

## PHÂN LOẠI CÁ LĂNG CHẤM Ở LƯU VỰC SÔNG TẠI THÁI NGUYÊN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Nguyễn Thị Hải Hà<sup>1</sup>, Bùi Văn Thắng<sup>1</sup>, Trần Việt Vinh<sup>2</sup>, Trần Thảo Vân<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>2</sup>Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

### TÓM TẮT

Cá lăng chấm (*Hemibagrus guttatus*) là tên gọi một loài cá trong giống cá Lăng (*Hemibagrus*) thuộc họ cá Lăng (Bagridae). Số loài thuộc giống cá Lăng ở Việt Nam ước tính khoảng 227 loài. Trong tự nhiên, một số loài cùng giống cá Lăng có hình thái khá giống nhau dẫn đến nhầm lẫn trong phân loại. Việc sử dụng chỉ thị phân tử giúp phân loại loài cá Lăng chấm một cách chính xác, bổ sung thêm cho phương pháp phân loại cá Lăng chấm. Nghiên cứu này đã sử dụng các cặp mồi đặc hiệu nhân bản thành công hai gen 16S và COI. Kết quả xác định, phân tích và so sánh trình tự vùng gen 16S và COI từ các mẫu cá Lăng chấm thu tại Thái Nguyên với trình tự gen này của mẫu cá Lăng chấm công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (NCBI) cho thấy cá Lăng chấm Thái Nguyên có trình tự gen 16S và COI đặc trưng và có thể được sử dụng để làm đoạn mã vạch ADN trong phân loại loài cá Lăng chấm. Kết quả nghiên cứu có thể giúp các nhà quản lý có những định hướng tốt trong bảo tồn, lai tạo và phát triển nguồn gen loài cá có giá trị cao này.

**Từ khóa:** Cá lăng chấm, chỉ thị phân tử, mã vạch ADN.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá Lăng chấm (*Hemibagrus guttatus*) là tên gọi một loài cá trong giống cá Lăng (*Hemibagrus*) thuộc họ cá Lăng (Bagridae). Ở Việt Nam chúng chỉ có mặt ở các con sông lớn thuộc các tỉnh phía Bắc như sông Hồng, sông Đà, sông Lô, sông Mã, sông Cầu, sông Công; trên thế giới, cá Lăng chấm phân bố ở Trung Quốc (Vân Nam) và Lào. Cá Lăng chấm được biết đến là một loài cá không có xương dăm, thịt rất ngon, rất được ưa chuộng và có giá thành cao. Do lợi ích kinh tế từ cá Lăng chấm rất lớn nên người dân địa phương khai thác đánh bắt loài cá này trong tự nhiên mà không bảo tồn chăm sóc nuôi dưỡng, trong khi môi trường sống bị tàn phá và thu hẹp. Vì vậy, đến nay số cá thể cá Lăng chấm còn lại trong tự nhiên không nhiều. Vì lý do đó, cá Lăng chấm đã được ghi vào Danh lục Đỏ Việt Nam, mức đe dọa VU A1c,d B2a,b - sẽ nguy cấp, suy giảm số lượng ít nhất 20% theo ước tính do sự suy giảm nơi cư trú, khu phân bố và do khai thác quá mức (Sách đỏ Việt Nam, 1992).

Để phân loại các loài, hiện nay bên cạnh việc sử dụng các đặc điểm về hình thái, phương pháp giám định loài sử dụng các đoạn mã vạch ADN (DNA barcode) cũng đang được các nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên

cứu. Mã vạch ADN là những đoạn ADN ngắn, nằm trong hệ gen (nhân, lục lạp và ty thể) đặc trưng cho mỗi loài sinh vật. Xác định loài bằng mã vạch ADN có độ chính xác cao, đặc biệt hữu dụng và khắc phục được hạn chế của phân loại về hình thái đối với các loài gần gũi mà những quan sát hình thái, sinh trưởng, phát triển chưa đủ cơ sở để phân biệt. Với đối tượng động vật, các đoạn mã vạch ADN chủ yếu được sử dụng thuộc ADN ty thể hoặc ARN ribosom gồm: CO, 16S, 18S. Năm 2008, Hubert và cộng sự đã phân tích 1360 đoạn mã vạch CO có độ lớn 652bp của 190 loài cá phân bố trong 85 chi và 28 họ cá ở Canada, kết quả cho thấy chuỗi COI của các loài được bảo tồn chặt chẽ và có sự khác biệt khoảng 0,1%. Cũng sử dụng trình tự COI, Zhang và cộng sự (2011) đã giải trình tự COI gồm 652bp của 121 loài cá sống ở bờ biển của Biển Đông. Ở Việt Nam, Dương Thúy Yên và cộng sự (2014) so sánh trình tự 3 gen mã vạch trong ty thể (Gene Cytochrom C oxidase subunit 1, COI, và Cytochrome b, Cyt b) và trong nhân (Gene Rhodopsin, Rho) của Cá rô đầu vuông và Cá rô đồng tự nhiên (*Anabas testudineus* bloch, 1792). Vũ Đăng Hạ Quyên và cộng sự (2014) phân tích mã vạch ADN một số loài cá nước ngọt ở đồng bằng sông Cửu Long thu được ở:

Cần Thơ, An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Trà Vinh, Bến Tre và Tiền Giang, sử dụng trình tự gen 16S rARN của ADN ty thể để kiểm chứng phân loại dựa vào hình thái và xây dựng mối quan hệ phát sinh chủng loại của các loài cá nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này 2 đoạn trình tự mã vạch ADN đặc trưng gồm 16S và COI đã được sử dụng để tiến hành phân lập, xác định và phân tích trình tự ADN làm cơ sở dữ liệu phân tử phục vụ cho việc phân loại loài cá Lăng chấm tại Thái Nguyên.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

*Đối tượng nghiên cứu:* Mẫu cá Lăng chấm được thu tại Thái Nguyên.

*Địa điểm thu mẫu:* Mẫu được thu tại 5 địa điểm: xã Bình Sơn, TP Sông Công; hồ Núi Cốc, huyện Đại Từ; đập Ba Đa, TP Thái Nguyên; sông Đào, huyện Phú Bình; xã Vô Tranh, huyện Phú Lương. Mỗi địa điểm thu 30 mẫu. Cách thu và xử lý mẫu vật được thực hiện theo Nguyễn Nghĩa Thìn (2007).

*Vật liệu nghiên cứu phân tử:* 5 mẫu vây Cá lăng chấm được thu từ 5 địa điểm tại Thái Nguyên. Mẫu được bảo quản trong ống eppendorf chứa dung dịch cồn 96<sup>0</sup>, sau đó được bảo quản ở -20°C để tách chiết ADN. Ký hiệu các mẫu cá Lăng chấm được lấy theo chữ viết tắt của tên họ khoa học của loài được ghi trong bảng 1.

**Bảng 1. Danh sách các mẫu nghiên cứu**

Ký hiệu mẫu	Địa điểm thu mẫu
H1	Đập Ba Đa, thành phố Thái Nguyên
H2	Xã Bình Sơn, thành phố Sông Công
H3	Sông Đào, huyện Phú Bình
H4	Xã Vô Tranh, huyện Phú Lương
H5	Hồ Núi Cốc, huyện Đại Từ

Các cặp mồi được sử dụng để nhân các đoạn gen *16S* và *COI* được thiết kế dựa trên các tài liệu đã được công bố (bảng 2).

**Bảng 2. Trình tự các cặp mồi và kích thước vùng gen đích theo lý thuyết**

Gen	Tên mồi	Trình tự 5'-3'	Nhiệt độ bắt mồi	Kích thước băng lý thuyết
<i>16S</i>	16SF	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	56°C	600 bp
	16SR	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT		
<i>COI</i>	COIF	TCAACCAACCACACCGACATTGGCAC	62°C	650 bp
	COIR	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA		

*Hóa chất:* hóa chất sử dụng để tách chiết ADN tổng số từ mẫu vây cá Lăng chấm: Kit tách chiết ADN tổng số (Animal DNA isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch ADN: Master mix của hãng iNtRon Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR purification Kit) của hãng Norgen, Canada; Hóa chất cho điện di trên gel Agarose, DNA marker, Redsafe của hãng Norgen, sigma.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ các mẫu vây cá Lăng chấm theo hướng dẫn của Kit (Animal DNA Isolation Kit). Xác định nồng độ và độ tinh sạch của dung dịch ADN tổng số bằng phương pháp quang phổ kế trên máy nanodrop2000. Nhân bản đoạn gen bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700 Thermal Cycler Applied Biosystems (Mỹ), mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng phản ứng 25 µl, bao gồm: H<sub>2</sub>O deion (8,5 µl), 2x PCR Master mix

Solution (12,5 µl), 10 pmol/µl môi xuôi (1,0 µl), 10 pmol/µl môi ngược (1,0 µl), ADN tổng số (2 µl tương ứng 50 ng). Chu trình nhiệt PCR: biến tính 94°C trong 5 phút, tiếp theo 35 chu kỳ [95°C - 30 giây, Nhiệt độ gắn môi - 50 giây, 72°C - 50 giây], 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%, nhuộm gel bằng redsafe, soi dưới đèn UV và chụp ảnh bằng hệ thống Dolphin - Doc Image system của hãng Wealtec (Mỹ). Sản phẩm PCR được tinh sạch theo quy trình của Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR purification Kit). Sau đó được giải trình tự hai chiều bởi công ty Macrogen, Hàn Quốc. Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

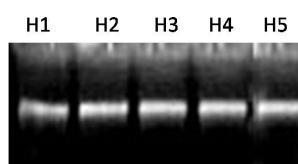
Dữ liệu trình tự được xử lý bằng phần mềm

BioEdit. Tìm kiếm và so sánh giữa trình tự nghiên cứu với các trình tự tương đồng trên ngân hàng Genbank (NCBI) bằng chương trình BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Phân tích số liệu bằng phần mềm MEGA (Kumar, 2016).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tách chiết ADN tổng số cá Lăng chấm

ADN tổng số của 5 mẫu cá Lăng chấm đã được tách chiết thành công với chất lượng ADN cao. Kết quả điện di kiểm tra ADN trên gel agarose 1% cho thấy các băng ADN tổng số thu được sắc nét, ADN không bị gãy (Hình 1). Kết quả đo OD cho chỉ số OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> của các mẫu luôn nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0. ADN đạt tiêu chuẩn để sử dụng cho các kỹ thuật tiếp theo.



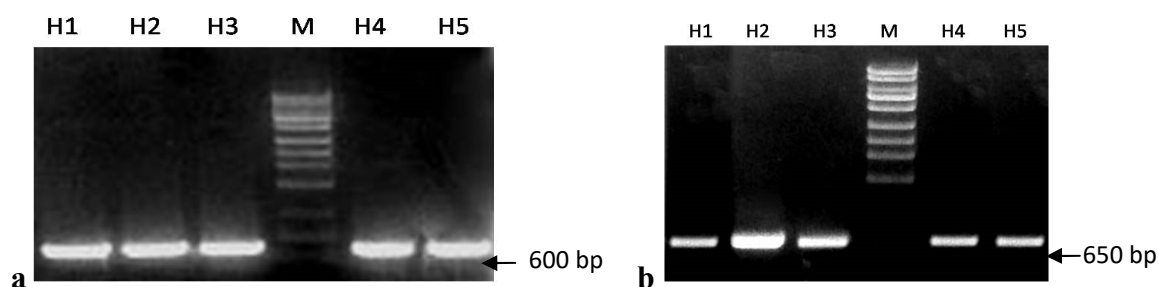
Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số cá Lăng chấm trên gel agarose 1%

(H1 ÷ H5 tương ứng: Đập Ba Đa, TP Thái Nguyên; Xã Bình Sơn, TP Sông Công; Sông Đào, huyện Phú Bình; Xã Vô Tranh, huyện Phú Lương; Hồ Núi Cốc, huyện Đại Từ)

#### 3.2. Nhân bản các đoạn mã vạch ADN bằng kỹ thuật PCR

ADN tổng số được pha loãng với nồng độ 25ng/µl và sử dụng cho phản ứng PCR với 2

cặp môi nhân đoạn gen *16S* và *COI*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR được thể hiện trên hình 2a, b.



