

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ PHÁT SINH LOÀI CỦA SÁN LÁ SONG CHỦ KÝ SINH TRÊN CÁ CHÈM (*Lates calcarifer* BLOCH, 1790) NUÔI TẠI KHÁNH HÒA**

**THE PHYLOGENY OF TREMATODES ON CULTURED SEABASS (*Lates calcarifer* BLOCH, 1790) IN KHANH HOA PROVINCE**

Nguyễn Nguyễn Thành Nhơn<sup>1</sup>, Đỗ Thị Hòa<sup>2</sup>, Đặng Thúy Bình<sup>3</sup>, Phạm Thị Hạnh<sup>2</sup>, Trương Thị Oanh<sup>3</sup>

Ngày nhận bài: 15/02/2017; Ngày phản biện thông qua: 14/3/2017, Ngày duyệt đăng: 15/6/2017

**TÓM TẮT**

Cá chẽm (*Lates calcarifer*) là một trong những đối tượng nuôi biển phổ biến ở khắp khu vực Châu Á - Thái Bình Dương. Bệnh ký sinh trùng là một mối đe dọa lớn đối với nghề nuôi cá chẽm. Mối quan hệ tiến hóa của 5 loài sán lá song chủ ký sinh trên cá chẽm được khảo sát dựa trên thuật toán Maximum Parsimony, Maximum Likelihood và Bayesian Inference. Cây phát sinh loài cho thấy các loài sán lá song chủ được sắp xếp chung với các loài cùng giống và cùng họ. Riêng có loài *Eriolepturus hamati* được xếp vào họ Cryptogonimidae dựa vào gen 18S rRNA, trong khi đó cây phát sinh loài dựa trên gen 28S rRNA cho thấy sự sắp xếp phù hợp với các loài cùng giống thuộc họ Hemiuridae. Cần tiến hành nghiên cứu trên các chỉ thị gen ti thể, cũng như khảo sát các đặc điểm hình thái đặc trưng cho các loài sán lá song chủ ký sinh trên cá chẽm.

Từ khóa: Sán lá song chủ, cá chẽm, *Lates calcarifer*, phát sinh loài, 18S rRNA, 28S rRNA

**ABSTRACT**

Seabass (*Lates calcarifer*) is one of the popular marine cultured species across Asia-Pacific. Parasitic diseases are a major threat of seabass farming. Evolutionary relationships of 5 digenea species that infected seabass were investigated based on three approaches: Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Both 18S and 28S rRNA phylogenetic trees show digenea species were clustered to species with the same genus and family. Species *Eriolepturus hamati* has been, however, categorized as species of family Cryptogonimidae in the 18S rRNA, while the 28S rRNA phylogram showed the matching of this species to those belong to family Hemiuridae. It is suggested that further research need to be conducted on the mitochondrial DNA markers, as well as study the morphological characteristics for digenea species infected seabass.

Keywords: Digenea, seabass, *Lates calcarifer*, phylogeny, 18S rRNA, 28S rRNA

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Cá chẽm (*Lates calcarifer*) là loài rộng muối, có thể nuôi trong môi trường nước mặn, nước ngọt, nước lợ. Với qui trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá chẽm đã hoàn thiện nên việc phát triển nuôi loài cá này theo qui mô

công nghiệp, nhằm cung cấp thực phẩm trong nước và phục vụ xuất khẩu là khả thi, góp phần nâng cao GDP thủy sản nước ta. Bên cạnh đó, việc thuần hóa cá chẽm để nuôi ở nước ngọt có thể giúp cải thiện đời sống của người dân ở nhiều vùng địa lý khác nhau. Tuy nhiên,

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

<sup>2</sup> Viện Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

<sup>3</sup> Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

cũng như nhiều đối tượng thủy sản khác, khi được nuôi với qui mô công nghiệp thì vấn đề bệnh và tác hại của bệnh trong quá trình nuôi vẫn là một khó khăn không nhỏ cho người nuôi. Các tác nhân gây bệnh thông thường như virus, vi khuẩn và ký sinh trùng (KST),.... Ký sinh trùng gây bệnh ở cá chêm nuôi có nhiều nhóm khác nhau: động vật đơn bào-Protozoa, Sán lá đơn chủ -Monogenea, giáp xác bậc thấp ký sinh - Crustacea, giun tròn - Nematelminthes và sán lá song chủ (SLSC) - Digenea. Các ký sinh trùng là sán lá song chủ (SLSC) ở giai đoạn trưởng thành chủ yếu sống nội ký sinh ở dạ dày, ruột, mạch máu, gan, thận... của động vật có xương sống như cá, động vật trên cạn, trong đó có con người.. Nghiên cứu ký sinh trùng trên cá chêm được tiến hành ở qui mô rộng trong khu vực châu Á và Úc [10], [17], [18], [19], [25]. Khoảng 75 loài ký sinh trùng được ghi nhận ký sinh trên loài cá này. Đối với lớp sán lá song chủ, các nghiên cứu ghi nhận khoảng 8 loài phổ biến thuộc 6 giống. Các loài chủ yếu ký sinh trong ruột và dạ dày, riêng các loài thuộc giống *Transversotrema* ký sinh trên mang và da.

Nghiên cứu thành phần loài sán lá song chủ ký sinh trên cá chêm nuôi thương phẩm tại Khánh Hòa ghi nhận 5 loài phổ biến bao gồm *Transversotrema patialense*, *Pseudometadene celebesensis*, *Erilepturus hamati*, *Helicometra fasciata* và *Bucephalus margaritae* [2], [4]. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu chỉ dừng lại ở mức độ khảo sát thành phần loài dựa vào đặc điểm hình thái.

Mục đích của nghiên cứu này là ứng dụng kỹ thuật di truyền kiểm chứng phân loại hình thái và khảo sát mối quan hệ tiến hóa của các loài sán lá song chủ ký sinh trên cá chêm dựa trên gen 18S rRNA và 28S rRNA.

## II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Phương pháp thu mẫu

Cá chêm (*Lates calcarifer*) được thu tại các ao, lồng bè nuôi ở ven hoặc trong các vịnh Cam Ranh, vịnh Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa.

Cá được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm để tiến hành nghiên cứu.

### 2. Phương pháp thu ký sinh trùng

Sán lá song chủ ký sinh trên cá chêm (*Lates calcarifer*) được thu và xử lý gồm các bước chính sau [1], [5]:

- Cá được cân trước khi đưa vào kiểm tra KST. Nhớt da và mang cá chêm được thu bằng dao giải phẫu, phết mỏng trên lam và quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 40x đến 100x.

- Máu từ tim cá được thu bằng xilanh 1 ml, nhỏ lên các lam sạch để soi tươi hoặc làm tiêu bản nhuộm, quan sát dưới kính hiển. Trong máu cá có thể bị nhiễm SLSC thuộc giống *Sanguinicola* (họ Sanguinicolidae).

- Vây và xương nắp mang cá chêm được cắt rời cho vào hộp lồng chứa nước biển, dưới kính hiển vi soi nổi có thể phát hiện KST.

- Mang cá được cắt rời từng lá cho vào hộp lồng có nước biển và soi tươi. Khi phát hiện KST, cắt các tơ mang có trùng cho vào hộp lồng khác, tách trùng cho lên lam kính, đặt lam và quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 100 - 400 lần.

- Nội quan cá được quan sát, ghi nhận các dấu hiệu bất thường và thu thập các KST kích thước lớn (nếu có). Kiểm tra túi mật, dùng xilanh hút dịch mật nhỏ lên lam kính, đặt lam và quan sát dưới kính hiển vi. Ruột, dạ dày được cho vào các hộp lồng riêng biệt có chứa nước muối sinh lý và đem kiểm tra SLSC dưới kính soi nổi. Sau đó, ống tiêu hóa của các mẫu cá được giải phẫu để thu nhớt dạ dày và ruột, đem kiểm tra dưới kính hiển vi để phát hiện SLSC có kích thước nhỏ.

- Các mẫu gan, thận, não và cơ của cá được ép mỏng bởi 2 lam kính và quan sát dưới kính giải phẫu có độ phóng đại thấp.

- Khi phát hiện KST là sán lá song chủ ký sinh trong các nội tạng của cá, kim giải phẫu và ống hút nhỏ được sử dụng để tách từng cá thể của SLSC ra khỏi cơ thể vật chủ, ngâm và rửa SLSC trong nước muối sinh lý (0,85%). Dưới kính hiển vi một số mẫu sán tươi được đưa

lên lam kính để quan sát, đo đạc và vẽ lại hình dạng, cấu tạo các cơ quan của sán. Ngoài ra, các thông tin quan sát được ghi chép cụ thể làm cơ sở cho việc phân loại sán bằng phương pháp hình thái học.

