

ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁC DÒNG CÁ RÔ ĐỒNG (*Anabas testudineus*, Bloch 1972) BẰNG CÁC CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD VÀ ISSR

Phạm Thị Trang Nhung¹ và Dương Thúy Yên²

¹ Lốp Nuôi trồng Thủy sản Tiên tiến K35, Khoa Thủy sản

² Bộ môn Kỹ thuật nuôi thủy sản nước ngọt, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

ABSTRACT

Genetic diversity of freshwater fish species in the wild can be negatively affected by overexploitation and aquaculture activities, while that of cultured populations can be reduced due to evolutionary changes associated in captive conditions. In this study, we evaluated genetic diversity of climbing perch (*Anabas testudineus*), an important species in aquaculture and fisheries, in one cultured (called square-head, in Hau Giang province) and 3 wild populations (sampled in Ca Mau, Hau Giang and Dong Thap provinces) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) techniques. Total 83 specimens were amplified using 7 primers (1 RAPD and 6 ISSR primers). All populations showed moderate levels of genetic diversity, evidenced by the percentage of polymorphism (ranged 78.9% - 85.9%) and heterozygosity (averaged 0.192 - 0.258). Wild fish population in Ca Mau had the highest genetic diversity. Results also revealed that a high portion of total genetic variation existed within populations (92%), while genetic differentiation among populations was low ($G_{st}=0.0648$), indicating a high level of gene flow ($N_m = 7.2$) among populations. Low genetic difference among climbing perch populations could be affected by anthropogenic activities and geographic feature such as river/canal systems of the Mekong delta.

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

Title:

Genetic diversity of climbing perch (*Anabas testudineus*, Bloch 1792) populations based on RAPD and ISSR markers

Từ khóa:

Đa dạng di truyền, cá rô đồng, *Anabas testudineus*, dòng chảy gene, các quần thể cá, RAPD, ISSR

Keywords:

Genetic diversity, climbing perch, *Anabas testudineus*, gene flow, fish populations, RAPD, ISSR

TÓM TẮT

Sự đa dạng di truyền của các quần thể cá nước ngọt tự nhiên có thể bị ảnh hưởng xấu bởi việc khai thác quá mức và các hoạt động trong nuôi trồng thủy sản, trong khi đó các quần thể cá nuôi lại có thể bị giảm sút do các quá trình thay đổi di truyền trong điều kiện nuôi. Nghiên cứu này nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của loài cá rô đồng (*Anabas testudineus*), 1 loài cá rất quan trọng trong nuôi trồng và đánh bắt thủy sản, ở 1 quần thể cá nuôi (được gọi là cá rô đầu vuông ở tỉnh Hậu Giang) và 3 quần thể cá tự nhiên (được thu tại Cà Mau, Đồng Tháp và Hậu Giang) sử dụng các kỹ thuật RAPD (Random amplified polymorphic DNA) và ISSR (Inter-simple sequence repeat). Tổng cộng 83 mẫu đã được khuếch đại với 7 loại mồi (1 mồi RAPD và 6 mồi ISSR). Bốn quần thể cá đều cho thấy mức độ đa dạng di truyền trung bình, thể hiện qua các thông số: tỉ lệ gene đa hình (từ 78,9% - 85,9%) và tỉ lệ dị hợp (trung bình từ 0,192 - 0,258). Quần thể cá tự nhiên ở Cà Mau có sự đa dạng di truyền cao nhất. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy phần lớn trong tổng số biến dị di truyền tồn tại trong cùng 1 quần thể (92%), trong khi đó sự khác biệt di truyền giữa các quần thể lại thấp (giá trị $G_{st} = 0,0648$), chứng tỏ mức độ trao đổi gene cao ($N_m=7,2$) giữa các quần thể. Sự khác biệt di truyền thấp có thể do bị ảnh hưởng bởi các hoạt động của con người và đặc điểm địa lí như hệ thống sông ngòi kênh rạch ở Đồng bằng sông Cửu Long.

1 GIỚI THIỆU

Cá rô đồng là một trong những loài cá nước ngọt được nuôi phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) bởi vì chúng dễ nuôi, có sức chịu đựng cao, chất lượng thịt ngon và có nhu cầu thị trường cao (Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993). Năm 2009, người dân nuôi cá rô ở Hậu Giang phát hiện ra một dòng cá rô đồng mới từ ao nuôi, được gọi là cá rô đầu vuông. Dòng cá này có hình dạng đầu hơi vuông, tăng trưởng nhanh và có kích cỡ lớn hơn cá rô đồng thường. Theo người dân ở Hậu Giang, đàn cá rô đầu vuông được nhân giống ban đầu từ 70 cá thể. Nếu vậy thì sự đa dạng di truyền của cá rô đầu vuông này có thể là rất thấp. Mặc dù, cá rô đồng đóng một vai trò khá quan trọng trong nuôi trồng thủy sản, song có rất ít nghiên cứu tập trung phân tích đa dạng di truyền của các quần thể ở các vùng phân bố tự nhiên của chúng, đặc biệt là ở ĐBSCL.

Ngày nay, nguy cơ bị đe dọa của nhiều loài trong tự nhiên đang có xu hướng tăng bởi sự thay đổi môi trường, cạnh tranh nguồn nước, thức ăn, đánh bắt tự do không kiểm soát,... (Sverdrup-Jensen, 2002). Vì vậy, quần thể các loài cá đang có xu hướng giảm về số lượng ngày càng nhanh, cá rô đồng cũng không ngoại lệ. Sự giảm về số lượng thường gắn với sự suy giảm về đa dạng di truyền, một yếu tố di truyền đóng vai trò rất quan trọng đối với khả năng thích ứng trước sự thay đổi liên tục của môi trường và khả năng phát triển bền vững của loài hoặc quần thể. Việc bảo tồn sự đa dạng di truyền cũng cần thiết cho sự phát triển của quần thể hiện tại cũng như trong tương lai.

Gần đây, để đảm bảo cho việc bảo tồn nguồn gene và nhân giống của các loài ngày càng hiệu quả, nhiều phương pháp và chỉ thị DNA đã được sử dụng để nghiên cứu về sự đa dạng di truyền của các loài khác nhau (Mondini *et al.*, 2009). Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được phát triển và được áp dụng rộng rãi vì sự đơn giản và tỉ lệ thành công cao (Bardakci, 2001). So với các kỹ thuật khác, RAPD và ISSR đã thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học. Có lẽ bởi những kỹ thuật này rất đơn giản, có thể tạo ra những vạch đa hình với tính lặp lại cao, chỉ cần một lượng nhỏ DNA mà không cần biết trước trình tự DNA, mà lại hiệu quả kinh tế. Kỹ thuật RAPD và ISSR cũng được ứng dụng thành công trong việc phân tích đa dạng di truyền của một số loài thủy sinh (Chen and Leibenguth, 1995; Nie *et al.* 2012; Saad *et al.* 2012).

Nghiên cứu này nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của các dòng cá rô đồng bằng các chỉ thị phân tử RAPD và ISSR, cung cấp thông tin hữu ích và cần thiết cho chương trình nhân giống và bảo tồn nguồn gene cá rô.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu mẫu

Cá rô đầu vuông được thu ở Hậu Giang. Cá rô đồng tự nhiên được thu ở Cà Mau (huyện U Minh), Hậu Giang (Châu Thành A) và Đồng Tháp (Vườn quốc gia Tràm Chim). Mỗi quần thể được thu 30 mẫu (tổng cộng 120 mẫu). Tuy nhiên, chỉ có 83 mẫu (gồm 20 mẫu ở Cà Mau, 19 mẫu Đồng Tháp, 20 mẫu Hậu Giang và 24 mẫu cá đầu vuông) ly trích DNA và khuếch đại (PCR) thành công.