Hình 2. a - Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *16S*; b - Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *COI* 5 mẫu cá Lăng chấm trên gel agarose 1,2%. M – thang AND chuẩn 1Kb.

Điện di sản phẩm PCR của tất cả các mẫu thí nghiệm cho thấy, ở các mẫu đều thu được một băng ADN sáng rõ nét, có kích thước khoảng 600 bp (đối với môi gen *16S*), 650 bp (đối với môi gen *COI*) và phù hợp với kích

thước lý thuyết của đoạn gen *16S* và *COI* dự kiến nhân bản. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần đều cho kết quả trùng nhau 100%. Kết quả điện di cũng cho thấy, không có băng ADN phụ xuất hiện, như vậy sản phẩm PCR nhân bản đoạn

gen *16S*, *COI* rất đặc hiệu, có thể sử dụng trực tiếp các sản phẩm này để tinh sạch và xác định trình tự nucleotide.

### 3.3. Xác định và phân tích trình tự nucleotide của đoạn mã vạch ADN

Trình tự nucleotide đoạn gen *16S* và *COI* ở sản phẩm PCR của 5 mẫu cá Lăng chấm đã được xác định. Kết quả cho thấy: các mẫu từ H1 đến H5 đều có chiều dài trình tự đoạn gen *16S* là 553 nucleotide, đoạn gen *COI* là 655 nucleotide giống nhau 100%.

Sử dụng phần mềm so sánh trình tự nucleotide BLAST của các mẫu từ H1 đến H5 với các loài cá Lăng chấm trên Genbank cho thấy các mẫu thu được tại Thái Nguyên gần nhất với trình tự nucleotide của gen *16S* của loài *H. guttatus* với mã số trên Genbank là KJ584373.1 với tỉ lệ giống 99%. Trong đó, tồn tại 1 điểm sai khác giữa trình tự mẫu cá Lăng chấm Thái Nguyên và mẫu cá Lăng chấm trên Genbank (KJ584373.1): Ở vị trí nucleotide 4: thay thế T bằng A (bảng 3).

**Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *16S* ở các mẫu từ H1 đến H5 với loài *H. guttatus* với mã số trên Genbank là KJ584373.1**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
H. guttatus -16S	AC	TT	CG	TATAGG	AGG	CT	TGCC	TGCC	AGT	GACA	AGTTAA
KJ584373.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
H. guttatus -16S	CT	GTA	GAA	TGGT	GGA	ACG	AGGG	CT	TAA	CTG	TCT
KJ584373.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
H. guttatus -16S	AC	CC	TTT	GG	AG	CT	TAA	GAT	GTA	AAA	TCA
KJ584373.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
H. guttatus -16S	AAA	ATAA	AGCT	CC	CA	CG	CG	CA	CC	CA	AA
KJ584373.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
H. guttatus -16S	AT	CA	CG	AA	CC	AA	GT	TACC	CT	AG	GA
KJ584373.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
	510	520	530	540	550						
H. guttatus -16S	AA	TGG	TGC	AG	CC	GC	TAT	TAA	GGG	TTC	GT
KJ584373.1	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

Tương tự, so sánh trình tự nucleotide của các mẫu từ H1 đến H5 với các loài trên Genbank cho thấy các mẫu từ H1 đến H5 thu được tại Thái Nguyên giống với trình tự nucleotide của gen *COI* của loài *Hemibagrus guttatus* có mã số trên Genbank là KJ584373.1 tới 99%. Chỉ có 2 điểm sai khác