### 3. Phân loại hình thái sán lá song chủ

Các đặc điểm chính để phân loại sán lá song chủ: hình dạng và kích thước cơ thể sán. Số lượng, hình dạng, kích thước, vị trí của các giác bám và tỷ lệ về kích thước giữa 2 giác bám miệng và bụng. Hình dạng, kích thước, vị trí của cơ quan sinh dục (gồm buồng trứng, tinh hoàn, noãn hoàng và các ống dẫn sinh dục) và vị trí lỗ sinh dục. Hệ thống tiêu hóa: gồm ruột kín hay hở, phân nhánh hay không, ngắn hay dài so với chiều dài thân, thẳng hay gấp khúc. Sán lá song chủ được định danh theo các nghiên cứu của Velasquez và Yamaguti [27][28].

### 4. Tách chiết DNA, nhân gen bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự

DNA của từng cá thể sán lá song chủ thu từ cá chêm được tách chiết bằng bộ kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR gen 18S rRNA và 28S rRNA được khuếch đại với các đoạn mỗi lần lượt là A: 5'AMCTGGTTGATCCTGCCAG 3'; B: 5'AGGTGAACCTGCAGATGGAC 3' [20], và LSU 5: 5'TAGGTCGACCCGCTGAATTTAAGCA3'; 1500R: 5'GCTATCCTG AGGGAAACTTCG 3' [22].

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 50µl (bao gồm 9 µL khuôn DNA, 5 µL 10X Dream Taq Buffer, 1 µL dNTP (10 mM), 1 µL mỗi mỗi (10 µM), 0,25 µl Taq DNA polymerase (5U/µl) và 32,75 nước cất cho đủ thể tích), phản ứng được tiến hành theo chu trình nhiệt gồm 94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ của 94°C trong 30 giây, 48°C (gen 18S), 52°C (gen 28S) trong 45 giây, 72°C trong 1 phút; chu kỳ cuối 72°C trong 7 phút.

Sản phẩm PCR được tiến hành phản ứng giải trình tự theo nguyên tắc Dye – labelled dideoxy terminator (Big Dye Terminator v.3.1,

Applied Biosystems) với các đoạn mỗi tương tự như phản ứng PCR theo chương trình luân nhiệt như sau: 96°C trong 20 giây, 50°C trong 20 giây, cuối cùng là 60°C trong 4 phút. Sản phẩm sau đó được phân tích bằng thiết bị ABI Prism 3.700 DNA Analyser (Applied Biosystems).

### 5. Phân tích mối quan hệ phát sinh loài

Các trình tự gen 18S rRNA và 28S rRNA của các loài sán lá song chủ thu được trên cá chêm được xử lý và kết nối bằng phần mềm Geneious R7.1 (<http://www.geneious.com>) [14] và kiểm chứng bằng chương trình BLAST ([ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast)). Các trình tự được đóng hàng bằng phần mềm Bioedit, sau đó được kiểm tra, chỉnh sửa bằng mắt thường [11].

Đối với gen 18S, trình tự của 4 loài nghiên cứu và 7 loài từ Ngân hàng gen (GenBank) được sử dụng, trong khi đó, 17 trình tự từ Genbank được sử dụng trong phân tích gen 28S. *Eudiplozoon nipponicum* và *Demidospermus mortenthaleri* lần lượt được sử dụng làm nhóm ngoại trong các phân tích dựa trên gen 18S rRNA và 28S rRNA.

Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên 3 thuật toán Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) và Bayesian Inference (BI) bằng các phần mềm PAUP 4.0, Mega 5.0 và MrBayes 3.1.2 [13], [15], [26]. Đối với thuật toán MP và ML, 1.000 độ lặp lại ngẫu nhiên được áp dụng. Trước khi tiến hành thuật toán ML và BI, các mô hình tiến hóa phù hợp được kiểm tra bằng phần mềm Modeltest 3.7 [21] và MrModeltest 2.2 [21].

