

Phân loại và mô tả giai đoạn nòng nọc của loài Cóc nước Marten *Occidozyga martensii* dựa trên chỉ thị 16S rRNA tại Cao nguyên Di Linh, Việt Nam

Đỗ Trần Phương Ánh^{1,2,*}, Lê Trần Tuyền^{1,2}, Phạm Mạnh Hùng^{1,2}, Lê Thị Thùy Dương^{1,2}

¹Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Đỗ Trần Phương Ánh, Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: dtphanh.eco@gmail.com

Lịch sử

- Ngày nhận: 11-5-2023
- Ngày chấp nhận: 20-3-2024
- Ngày đăng: 31-3-2024

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i1.1293>



Bản quyền

© ĐHQG TP.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Phân loại nòng nọc chính xác cung cấp thông tin giai đoạn ấu trùng các loài lưỡng cư giúp ích trong công tác bảo tồn và nghiên cứu đặc điểm vòng đời, sinh thái của chúng. Dựa trên dữ liệu hình thái và sinh học phân tử, nghiên cứu này đã xác định chính xác phân loại nòng nọc của loài Cóc nước Marten *Occidozyga martensii* ghi nhận tại cao nguyên Di Linh, Lâm Đồng. Các mẫu vật nòng nọc này được thu vào mùa mưa tháng 7 và tháng 8 năm 2022. Phân tích đặc điểm hình thái và sinh học phân tử của nòng nọc, phản ứng khuếch đại trình tự gene 16S rRNA bằng việc sử dụng cặp mồi AH-16S_S và AH-16S_R. Trình tự gene 16S rRNA của chúng trùng khớp với trình tự các mẫu vật được thu tại địa điểm mô tả gốc *O. martensii* ở Bangkok (Thái Lan) và có quan hệ gần với *O. laevis* ở Philippines. Kết quả nghiên cứu cung cấp mô tả hình thái chi tiết nòng nọc *O. martensii* ở giai đoạn 37 và những thay đổi hình thái từ giai đoạn 37 đến giai đoạn 41, với các đặc điểm nhận diện: vây đuôi trên bắt đầu phía sau gốc đuôi tại vị trí khoảng 17% chiều dài đuôi, có vết đen dọc trước hai mắt và vết đen ngang sau miệng, bụng màu nâu với nhiều đốm trắng. Hình thái nòng nọc của *O. martensii* khác biệt rõ ràng với hầu hết các loài trong giống *Occidozyga* và tương đồng cao nhất với *O. laevis*. Mặc dù vậy, *O. martensii* chỉ khác biệt với *O. laevis* ở vết đen dọc trước hai mắt, dẫn đến việc dễ nhầm lẫn khi định danh hai loài này bằng đặc điểm hình thái. Tuy nhiên, dữ liệu sinh học phân tử từ nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đây cho thấy *O. martensii* là một đơn vị phân loại tách biệt so với *O. laevis*. Điều này cho thấy sự cần thiết của phương pháp sinh học phân tử trong định loại các loài lưỡng cư. Dữ liệu phân loại hình thái và sinh học phân tử của nòng nọc loài *O. martensii* là cơ sở cho các nghiên cứu phân loại và quản lý các loài Cóc nước *Occidozyga* trong tương lai.

Từ khoá: 16S rRNA, Di Linh, hình thái, nòng nọc, *Occidozyga martensii*

MỞ ĐẦU

Hiện nay lưỡng cư là một nhóm loài nhạy cảm bởi biến đổi khí hậu và mất sinh cảnh do phá rừng¹⁻³. Nhiều nghiên cứu hiện nay cung cấp đặc điểm phân loại ở giai đoạn trưởng thành của nhiều loài lưỡng cư mà bỏ qua giai đoạn nòng nọc vì khó phân loại do kích thước nhỏ và biến đổi nhanh, trong khi thông tin phân loại nòng nọc có thể giúp hiểu biết đặc điểm sinh thái về toàn bộ vòng đời của ếch nhái, và phục vụ trong công tác nghiên cứu đa dạng và bảo tồn chúng trong tự nhiên⁴. *Occidozyga martensii* (Peters 1867) là một loài Cóc nước phân bố rộng ở các nước thuộc bán đảo Đông Dương (Indochina Peninsula) và bao gồm cả Quảng Đông, Quảng Tây, Hải Nam và Vân Nam thuộc Trung Quốc⁵. Đây là một loài có phân bố và dải môi trường sống rộng nên được đánh giá ở cấp độ LC (ít quan ngại) bởi Liên minh Bảo tồn Thiên nhiên Quốc tế⁶. Năm 1867, Peters lần đầu tiên đã mô tả loài Cóc nước Marten thuộc giống *Phrynoglossus*.

Thập kỷ qua, nhiều nghiên cứu đã ứng dụng thành công công cụ sinh học phân tử để giải quyết vấn đề phân loại cho nhiều loài lưỡng cư^{4,7,8}. Bảng dẫn liệu sinh học phân tử Alexander Pyron và Wiens (2011) đã chứng minh giống *Phrynoglossus* là đồng danh của giống *Occidozyga* Kuhl và Van Hasselt, 1822⁹. Tuy nhiên, gần đây Köhler và cs. (2021) lại công nhận hai giống *Phrynoglossus* và *Occidozyga* với bằng chứng sinh học phân tử và đặc điểm hình thái lưỡng⁷. Một số nghiên cứu tương tự khác như Chan và cs. (2020) hay Dubois và cs. (2021) hay Trageser và cs. (2021) cũng phân chia hai giống riêng biệt *Phrynoglossus* và *Occidozyga* trong cây phát sinh loài xây dựng được¹⁰⁻¹². Mặc dù vậy, do việc lấy mẫu chưa đầy đủ các taxa của hai giống *Phrynoglossus* và *Occidozyga* trong các nghiên cứu này, Frost (2023) đã cân nhắc tạm thời chỉ giữ lại một giống duy nhất *Occidozyga sensu lato*⁵. *O. martensii* có phổ phân bố rộng và ít được quan tâm nghiên cứu nên cho đến hiện nay, vẫn chưa có nghiên cứu nào cung cấp một cách đầy đủ về thông tin phân

Trích dẫn bài báo này: Đỗ T P A, Lê T T, Phạm M H, Lê T T D. Phân loại và mô tả giai đoạn nòng nọc của loài Cóc nước Marten *Occidozyga martensii* dựa trên chỉ thị 16S rRNA tại Cao nguyên Di Linh, Việt Nam. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024; 8(1):2869-2878.

