COMBINING THE TECHNIQUES OF USING DNA BARCODING AND SPECIES-SPECIFIC PRIMERS IN IDENTIFYING CHEVROTAIN IN VIETNAM

Tuan Anh Bui[1*], Thuy Thi Thu Le[1], Thuy Thi Bich Vo[2], Huy Quoc Hoang[3], Thuy Kim Nguyen[4], Cuong Van Tran[5], Truong Son Nguyen[6]

[1]Institute of Forensic Science - Ministry of Public Security, [2]Institute of Genome Research – VAST,
[3]Greenviet Biodiversity Conservation Centre, [4]Hanoi University of Science and Technology
[5]People's Security Academy - Ministry of Public Security, [6]Institute of Ecology and Biological Resources - VAST

ARTICLE INFO

Received: 03/10/2024
Revised: 06/02/2025
Published: 07/02/2025

KEYWORDS

Silver-backed
Chevrotain
Biodiversity
DNA barcoding
Species-specific primer
Molecular indentification

ABSTRACT

Silver-backed chevrotain (*Tragulus versicolor*) is an endemic animal species of Vietnam, once thought to be extinct, but recently, it is rediscovered in the South Central region. This is a mammal with very limited scientific information to date and needs special priority for protection. To accurately identify the silver-backed chevrotain, in addition to using morphological criteria, it is necessary to develop a set of potential molecular genetic markers to accurately distinguish it from other chevrotain species. In this study, the method of using DNA barcoding and species-specific PCR primers were used in combination to identify and differentiate two species of chevrotain distributed in the territory of Vietnam. Identification results of 8 research samples, 4 samples belonged to the species *Tragulus versiclor*, 2 samples belonged to the species *Tragulus kanchil* and 2 samples showed results that they were not Artiodactyla. Study results show that the combination of DNA barcoding and species-specific primers is an effective tool to accurately identify chevrotain species, helping authorities have a scientific basis to handle cases infringing on wildlife, contributing to the protection of biodiversity.

KẾT HỢP SỬ DỤNG KỸ THUẬT MÃ VẠCH DNA VÀ MỒI ĐẶC HIỆU LOÀI TRONG ĐỊNH DANH HAI LOÀI CHEO CHEO TẠI VIỆT NAM

Bùi Anh Tuấn[1*], Lê Thị Thu Thuỷ[1], Võ Thị Bích Thuỷ[2], Hoàng Quốc Huy[3], Nguyễn Kim Thủy[4], Trần Văn Cường[5], Nguyễn Trường Sơn[6]

[1]Viện Khoa học hình sự - Bộ Công an, [2]Viện Nghiên cứu Hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
[3]Trung tâm bảo tồn đa dạng sinh học Việt Xanh, [4]Đại học Bách khoa Hà Nội,
[5]Học viện An ninh nhân dân - Bộ Công an, [6]Viện Sinh thái và Tài Nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO

Ngày nhận bài: 03/10/2024
Ngày hoàn thiện: 06/02/2025
Ngày đăng: 07/02/2025

TỪ KHÓA

Mã vạch DNA
Cheo cheo lưng bạc
Mồi đặc hiệu loài
Định danh phân tử
Đa dạng sinh học

TÓM TẮT

Cheo cheo lưng bạc (*Tragulus versicolor*) là loài động vật đặc hữu của Việt Nam, đã từng được cho là tuyệt chủng, mới đây, được phát hiện lại tại địa bàn Nam Trung Bộ. Đây là loài thú với các thông tin khoa học đến nay còn rất hạn chế, cần đặc biệt ưu tiên bảo vệ. Để định danh chính xác loài Cheo cheo lưng bạc, ngoài việc sử dụng các chỉ tiêu hình thái, cần nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị phân tử tiềm năng để phân biệt chính xác với các loài cheo cheo khác. Trong nghiên cứu này, phương pháp mã vạch DNA và phương pháp sử dụng mồi PCR đặc hiệu loài được sử dụng kết hợp để định danh phân biệt hai loài cheo cheo phân bố trên lãnh thổ Việt Nam. Kết quả định danh phân tử trong 8 mẫu nghiên cứu, có 4 mẫu thuộc loài Cheo cheo lưng bạc (*Tragulus versiclor*), 2 mẫu thuộc loài Cheo cheo nam dương (*Tragulus kanchil*) và 2 mẫu cho kết quả không phải thú Móng guốc ngón chẵn. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc kết hợp sử dụng phương pháp mã vạch DNA và mồi đặc hiệu loài là công cụ hữu hiệu xác định chính xác loài cheo cheo, giúp cơ quan chức năng có căn cứ khoa học để xử lý các vụ việc xâm phạm đến động vật hoang dã, góp phần vào công tác bảo vệ đa dạng sinh học.