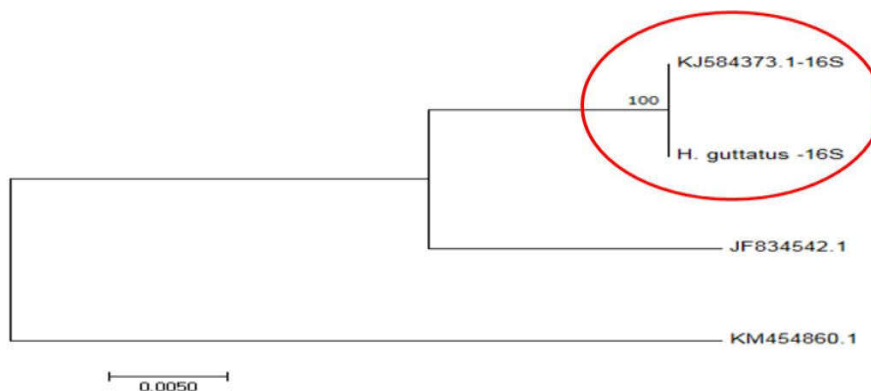
giữa trình tự mẫu cá Lăng chấm Thái Nguyên và mẫu cá Lăng chấm trên Genbank (KJ584373.1): Ở vị trí 37: trình tự gen của mẫu cá Lăng chấm Thái Nguyên là T được thay bằng A thuộc trình tự gen *COI* của loài có mã số KJ584373.1. Tương tự, ở vị trí 201, A được thay thế bằng C (bảng 4).

**Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen COI ở các mẫu từ H1 đến H5 với loài *Hemibagrus guttatus* có mã số trên Genbank là KJ584373.1**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	610	620	630	640	650					
H. guttatus -COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KJ584373.1-COI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Dựa vào những kết quả trên, chúng tôi xây dựng cây phát sinh thể hiện mối quan hệ của các mẫu nghiên cứu với các loài trên ngân hàng gen NCBI (*Hemibagrus guttatus* có mã số trên Genbank là KJ584373.1, *Hemibagrus*

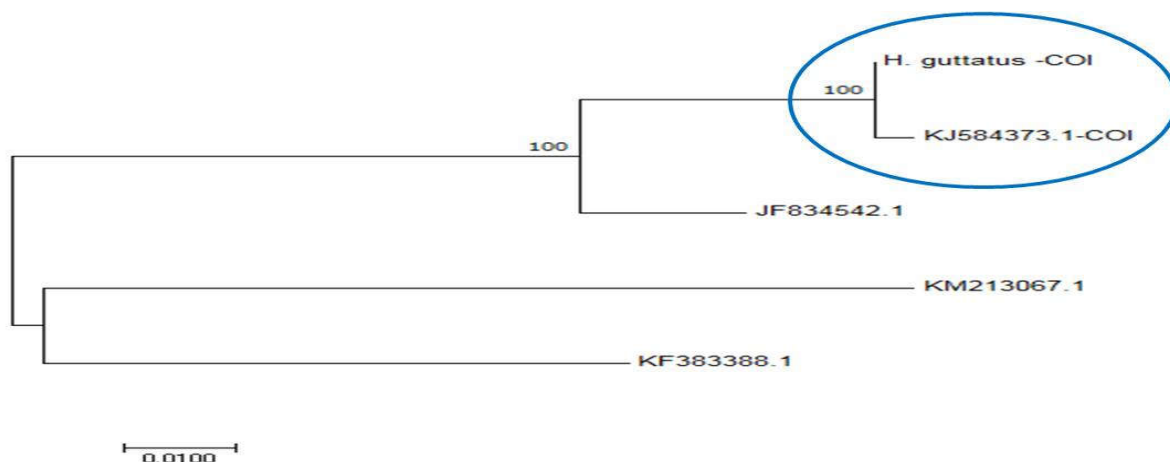
*macropterus* có mã số trên Genbank là JF834542.1, *Hemibagrus nemurus* có mã số trên Genbank là KM454860.1) dựa trên kết quả phân tích đoạn gene 16S:



**Hình 3. Cây phân loại dựa trên đoạn gen 16S của một số loài *Hemibagrus* xây dựng bằng phần mềm MEGA (phương pháp Neighbor-joining)**

Tương tự, cây phát sinh thể hiện mối quan hệ của các mẫu cá Lăng chấm nghiên cứu và một số loài cùng chi *Hemibagrus* trên ngân hàng gen NCBI (*Hemibagrus macropterus* mã

số JF834542.1, *Hemibagrus punctatus* mã số KF383388.1, *Hemibagrus nemurus* mã số KM213067.1) dựa trên kết quả phân tích đoạn gene *COI*:



**Hình 4. Cây phân loại dựa trên đoạn gen COI của một số loài Hemibagrus xây dựng bằng phần mềm MEGA (phương pháp Neighbor-joining)**