Đối với thuật toán BI, các mô hình thay thế được tính toán. Chương trình được chạy trên 4 kênh với 1 triệu thế hệ, với tần suất tính toán trên 100 thế hệ. Phân tích được lặp lại 2 lần để xác định độ chính xác của phương pháp phân tích (so sánh sự tương tự của các thông số likelihood). Các cây đạt được trước khi thông số likelihood đạt độ ổn định sẽ bị loại bỏ bằng chức năng burnin (10,000 cây). Giá trị tin cậy

(Posterior probability) được biểu hiện trên các nhánh của cây tiến hóa [13].

Giá trị bootstrap (BT) được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán MP với độ lặp lại 1000. Cây đa dạng loài được hiển thị và hiệu chỉnh bằng phần mềm TreeView 1.6.6 [23].

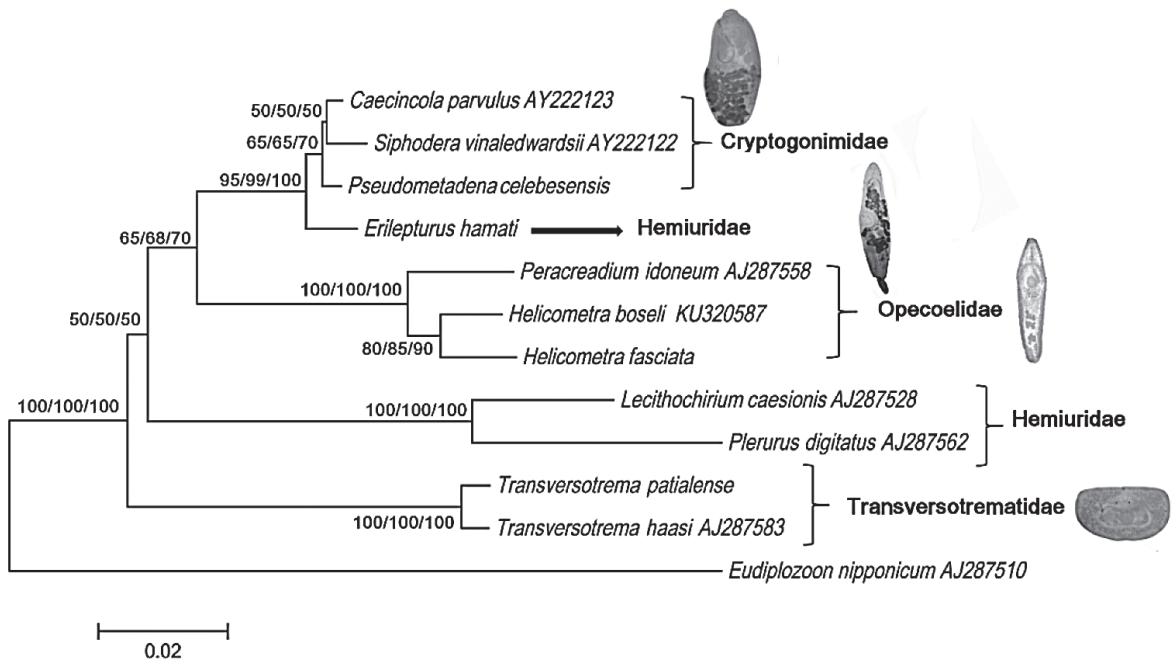
**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**1. Cây phát sinh loài dựa trên gen 18S rRNA**

Sau khi so sánh và dóng hàng trình tự, 935 bp được sử dụng cho việc phân tích mối quan hệ tiến hóa. Kết quả phân tích đối với dữ liệu trình tự gen 18S rRNA dựa theo phương pháp ML được trình bày ở Hình 1 với giá trị Bootstrap của phương pháp MP, ML và PP được thể hiện trên các nhánh.

Qua Hình 1 cho thấy các loài SLSC ký sinh trên cá chêm phân thành 1 nhóm với giá trị BT và giá trị tin cậy tương đối (ML/MP/PP=100/100/100). Bốn nhóm phụ được phát