DOI: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11223

* Corresponding author. *Email: buianhtuanifs@gmail.com*

1. Giới thiệu

Cheo cheo là loài thú nhỏ nhất thuộc bộ thú Móng guốc ngón chẵn (Artiodactyla), phân bố chủ yếu ở rừng nhiệt đới Đông Nam Á [1]. Việt Nam ghi nhận có hai loài cheo cheo, phân bố ở các vùng địa động vật khác nhau, trong đó Cheo cheo lưng bạc (*Tragulus versicolor*) gần đây được ghi nhận lại ở một số tỉnh Nam Trung Bộ [2] và Cheo cheo nam dương (*Tragulus kanchil*) [3], [4].

(A) (Nguồn: Nick Baker © Ecology Asia 2024) [2]

(B) (Nguồn: ©SIE/GWC/Leibniz-IZW NCNP, Ecology Asia 2024) [2]

Hình 1. *Hình ảnh Cheo cheo nam dương (A) và Cheo cheo lưng bạc thu được từ bẫy ảnh (B)*

Cheo cheo nam dương là loài thú Móng guốc chẵn nhỏ nhất, với ngoại hình giống hoẵng và hươu. Cheo cheo lưng bạc là loài thú móng guốc được ghi nhận đầu tiên ở Việt Nam ở tỉnh Khánh Hòa [5]. Tuy nhiên, quần thể của loài tưởng chừng đã bị tuyệt chủng ở Việt Nam cho đến năm 2004 loài được ghi nhận lại ở Buôn Lưới thuộc tỉnh Gia Lai [6] và một số tỉnh Nam Trung Bộ như Vườn quốc gia Núi Chúa (Ninh Thuận), Khu vực Krong Trai (Phú Yên), bán đảo Hòn Heo (Khánh Hòa) [2] với số lượng quần thể của loài cần được quan tâm bảo vệ nghiêm ngặt. Danh lục đỏ IUCN (2014) để Cheo cheo lưng bạc ở mức "DD" (thiếu thông tin) do không có thông tin về phạm vi phân bố hiện tại hoặc tình trạng quần thể của loài do thiếu công tác khảo sát phù hợp đối với loài này ở các khu vực phân bố trước đây của loài [7]. Việc ghi nhận lại phân bố của loài ở Việt Nam ở các vùng đã và đang cho thấy Cheo cheo lưng bạc là một trong những đối loài cần được ưu tiên bảo tồn cao do cho đến nay, loài mới chỉ được ghi nhận ở Việt Nam. Trong khi đó các hoạt động của con người đang tác động trực tiếp vào sinh cảnh của loài. Các nghiên cứu về sinh học, sinh thái, đặc điểm di truyền, hiện trạng phân bố và số lượng quần thể của loài Cheo cheo lưng bạc còn hạn chế gây khó khăn trong việc phân loại cũng như công tác bảo tồn loài này ở Việt Nam. Nhóm tác giả An Nguyen và cộng sự [2] đã xác nhận loài Cheo leo lưng bạc được tái phát hiện lại trong môi trường hoang dã ở Việt Nam sau thời gian dài nghi ngờ khả năng bị tuyệt chủng , đã và đang mở ra định hướng cho công tác nghiên cứu và bảo tồn loài này, một trong những loài thú móng guốc được đánh giá là đặc hữu của Việt Nam, có thể tuyệt chủng trong tương lai gần. Trong các vụ việc có dấu hiệu xâm phạm đa dạng sinh học, cụ thể là các vụ việc liên quan đến săn bắn, bẫy bắt và buôn bán động vật hoang dã, trong đó có nhiều vụ việc liên quan đến các loài cheo cheo, nhất là hiện tượng này đã diễn ra phổ biến ở khu vực Tây Nguyên và Nam Trung bộ, là khu vực phân bố của hai loài cheo cheo ghi nhận ở Việt Nam. Các mẫu vật cheo cheo được cơ quan chức năng thu giữ phục vụ giám định thường ở dạng không còn nguyên vẹn như không lông, không nội tạng, không đầu, hoặc chỉ còn là các bộ phận như mẫu mô, máu, nên công tác giám định hình thái gặp rất nhiều khó khăn và cần sử dụng phương pháp sinh học phân tử để hỗ trợ cho công tác giám định xác định loài đối với các mẫu vật được thu giữ.