2.2 Ly trích DNA

DNA được ly trích từ vây cá sử dụng phương pháp phenol-chloroform (Taggart *et al.* 1992) đã có hiệu chỉnh. Vây cá lưu trữ trong 95% ethanol được cắt, nghiền nhỏ bằng 750 μ L dung dịch ly trích (HCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0,5M, 0,5% SDS, Ure 4M), 200 μ L dung dịch CTAB (Tris HCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0,5M, 2% CTAB) và 50 μ L proteinase K (Merk, Germany) (20 μ g/mL), sau đó ủ qua đêm ở 55°C. Protein và các chất lỏng khác được kết tủa và phân lập với DNA bằng hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) và chloroform: isoamyl alcohol (24:1) và ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 25°C. DNA từ phần dung dịch nổi phía trên được kết tủa bởi 600 μ L isopropanol lạnh và ly tâm lạnh 13000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Sau đó rửa lại DNA kết tủa bằng ethanol 70% rồi phơi khô ở nhiệt độ phòng ít nhất 1 giờ. Cuối cùng, pha loãng DNA trong 80 μ L dung dịch TE và lưu trữ ở -20°C cho tới khi sử dụng.

2.3 Điện di

Sử dụng phương pháp điện di trên gel agarose để kiểm tra chất lượng DNA đã ly trích và sản phẩm PCR. Sau khi ly trích DNA, dùng gel agarose 1% để kiểm tra sự hiện diện và độ tinh sạch của DNA. Nấu hỗn hợp 0,4 g agarose hoà tan trong 40 mL dung dịch TBE 1X rồi đổ vào khay 7 x 10 cm. DNA được bơm vào từng giếng trong gel và chạy ở 60 V trong 35 phút. Sau đó nhuộm gel bằng ethidium bromide (0,5 μ g/mL) ít nhất 15 phút trước khi đưa lên bàn đọc gel. Những mẫu DNA có chất lượng tốt sẽ cho những vạch sáng rõ. Những mẫu đó sẽ được chọn cho phản ứng PCR sau đó.

Tương tự, phương pháp điện di cũng được dùng để ước tính kích cỡ của sản phẩm PCR dựa theo thang chuẩn 100-bp (Fermentas). Tuy nhiên trong trường hợp này, sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,2% ở 50V trong 80 phút.

2.4 Khuyếch đại PCR

Trước tiên, tất cả các mẫu được sàng lọc với 1 hoặc 2 mẫu cá bất kì của mỗi dòng để đánh giá

hiệu quả sử dụng của các mẫu. Trong mỗi phản ứng PCR, đối chứng âm (không có DNA) được triển khai để kiểm tra sự nhiễm, một hoặc hai mẫu cũng được lặp lại để kiểm tra sự ổn định của mẫu.

Sau khi sàng lọc, 7 trong tổng số 20 mẫu RAPD và ISSR cho vạch rõ và đa hình được chọn dùng trong phân tích đa dạng di truyền của 83 mẫu cá rô đồng (Bảng 1).

Bảng 1: Các loại mẫu của RAPD và ISSR cùng với trình tự, GC content, nhiệt độ tan chảy dùng trong phân tích đa dạng di truyền cá rô đồng

Mẫu	Hãng sản xuất	Trình tự	Số lượng Nucleotide	Nhiệt độ tan chảy	Trích dẫn
OPA09	Sigma	GGGTAACGCC	10	34	UCSB, 2010
IG 05	Sigma	GACAGACAGACAGACA	16	48,2	Rout <i>et al.</i> 2009
ISSR811	Sigma	GAGAGAGAGAGAGAGAC	17	52,4	Raghuwanshi <i>et al.</i> 2013
ISSR16	Sigma	CACCACCACGC	11	34,2	Sharma <i>et al.</i> 2011
UBC 8932800	Sigma	AGCAGCAGCAGCGT	14	46,7	Raghuwanshi <i>et al.</i> 2013
Chiu-SSR2	Sigma	GGACGGACGGACC	13	48	Pazza <i>et al.</i> 2007
Micro 11	Sigma	GGACGGACGGACGGAC	16	58,4	Fernandes-Matioli <i>et al.</i> 2000

Sau khi chuẩn hóa các điều kiện trong phản ứng PCR, hỗn hợp 10 µL được dùng cho mỗi phản ứng khuyếch đại của cả RAPD và ISSR với các thành

phần được mô tả như trong Bảng 2. Thành phần trong hỗn hợp phản ứng của RAPD và ISSR tương tự như nhau.