hiện. Nhóm 1 gồm loài *P. celebesensis* có quan hệ gần gũi với loài *Caecincola parvulus* và *Siphodera vinalwardsii* (3 loài này thuộc họ Cryptogonimidae) và *E. hamati* (thuộc họ Hemiuridae); Nhóm 2 gồm loài *Helicometra fasciata* từ nghiên cứu hiện tại được sắp xếp cùng nhánh với loài *Helicometra boseli*, và nhóm này có quan hệ gần gũi với *Peracreadium idoneum*, 3 loài này đều thuộc họ Opecoelidae; Nhóm 3 gồm loài *Lecithochirium caesionis* và loài *Plerurus digitatus* (thuộc họ Hemiuridae); Nhóm 4 bao gồm loài *Transversotrema patialense* và loài *Transversotrema haasi* từ GenBank (thuộc họ Transversotrematidae). Kết quả này cũng cho thấy kết quả phân loại dựa trên đặc điểm hình thái khá chính xác, các loài đều được sắp xếp với các loài cùng giống hoặc các giống cùng một họ. Tuy nhiên, loài *Erilepturus hamati* thuộc họ Hemiurida (Nhóm 3) lại được sắp xếp với các loài thuộc họ Cryptogonimidae (Nhóm 1).



**Hình 1. Cây phát sinh loài dựa trên gen 18S rRNA theo phương pháp ML của các loài SLSC ký sinh trên cá chêm**

Loài *Eudiplozoon nipponicum* được sử dụng làm nhóm ngoại - outgroup. Giá trị BT và PP được biểu hiện trên các nhánh. Hình thái ngoài và hệ thống phân loại của các loài ký sinh trùng được biểu hiện

Blair và cộng sự nghiên cứu về mối quan hệ phát sinh loài của các loài SLSC Digenea thuộc trên họ (superfamily) Hemiuroidea dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền, cây phát sinh loài dựa trên vùng V4 của gen 18S rRNA của các loài SLSC cho thấy sự thiếu phù hợp về đặc điểm hình thái và di truyền (do thiếu các đặc điểm hình thái đặc trưng), các loài khác giống nằm trên các nhánh khác nhau. Họ Hemiuridae thể hiện sự đồng nhất, trong đó loài thuộc giống *Erilepturus* được xếp với các loài thuộc giống *Plerurus*, và nhóm này có quan hệ gần gũi với các loài thuộc giống *Lecithochirium*, *Hemiurus*, *Lechithocladium* trên cây phát sinh loài. Nhóm tác giả cũng thảo luận về đặc điểm hình thái quan trọng để phân loại họ Hemiuridae là túi bài tiết hình phễu lớn có thể đưa ra ngoài hay kéo vào trong cơ thể chưa đủ để phân biệt các giống trong họ. Nghiên cứu hiện tại dựa vào một phần gen 18S rRNA có bao gồm vùng V4 cho thấy loài *E. hamati* được xếp chung với các loài thuộc họ Cryptogonimidae và phân tách với các loài thuộc họ Hemiuridae (Hình 1).

