ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ THÙY LINH

NGHIÊN CỨU PHÂN LOẠI MỘT SỐ LOÀI CÁ THUỘC GIỐNG CÁ BỖNG (*SPINIBARBUS*) Ở VIỆT NAM DỰA TRÊN GEN TY THỂ (COI, 16S rRNA)

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2015

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN http://www.lrc.tnu.edu.vn

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ THÙY LINH

NGHIÊN CỨU PHÂN LOẠI MỘT SỐ LOÀI CÁ THUỘC GIỐNG CÁ BỖNG (*SPINIBARBUS*) Ở VIỆT NAM DỰA TRÊN GEN TY THỂ (COI, 16S rRNA)

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Mã số: 60 42 02 01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
TS. KIM THỊ PHƯƠNG OANH

THÁI NGUYÊN - 2015

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN http://www.lrc.tnu.edu.vn

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu, phòng Đào tạo, ban chủ nhiệm Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình đến TS. Kim Thị Phương Oanh, trưởng phòng Hệ gen học môi trường, Viện Nghiên cứu hệ Gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người cô đã dành nhiều thời gian, tâm huyết, tận tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự quan tâm, chỉ bảo và giúp đỡ nhiệt tình của tập thể cán bộ Phòng Hệ gen học môi trường - Viện Nghiên cứu hệ Gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cùng các cán bộ của các phòng ban khác, thuộc Viện Nghiên cứu hệ Gen đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn nhà ngư loại học TS. Nguyễn Văn Hảo và TS. Nguyễn Thị Diệu Phương thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I cùng anh Hồ Enốt - người dân tộc Vân Kiều đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong việc thu thập và phân loại hình thái các mẫu cá nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè và tập thể lớp Cao học Công nghệ sinh học K6B đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Thái Nguyên, ngày 17 tháng 11 năm 2015

Học viên

Nguyễn Thị Thùy Linh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn này hoàn toàn được trình bày dựa trên kết quả nghiên cứu khoa học của bản thân dưới sự hướng dẫn của chuyên môn của TS. Kim Thị Phương Oanh, trưởng phòng Hệ gen học môi trường, Viện Nghiên cứu hệ Gen, cùng với sự hướng dẫn kỹ thuật của các cán bộ trong phòng Hệ gen học môi trường. Các số liệu hình ảnh, kết quả được trình bày trong luận văn này là trung thực, không sao chép từ bất cứ tài liệu, công trình nghiên cứu của người khác mà không chỉ rõ nguồn tham khảo. Tôi xin chịu trách nhiệm về lời cam đoan của mình trước hội đồng nhà trường.

Thái Nguyên, ngày 17 tháng 11 năm 2015

Học viên

Nguyễn Thị Thùy Linh

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN http://www.lrc.tnu.edu.vn

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN i
LỜI CAM ĐOAN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT v
DANH MỤC CÁC BẢNG vi
DANH MỤC CÁC HÌNH vii
MỞ ĐẦU 1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Tổng quan về giống cá Bỗng 3
1.1.1. Vị trí phân loại và phân bố 3
1.1.2. Đặc điểm sinh học 4
1.1.3. Giá trị kinh tế 5
1.2. Nghiên cứu phân loại cá 5
1.2.1. Khái niệm về hệ thống phân loại cá 5
1.2.2. Đặc điểm hình thái thường dùng trong phân loại cá 6
1.2.3. Phân loại học phân tử trong phân loại cá 6
1.2.4. Tình hình nghiên cứu phân loại cá ở Việt Nam 9
1.3. Đặc điểm hệ gen ty thể và vai trò của gen ty thể trong phân loại phân tử 11
1.3.1. Đặc điểm hệ gen ty thể 11
1.3.2. Sử dụng gen ty thể trong phân loại phân tử 12
1.3.3. Hệ gen ty thể của một số loài thuộc giống cá Bỗng (*Spinibarbus*) 12
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 14
2.1. Vật liệu 14
2.1.1. Nguyên liệu 14