Bảng 2: Các thành phần PCR

Giai đoạn	ISSR			RAPD		
	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kì	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kì
Biến tính đầu tiên	95°C	5 phút	1	95°C	5 phút	1
Biến tính	95°C	30 giây		94°C	1 phút	
Gắn mẫu	46°C	40 giây	40	40°C	1 phút 10 giây	35
Nối dài	72°C	60 giây		72°C	1 phút 30 giây	
Nối dài cuối cùng	72°C	5 phút	1	72°C	10 phút	1

Chu kì phản ứng PCR được mô tả trong Bảng 3. Phản ứng PCR của RAPD và ISSR khác nhau về nhiệt độ gắn mẫu, thời gian, và chu kì lặp lại. Sau khi kết thúc phản ứng PCR, sản phẩm được đem đi điện di trên gel agarose 1,2% sau đó đọc kết quả trên bàn đọc gel.

Bảng 3: Chu kì nhiệt trong phản ứng PCR của RAPD và ISSR

Thành phần	ISSR/RAPD
Dung dịch đệm (100mM Tris, 500 mM KCl; 0.1% gelatin; pH 9,0)	1,5 mM
dNTP (Fermentas)	0,2 mM
MgCl ₂ (Fermentas)	1,5 mM
Mẫu	8 pmoles
Tap polymerase (Fermentas)	2 U
DNA (ước tính)	300 ng

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Cả hai kỹ thuật phân tử RAPD và ISSR đều có tính chất giống nhau là những chỉ thị trội, do đó số liệu di truyền của hai chỉ thị này được phân tích chung bằng chương trình GenAIEx 6,5 (Peakall and Smous, 2012) và Popgene 1,3 (Yeh *et al.*, 1999). GenAIEx 6,5 được sử dụng để ước tính phần trăm của sự đa hình, số lượng alleles quan sát và mong đợi, và tỉ lệ dị hợp cho mỗi quần thể. Khoảng cách di truyền (Genetic distance) và mức độ giống nhau về di truyền (Genetic identity) (Nei, 1972) giữa các quần thể cá được đánh giá dựa vào chương trình Popgene 1,3. Chương trình này cũng được dùng để vẽ cây di truyền theo phương pháp UPGMA.

3 KẾT QUẢ

3.1 Về đa dạng di truyền của các dòng cá rô đồng

Trên tổng số 83 mẫu cá của 4 dòng cá rô, 7 môi (1 môi của RAPD và 6 môi của ISSR) đã tạo ra được 71 alleles có kích thước khoảng 250-1700 bp. Số vạch trên mỗi môi dao động từ 5-12. Tỷ lệ gene

đa hình và tỷ lệ dị hợp tương ứng tăng từ 78,87% và 0,192 tới 85,92% và 0,258 (Bảng 4). trong số 4 dòng cá rô đồng thì dòng cá Cà Mau thể hiện sự đa dạng di truyền cao nhất, thể hiện qua các thông số khác như tỷ lệ dị hợp, tổng số vạch chung và riêng, số alleles quan sát và mong đợi. Ngược lại dòng Đồng Tháp có tỷ lệ dị hợp và chỉ số Shannon thấp hơn các dòng khác.