Mã vạch DNA dựa trên việc giải trình tự và phân tích các vùng tiêu chuẩn như cytochrome c oxidase subunit I (*COI*), cytochrome b (*Cytb*), RNA ribosomal 16S (*16S rRNA*) [8]. Một kỹ thuật sinh học phân tử khác là sử dụng mồi đặc hiệu loài cũng được áp dụng khá phổ biến trong giám định định danh [9] vì có thể bỏ qua bước giải trình tự và hơn hết là có thể tiến hành đơn giản, nhanh chóng và tiết kiệm chi phí. Mục đích của nghiên cứu này là xây dựng bộ chỉ thị phân tử (mã vạch DNA và mồi đặc hiệu loài) phục vụ giám định định danh mẫu vật, dấu vết nghi là từ các loài cheo

cheo ghi nhận ở Việt Nam, phân biệt với các loài động vật khác. Hai phương pháp được sử dụng song song để so sánh tỷ lệ thành công, mức độ thuận tiện và chi phí để tìm ra kỹ thuật hiệu quả ứng dụng trong giám định thường quy đối với loài động vật này. Kết quả nghiên cứu cung cấp dữ liệu về sinh học phân tử quan trọng, đóng góp vào nguồn dữ liệu đang còn rất hạn chế về hai loài cheo cheo này tại Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

Tám mẫu mô tươi được thu thập từ vụ việc do cơ quan điều tra thu giữ, thực hiện trưng cầu giám định ở địa bản 2 tỉnh miền Trung Việt Nam (Khánh Hoà và Bình Thuận). Các mẫu mô được chọn lựa là loại mô cơ, được loại bỏ vùng da, cắt nhỏ bằng dao mổ vô trùng. Các mẫu mô được dán nhãn riêng biệt theo từng cá thể và bảo quản lạnh ở -80ºC.

Các mồi oligo phổ dụng (3 cặp mồi) và mồi đặc hiệu loài (2 cặp mồi) được tác giả thiết kế và đặt tổng hợp từ hãng Synbio Technologies (Hoa Kỳ). Các ống mồi được tổng hợp ở dạng đông khô, bổ sung ddH2O để có được nồng độ 100 µM/ống.

Khoảng 30 mg mẫu mô được sử dụng để tách chiết và tinh sạch DNA tổng số bằng phương pháp sử dụng hấp phụ cột lọc màng silica theo hướng dẫn của Bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Thể tích dung dịch rửa giải là 100 µL.

DNA tổng số sau tách chiết được khuếch đại sử dụng các mồi phổ dụng với vùng gen đích *COI*, *Cytb* và *16S rRNA*. Để tối ưu hóa khả năng bắt cặp, một số mồi *COI* được thiết kế dạng cocktails bao gồm trình tự mồi suy biến *COI* và trình tự M13 để gia tăng hiệu quả giải trình tự [10]. Thông tin về trình tự các mồi phổ dụng được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. *Thông tin về các mồi được sử dụng*

TT	Tên mồi	Trình tự	Gen	TL tham khảo
Mồi đặc hiệu loài				
1.	*T.Kanchil-ATP6 -F*	GGCCTCCCCATCGTAATTCT	*ATP6*	Nghiên cứu này
2.	*T.Kanchil-ATP6 -R*	GAGGGCTGTGGTGGTGCTAA	*ATP6*	
3.	*T.kan-Cytb -F*	TCACCAATCTCCTATCAGCTATTC	*Cytb*	Nghiên cứu này
4.	*T.kan-Cytb -R*	GTATGGAGAAGAGGCATGAGT	*Cytb*	
5.	*T.ver-Cytb -F*	TGAAACAGGGTCTAACAATCCA	*Cytb*	Nghiên cứu này
6.	*T.ver-Cytb -R*	GCGAGTTGTCCGATAATGATG	*Cytb*	
Mồi phổ dụng				
7.	mcb398	TACCATGAGGACAAATATCATTCTG	*Cytb*	[1]
8.	mcb869	CCTCCTAGTTTGTTAGGGATTGATCG	*Cytb*	
9.	*16S* a2	CGCCTGTTTACCAAAAACAT	*16S*	[2]
10.	*16S* b	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	*16S*	
11.	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	*COI*	[3]
12.	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	*COI*	
Mồi dạng cocktails				
13.	VF1d_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCA ACCACAARGAYATYGG	*COI*	[4]
14.	VR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTG GGTGGCCRAARAAYCA	*COI*	
15.	M13F (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT		[5]
16.	M13R (-27)	CAGGAAACAGCTATGAC		

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 50 µL. Chu trình nhiệt được thiết lập như sau: tiền biến tính trong 5 phút ở 95ºC, tiếp theo là 35 chu kỳ: biến tính ở 94ºC trong 1 phút, gắn mồi 16S ở 54ºC, *COI* và *Cytb* ở 56ºC trong 30 giây, kéo dài ở 72ºC trong 1 phút, cuối cùng kéo dài 72ºC trong 5 phút. Thành phần phản ứng PCR được chuẩn bị như trong Bảng 2.