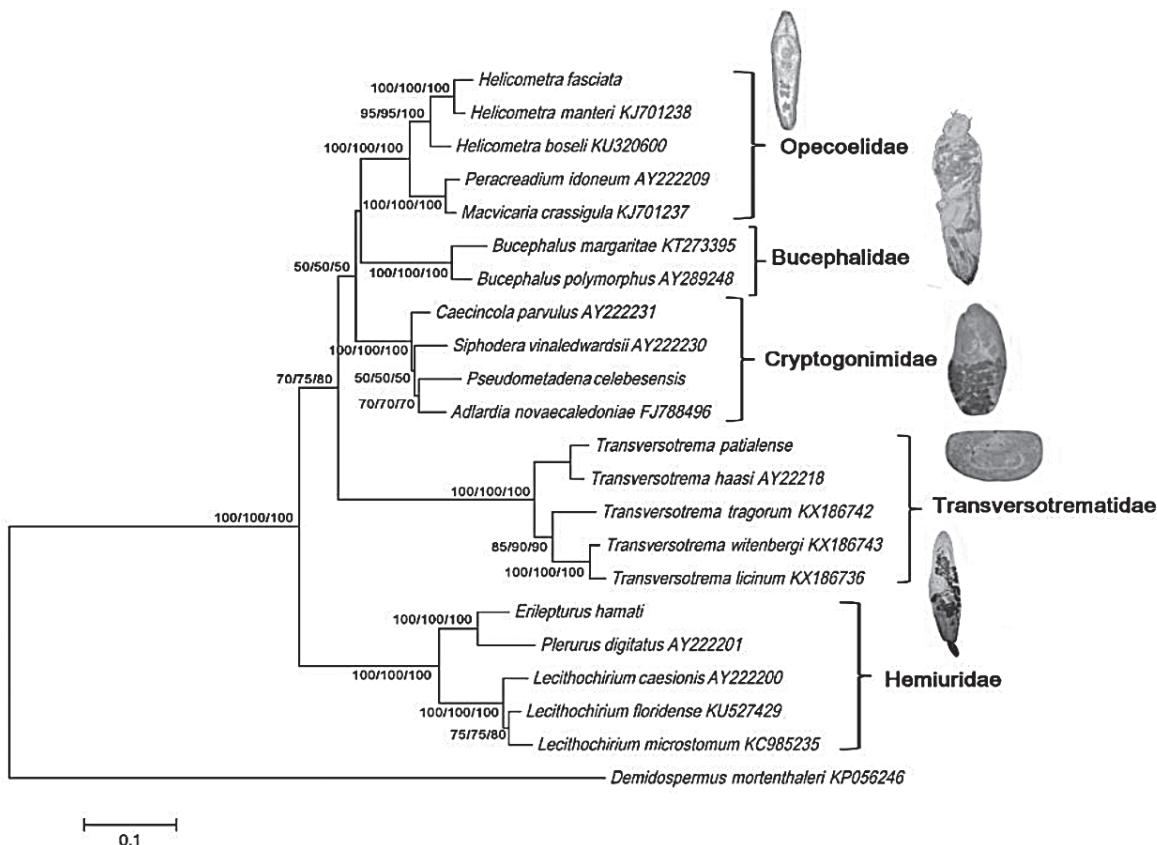
Bray và cộng sự khi xây dựng cây phát sinh loài đối với các loài thuộc họ Opecoelidae dựa vào trình tự gen 18S cho thấy sự không phù hợp về mặt hình thái và di truyền, ví dụ liên họ Plariopoginae là không đồng nhất. Nhóm tác giả đã đề xuất liên họ Helicometrinae bao gồm giống *Helicometra*, *Helicometrina* và giống *Neohelicometra*. Tác giả cũng chỉ rõ sự phân tách của các nhóm thuộc giống khác nhau và trong đó các loài thuộc giống *Helicometra* đều có đặc điểm chung (trứng có lông tơ, đặc điểm của tử cung) và được sắp xếp trên cùng 1 nhánh của cây phát sinh loài [7].

## 2. Cây phát sinh loài dựa trên gen 28S rRNA

Sau khi so sánh và đóng hàng trình tự, 1325 bp được sử dụng cho việc phân tích mối quan hệ tiến hóa. Kết quả phân tích đối với dữ liệu trình tự gen 28S rRNA dựa trên phương pháp ML với giá trị BT và PP được thể hiện trên các nhánh (Hình 2).

Qua hình 2 cho thấy, cây phát sinh loài dựa trên gen 28S rRNA chia thành 2 nhánh chính. Nhánh 1 lại được chia thành 4 nhóm phụ. Nhóm 1.1 gồm loài *Helicometra fasciata* từ nghiên cứu hiện tại, thể hiện sự tương đồng cao với loài cùng giống từ Genbank, được sắp xếp cùng với 2 loài thuộc họ Opecoelidae (*Peracreadium idoneum* và *Macvicaria crassigula*). Tiếp đó là nhóm 1.2 với các loài thuộc giống *Bucephalus* spp (Họ Bucephalidae). Nhóm 1.3 là loài *P. celebesensis* sắp xếp với các loài cùng họ Cryptogonimidae. Cuối cùng là nhóm 1.4 phân tách khỏi 3 nhóm gồm các loài thuộc giống *Transversotrema*. Nhánh 2 bao gồm loài *E. hamati* nằm cùng nhánh với loài *Plerurus digatatus*, và nhánh này có quan hệ gần gũi với các loài thuộc giống *Plerurus* và *Lecithochinium*, các loài này đều thuộc họ Hemiuridae.

Dựa vào cây phát sinh loài của trình tự gen 28S rRNA cho thấy các loài được sắp xếp phù hợp với hệ thống phân loại dựa vào đặc điểm hình thái. Các loài thuộc cùng 1 giống đều nằm trên 1 nhánh chung và có sự sắp xếp hợp lý với các loài cùng một họ. Đặc biệt, đối với gen 28S rRNA, loài *E. hamati* được sắp xếp cùng với các loài cùng họ Hemiuridae, trong khi ở cây phát sinh loài dựa trên gen 18S rRNA, chúng lại được sắp xếp với các loài thuộc họ Cryptogonimidae.



**Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên gen 28S rRNA của các loài SLSC ký sinh trên cá chêm *Dendritobilharzia pulverulenta* được sử dụng làm nhóm ngoài –outgroup; Giá trị BT (MP, ML) và PP được biểu hiện trên các nhánh.**

Hình thái ngoài và hệ thống phân loại của các loài ký sinh trùng được biểu hiện.

Các loài thuộc họ Transversotrematidae là nhóm SLSC ký sinh tại các vị trí đặc trưng của vật chủ (dưới vảy) và có cấu trúc cơ thể khác với các loài SLSC khác. Trên cây phát sinh loài dựa trên gen 28S rRNA, các loài thuộc giống *Transversotrema* có quan hệ gần gũi với nhau và nằm trên cùng một nhánh riêng biệt (Nhóm 1.3). Kết quả phù hợp với kết quả nghiên cứu của Cribb và cộng sự năm 2014 khi khảo sát mối quan hệ tiến hóa dựa vào trình tự gen ITS2 rRNA của các loài thuộc giống *Transversotrema* trên một số loài cá hồng và cá bướm tại vùng biển nước Pháp và các trình tự trên GenBank. Kết quả cho thấy giống này chia thành 3 nhóm (Clade) gồm các loài từ họ cá đối (Mullidae), cá hồng/cá mó/cá bàng chài và nhóm cuối cùng là loài *T. polynesia* và các loài còn lại [8]. Cutmore

và cộng sự cũng cho thấy mối quan hệ gần gũi của các loài thuộc giống *Transversotrema* đối với trình tự gen 28S và ITS2 khi xây dựng cây phát sinh loài [9].

Nghiên cứu về hệ ký sinh trùng trên cá chêm còn nhiều hạn chế, đặc biệt các nghiên cứu về di truyền học. Một số loài được phát hiện trên cá chêm chưa có trình tự trên GenBank để so sánh (ví dụ *Eriplepturus hamati*, *Pseudometadema celebesensis*). Tuy nhiên, phân tích cây phát sinh loài 18S rRNA và 28S rRNA cho thấy sự gần gũi với các giống trên GenBank (*Plerurus* và *Caesicola*). Nhìn chung, cả 2 cây phân loại đều cho thấy sự phù hợp giữa hệ thống phân loại dựa trên hình thái và di truyền, tuy nhiên, loài *Eriplepturus hamati* thể hiện sự không phù hợp giữa 2 cây phân loại.

## IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. Kết luận

Cây phát sinh loài dựa trên gen 18S rRNA và 28S rRNA cho thấy 5 loài ký sinh trùng (*Erilepturus hamati*, *Pseudometadema celebesensis*, *Helicometra fasciata*, *Bucephalus margaritae* và *Transversotrema patialense*) tìm thấy trên cá chẻm (*Lates*

*calcarifer*) được sắp xếp chung với các loài cùng giống và cùng họ. Riêng có loài *E. hamati* được xếp vào họ Cryptogonimidae thay vì Họ Hemiuridae dựa vào gen 18S rRNA.

### 2. Kiến nghị

Cần tiếp tục tiến hành nghiên cứu trên các chỉ thị gen nhân và khảo sát cụ thể hơn các đặc điểm hình thái ở mức độ giống và họ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Võ Thế Dũng, 2010. Động vật ký sinh ở cá chẻm thuộc giống *Epinephelus*. Luận án tiến sĩ sinh học. Viện Hải dương học, Nha Trang.
2. Đỗ Thị Hòa, Trần Vũ Hích, Nguyễn Thị Thùy Giang, Phan Văn Út, Nguyễn Thị Nguyệt Huệ, 2008. Các loại bệnh thường gặp trên cá biển nuôi ở Khánh Hòa. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang, 16-24.
3. Hà Ký và Bùi Quang Tề, 2007. Ký sinh trùng cá nước ngọt Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
4. Nguyễn Nguyễn Thành Nhơn, Võ Thế Dũng, Võ Thị Dung, Glenn Allan Bristow, Đỗ Thị Hòa, 2010. Một số ký sinh trùng ở cá chẻm (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) nuôi tại Khánh Hòa. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 6, 59-63.
5. Bùi Quang Tề, 2001. Ký sinh trùng một số loài cá nước ngọt ở đồng bằng sông Cửu Long và các giải pháp phòng trị chúng. Luận án tiến sĩ sinh học. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, Bắc Ninh.