Bảng 4: Các thông số đa dạng di truyền (Mean ± SE) của 4 dòng cá rô đồng qua 7 môi (1 RAPD + 6 ISSR)

Dòng cá	Số mẫu	Số vạch riêng	Tỷ lệ gene đa hình (% P)	Số alleles quan sát được (na)*	Số alleles mong đợi (ne)*	Tỷ lệ dị hợp (He)*	Chỉ số Shannon
Cà Mau	20	2	85,92	1,746 (0,077)	1,426 (0,041)	0,265 (0,021)	0,397 (0,028)
Đồng Tháp	19	2	80,28	1,634 (0,090)	1,308 (0,040)	0,198 (0,021)	0,305 (0,029)
Hậu Giang	20	2	80,28	1,577 (0,098)	1,374 (0,042)	0,235 (0,022)	0,352 (0,030)
Đầu vuông	24	0	78,87	1,620 (0,103)	1,348 (0,041)	0,218 (0,022)	0,331 (0,030)
Tổng cộng	83		81,31 (1,56)	1,651 (0,044)	1,364 (0,020)	0,223 (0,011)	0,347 (0,015)

3.2 Về sự khác biệt di truyền giữa các dòng cá rô đồng

Các thông số Nei về mức độ giống nhau và khoảng cách di truyền giữa các dòng cá tương ứng trong khoảng từ 0,964 – 0,984 và 0,019 – 0,036 (Bảng 5). Trong đó, dòng Đồng Tháp có sự khác biệt di truyền lớn nhất so với các dòng còn lại. Ngược lại, dòng cá Cà Mau có sự khác biệt di truyền thấp nhất. Phân tích sự biến động di truyền

cấp phân tử (Bảng 6) cho thấy rằng biến động di truyền khá thấp giữa các dòng, đóng góp 8% trong tổng số biến động di truyền, còn lại 92% là biến động di truyền trong cùng một dòng. Sự khác biệt di truyền cũng được thể hiện rõ trong cây di truyền theo phương pháp UPMA (Hình 1), trong đó, dòng cá Đồng Tháp tách ra một nhánh khác biệt với các dòng khác. Tuy nhiên, khoảng cách di truyền giữa các nhóm nhỏ.

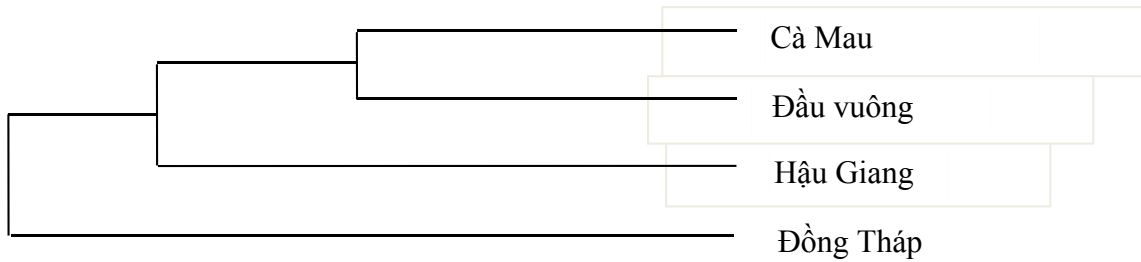
Bảng 5: Mức độ tương đồng di truyền (dưới đường chéo) và khoảng cách di truyền (trên đường chéo) giữa các dòng cá rô dựa trên chỉ thị RAPD và ISSR

	Cà Mau	Đồng Tháp	Hậu Giang	Đầu vuông
Cà Mau	***	0,029	0,019	0,016
Đồng Tháp	0,971	***	0,028	0,036
Hậu Giang	0,981	0,973	***	0,030
Đầu Vuông	0,984	0,964	0,970	***

Bảng 6: Phân tích nguồn biến động di truyền (AMOVA) của 4 dòng cá rô

Nguồn	Df	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Biến động ước tính	Phần trăm
Giữa các dòng	3	109	36,5	1,13	8%
Trong cùng dòng	79	1042	13,2	13,20	92%
Tổng cộng	82	1151		14,33	100%

Ghi chú: df: độ tự do



Hình 1: Cây di truyền UPGMA dựa theo khoảng cách di truyền Nei (1978) giữa các dòng cá rô