loại và mô tả đặc điểm hình thái giai đoạn nòng nọc của chúng. Sau khi được Peters (1867) lần đầu tiên mô tả thì loài Cóc nước Marten *O. martensii* đã được Smith (1916) xếp vào loài phụ của *O. laevis* là loài Cóc nước nhẵn phân bố ở quần đảo Philippines¹³. Smith (1916) cũng đã cung cấp một mô tả hình thái nòng nọc đơn giản của loài phụ mà ông cho là ‘*Phrynoglossus laevis martensii*’¹³. Tuy nhiên, Flury và cs. (2021) và Lyu và cs. (2022) đã chứng minh rằng *Occidozyga laevis* và *O. martensii* là hai loài tách biệt và có quan hệ đa phát sinh dựa vào trình tự gene 12S rRNA, tRNA-Val, 16S rRNA và COI cũng như có vùng phân bố khác nhau^{8,14}. Như vậy, hiện nay đơn vị phân loại và dữ liệu hình thái của nòng nọc *O. martensii* vẫn chưa được cung cấp một cách đầy đủ và chi tiết trong bất kỳ nghiên cứu nào. Theo Gosner (1960), vòng đời của các loài ếch nhái trải qua 46 giai đoạn phát triển: giai đoạn phôi (1-19), giai đoạn còn noãn (20-25), giai đoạn nòng nọc (26-41) và giai đoạn con non biến thái thành con trưởng thành (42-46). Ở giai đoạn nòng nọc, chúng tập trung tăng trưởng và hoàn thiện chi sau (giai đoạn 26-40) cho đến khi bắt đầu xuất hiện mầm chi trước (giai đoạn 41)¹⁵⁻¹⁷. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành: (i) Phân loại các mẫu vật nòng nọc của Cóc nước Marten *O. martensii* thu nhận được ở Cao nguyên Di Linh bằng trình tự gene 16S rRNA (ii) Cung cấp mô tả hình thái nòng nọc giai đoạn 37 một cách chi tiết, và sự thay đổi về hình thái nòng nọc từ giai đoạn 37 đến giai đoạn 41. Từ đó so sánh với mô tả của Smith (1916) và xác nhận lại đặc điểm phân loại chính xác cho nòng nọc *O. martensii*. Đây là nghiên cứu đầu tiên cung cấp đặc điểm hình thái nòng nọc của Cóc nước Marten *O. martensii* dựa trên xác nhận của dẫn liệu sinh học phân tử.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phạm vi thu mẫu

Nòng nọc của *O. martensii* được thu vào ngày 25/07/2022 tại 11°26'57.21"N; 108°3'22.49"E, độ cao 953m và ngày 27/08/2022 tại 11°17'51.25"N; 108°5'41.76"E, độ cao 717m thuộc địa phận huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam. Mẫu nòng nọc được chụp sống bằng máy ảnh Canon 300D trong bể thủy tinh nhỏ. Các mẫu vật được ký hiệu: giai đoạn 37 (n=1): DL488; 38 (n=1): DL487; 39 (n=5): DL181, DL246A, DL246B, DL246C, DL247; 40 (n=5): DL489, DL490, DL491, DL492, DL493; 41 (n=2): DL486A, DL486B. Mẫu mô lấy từ mô cơ đuôi của nòng nọc được bảo quản trong cồn 99%. Tất cả các mẫu vật còn lại được bảo quản trong formalin 10%.

Phân tích hình thái

Giai đoạn của nòng nọc được xác định dựa trên Gosner (1960)¹⁵. Mẫu nòng nọc được đo bằng thước kẹp (sai số 0,01 mm). Các chỉ số đo hình thái được dựa theo Altig và McDiarmid (1999)¹⁷ và Pezzuti và cs. (2021)¹⁸ bao gồm: Tổng chiều dài cơ thể (TL): khoảng cách từ phần mút mõm đến cuối đuôi; Chiều dài thân (BL): khoảng cách từ phần mút mõm đến phần kết thúc của thân (nơi bắt đầu của cơ đuôi); Chiều dài đuôi (TaL): khoảng cách từ điểm bắt đầu của cơ đuôi đến cuối đuôi; Chiều cao đuôi (MTH): khoảng cách lớn nhất của vây đuôi trên và vây đuôi dưới; Khoảng cách hai mắt (IOD): khoảng cách giữa hai con ngươi; Khoảng cách hai mũi (IND): khoảng cách rìa của hai mũi; Chiều cao cơ đuôi (TMH): khoảng cách lớn nhất giữa cơ đuôi trên và cơ đuôi dưới; Chiều rộng cơ đuôi (TMW): khoảng cách lớn nhất giữa bên trái và bên phải cơ đuôi; Chiều rộng thân (BW): khoảng cách lớn nhất giữa bên trái và bên phải thân; Chiều cao thân (BH): khoảng cách lớn nhất giữa mặt bụng và mặt lưng của thân; Khoảng cách mắt mõm (ES): khoảng cách từ chính giữa hai mắt đến mút mõm; Khoảng cách mũi mắt (NE): khoảng cách của chính giữa hai mũi đến chính giữa hai mắt; Khoảng cách mũi mõm (SN): khoảng cách từ giữa hai mũi đến mút mõm; Đường kính mắt (ED): khoảng cách lớn nhất của rìa mắt; Khoảng cách từ mõm đến lỗ thở (SS); Đường kính đĩa miệng (ODW): chiều rộng lớn nhất của đĩa miệng; Chiều cao vây đuôi trên (DFH): khoảng cách lớn nhất từ mép ngoài đến mép trong của vây đuôi trên; Chiều cao vây đuôi dưới (VFH): khoảng cách lớn nhất từ mép ngoài đến mép trong của vây đuôi dưới. Công thức răng (LTRF) dựa theo Altig và McDiarmid (1999)¹⁷.

Phân tích sinh học phân tử

Tách chiết DNA tổng số từ mẫu mô của nòng nọc theo kit Omega BIO-TEK. Trình tự DNA vùng gene 16S rRNA (~550 bp) được khuếch đại sử dụng cặp mồi AH-16S_S và AH-16S_R theo Grosjean và cs. (2015)⁴. Thành phần phản ứng PCR (25 μ L): 7,5 μ L nước cất, 12,5 μ L dung dịch 2X Tools Taq PCR Master Mix, 2 μ L mỗi (1 mM), 3 μ L DNA tổng. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: (1) Biến tính DNA tổng (92°C trong 3 phút); (2) Mỗi bắt cặp với DNA tổng và khuếch đại trình tự DNA mục tiêu (92°C trong 45 giây, 52°C trong 45 giây và 72°C trong 1 phút được lặp lại 35 lần); (3) Tổng hợp trình tự DNA mục tiêu (72°C trong 5 phút) và được bảo quản ở 8°C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng cách sử dụng CleanPCR kit (Proteogene, Saint-Marcel, France). Giải trình tự Sanger được thực hiện bởi công ty 1st BASE. Các tệp trình tự