Bảng 2. *Thành phần phản ứng PCR*

Thành phần	Thể tích hút (µL)
DEPC Water	21
2X Master Mix	25
Primer mix (10 µM each)	2
DNA khuôn	2
Tổng thể tích	*50*

Quá trình điện di kiểm tra sản phẩm được tiến hành trên gel agarose 1,0% với thuốc nhuộm RedSafe™, sử dụng 7 µL sản phẩm PCR. Kết quả điện di được quan sát trên hệ thống đọc gel, sản phẩm PCR được gửi giải trình tự Sanger.

Trình tự của mẫu nghiên cứu sẽ được phần mềm phiên mã thành trình tự protein, sau đó tiến hành dóng hàng đa trình tự với các trình tự tham khảo của loài nghi ngờ thu được từ NCBI, các đoạn trình tự thừa sẽ được cắt bỏ.

Trình tự các gen *COI*, *Cytb* và *16S rRNA* thu được được sử dụng riêng biệt làm dữ liệu để xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên phương pháp Neighbor-Joining bằng phần mềm MEGA (v.11.0.13) [15]. Gốc của cây phát sinh chủng loại được xác định bằng phương pháp sử dụng nhóm đối chứng (out-group). Trong phương pháp này, trình tự tương đồng đối chứng của loài Dê nhà (*Capra hircus*), là loài cùng thuộc bộ Móng guốc chẵn Artiodactyla, nhưng khác họ, Bovidae đã được sử dụng. Cây phát sinh chủng loại sẽ được kiểm tra thứ tự phân nhánh và tính chính xác bằng phân tích giá trị bootstrap sau 1000 lần lặp lại sử dụng công cụ MEGA.

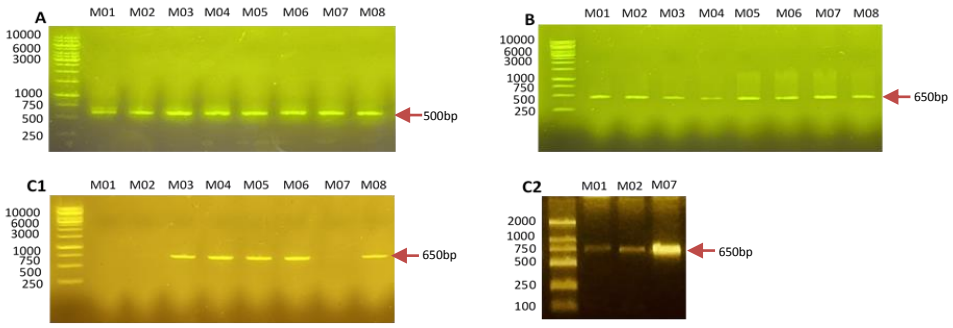
Dựa trên các trình tự đích được lựa chọn là *Cytb* và *ATP6*, phần mềm Primer 3plus được sử dụng để thiết kế các mồi đặc hiệu loài. Tính đặc hiệu của mồi được kiểm tra *in-silico* bằng phần mềm PrimerBlast của NCBI.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá hiệu quả định danh loài của các mã vạch COI, Cytb và 16S rRNA

DNA khuôn tách chiết được từ 8 mẫu nghiên cứu được tiến hành khuếch đại bằng phản ứng PCR lần lượt với các cặp mồi của 3 đoạn mã vạch *COI*, *Cytb* và *16S* rRNA. Kết quả kiểm tra điện di trên gel sản phẩm khuếch đại các trình tự *COI*, *Cytb*, *16S rRNA* được minh chứng tại Hình 2.

Với các cặp mồi *16S rRNA* và *Cytb* đều khuếch đại thành công, cho các sản phẩm PCR đặc hiệu với các băng vạch sáng rõ. Với các cặp mồi *COI* đã khuếch đại thành công ngoại trừ 3 mẫu M01, M02 và M07. Cặp mồi phổ dụng *COI* đã được thiết kế lại dưới dạng cocktail sử dụng mồi suy biến và mồi M13 để tiến hành PCR lại giúp cho ra sản phẩm PCR đặc hiệu và giải trình tự Sanger. Các trình tự *COI*, *Cytb*, *16S rRNA* thu được sau khi loại bỏ vùng trình tự mồi lần lượt có kích thước là 650, 650 và 500 bp. **x**



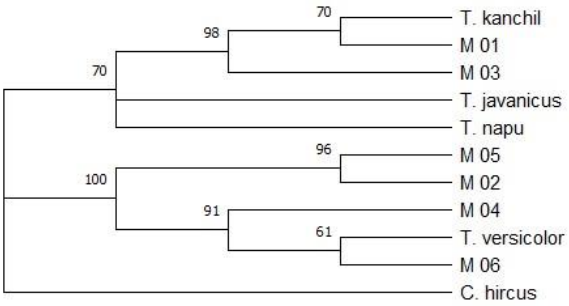
Hình 2. *Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose khuếch đại sử dụng mồi phổ dụng trình tự 16S rRNA (hình A), Cytb (hình B) và COI (hình C1). Các mẫu M01, M02 và M07 không thu được sản phẩm PCR với mồi phổ dụng, được tiến hành PCR lại với mồi suy biến (hình C2).*

Sử dụng công cụ BLAST để đánh giá hiệu quả định danh của các mã vạch thể hiện ở chỉ số tương đồng cao nhất. Kết quả cho thấy, trong số các mồi universal dùng để nhận diện 2 loài cheo cheo, mồi *Cytb* cho khả năng nhận diện loài ở mức độ tin cậy cao nhất (gần đạt 100%), sau đó đến mồi *16S* và thấp nhất là mồi *COI*. Nguyên nhân là do hầu hết dữ liệu về trình tự của các loài nghiên cứu còn rất hạn chế, như trường hợp trình tự của gen *COI* của loài cheo cheo vẫn chưa được ghi nhận trên ngân hàng gen NCBI. Kết quả định danh bằng cách so sánh chỉ số tương đồng trình tự cho thấy trong 08 mẫu nghiên cứu, chỉ có 02 mẫu (M03 và M04) được xác định là thuộc loài Cheo cheo nam dương (*Tragulus kanchil*), 04 mẫu (M01, M02, M05 và M06) được xác định thuộc loài Cheo cheo lưng bạc (*Tragulus versicolor*) và 02 mẫu còn lại (M07 và M08) không thuộc họ Cheo cheo (*Tragulidae*).

3.2. Đánh giá hiệu quả nhận dạng loài thông qua phân tích kết quả cây phát sinh chủng loại

Phân đoạn trình tự mã vạch *Cytb* được xem là loại mã vạch hiệu quả nhất để định danh hai loài cheo cheo được nhận diện trong các mẫu nghiên cứu. Do đó, phân đoạn này được chọn lựa để xây dựng cây phát sinh chủng loại giữa các loài gần gũi với hai loài được phát hiện.

Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Maximum Likelihood kiểm tra trật tự phân nhánh và đảm bảo độ tin cậy thông qua các giá trị bootstrap sau 1000 lần lặp lại, các mẫu từ các loài gần gũi được gom cụm vào trong một nhánh. Hiệu quả định danh của mã vạch *Cytb* cũng được đánh giá thông qua chỉ số khoảng cách di truyền được tính toán bằng phần mềm MEGA. Trong đó, khoảng cách trong cùng loài giữa mẫu M01, M03 thu được là 0,0002. Khoảng cách tối đã giữa các loài là 0,273, khoảng cách tối thiểu giữa các loài là 0,0125. Kết quả này cho thấy, mã vạch *Cytb* và có khả năng phân biệt tốt giữa các mẫu từ các loài cheo cheo khác nhau.



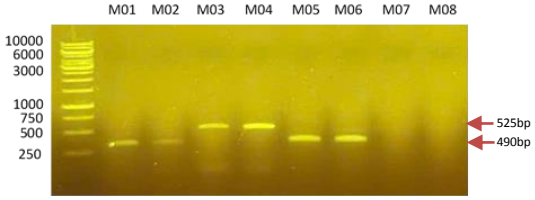
Hình 3. *Cây phát sinh chủng loại từ tập hợp trình tự phân đoạn Cytb của các mẫu nghiên cứu (khuếch đại bằng cặp mồi phổ dụng) với một số loài liên quan*

Kết quả trật tự phân nhánh trên cây phát sinh chủng loại ở Hình 3 cho thấy có sự tương đồng khi so sánh với các kết quả phân tích chỉ số tương đồng trình tự thu thập được từ các loài khác nhau. Mẫu M01 và M03 cùng phân nhánh với loài *T. kanchil* với khoảng cách tiến hóa bằng 0. Trong khi các mẫu M02, M04, M05 và M06 cùng phân nhánh với *T. versicolor*, với cùng khoảng cách tiến hóa bằng 0. Trật tự phát sinh trong cây tiến hóa cho thấy có sự hình thành một dòng dõi tiến hóa của các loài được chọn lựa phân tích trong chi *Tragulus*. Kết quả này phù hợp với nhận định rằng *Tragulus versicolor* khác biệt về mặt phát sinh loài với tất cả các loài khác trong cùng chi của nhóm tác giả nghiên cứu mới đây.