3.3 Thảo luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy bốn dòng cá rô đồng của Việt Nam có sự đa dạng di truyền tương đối cao (thể hiện qua tỉ lệ gene đa hình tăng từ 78,87% tới 85,92%, và tỉ lệ dị hợp tăng từ 0,192 tới 0,258) so với các nghiên cứu khác sử dụng cùng loại chỉ thị phân tử (RAPD và ISSR). Ví dụ, Yoon và Kim (2001) cho thấy rằng tỉ lệ gene đa hình từ 5 mỗi của RAPD bao gồm cả OPA 09 (như đã sử dụng trong nghiên cứu) trên cá da trơn Hàn Quốc (*Silurus asotus*) dao động từ 56,4 % tới 59,6 %. Trong một nghiên cứu khác, Casu *et al.* 2009 sử dụng ISSR để phân biệt Mediterranean *Diplodus spp.* and *Dentex dentex* (Sparidae), ông ghi nhận rằng phần trăm đa hình khoảng từ 27,8 – 40,2 %, và tỉ lệ dị hợp từ 0,082 – 0,127.

Việc khai thác cá quá mức và các hoạt động nuôi trồng thủy sản khác như sản xuất giống nhân tạo và nuôi thương phẩm có thể là nguyên nhân dẫn đến sự suy giảm đa dạng di truyền của các quần thể tự nhiên (Frost *et al.*, 2006; Ford and Myers, 2008). Ở Cà Mau, trước năm 2012, nuôi cá rô hầu như chưa có, trong khi các tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp, phong trào nuôi cá đã có từ lâu và phát triển mạnh trên phạm vi rộng. Ford and Myers (2008) nghiên cứu trên cá hồi và tìm thấy rằng những hoạt động nuôi trồng thủy sản có thể làm giảm sự đa dạng di truyền của dòng cá tự nhiên, do cá nuôi thất thoát ra môi trường ngoài và lai tạo với cá tự nhiên. Điều này có thể là nguyên nhân của đa dạng di truyền ở các tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp thấp hơn so với Cà Mau. Một kết quả tương tự được tìm thấy trong một nghiên cứu khác với tôm càng xanh, trong đó, dòng tôm Cà Mau có mức đa dạng di truyền cao nhất so với các tỉnh khác là Cần Thơ và Long An (Duong Thuy Yen *et al.* 2013).

Mức độ đa dạng di truyền tương tự nhau giữa các dòng cá đầu vương và dòng cá tự nhiên Hậu Giang cho thấy chưa thể khẳng định dòng cá nuôi trải qua sự mất gen nghiêm trọng. Tuy nhiên, các nghiên cứu khác đã tìm thấy rằng dòng cá nuôi có sự đa dạng di truyền thấp hơn dòng cá tự nhiên.

Hidayat and Senanan (2010) đã ghi nhận lại rằng dòng cá rô đồng tự nhiên ở Thái Lan có sự biến động di truyền gene mtDNA cao hơn dòng cá nuôi (đa dạng kiểu haplotype tương ứng = 0,52 và 0,10). Tương tự, cá chêm (*Lates calcarifer*) trong điều kiện nuôi có sự đa dạng di truyền thấp hơn dòng cá tự nhiên qua sử dụng phương pháp RAPD (Rajasekar *et al.*, 2012).

Sự trao đổi gen cao gây ra sự đa dạng di truyền thấp giữa các dòng cá rô có thể là do tác động của con người hoặc đặc điểm địa lí như hệ thống sông ngòi kênh rạch. Hoạt động mua bán cá cho nuôi trồng thủy sản và tiêu thụ của con người diễn ra rất nhộn nhịp và trên diện rộng ở ĐBSCL. Đặc biệt, không chỉ cá rô mà còn nhiều loại cá đồng khác ở Cà Mau thường xuyên được đem đi bán cho các nơi khác trong vùng. Những hoạt động đó có thể làm tăng trao đổi gene giữa các dòng cá rô. Như Hasselman *et al.*, 2013 đã khẳng định sự trao đổi gene do con người gây ra phổ biến ở nhiều loài. Hơn nữa, hệ thống sông ngòi dày đặc của ĐBSCL cùng với tập tính di trú của cá rô có thể làm tăng sự trao đổi gen giữa các vùng, đặc biệt là vào mùa mưa (tháng 8-11). Vị trí địa lí cũng một phần nào đó cho thấy rằng dòng cá Đồng Tháp có sự khác biệt di truyền lớn hơn các dòng khác. Tỉnh Đồng Tháp nằm trên nhánh sông Tiền của hệ thống sông Mekong trong khi hai tỉnh Cà Mau và Hậu Giang nằm dưới nhánh sông Hậu của hệ thống sông Mekong. Sekino and Hara's (2000) dựa vào allozyme data chứng minh rằng dòng cá rô ở Thái Lan bị ảnh hưởng bởi đặc điểm địa hình, chủ yếu là hệ thống sông ngòi. Cũng bằng cách phân tích allozyme, Maltagliati (1998) đã chứng minh sự tương quan giữa khoảng cách di truyền và khoảng cách địa lí đối với loài *Aphanius fasciatus* sống ở vùng nước lợ nước Ý, và cho rằng chính khoảng cách địa lý tạo nên cấu trúc của loài cá này.