Từ kết quả phân tích trình tự gen 16S và COI của cá Lăng chấm Thái Nguyên và so sánh với các trình tự gen đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế (NCBI) cho thấy các mẫu cá Lăng chấm Thái Nguyên thuộc cùng một loài có tên khoa học là *Hemibagrus guttatus* (Lacepède, 1803); nhưng có sự khác biệt khoảng 1% giữa trình tự gen 16S và COI so với mẫu cá Lăng chấm có mã số đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế là KJ584373.1. Đây là điểm đặc trưng của cá Lăng chấm Thái Nguyên. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả phân loại về hình thái đối với loài cá Lăng chấm tại Thái Nguyên. Hai trình tự gen 16S và COI xác định được đã được đăng ký và công bố trên NCBI với mã số lần lượt là MH828725.1 và MH828724.1.

#### 4. KẾT LUẬN

Xác định, so sánh và phân tích trình tự vùng gen 16S và COI từ 5 mẫu cá Lăng chấm thu tại Thái Nguyên và xác định được các mẫu cá Lăng chấm nghiên cứu thuộc cùng một loài *Hemibagrus guttatus*. Trình tự gen 16S và COI đã được đăng ký và công bố trên NCBI với mã số lần lượt là MH828725.1 và MH828724.1.

Việc sử dụng mã vạch DNA của đoạn gen 16S và COI trong việc phân loại các mẫu cá Lăng chấm ở Thái Nguyên là hiệu quả và là cơ sở khoa học quan trọng cho bảo tồn và phát triển nguồn gen cá Lăng chấm quý ở tỉnh Thái Nguyên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nicolas Hubert, Robert Hanner, Erling Holm, Nicholas E. Mandrak, Eric Taylor, Mary Burrige, Douglas Watkinson, Pierre Dumont, Allen Curry, Paul Bentzen, Junbin Zhang, Julien April, Louis Bernatchez (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, Volume 3, Issue 6.
2. Nguyễn Nghĩa Thìn (2007). *Các phương pháp nghiên cứu Thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Hà Nội.
3. *Sách đỏ Việt Nam - Phần II - Động vật*. Nhà xuất bản Khoa học - Tự nhiên và Công nghệ, 1992, tr. 189.
4. Vũ Đặng Hạ Quyên, Đặng Thúy Bình, Trương Thị Oanh và Thái Thị Lan Phương (2014). DNA barcoding một số loài cá nước ngọt ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, (1): 123-131.
5. Dương Thúy Yên (2014). So sánh trình tự một số gene mã vạch của cá rô đầu vuông và cá rô đồng tự nhiên (*Anabas testudineus* bloch, 1792). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 30: 29-36.

## CLASSIFICATION OF *Hemibagrus guttatus* IN THAI NGUYEN BY MOLECULAR MARKERS

Nguyen Thi Hai Ha<sup>1</sup>, Bui Van Thang<sup>1</sup>, Tran Viet Vinh<sup>2</sup>, Tran Thao Van<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vietnam National University of Forestry

<sup>2</sup>Thainguyen University of Agriculture and Forestry

### SUMMARY

*Hemibagrus guttatus* is a species of the *Hemibagrus* genus of Barridae. This family has about 20 genera with 227 species. Molecular markers help to identify the *Hemibagrus* correctly. In nature, some species in the *Hemibagrus* genus have similar morphology, leading to confusion in classification. Molecular markers helps to classify the species of *H. guttatus* correctly, adding to the method of classifying the *H. guttatus*. This study used specific primers to duplicate 16S and COI genes. Analysing and comparing sequences of 16S and COI genes from the samples collected in Thai Nguyen, these sequence are published on the International Genebank (NCBI), showed that the *H. guttatus* in Thai Nguyen have distinct characteristics. This sequences of 16S and COI genes can be used as DNA barcodes in the classification of *H. guttatus*. This resul helps the officials to have a good directions in the conservation, breeding and genetic development of this precious fish.

**Keywords:** DNA barcode, *Hemibagrus*, molecular markers.

Ngày nhận bài : 16/4/2019

Ngày phản biện : 11/7/2019

Ngày quyết định đăng : 25/7/2019