3.3. Đánh giá hiệu quả định danh của các mồi đặc hiệu loài

Sản phẩm PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu loài khuếch đại vùng gen *ATP6* và *Cytb* được giải trình tự, kích thước sản phẩm PCR của 2 vùng gen lần lượt là 525 bp và 490 bp. Tuy nhiên, khi so sánh chỉ số tương đồng của các phân đoạn được khuếch đại bằng 2 cặp mồi đặc hiệu loài, kết quả cho thấy toàn bộ 6 mẫu được định danh bằng cặp mồi đặc hiệu *Cytb* thì 5 mẫu cho chỉ số tương đồng là 100%, duy nhất 1 mẫu cho chỉ số tương đồng là 99,75%. Kết quả này cao hơn nhiều so với cặp mồi khuếch đại vùng gen *ATP6* (trung bình 94,31%).

Kết quả kiểm tra sản phẩm khuếch đại PCR sử dụng mồi đặc hiệu loài có sự tương đồng với kết quả định danh sử dụng mồi phổ dụng đã trình bày ở phần trên với sự xuất hiện của 2 loài Cheo cheo nam dương (các mẫu M03 và M04) và Cheo cheo lưng bạc (M01, M02, M05 và M06) với các băng vạch có kích thước đặc hiệu cho từng loài trong các mẫu nghiên cứu. Hai mẫu M07 và M08 không thuộc họ Cheo cheo nên không xuất hiện band DNA.



Hình 4. *Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm PCR sử dụng mồi đặc hiệu loài với các mẫu nghiên cứu*

Từ kết quả điện di gel agarose với băng vạch sáng rõ (Hình 4) và kết quả giải trình tự cho sự tương đồng cao với loài nghi ngờ, có thể thấy hai mồi đặc hiệu loài cho kết quả định danh hiệu quả, có độ tin cậy cao. Mồi đặc hiệu loài cho phép định danh, phân biệt được rõ 2 loài Cheo cheo là Cheo cheo lưng bạc và Cheo cheo nam dương, với các loài động vật khác.

Toàn bộ các trình tự sau khuếch đại bằng các cặp mồi phổ dụng và mồi đặc hiệu loài được sử dụng trong nghiên cứu để định danh loài đã được tác giả đăng ký trên ngân hàng GenBank (NCBI) để làm cơ sở cho công tác định danh loài về sau, các trình tự cùng các mã số truy cập được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. *Mã số truy cập GenBank của trình tự thu được từ các mẫu nghiên cứu*

Ký hiệu Mẫu	Tên trình tự	Tổng điểm (total score)	Độ che phủ (query cover)	Mã số truy cập GenBank
M01	*Tragulus versicolor*, *16S* ribosomal RNA gene, partial sequence	756	100%	PQ305497
	Tragulus versicolor, *COI* gene, partial sequence			PQ305533
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence			PQ325473
	Tragulus versicolor, *ATP6* gene, partial sequence*			PQ309689
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence*			PQ325506
M02	*Tragulus versicolor*, *16S* ribosomal RNA gene, partial sequence	754	100%	PQ305499
	Tragulus versicolor, *COI* gene, partial sequence			PQ305535
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence			PQ325476
	Tragulus versicolor, *ATP6* gene, partial sequence*			PQ309691
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence*			PQ325507
M03	*Tragulus kanchil*, *16S* ribosomal RNA gene, partial sequence	765	100%	PQ305496
	Tragulus kanchil, *COI* gene, partial sequence			PQ305532
	Tragulus kanchil, *CYTB* gene, partial sequence			PQ325471
	Tragulus kanchil, *ATP6* gene, partial sequence*			PQ309688
	Tragulus kanchil, *CYTB* gene, partial sequence*			PQ325472
M04	*Tragulus kanchil*, *16S* ribosomal RNA gene, partial sequence	760	100%	PQ305498
	Tragulus kanchil, *COI* gene, partial sequence			PQ305534
	Tragulus kanchil, *CYTB* gene, partial sequence			PQ325474
	Tragulus kanchil, *ATP6* gene, partial sequence*			PQ309690
	Tragulus kanchil, *CYTB* gene, partial sequence*			PQ325475
M05	*Tragulus versicolor*, *16S* ribosomal RNA gene, partial sequence	767	100%	PQ305500
	Tragulus versicolor, *COI* gene, partial sequence			PQ305536
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence			PQ325477
	Tragulus versicolor, *ATP6* gene, partial sequence*			PQ309692
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence*			PQ325508
M06	*Tragulus versicolor*, *16S* ribosomal RNA gene, partial sequence	761	100%	PQ305501
	Tragulus versicolor, *COI* gene, partial sequence			PQ305537
	Tragulus versicolor, *CYTB* gene, partial sequence			PQ325478
	Tragulus versicolor, *ATP6* gene, partial sequence*			PQ309693

Ký hiệu Mẫu	Tên trình tự	Tổng điểm (total score)	Độ che phủ (query cover)	Mã số truy cập GenBank
	Tragulus versicolor, CYTB gene, partial sequence*			PQ325509
C.hircus	*Capra hircus, CYTB* gene, complete sequence			QGG43642
T.kanchil	*Tragulus kanchil, CYTB* gene, complete sequence			PP783605
T.versicolor	*Tragulus versicolor, CYTB* gene, partial sequence			PP783611
T.javanicus	*Tragulus javanicus, CYTB* gene, complete sequence			AB122099

Ghi chú: (*) là các trình tự được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu loài

Hiện nay, Cheo cheo lưng bạc đã được đánh giá mức độ đe dọa ở Việt Nam (Danh lục đỏ Việt Nam, 2023) (Bậc CR, Cực kỳ nguy cấp). Tuy nhiên, loài vẫn Thiếu dữ liệu (DD) trong Danh lục đỏ (các loài sinh vật bị đe dọa tuyệt chủng) của Tổ chức Bảo tồn thiên nhiên quốc tế IUCN mà cần được đưa vào mức độ đe dọa cụ thể. Do đó, cập nhật hiện trạng phân bố cũng như quần thể của loài ở Việt Nam có đề xuất mức độ đánh giá quần thể của loài theo tiêu chí phân hạng của IUCN là rất cần thiết để có kế hoạch hành động bảo tồn loài cho phù hợp với điều kiện thực tế của từng địa phương.

Các loài cheo cheo hoang dã ở Việt Nam hiện đang bị suy giảm nghiêm trọng dưới nhiều hình thức tác động (săn bắn, bẫy bắt, buôn bán, mất sinh cảnh). Các phát hiện gần đây về vùng phân bố của loài, kết quả về dẫn liệu sinh học phân tử, cũng như các vụ việc buôn bán bẫy bắt các loài cheo cheo nói chung Cheo cheo lưng bạc cùng với kết quả nghiên cứu này đã chứng minh việc kết hợp kỹ thuật mã vạch DNA và sử dụng mồi đặc hiệu loài để định danh chính xác loài sẽ đóng góp nhanh và chính xác vào công tác giám định, hỗ trợ xác lập chứng cứ trong xử lý các vụ việc xâm phạm bảo vệ động vật hoang dã hiện nay ở Việt Nam.

Việc sử dụng mồi đặc hiệu loài hay mã vạch DNA đều có ưu và nhược điểm. Thông qua giải trình tự DNA, phương pháp nhận dạng bằng mã vạch DNA có thể thu được trình tự DNA của một vị trí đặc hiệu trong một mẫu và xác định chính xác loài của một nguồn mẫu chưa biết. Tuy nhiên, phương pháp này cần nhiều thời gian và tốn kém thêm chi phí giải trình tự. Trong khi đó, chỉ thông qua kết quả điện di trên gel, mồi đặc hiệu loài được xác định nhanh chóng khi có mặt mẫu của loài nghi ngờ. Phương pháp này giúp tiết kiệm chi phí và thời gian, có thể dễ dàng thực hiện ở các phòng thí nghiệm sinh học phân tử thông thường.

Mồi đặc trưng cho loài có thể tiến hành nhanh chóng và hiệu quả về mặt chi phí vượt trội nhưng lại thiếu độ chính xác như của phương pháp nhận dạng mã vạch DNA. Mặc dù mồi dành riêng cho từng loài có thể đáp ứng hầu hết các yêu cầu nhận dạng, tuy nhiên không thể loại bỏ hoàn toàn các trường hợp dương tính giả và kết quả âm tính giả. Vì vậy, mồi đặc hiệu loài được khuyến nghị sử dụng làm phương pháp chính ứng dụng trong thực tế, mã vạch DNA là phương pháp bổ sung cho trường hợp kết quả bằng phương pháp mồi đặc hiệu không rõ, mẫu khó, phức tạp.

Việc thiết kế mồi đặc hiệu loài cần tuân thủ nghiêm ngặt nguyên tắc bổ sung giữa mồi và trình tự DNA khuôn, nguyên tắc bổ sung giữa mồi đặc hiệu và trình tự DNA của loài đó phải nghiêm ngặt hơn so với các loài khác. Ngoài ra, các điều kiện của phản ứng PCR cũng ảnh hưởng tới sự khuếch đại đặc hiệu. Do đó, cần phải tối ưu hóa phản ứng PCR trước khi đánh giá hiệu quả khuếch đại đặc hiệu của các mồi. Mồi đặc hiệu loài cũng cần được kiểm tra đồng thời với loài đặc hiệu và loài khác để loại trừ các điều kiện khác bao gồm thiết bị hoặc điều kiện tối ưu của phản ứng PCR có thể ảnh hưởng cho kết quả khuếch đại một band duy nhất.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã đưa ra phương pháp định danh phân tử tin cậy và nhanh chóng đối với hai loài Cheo cheo lưng bạc và Cheo cheo nam dương tại Việt Nam dựa trên các trình tự phổ dụng, trong đó trình tự gen *Cytb* cho hiệu quả định danh loài cao nhất. Bên cạnh đó, mồi đặc hiệu cho hai loài cheo cheo này cũng được thiết kế để giúp nhận dạng phân biệt nhanh hai loài cheo cheo. Nghiên cứu cũng cung cấp các cứ liệu phân tử phục vụ cho việc giám định, bảo tồn đa dạng các

loài cheo cheo. Với loài Cheo cheo lưng bạc, cần thiết phải bổ sung vào các văn bản pháp luật, công ước quốc tế để bảo vệ là loài thú đặc hữu, quý, hiếm của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1] M. R. Wilson DE, *Handbook of the Mammals of the World*, vol. 2. Hoofed Mammals. Barcelona: Lynx Edicions (Zoo Biology), 2011.

[2] A. Nguyen *et al.*, "Camera-trap evidence that the silver-backed chevrotain *Tragulus versicolor* remains in the wild in Vietnam," *Nature ecology & evolution*, vol. 3, no. 12, pp. 1650-1654, 2019, doi: 10.1038/s41559-019-1027-7.

[3] N. C. Dang *et al.*, *List of Vietnam's wild animals*. Primates Research Institute (Inuyama) and Institute of Ecology and Biological Resources (Hanoi), 2008, p. 400.

[4] H. H. Dang *et al.*, *Vietnamese Animals*, vol. 25: Animal Class - Mammalia (Primates, Carnivora, Artiodactyla, Perissodactyla, Rodentia). Hanoi: Science and Technology Publishing House, 2008, p. 362.

[5] O. Thomas, "LXXIV.Three new Asiatic mammals," *Annals and Magazine of Natural History*, vol. 5, no. 30, pp. 534-536, 1910, doi: 10.1080/00222931008692812.

[6] A. G. Kuznetsov and A. Borisenko, "A new record of *Tragulus versicolor* (Artiodactyla, Tragulidae) from Vietnam, and its sympatric occurrence with T. kanchil," *Russian Journal of Theriology*, vol. 3, pp. 9-13, 2004, doi: 10.15298/rusjtheriol.03.1.03.

[7] R. Timmins, J. W. Duckworth, and E. Meijaard, *Tragulus versicolor*, The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T136360A61978789, 2015, doi: 10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T136360A61978789.en.

[8] M. Natonek-Wiśniewska and E. Slota, "Polymorphism of the *Cytb* gene as a marker for species identification of mammalian mtDNA," *Annals of Animal Science*, vol. 8, pp. 243-247, 2008.

[9] H. Gargouri, N. Moalla, and H. Hadj Kacem, "PCR–RFLP and species-specific PCR efficiency for the identification of adulteries in meat and meat products," *European Food Research and Technology*, vol. 247, 2021, doi: 10.1007/s00217-021-03778-y.

[10] J. Messing, "New M13 vectors for cloning," *Methods in enzymology*, vol. 101, pp. 20-78, 1983, doi: 10.1016/0076-6879(83)01005-8.

[11] S. Verma and L. Singh, "Novel universal primers establish identity of enormous number of animal species for forensic application," *Molecular Ecology Notes*, vol. 3, pp. 28-31, 2002, doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00340.x.

[12] S. Palumbi, *The Simple Fool's Guide to PCR*. ed: Univ Hawaii Press, 1991.

[13] P.D. Hebert, A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. DeWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 270, no. 1512, pp. 313-321, 2003.

[14] N. V. Ivanova, J. R. Dewaard, and P. D. N. Hebert, "An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA," *Molecular Ecology Notes*, vol. 6, no. 4, pp. 998-1002, 2006, doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x.

[15] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, pp. 3022-3027, 2021.