2.1.2. Hóa chất 15
2.1.3. Thiết bị, dụng cụ nghiên cứu 16
2.2. Phương pháp nghiên cứu 17
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu hình thái 17
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử 17
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 27
3.1. Kết quả phân loại về mặt hình thái 27
3.2. Kết quả tách chiết DNA tổng số 28
3.3. Kết quả khuếch đại gen 16S rRNA và COI bằng kỹ thuật PCR 29
3.4. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR 30
3.5. Kết quả giải trình tự gen 31
3.5.1. Kết quả giải mã đoạn gen 16S rRNA của ba mẫu cá nghiên cứu 31
3.5.2. Kết quả giải mã đoạn gen COI của ba mẫu cá nghiên cứu 34
3.6. Kết quả phân tích phân tử và phân loại 3 mẫu cá nghiên cứu dựa trên đoạn gen 16S rRNA và COI 38
3.6.1. Kết quả phân tích phân tử và phân loại 3 mẫu cá nghiên cứu dựa trên đoạn gen 16S rRNA 38
3.6.2. Kết quả phân tích phân tử và phân loại 3 mẫu cá nghiên cứu dựa trên đoạn gen COI 43
3.7. Đánh giá tính hiệu quả của DNA barcoding sử dụng để phân loại giống cá Bỗng (*Spinibarbus*) 48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 49
TÀI LIỆU THAM KHẢO 50
PHỤ LỤC 56

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

COI	Cytochrome c Oxidase subunit I
DNA	Deoxyribonucleic Acid
bp	basepair
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid
epp	eppendorf
EtBr	Ethidium Bromide
Kb	Kilobase
K2P	Kimura 2-Parameter
mM	milliMol
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mtDNA	mitochondrial DNA
ng	nanogram
NJ	Neighbour Joining
OD	Opitical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	picomol
Primer F	Primer Forward
Primer R	Primer Reverse
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris base-Acetic acid-EDTA
µl	microliter

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1: Các hóa chất được sử dụng 15

Bảng 2.2: Các thiết bị, dụng cụ được sử dụng 16

Bảng 2.3: Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu 19

Bảng 2.4: Thành phần phản ứng PCR 22

Bảng 3.1: Bảng kết quả xác định nồng độ và $OD_{260/280}$ DNA tổng số của các mẫu cá nghiên cứu 28

Bảng 3.2: Bảng kết quả xác định nồng độ và $OD_{260/280}$ sản phẩm PCR của các mẫu cá nghiên cứu sau khi đã được tinh sạch 30

Bảng 3.3: Bảng thống kê một phần kết quả BLAST đối với đoạn gen 16S rRNA của ba mẫu nghiên cứu 32

Bảng 3.4: Bảng thống kê một phần kết quả BLAST đối với đoạn gen COI của ba mẫu nghiên cứu 35

Bảng 3.5: Bảng thống kê khoảng biến thiên khoảng cách di truyền ở một số node trên cây phát sinh chủng loại (Hình 3.4) cho sự phân tách rõ các loài trong cùng một giống 41

Bảng 3.6: Khoảng cách di truyền (K2P) giữa các loài cá nghiên cứu và 4 loài thuộc giống cá Bỗng đã được định danh trên GenBank từ bộ dữ liệu trình tự đoạn gen 16S rRNA 42

Bảng 3.7: Bảng thống kê khoảng biến thiên khoảng cách di truyền ở một số node trên cây phát sinh chủng loại (Hình 3.5) cho sự phân tách rõ các loài trong cùng một giống 46

Bảng 3.8: Khoảng cách di truyền (K2P) giữa các loài cá nghiên cứu và 4 loài thuộc giống cá Bỗng đã được định danh trên GenBank từ bộ dữ liệu trình tự đoạn gen COI 46

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN http://www.lrc.tnu.edu.vn

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Sự phân bố của giống cá Bỗng (*Spinibarbus*) [26]..... 4