### Tiếng Anh

6. Blair, D., Bray, R. A., and Barker, S. C., 1998. Molecules and Morphology in Phylogenetic Studies of the Hemiuroidea (Digenea: Trematoda: Platyhelminthes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 15-25.
7. Bray, R. A., Cribb, T. H., Littlewood, D. T., Waeschenbach A., 2016. The molecular phylogeny of the digenean family Opecoelidae Ozaki, 1925 and the value of morphological characters, with the erection of a new subfamily. *Folia Parasitologica (Praha)*, 63, 2-11.
8. Cribb, T. H., Adlard, R. D., Bray, R. A., Pierre Sasal, Cutmore, S. C., 2014. Biogeography of tropical Indo-West Pacific parasites: A cryptic species of *Transversotrema* and evidence for rarity of *Transversotrematidae* (Trematoda) in French Polynesia. *Parasitology International*, 63(2), 285-294.
9. Cutmore, S. C., Diggles, B. K. and Cribb, T. H., 2016. *Transversotrema* Witenberg, 1944 (Trematoda: Transversotrematidae) from inshore fishes of Australia: description of a new species and significant range extensions for three congeners. *Systematic Parasitology*, 93, 639-652.
10. Glazebrook, J. S.; Campbell, R. S. F., 1987. Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. In: Management of wild and cultured sea bass/barramundi (*Lates calcarifer*). J. W. Copland and D. L. Grey (Eds). Proc. International Workshop, Darwin, NT, Australia, 24-30 September 1986. ACIAR Proc. 20: 204-207.
11. Hall, T.A., 1999, "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95-98.
12. Herbert, B. W., Shaharom-Harrison, F. M. & Overstreet, R. M., 1994. Description of a new blood-fluke, *Cruoricola lates* n. g., n. sp. (Digenea: Sanguinicolidae), from sea-bass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) (Centropomidae). *Syst Parasitol* (1994) 29: 51. doi:10.1007/BF00009838

13. Huelsenbeck, J.P, Ronquist F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
14. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
15. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. and Nei, M., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17, 1244-1245.
16. Leong, T. S., Wong, S. Y., 1986. Parasite fauna of seabass, *Lates calcarifer* Bloch, from Thailand and from floating cage culture in Penang, Malaysia. In: First Asian fisheries forum. J. L. Maclean, L. B. Dizon and L. V. Hosillos (Eds). Proceedings of the First Asian Fisheries Forum, 26–31 May 1986, Manila, Philippines: 251–254.
17. Leong, T. S., Wong, S. Y., 1992a. Parasites of marine finfishes cultured in ponds and cages in Indonesia. Proceedings of the Symposium on Tropical Fish Health Management in Aquaculture. 14-16 May 1991, Bogor, Indonesia. *Biotrop Spec. Publ.* 48, 119 - 124.
18. Leong, T. S., Wong, S. Y., 1992b. The parasite fauna of cultured seabass, *Lates calcarifer* Bloch from Kelantan and Penang, Malaysia. *Journal of Biosciences*, 3, 27–29.
19. Littlewood, D. T. J., Rohde, K. and Clough, K.A., 1999. The interrelationships of all major groups of Platheminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. *Biological Journal of The Linnean Society*, 66, 75-114.
20. Nylander, J. A., 2004. Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University, Uppsala, Sweden.
21. Olson, P. D., Cribb, T. H., Tkachd, V. V., Bray, R. A., Littlewood, D. T. J., 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platheminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33, 733–755.
22. Page, R. D., 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications Biosciences*, 12, 357-358.
23. Posada, D., and Crandall, K. A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
24. Rückert, S., Palm, H. W. and Klimpel, S., 2008. Parasite fauna of seabass (*Lates calcarifer*) under mariculture conditions in Lampung Bay, Indonesia. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 321–327. doi:10.1111/j.1439-0426.2008.01064.x
25. Swofford, D. L., 2001. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
26. Velasquez, C. C., 1975. Some parasitic helminths of Philippine fishes. *The University of the Philippines Research Digest*, 5(1), 23-29.
27. Yamaguti, S., 1965. New digenetic trematodes from Hawaiian fishes, Part 1. *Pacific Science*, 19(1-4), 458-481.