ABI xuôi và ngược được kiểm tra, đối chiếu và hiệu chỉnh thủ công dựa vào đồ thị ABI Chromatogram trên phần mềm Chromas 2.6. Các trình tự xuôi ngược đã được đồng nhất từ nghiên cứu này và các trình tự gene 16S rRNA của các loài *Fejervarya limnocharis*, *F. cancrivora*, *Limnonectes kuhlii*, *L. sisikdagu*, *L. leporinus*, *L. paramacrodon*, *L. palavanensis*, *L. finchi*, *Occidozyga sumatrana*, *O. baluensis*, *O. diminutiva*, *O. baluensis*, *O. rhacoda*, *O. lima*, *O. laevis*, *O. martensii* từ nghiên cứu của Chan và cs. (2020)¹⁰, Flury và cs. (2021)¹⁴, Köhler và cs. (2021)⁷ và Lyu và cs. (2022)⁸ đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh phân loại cho các mẫu vật nòng nọc thuộc *O. martensii*. Loài *Alcalus baluensis* có quan hệ gần gũi với các loài phân tích được chọn làm nhóm ngoài¹⁴. Tất cả trình tự được xếp thẳng hàng bằng chức năng ClustalW và được chỉnh sửa thủ công trên phần mềm MEGA 7. Mô hình tiến hóa được xác định dựa vào tiêu chí Bayesian Information Criterion (BIC), lựa chọn mô hình GTR+G+I phù hợp với dữ liệu trình tự gene trên phần mềm jModeltest v3.7. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum likelihood 100 lần chạy độc lập ngẫu nhiên với 1000 lần lặp lại, thực hiện trên phần mềm raxmlGUI v. 1.3. Cây phát sinh loài được hiệu chỉnh bằng phần mềm TreeGraph v. 2.0.47. Khoảng cách di truyền và sai số chuẩn giữa các trình tự được xác định bằng phần mềm MEGA 7, mô hình p-distance với 1000 lặp lại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm sinh học phân tử

Cây phát sinh Maximum likelihood dựa trên trình tự gene 16S rRNA của các loài *Fejervarya limnocharis*, *F. cancrivora*, *Limnonectes kuhlii*, *L. sisikdagu*, *L. leporinus*, *L. paramacrodon*, *L. palavanensis*, *L. finchi*, *Occidozyga sumatrana*, *O. baluensis*, *O. diminutiva*, *O. baluensis*, *O. rhacoda*, *O. lima*, *O. laevis*, *O. martensii* được thể hiện ở Hình 1. Cây phát sinh thể hiện sự phân tách rõ của 16 loài với giá trị bootstrap > 50% ở tất cả các vị trí phát sinh trên mỗi nhánh. Mỗi loài hình thành một nhánh đơn phát sinh dựa vào dữ liệu trình tự gene 16S rRNA. Trong nghiên cứu này, các trình tự của ba loài *O. lima*, *O. laevis* và *O. martensii* được thu thập từ các nghiên cứu trước đây, đều là các mẫu vật được thu tại vị trí của mẫu chuẩn (type locality) và các khu vực lân cận. Tất cả bốn mẫu vật nòng nọc DL181, DL247, DL489 và DL490 thu được từ Di Linh trong nghiên cứu này đều thuộc cùng chung một nhóm với loài *O. martensii*, bao gồm cả các mẫu vật từ Chan và cs. (2020)¹⁰, Flury và cs. (2021)¹⁴, Köhler và cs. (2021)⁷ và Lyu và cs. (2022)⁸ với giá trị lặp lại 99%. Khoảng cách di truyền p-distance trình tự gene

16S rRNA giữa các loài *Occidozyga* spp. được trình bày ở Bảng 1. Khoảng cách di truyền trong nhóm *O. martensii* khá cao $0,05 \pm 0,007$, và cách biệt $0,172 \pm 0,016$ so với loài gần nhất *O. laevis*. Khoảng cách di truyền p-distance của trình tự gene 16S rRNA giữa các loài ghi nhận từ nghiên cứu này cũng tương tự khoảng cách di truyền được công bố từ Lyu và cs. (2022)⁸. Điều này chứng tỏ sự đa dạng di truyền cao trong gene 16S rRNA giữa các quần thể khác nhau trong loài *O. martensii*, *O. laevis* và *O. lima*, kết quả này cũng được ghi nhận bởi Chan và cs. (2020)¹⁰, Flury và cs. (2021)¹⁴, Köhler và cs. (2021)⁷ và Lyu và cs. (2022)⁸. Cây phát sinh loài từ các nghiên cứu này đều cho thấy loài *O. martensii* phân tách thành nhiều dòng (lineage) giữa các quần thể được thu thập ở nhiều địa điểm khác nhau từ Thái Lan và Việt Nam. Dữ liệu từ cây phát sinh cho thấy các mẫu ở Di Linh và miền Trung Việt Nam (GenBank DQ283357) cùng với các mẫu ở Đông Bắc Thái Lan (GenBank MW007296, MW217484, MW217476, MW217477) gần gũi với nhau, trong khi cách biệt xa hơn với các mẫu vật thu thập ở miền Nam và Tây Nam Thái Lan (GenBank MW217475, AB530610, KP318725, MG935941, MW007313) (Hình 1). Như vậy, dựa vào kết quả từ nghiên cứu cho thấy trình tự gene 16S rRNA đã hỗ trợ xác định phân loại chính xác nòng nọc cho loài *O. martensii* ghi nhận ở cao nguyên Di Linh. Dữ liệu trình tự gene 16S rRNA cho thấy hai loài hiện diện ở Việt Nam *O. martensii* và *O. lima* có khoảng cách xa nhau trong khi *O. martensii* gần gũi hơn với *O. laevis*⁸. Điều này tương thích với dẫn liệu về hình thái, *O. martensii* có nhiều đặc điểm hình thái chung với *O. laevis*, do đó Smith (1916) đã phân loại *O. martensii* là một loài phụ của *O. laevis*¹³. Tuy nhiên, bằng dữ liệu gene nhân (BDNF, NTF3, POMC) kết hợp với ty thể (12S, tRNA-Val and 16S rRNA), Flury và cs. (2021) cho thấy rằng *O. martensii* lại có mối quan hệ gần gũi với *O. lima* và là một tổ tiên xa của *O. laevis*¹⁴. Điều này hoàn toàn hợp lý vì *O. martensii* và *O. lima* là hai loài có sự giao nhau trong vùng phân bố ở bán đảo Đông Dương trong khi *O. laevis* chỉ phân bố ở các đảo Philippines^{8,10,14}. Thực tế, Flury và cs. (2021) đã chỉ ra rằng *O. sumatrana* mới là tổ tiên gần đây của *O. laevis*¹⁴. Nghiên cứu này cũng đã nhận định rằng *O. laevis* là loài đã tiến hóa và phát tán từ *O. sumatrana* phân bố ở các đảo Sumatra để chiếm lĩnh ở các hòn đảo Philippines thông qua các cầu nối giữa Palawan (Philippines), Borneo và Sumatra xuất hiện vào khoảng thời gian từ 11 đến 9 triệu năm trước đây. Từ các dẫn liệu này của Flury và cs. (2021) và các nghiên cứu của Chan và cs. (2020), Lyu và cs. (2022) đã kết luận rằng *O. laevis* là loài phân bố giới hạn ở các đảo thuộc Philippines và *O. martensii* là một loài

được công nhận phân bố ở các nước thuộc bán đảo Đông Dương (Indochina Peninsula) và một số tỉnh phía nam Trung Quốc (Quảng Đông, Quảng Tây, Hải Nam và Vân Nam)^{8,10,14}.

Đặc điểm hình thái nòng nọc *O. martensii*

Dựa trên các mẫu vật thu được, nghiên cứu mô tả chi tiết mẫu vật nòng nọc Cóc nước Marten ở giai đoạn 37 (Hình 2A, B, C) và phân tích sự thay đổi hình thái của nòng nọc ở các giai đoạn còn lại (giai đoạn 38 đến 41, Hình 2D, E, F). Chi tiết chi tiêu số đo của nòng nọc *O. martensii* được thể hiện ở Bảng 2.

Hình thái nòng nọc giai đoạn 37 (mẫu vật DL488)

Đầu miệng: không có đĩa miệng và răng LTRF 0/0. Miệng dạng tròn, miệng hơi nhỏ về phía trước 0,33 mm hình móng ngựa, chiều rộng miệng 0,66 mm (Hình 2G).

Cơ thể mặt lưng: thân nòng nọc hình bầu dục (BW/BL=0,72). Mồm nhọn. Mũi dạng tròn, nằm gần mồm hơn mắt (NE/ES = 0,52), hai mũi cách nhau 0,64 mm, hướng mở chéo lên trên. Mắt có kích thước to (ED/BL= 0,17), dạng tròn, nằm ở mặt lưng, khoảng cách từ mắt đến mồm là 1,95 mm, hai mắt cách nhau 1,31 mm, tầm nhìn hướng về hai bên, có vệt đen dài hướng dọc theo con người (Hình 2A).

Cơ thể mặt bên: cơ thể dẹp. Lỗ thở dạng ống, nằm bên trái thân, phần cuối ống tách hoàn toàn khỏi thân, cách mồm 6,53 mm, hướng chéo về phía sau (Hình 2H). Lỗ huyết nằm cuối thân, giữa đuôi, hướng mở ra sau. Đường bên không rõ. Không quan sát được vòng xoắn ruột. Đuôi rất dài (TAL/BL=2,80). Vây đuôi trên bắt đầu phía sau gốc đuôi tại vị trí khoảng 17% chiều dài đuôi, mút đuôi nhọn, độ cao tổng đuôi 3,99 mm, chiều cao lớn nhất vây đuôi trên bằng 0,31 lần chiều cao lớn nhất đuôi, chiều cao lớn nhất vây đuôi dưới bằng 0,22 lần chiều cao lớn nhất đuôi, ria vây đuôi có các chùy đốm đen cách đều nhau (Hình 2B). Cơ đuôi chắc khỏe, chiều rộng cơ đuôi 2,19 mm, chiều cao lớn nhất của cơ đuôi bằng 0,89 lần chiều cao lớn nhất của thân.

Màu sắc: Mẫu vật nòng nọc lúc còn sống có cơ thể màu vàng, phần bụng có thể quan sát thấy tim bên trong cơ thể nhưng không nhìn thấy vòng xoắn ruột, có các chấm trắng rải rác trên bụng. Trong dung dịch bảo quản, phần thân: từ mồm đến mắt và hai bên thân có màu trắng đục, giữa thân màu nâu. Cơ đuôi và vây đuôi màu trắng đục. Viên vây đuôi có các chấm đen xen kẽ, vây đuôi trên có các đường màu nâu dọc theo chiều dài vây (Hình 2A, B, C).

Sự thay đổi về hình thái nòng nọc từ giai đoạn 37 đến giai đoạn 41

Màu sắc chuyển dần từ vàng sang nâu đậm. Về các chỉ số hình thái, tỷ lệ chiều dài đuôi và chiều dài thân (TAL/BL) có xu hướng giảm dần qua các giai đoạn cùng với sự ngắn dần của đuôi. Tỷ lệ chiều rộng thân và chiều cao thân (BW/BH) lớn nhất ở giai đoạn 37, các giai đoạn từ 38 đến 41 thấp hơn giai đoạn 37 và tương đối ổn định giữa các giai đoạn. Các tỷ lệ số đo hình thái khác không có sự chênh lệch nhiều từ giai đoạn 37 đến 41. Giai đoạn 39 có năm cá thể có kích thước cơ thể và các chỉ số đo nhỏ hơn các cá thể ở các giai đoạn khác, tuy nhiên tỷ lệ các chỉ số đo đều không khác biệt so với các giai đoạn khác.

Môi trường sống: nòng nọc *O. martensii* được thu tại tầng đáy vùng nước đọng nền bùn, xung quanh là các cây bụi nhỏ và cây tre, ven quốc lộ 28 nối tỉnh Lâm Đồng và tỉnh Bình Thuận (Hình 2I). Nòng nọc *O. martensii* được tìm thấy sống chung với nòng nọc loài *Microhyla heymonsi* và *Rhacophorus annamensis*.

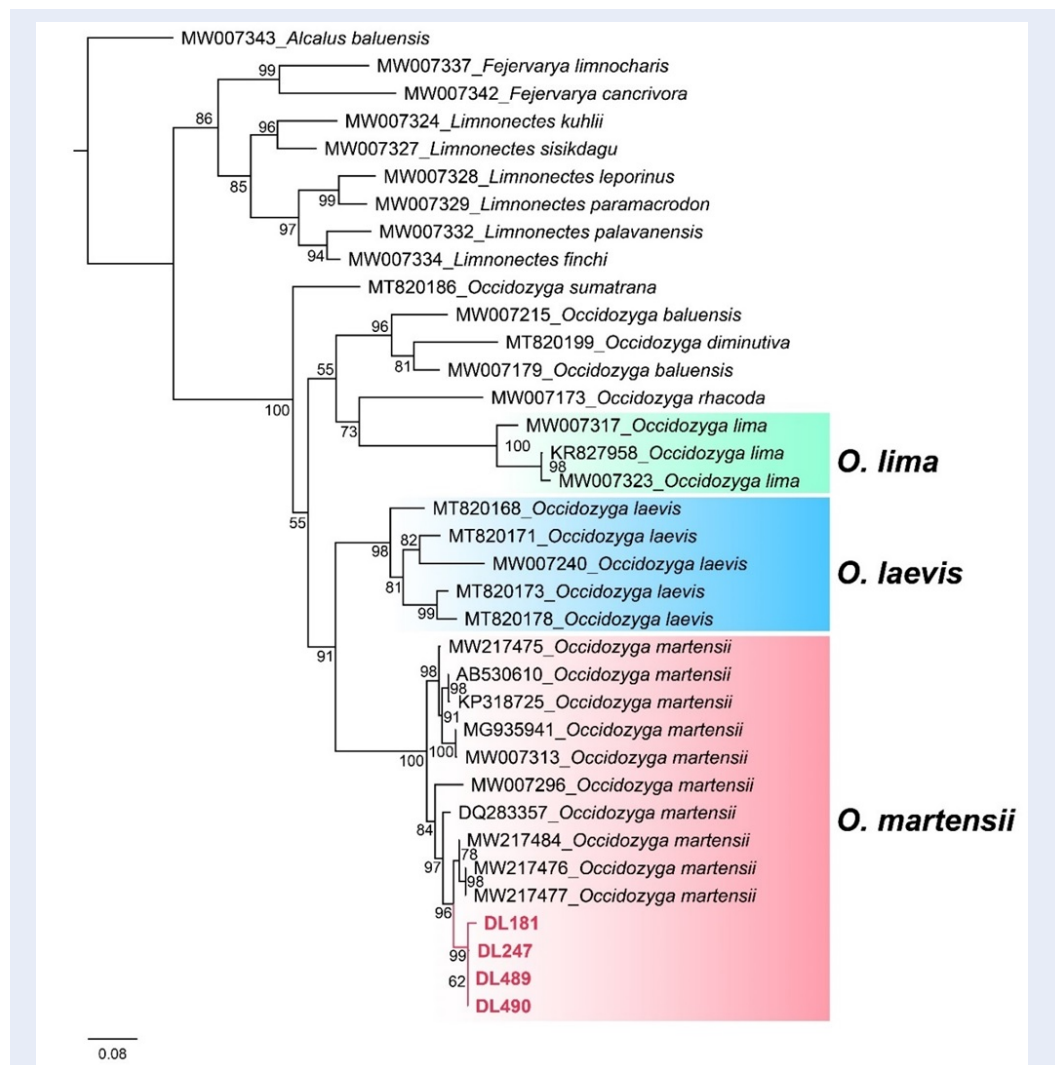
So sánh đặc điểm hình thái nòng nọc của *O. martensii* so với các loài khác trong giống *Occidozyga*

Nòng nọc của các loài thuộc giống *Occidozyga* vẫn chưa được mô tả hình thái đầy đủ, với chỉ bốn loài có dữ liệu hình thái nòng nọc gồm: *O. lima*, *O. berbeza*, *O. baluensis* và *O. laevis*. Đặc điểm chung và phân biệt về hình thái nòng nọc thuộc giống *Occidozyga* so với các giống khác của các loài ếch nhái theo Smith (1916) là cơ thể dài, mồm nhọn, miệng lớn, nhỏ về phía trước, không có răng¹³. Tất cả các đặc điểm trên đều trùng khớp với nòng nọc *O. martensii* trong nghiên cứu này. Bên cạnh đó sau khi so sánh các nghiên cứu trước đây hình thái nòng nọc của giống *Occidozyga* còn các đặc điểm chung sau đây: miệng nhỏ về phía trước, hình móng ngựa, lỗ thở tách biệt hoàn toàn khỏi thân, bụng không nhìn thấy vòng xoắn ruột^{13,19-21}.

Năm 1916, Smith đã mô tả hình thái nòng nọc loài *Occidozyga laevis martensii* dựa trên một mẫu vật không rõ giai đoạn được thu tại Bangkok, Thái Lan. Nòng nọc loài *O. laevis martensii* có chiều dài toàn bộ cơ thể là 23 mm nhỏ hơn khá nhiều so với nòng nọc loài *O. laevis* là 33 mm theo Haas và cs. (2022) và là 51 mm theo Boulenger (1897)^{13,20,21}. Nòng nọc loài *O. martensii* của nghiên cứu này có những hình thái tương đồng với nòng nọc loài *O. laevis martensii* ở những điểm sau: cơ thể màu vàng nâu, đuôi rất dài, vây đuôi thấp, trên vây đuôi có những chấm đen xen kẽ, có vệt đen dọc theo mắt, miệng nhỏ về phía trước và không có răng. Ngoài những đặc điểm trên,

Bảng 1: Khoảng cách p-distance trình tự gene 16S rRNA giữa mẫu vật *O. martensii* thu ở Di Linh và các loài *Occidozyga* spp.

Loài	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>O. sumatrana</i>							
2. <i>O. diminutiva</i>	0,13						
3. <i>O. baluensis</i>	0,14	0,09					
4. <i>O. rhacoda</i>	0,17	0,19	0,17				
5. <i>O. lima</i>	0,18	0,18	0,18	0,17			
6. <i>O. laevis</i>	0,14	0,15	0,17	0,17	0,21		
7. <i>O. martensii</i>	0,15	0,18	0,17	0,19	0,17	0,16	
8. <i>O. martensii</i> _Di Linh	0,16	0,18	0,17	0,19	0,18	0,16	0,05

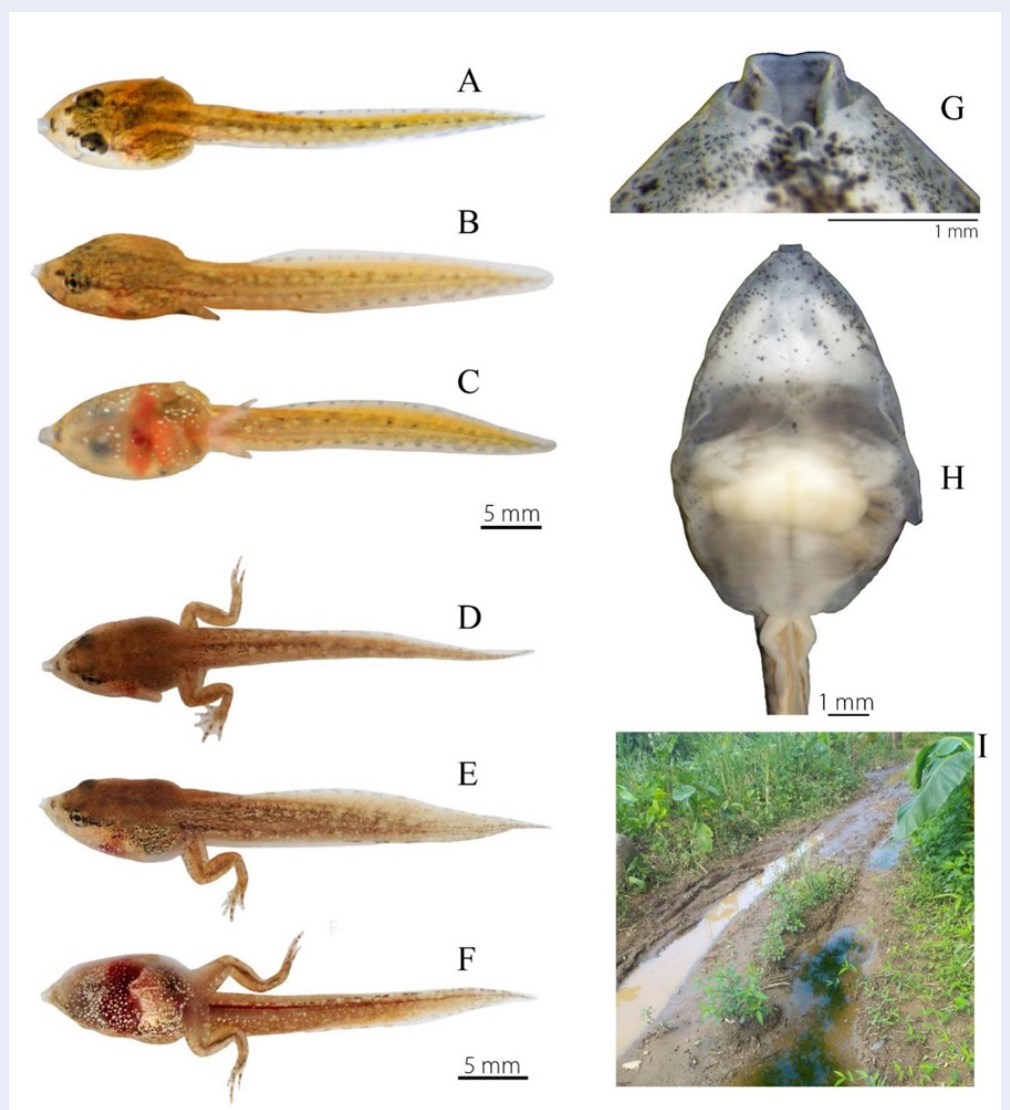


Hình 1: Cây phát sinh Maximum likelihood dựa trên trình tự gene 16S rRNA cho các loài *Fejervarya*, *Limnonectes*, *Occidozyga* và outgroup *Alcalus baluensis*, tên của bốn trình tự *O. martensii* từ nghiên cứu này thu ở Di Linh được in đỏ, giá trị bootstraps được thể hiện trên các vị trí phát sinh mỗi nhánh.

Bảng 2: Các số đo và tỷ lệ hình thái nòng nọc *O. martensii* được thu tại cao nguyên Di Linh, tỉnh Lâm Đồng. Đơn vị: milimet (mm), n: số lượng mẫu. Với các giai đoạn có n > 1, số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn.

Chỉ tiêu hình thái	37 (n=1)	38 (n=1)	39 (n=5)	40 (n=5)	41 (n=2)
Tổng chiều dài (TTL)	26,29	29,61	20,95±2,11	27,72±3,6	29,54±0,5
Chiều dài thân (BL)	6,92	7,89	6,21±0,27	9,28±1,09	8,94±0,4
Chiều cao thân cao nhất (BH)	2,87	3,70	2,35±0,26	3,60±0,33	3,74±0,00
Khoảng cách từ cuối thân đến lỗ thở (BS)	1,39	1,08	0,99±0,36	2,01±0,08	1,79±0,18
Chiều rộng thân lớn nhất (BW)	4,99	5,21	3,20±0,51	5,19±0,52	5,63±0,18
Đường kính mắt (ED)	1,20	1,44	1,06±0,08	1,35±0,05	1,46±0,06
Khoảng cách mắt mõm (ES)	1,95	2,06	2,14±0,22	2,58±0,33	2,65±0,08
Khoảng cách hai mũi (IND)	0,64	0,71	0,97±0,05	1,10±0,02	0,83±0,01
Khoảng cách hai mắt (IOD)	1,31	1,23	2,13±0,33	2,80±0,09	1,41±0,08
Công thức răng (LTRF)	-	-	-	-	-
Chiều cao vây dưới (LFH)	0,89	0,99	0,59±0,03	0,81±0,18	0,94±0,08
Chiều cao cả đuôi (MTH)	3,99	4,41	2,67±0,05	4,76±1,09	3,97±0,05
Khoảng cách mũi mắt (NE)	1,01	1,07	0,93±0,03	1,07±0,08	1,23±0,01
Chiều rộng đĩa miệng (ODW)	-	-	-	-	-
Khoảng cách từ mũi đến mõm (SN)	1,29	1,30	1,22±0,12	1,65±0,11	1,42±0,01
Khoảng cách từ mõm đến lỗ thở (SS)	6,53	6,80	5,23±0,65	6,76±0,26	7,26±0,05
Chiều dài đuôi (TAL)	19,37	21,72	14,74±1,85	18,44±2,5	20,61±0,11
Chiều cao cơ đuôi (TMH)	2,55	2,64	1,55±0,17	2,77±0,82	2,87±0,05
Chiều rộng cơ đuôi (TMW)	2,19	2,37	1,40±0,21	2,12±0,19	1,92±0,01
Chiều cao vây đuôi trên (UFH)	1,23	1,41	0,90±0,06	1,31±0,68	1,85±0,06
BW/BL	0,72	0,66	0,52±0,06	0,56±0,11	0,63±0,01
TAL/BL	2,80	2,75	2,38±0,19	2,00±0,39	2,31±0,09
BW/BH	1,74	1,41	1,37±0,35	1,44±0,11	1,46±0,05
NE/ES	0,52	0,52	0,43±0,02	0,42±0,03	0,47±0,01
ED/BL	0,17	0,18	0,17±0,01	0,15±0,02	0,18±0,01
IOD/IND	2,05	1,7	2,19±0,02	2,55±0,1	1,64±0,07
TMH/BH	0,89	0,71	0,66±0,15	0,77±0,16	0,76±0,01
UFH/MTH	0,31	0,32	0,34±0,01	0,28±0,08	0,46±0,01
LFH/MTH	0,22	0,22	0,22±0,02	0,18±0,1	0,22±0,02