Hình 1.2: Đặc điểm hình thái đặc trưng của giống cá Bỗng..... 4

Hình 2.1: Các mẫu cá sử dụng trong nghiên cứu..... 14

Hình 2.2: Sơ đồ thiết kế mồi khuếch đại hai đoạn gen 16S rRNA và COI 20

Hình 2.3: Sơ đồ chu trình nhiệt khuếch đại đoạn gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR 22

Hình 2.4: Sơ đồ chu trình nhiệt khuếch đại đoạn gen COI bằng phản ứng PCR..... 23

Hình 3.1: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách DNA tổng số trên gel agarose 0,8%..... 28

Hình 3.2: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%..... 29

Hình 3.3: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR sau khi đã tinh sạch 31

Hình 3.4: Cây phát sinh chủng loại NJ xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA của 3 mẫu cá nghiên cứu và 40 loài cá khác thuộc họ cá Chép..... 39

Hình 3.5: Cây phát sinh chủng loại NJ xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen COI của 3 mẫu cá nghiên cứu và 40 loài cá khác thuộc họ cá Chép 44

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN http://www.lrc.tnu.edu.vn

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Giống cá Bỗng *(Spinibarbus*) là một trong những giống cá thuộc họ cá Chép (*Cyprinidae)*. Các loài cá thuộc giống cá Bỗng phân bố chủ yếu ở các sông lớn phía nam Trung Quốc, phía bắc Việt Nam và Lào. Theo kết quả nghiên cứu gần đây, ở Việt Nam giống cá Bỗng hiện có 13 loài, trong đó có 3 loài mới phát hiện có khả năng là loài mới. Ở Việt Nam, cá Bỗng được mệnh danh là một trong 5 loại "cá vua" của sông suối Tây Bắc rất được ưa chuộng, cho thấy giá trị kinh tế cao của cá Bỗng nói riêng cũng như các loài thuộc giống cá Bỗng nói chung. Giống cá Bỗng là một trong những giống cá quý hiếm, một số loài thuộc giống cá Bỗng hiện nay được ghi trong sách Đỏ Việt Nam, có nguy cơ tuyệt chủng ở mức độ V và đồng thời nằm trong danh sách đỏ có nguy cơ tuyệt chủng của IUCN (International Union for Conservation of Nature). Trước thực tế một số loài thuộc giống cá Bỗng có hình thái bên ngoài tương đối giống nhau, nếu chỉ dựa vào đặc điểm hình thái sẽ gặp khó khăn khi phân loại ở cấp độ loài hoặc mẫu phân loại có kích thước nhỏ. Hơn nữa, một số loài thuộc giống cá Bỗng mới được phát hiện, xét về mặt hình thái có khả năng là loài mới cần được khẳng định lại ở mức độ phân tử. Nhằm cung cấp nguồn dữ liệu về mặt di truyền, hỗ trợ việc nhận dạng một số loài cá thuộc giống cá Bỗng và khẳng định lại một số loài được cho là loài mới thuộc giống cá Bỗng được phát hiện ở Việt Nam. Chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: "**Nghiên cứu phân loại một số loài cá thuộc giống cá Bỗng (*Spinibarbus*) ở Việt Nam dựa trên gen ty thể (COI, 16S rRNA)**".

2. Mục tiêu của đề tài

Xác định chỉ thị mã vạch phân tử (DNA barcoding marker) cho một số loài thuộc giống cá Bỗng (*Spinibarbus*) dựa trên phân tích hai gen ty thể: cytochrome c oxidase subunit I (COI) và 16S rRNA.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Một số loài được phân loại sơ bộ về mặt hình thái thuộc giống cá Bỗng (*Spinibarbus*) hoặc được đánh giá có mối quan hệ di truyền rất gần gũi với giống cá Bỗng được thu thập tại sông Đakrông, huyện Đakrông, tỉnh Quảng Trị, bao gồm: