng gene COI của 5 mẫu giống *Lutraria* được xếp thành hai phân nhóm như Hình 2. Trong đó, 4 loài *L. rhynchaena*, *L. australis*, *L. arcuate* và *L. maxima* được xếp trong một phân nhóm gồm 2 nhóm nhỏ, nhóm thứ nhất *L. rhynchaena* và *L. australis*, nhóm thứ hai gồm *L. maxima* và *L. arcuate*, phân nhóm còn lại là *L. lutraria* nằm riêng lẻ.



Hình 2. Cây phát sinh giữa các loài *Lutraria* dựa vào phân tích trình tự gene COI sử dụng thuật toán BI (Bayesian inference với mô hình Clock Model: Strict)

Kết quả xây dựng cây phát sinh loài từ trình tự vùng gene COI đều cho kết quả giống nhau.

Như vậy, đối với trình tự gene COI khi phân tích phát sinh loài ML và BI cho kết quả tương tự nhau. Cây phân loại được chia thành 2 nhánh, trong đó nhánh thứ nhất gồm hai phân nhóm, nhóm *L. rhynchaena* và *L. australis*, nhóm còn lại là *L. maxima* và *L. arcuate*, phân nhóm kia là loài *L. lutraria*. Trình tự vùng gene COI của *L. rhynchaena* và *L. australis* có độ tương đồng cao và hoàn toàn phù hợp với kết quả phân loại dựa trên hình thái [20]. Theo mô tả của Holm, chúng là cùng một loài, loài *L. rhynchaena* có tên đồng danh *L. australis* hay có tên khác là *L. philippinarum* Deshayes, 1854 [20]. Kết quả xây dựng cây phát sinh loài từ trình tự DNA vùng gene COI góp phần khẳng định độ tin cậy của phương pháp phân tích phân tử trong phân loại, đồng thời phương pháp phân tích phân tử sẽ góp phần củng cố thêm cho phương pháp định loại bằng hình thái.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trình tự gene COI có thể sử dụng làm chỉ thị để nhận dạng loài *L. rhynchaena* với các loài khác trong chi *Lutraria*. Như vậy qua kết quả phân tích, mã vạch COI không chỉ hữu hiệu trong việc nghiên cứu đa dạng di truyền mà còn rất hữu hiệu trong nghiên cứu định loại.

3.3. Xây dựng mã vạch DNA vùng gene COI cho tu hài ở Việt Nam

Trong một số nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng vùng gene ty thể (16S, COI, Dloop) và các vùng gen nhân (18S, 28S, H3) phù hợp nhất trong việc ứng dụng phân tử trong phân loại các loài sinh vật [21]. Dựa trên trình tự các vùng gene của loài *Lutraria* đã được công bố trên GenBank, vùng gene COI được lựa chọn để nghiên cứu xây dựng mã vạch phân tử phục vụ cho việc phân loại các loài trong chi *Lutraria*, góp phần củng cố tính chính xác của việc phân tích phân loại dựa vào hình thái của các loài thuộc chi *Lutraria*.

Từ kết quả phân tích so sánh trình tự bằng chương trình BioEdit và cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ vùng gene COI của tu hài trong nghiên cứu này, đã xác định được các vị trí

nucleotide đặc thù cho từng loài tu hài, do đó có thể sử dụng làm mã vạch riêng để nhận dạng và phân biệt loài *L. rhynchaena* so với các loài khác nhờ vị trí nucleotide đặc thù, khác biệt so với các loài khác thuộc chi *Lutraria*.

Kết quả phân tích trình tự vùng gene COI của 5 loài thuộc chi *Lutraria* sau khi được đóng hàng và căn chỉnh có chiều dài 615 nucleotide, đã xác định được 143 vị trí sai khác trong các chi *Lutraria*. Giữa loài *L. rhynchaena* với loài *L. australis* đã xác định được một vị trí sai khác nucleotide ở vị trí số 265, trong khi đó với loài *L. maxima* và *L. arcuata* đã xác định được lần lượt 78 và 79 vị trí sai khác. Giữa loài *L. rhynchaena* với loài *L. lutraria* đã xác định được 117 vị trí nucleotide sai khác Bảng 3.

Bảng 3. Các vị trí sai khác nucleotide trên trình tự vùng gene COI (615 bp) của 5 loài tu hài

Tên loài	Vị trí nucleotide											
	16	19	22	28	29	34	37	40	46	47	49	61
TT tương đồng	T	G	T	A	T	G	T	T	G	G	G	G
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	C	.	C	.	.	.	A	C	.	.	T	.
<i>L. arcuata</i>	C	.	C	.	.	.	A	C	.	.	T	.
<i>L. lutraria</i>	.	A	.	G	A	A	.	.	A	A	T	A
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	65	67	73	76	85	89	91	94	97	100	103	109
TT tương đồng	C	G	G	T	G	T	G	C	T	G	T	T
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	T	.	A	A	.	C	T	T	.	.	.	T
<i>L. arcuata</i>	T	.	A	A	.	C	T	T	.	.	.	T
<i>L. lutraria</i>	.	A	.	.	T	C	T	T	G	A	A	C
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	110	112	115	118	121	124	133	136	139	148	151	154
TT tương đồng	C	G	T	C	C	C	A	A	G	T	A	T
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	T	A	A	T	G	T	G	T	.	.	.	G
<i>L. arcuata</i>	T	A	A	T	G	T	G	T	.	.	.	G
<i>L. lutraria</i>	T	.	G	T	G	T	G	T	A	C	G	A
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	157	160	166	169	172	181	187	190	196	197	199	202
TT tương đồng	A	A	G	G	T	T	A	G	C	A	G	G
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	G	T	.	.	.	.	G	.	T	.	A	.
<i>L. arcuata</i>	G	T	.	.	.	.	G	.	T	.	A	.
<i>L. lutraria</i>	G	T	A	A	A	G	.	A	.	T	A	A
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	203	208	220	223	232	241	247	250	256	257	259	262
TT tương đồng	T	G	A	G	T	T	G	T	G	T	G	G
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	.	A	G	.	A	.	.	.	A	C	C	.
<i>L. arcuata</i>	.	A	G	.	A	.	.	.	A	C	C	.
<i>L. lutraria</i>	C	A	G	A	G	C	A	C	T	C	G	A
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	265	268	274	275	277	278	280	283	286	289	292	295

TT tương đồng	T	T	G	T	G	C	G	G	T	T	T	T
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	.	A	.	C	T	T	A	A	G	.	.	.
<i>L. arcuata</i>	.	A	A	C	T	T	A	A	G	.	.	.
<i>L. lutraria</i>	.	A	.	C	T	C	T	.	.	A	C	C
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	298	310	316	325	328	331	340	346	349	352	355	358
TT tương đồng	G	T	C	T	C	T	G	G	G	A	T	C
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	.	.	.	.	T	C	A	.	.	.	.	T
<i>L. arcuata</i>	.	.	.	.	T	C	A	.	.	.	.	T
<i>L. lutraria</i>	A	A	G	A	T	.	A	C	A	G	G	T
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	361	364	367	370	373	379	382	392	394	400	403	407
TT tương đồng	G	T	G	A	G	T	A	C	G	G	C	C
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	T	.	T	T	.	.	T	.	G	A	G	T
<i>L. arcuata</i>	T	.	T	T	.	.	T	.	G	A	G	T
<i>L. lutraria</i>	A	A	T	T	A	C	T	T	A	.	G	T
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	409	421	427	433	439	448	454	460	463	466	467	469
TT tương đồng	G	A	T	T	T	C	G	T	G	G	G	A
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	.	.	A	.	.	T	A	G	.	.	A	G
<i>L. arcuata</i>	.	.	A	.	.	T	A	G	.	.	A	G
<i>L. lutraria</i>	A	G	.	C	C	T	.	.	A	A	.	G
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	472	475	478	481	484	488	490	491	493	499	508	511
TT tương đồng	G	T	A	A	A	A	C	T	G	T	G	A
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	A	.	G	G	T	.	T	C	.	A	A	G
<i>L. arcuata</i>	A	.	G	G	T	.	T	C	.	A	A	G
<i>L. lutraria</i>	.	C	G	G	G	C	T	.	A	.	A	G
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	520	523	529	533	541	544	550	553	556	559	562	565
TT tương đồng	A	C	G	G	A	T	G	A	T	G	G	T
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>L. maxima</i>	T	T	.	.	.	G	.	T	T	T	A	A
<i>L. arcuata</i>	T	T	.	.	.	G	.	T	T	T	A	A
<i>L. lutraria</i>	T	.	A	A	G	T	A	T	G	T	A	A
Tên loài	Vị trí nucleotide											
	568	574	580	583	586	592	598	601	607	610	613	
TT tương đồng	G	A	T	A	T	T	T	T	T	A	T	
<i>L. rhynchaena</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>L. australis</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>L. maxima</i>	.	.	.	G	.	C	.	.	C	G	.	
<i>L. arcuata</i>	.	.	.	G	.	C	.	.	C	G	.	
<i>L. lutraria</i>	A	G	C	T	C	.	C	C	.	T	G	

Từ kết quả phân tích trình tự cho thấy, gene COI của loài *L. rhynchaena* có sự khác biệt với các loài *L. maxima*, *L. arcuata* và *L. lutraria*, cũng như khác biệt trình tự nucleotide với *L. australis*, đây là cơ sở để xác định mã vạch DNA cho loài tu hải *L. rhynchaena* thu tại Việt Nam. Do đó, gene COI có thể sử dụng làm mã vạch DNA để nhận diện loài *L. rhynchaena* với các loài khác trong giống *Lutraria*.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, phương pháp định danh loài tu hải ở Việt Nam (*L. rhynchaena*) bằng trình tự DNA vùng gen COI với chiều dài 658 bp. Mỗi quan hệ phát sinh chủng loại của các loài tu hải trong nghiên cứu đã được xác lập qua phân tích dựa trên trình tự vùng gen COI (658 bp). Kết quả phân tích trình tự đã xác định được 243 điểm sai khác giữa loài tu hải Việt Nam với các loài còn lại trong giống *Lutraria*. Từ đó, mã vạch DNA vùng gene COI đã được xây dựng cho loài tu hải ở Việt Nam (*L. rhynchaena*). Có thể tiếp tục sử dụng thêm trình tự vùng gene nhân để nghiên cứu nhằm củng cố thêm cơ sở khoa học trong việc xây dựng mã vạch DNA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. T. Dang and T. H. Ho, *Fundamentals of Hydrobiology*. Publishing House for Science and Technology, Hanoi, 2007.
- [2] A. T. Trieu, T. B. Thai, X. V. Nguyen, and H. S. Bui, "Current situation of resources and *Lutraria rhynchaena* in Van Don district, Quang Ninh province," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 10, pp. 211-219, 2021.
- [3] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Proc Biol Sci*, vol. 270, no. 1512, pp. 313-321, 2003.
- [4] P. Taberlet, G. Pautou, and J. Bouvet, "Universal primer for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA," *Plant Molecular Biology*, vol. 17, pp. 1105-1109, 2007.
- [5] J. A. Castro, A. Picornell, and M. Ramon, "Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies," *Int Microbiol*, vol. 1, no. 4, pp. 327-332, 1998.
- [6] N. Knowlton and L. A. Weigt, "New dates and new rates for divergence across the isthmus of Panama," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 265, no. 1412, pp. 2257-2263, 1998.
- [7] T. B. Thai, V. H. Nguyen and V. H. Luu, "Application of DNA barcoding markers to classify Spotted babylon," *Vietnam Science and Technology*, vol. 13, no. 2, pp. 49-52, 2017.
- [8] K. K. S. Layton, A. L. Martel, and P. D. N. Hebert, "Patterns of DNA Barcode Variation in Canadian Marine Molluscs," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e95003, 2014.
- [9] H. V. der Bank and G. Richard, "A pioneer survey and DNA barcoding of some commonly found gastropod molluscs on Robben Island," *ZooKeys*, vol. 481, pp. 15-23, 2015.
- [10] K. Katoh, J. Rozewicki, and K. D. Yamada, "MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 20, pp. 1160-1166, 2019.
- [11] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms," *Mol Biol Evol*, vol. 35, no. 6, pp. 1547-1549, 2018.
- [12] M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 2000.
- [13] A. Stamatakis, "RAxML-VI-HPC, maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models," *Bioinformatics*, vol. 22, pp. 2688-2690, 2006.
- [14] A. Stamatakis, P. Hoover, and J. Rougemont, "A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers," *Systematics Biology*, vol. 57, pp. 758-771, 2008.
- [15] D. Posada, "jModelTest, phylogenetic model averaging," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 25, pp. 1253-1256, 2008.
- [16] F. Ronquist and J. P. Huelsenbeck, "MrBayes 3, Bayesian phylogenetic inference under mixed models," *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 1572-1574, 2003.
- [17] A. Rambaut and A. J. Drummond, "BEAST: Bayesian evolutionary analysis sampling trees," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 7, no. 1, pp. 1-8, 2007.
- [18] T. A. Hall, "BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis," *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, pp. 95-98, 1999.

- [19] E. Stackebrandt and J. Ebers, "Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards," *Microbiol Today*, vol. 8, pp. 6-9, 2006.
- [20] A. N. Holme, "The british species of Lutraria with a Description of Lutraria augustior philippi," *Journal Biol Assoc U. K.*, vol. 58, no. 3, pp. 557-568, 1959.
- [21] Plant Working Group CBOL, "A DNA barcoding for land plants," *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, vol. 106, no. 31, pp. 12794-12797, 2009.