Mã số mẫu vật: 37 (DL488), 38 (DL487), 39 (DL181, DL246A, DL246B, DL246C, DL247), 40 (DL489, DL490, DL491, DL492, DL493), 41 (DL486A, DL486B)



Hình 2: Hình thái nòng nọc *O. martensii*. (A, B, C): Giai đoạn 37; (D, E, F): Giai đoạn 41; (G): Cấu trúc miệng; (H): Mặt bụng nòng nọc với miệng và lỗ thở. (I): Sinh cảnh nòng nọc *O. martensii* tại cao nguyên Di Linh, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.

giai đoạn nòng nọc và các chỉ số hình thái của loài *O. laevis martensii* không được đề cập. Như vậy, dựa vào dữ liệu hình thái kết hợp sinh học phân tử, *O. laevis martensii* được thu tại Bangkok và mô tả bởi Smith (1916) phải được xem xét là *O. martensii*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cung cấp đầy đủ các thông số đo về hình thái nòng nọc *O. martensii* theo từng giai đoạn và mô tả cụ thể các đặc điểm hình thái.

Khác biệt về hình thái nòng nọc của *O. martensii* với các loài thuộc giống *Occidozyga* đã được mô tả: Nòng nọc *O. martensii* có vây đuôi trên bắt đầu phía sau gần gốc đuôi tại vị trí khoảng 17% chiều dài đuôi, bụng màu nâu, nhiều đốm trắng so với nòng nọc *O. balu-*

ensis và *O. berbeza*, vây đuôi trên bắt đầu phía sau xa gốc đuôi tại vị trí khoảng 40% chiều dài đuôi bụng màu trắng đục, không có hoặc có ít đốm trắng¹⁹. Ở nòng nọc *O. martensii* phần vây đuôi trên liền mạch và có các đốm đen ở viền vây đuôi, cơ thể màu nâu so với nòng nọc *O. lima* từ gốc đuôi đến $\frac{1}{2}$ vây đuôi trên nhô lên cao hơn so với phần còn lại của vây đuôi, cơ thể màu trắng có sọc nâu²⁰. Nòng nọc *O. martensii* có hình thái tương đồng nhất với nòng nọc *O. laevis* tuy nhiên nòng nọc *O. martensii* có thể phân biệt dựa vào đặc điểm có vết đen dọc phía trước hai mắt và một vết đen ngang sau miệng còn nòng nọc *O. laevis* thì không có những vết đen này^{19,22,23}. Như vậy, cho

thấy hình thái nòng nọc của *O. martensii* và *O. laevis* có sự tương đồng cao và dễ nhầm lẫn khi định danh hai loài này bằng đặc điểm hình thái. Bên cạnh sự giống nhau về hình thái nòng nọc, Günther (1858) và Hecht và cs. (2013) cũng đã ghi nhận sự tương đồng về hình thái trong giai đoạn trưởng thành giữa hai loài này^{24,25}.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định phân loại chính xác cho nòng nọc của loài *O. martensii* thu được ở cao nguyên Di Linh dựa trên trình tự gene 16S rRNA. Kết hợp với dữ liệu của các nghiên cứu cho thấy *O. martensii* là một đơn vị phân loại tách biệt so với loài *O. laevis*. Sự tương đồng về hình thái ở giai đoạn nòng nọc của *O. martensii* và *O. laevis* cho thấy việc định loại chính xác hai loài này cần phải áp dụng thêm phương pháp sinh học phân tử và thông tin về địa lý phân bố của từng loài. Dữ liệu phân loại hình thái và sinh học phân tử của nòng nọc *O. martensii* từ nghiên cứu này là cơ sở phục vụ cho các nghiên cứu phân loại và quản lý nguồn gene giống Cóc nước *Occidozyga* trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số 562-2022-18-06. Giấy phép thực địa bởi công ty lâm nghiệp Di Linh số 0025/GGTKHTN. Chúng tôi cảm ơn sự giúp đỡ của các thành viên nhóm nghiên cứu từ Phòng thí nghiệm Động Vật, Bộ môn Sinh thái và Sinh học Tiến hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh.

VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT

Được cấp giấy chấp thuận (cho phép) của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM (ACUCUS).

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

cs: cộng sự
16S rRNA: 16S ribosomal RNA
DNA: Deoxyribonucleic acid
LC: Least concern

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Đỗ Trần Phương Ánh: tra cứu và tổng hợp tài liệu, thực nghiệm, phân tích và trình bày kết quả, dữ liệu sinh học phân tử, viết và hoàn thiện bản thảo.

Lê Trần Tuyền: phân tích dữ liệu hình thái và trình bày hình ảnh.

Phạm Mạnh Hùng: phân tích dữ liệu sinh học phân tử, hình thái và hình ảnh, chỉnh sửa bản thảo.

Lê Thị Thùy Dương: tra cứu và tổng hợp tài liệu, phân tích dữ liệu hình thái và hình ảnh, chỉnh sửa bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, et al. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* (1979). 2004 Dec 3;306(5702):1783-6;PMID: 15486254. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1103538>.
2. Rowley J, Brown R, Bain R, Kusriani M, Inger R, Stuart B, et al. Impending conservation crisis for Southeast Asian amphibians. *Biol Lett*. 2010 Jun 23;6(3):336-8;PMID: 20007165. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0793>.
3. Krzikowski M, Nguyen TQ, Phạm CT, Rödder D, Rauhaus A, Le MD, et al. Assessment of the threat status of the amphibians in Vietnam - Implementation of the One Plan Approach. *Nat Conserv*. 2022;49:77-116;Available from: <https://doi.org/10.3897/natureconservation.49.82145>.
4. Grosjean S, Ohler A, Chuayn Kern Y, Cruaud C, Hassanin A. Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles. Case studies from Southeast Asia. *C R Biol*. 2015 May 1;338(5):351-61;PMID: 25936275. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.03.015>.
5. Frost DR. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 6.1. Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2023;.
6. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on [28/04/2023]. 2023;.
7. Köhler G, Vargas J, Than NL, Schell T, Janke A, Pauls SU, et al. A taxonomic revision of the genus *Phrynoglossus* in Indochina with the description of a new species and comments on the classification within Occidozyginae (Amphibia, Anura, Dicroglossidae). *Vertebr Zool*. 2021 Feb 26;71:1-26;Available from: <https://doi.org/10.3897/vz.71.e60312.figure10>.
8. Lyu ZT, Wang J, Zeng ZC, Luo L, Zhang YW, Guo CP, et al. Taxonomic clarifications on the floating frogs (Anura: Dicroglossidae: *Occidozyga* sensu lato) in southeastern China. *Vertebr Zool*. 2022 Jul 1;72:495-512;Available from: <https://doi.org/10.3897/vz.72.e80019>.
9. Alexander Pyron R, Wiens JJ. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol*. 2011 Nov;61(2):543-83;PMID: 21723399. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.06.012>.
10. Chan KO, Schoppe S, Rico ELB, Brown RM. Molecular systematic investigation of Philippine puddle frogs (Anura: Dicroglossidae: *Occidozyga* Kuhl and Van Hasselt, 1822) reveals new candidate species and a novel pattern of species dyads. *Philipp J Syst Biol*. 2020 Jan 1;19(2 Special Issue 2):1-14;Available from: <https://doi.org/10.26757/pjsb2020b14007>.
11. DUBOIS A, OHLER A, PYRON RA. New concepts and methods for phylogenetic taxonomy and nomenclature in zoology, exemplified by a new ranked cladonomy of recent amphibians (Lissamphibia). *Megataxa*. 2021 Feb 26;5(1);Available from: <https://doi.org/10.11646/megataxa.5.1.1>.

12. Trageser S, Al-Razi H, Maria M, Nobel F, Asaduzzaman M, Rahman SC. A new species of *Phrynoglossus* Peters, 1867 Dicroglossidae from southeastern Bangladesh, with comments on the genera *Occidozyga* and *Phrynoglossus*. *PeerJ*. 2021 Aug 19;9;PMID: 34466290. Available from: <https://doi.org/10.7717/peerj.11998>.
13. Smith MA. On a collection of reptiles and batrachians from Peninsular Siam. *Journal of the Natural History Society of Siam*. 1916;2(2):148-71;.
14. Flury JM, Haas A, Brown RM, Das I, Pui YM, Boon-Hee K, et al. Unexpectedly high levels of lineage diversity in Sundaland puddle frogs (Dicroglossidae: *Occidozyga* Kuhl and van Hasselt, 1822). *Mol Phylogenet Evol*. 2021 Oct 1;163;PMID: 34029720. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107210>.
15. Gosner KL. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 1960;16:183-90;.
16. Grosjean S. The choice of external morphological characters and developmental stages for tadpole-based anuran taxonomy: A case study in *Rana (Sylvirana) nigrovittata* (Blyth, 1855) (Amphibia, Anura, Ranidae). *Contributions to Zoology*. 2005;74(1-2):61-76; Available from: <https://doi.org/10.1163/18759866-0740102005>.
17. McDiarmid RW, Altig R. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press; 1999. 1-458 p;.
18. Pezzuti TL, Fortes Leite FS, Rossa-Feres D de C, Anchieta Garcia PC. The Tadpoles of the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil: A Baseline for Larval Knowledge and Anuran Conservation in a Diverse and Threatened Region. *South Am J Herpetol*. 2021 Dec 15;22(sp1); Available from: <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-20-00042.1>.
19. Haas A, Das I, Hertwig ST, Bublies P, Schulz-Schaeffer R. *A Guide to the Tadpoles of Borneo*. Germany: Tredition; 2022;.
20. Bourret R. *Les batraciens de l'Indochine*. Vol. 6. Gouvernement Général de l'Indochine; 1942. 1-517 p;.
21. Boulenger GA. A catalogue of the reptiles and batrachians of Celebes with special reference to the collections made by Drs P & F Sarasin in 1893-1896. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 1897;PL.VII-XVI:193-237;.
22. Alcalá A, Brown WC. *Philippine Amphibians: Illustrated Field Guide*. Bookmark, Inc., Philippines; 1998. 1-116 p;.
23. Inger RF, Stuebing RB, Grafe UT, Dehling MJ. *A Field Guide to the Frogs of Borneo*. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo); 2005;.
24. Günther A. *Catalogue of the Batrachia Salientia in the collection of the British Museum*. London: Order of The Trustees; 1858;.
25. Hecht VL, Pham CT, Nguyen TT, Nguyen TQ, Bonkowski M, Ziegler T. First report on the herpetofauna of Tay Yen Tu Nature Reserve, northeastern Vietnam. *Biodivers J*. 2013;4(4):507-52;.

Tadpole identification and description of Marten's Oriental Frog *Occidozyga martensii* based on marker 16S rRNA in Di Linh Plateau, Vietnam

Do Tran Phuong Anh^{1,2,*}, Le Tran Tuyen^{1,2}, Pham Manh Hung^{1,2}, Le Thi Thuy Duong^{1,2}

ABSTRACT

The tadpole identification can support providing important information on the larval stage of amphibian species, which helps for studying the conservation, ecology, and life history of them. Based on morphological and molecular data, this study accurately identified the tadpoles of Marten's Oriental Frog *Occidozyga martensii* which had been recorded in the Di Linh Plateau, Lam Dong province. These tadpole specimens were collected in the wet season, July and August 2022. Analyzing the morphology and molecule of the tadpoles, amplifying the 16S rRNA marker by using a pair of primers AH-16S_S and AH-16S_R. Their 16S rRNA sequences matched to those collected at the type locality of *O. martensii* in Bangkok (Thailand) and closely related to those of *O. laevis* collected in Philippines. The results provided detailed morphological description of *O. martensii* tadpoles at stage 37 and the morphological changes from stage 37 to 41, with diagnostic characteristics: upper fin originates far posterior to trunk-tail junction, at approximately 17% of tail length, with black short-stripes in front of eyes and black short-stripe behind mouth, brown belly with many white spots. The tadpole morphology of *O. martensii* most resembles tadpole of *O. laevis* when compared with all congeners in genus *Occidozyga*. *O. martensii* differs from *O. laevis* in only having black short-stripes in front of eyes. It is easily confused when identifying these two species by their morphological characteristics. However, the molecular data from this study and previous studies suggested that *O. martensii* is a different taxon from *O. laevis*. These results from this study indicated the necessity of molecular methods in the identification of amphibians. The morphological and molecular data of *O. martensii* tadpole are helpful for the next taxonomic studies and management of Oriental Frog *Occidozyga* species in the future.

Key words: 16S rRNA, Di Linh, morphology, tadpole, *Occidozyga martensii*

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Do Tran Phuong Anh, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: dtpanh.eco@gmail.com

History

- Received: 11-5-2023
- Accepted: 20-3-2024
- Published Online: 31-3-2024

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i1.1293>



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Do T P A, Le T T, Pham M H, Le T T D. Tadpole identification and description of Marten's Oriental Frog *Occidozyga martensii* based on marker 16S rRNA in Di Linh Plateau, Vietnam. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024, 8(1):2869-2878.