Sự khác biệt di truyền giữa các dòng cá rô trong nghiên cứu này thấp hơn rất nhiều so với các nghiên cứu khác cũng làm với cá rô đồng nhưng sử dụng các chỉ thị khác. Nghiên cứu trình tự gene

vùng D-loop của mtDNA trên cá rô đồng ở Malaysia, Jamsari *et al.* (2010) tìm thấy sự biến động di truyền thấp trong cùng 1 dòng (15,28%) trong khi biến động di truyền giữa các dòng lại lớn (84,78%). Tương tự, sự biến động di truyền giữa các dòng cá rô ở Thái Lan cũng được chứng minh là khá cao dựa trên phương pháp PCR-RFLP trong ti thể (Hidayat and Senanan, 2010). Ngược lại với những nghiên cứu đó, nghiên cứu này cho thấy sự biến động di truyền rất thấp giữa các dòng cá rô có thể 1 phần do chỉ thị đã sử dụng (RAPD và ISSR).

Chỉ thị ISSR rất phổ biến trong phân tích đa dạng di truyền ở thực vật (Reddy *et al.* 2002; Sica *et al.* 2005; Li and Ge, 2001) hơn là ở cá. Gần đây, chỉ thị này được áp dụng trên nhiều sinh vật khác như động vật biển không xương sống và cá (Casu *et al.*, 2009). Cũng gần đây, Miguel *et al.*, 2007 đã chứng minh ISSR rất hữu ích cho phân tích đa dạng di truyền và định rõ bố mẹ và các mối quan hệ của trai nước mặn *Mytilus* dựa vào việc tìm ra rất nhiều vạch đa hình cung cấp thông tin về loci cùng lúc. Với kết quả cho sự biến động di truyền khá cao trong cùng 1 dòng của nghiên cứu này cho thấy ISSR có thể ứng dụng để đánh giá sự đa dạng di truyền của cá rô đồng cũng như các loài cá khác.

Cùng với các chỉ thị phân tử khác, RAPD và ISSR là những công cụ rất hữu ích cho nhiều ứng dụng trong nuôi trồng và đánh bắt thủy sản, như nhận dạng cá thể và phá hệ, chuẩn đoán bệnh, và cải thiện các tính trạng trong chương trình nhân giống (Yoon and Kim, 2001; Holsinger *et al.*, 2002). RAPD và ISSR là những kỹ thuật đơn giản, không cần phải biết trước trình tự đoạn gene trước đó (Bardakci, 2001; Godwin *et al.*, 1997; Kol and Lazebny, 2006). RAPD và ISSR có thể thể hiện sự đa hình mà không cần quy trình phức tạp (Nagaoka and Ogihara, 1997; Esselman *et al.*, 1999). Hơn nữa, 2 kỹ thuật này rất hữu ích khi thời gian và tài chính bị hạn chế (Abbot, 2001). Tuy nhiên, do là chỉ thị trội nên 2 chỉ thị phân tử này không thể phân biệt được cá thể đồng hợp hay dị hợp (Kosman and Leonard, 2005), do đó, hai chỉ thị này ít thông tin hơn các chỉ thị đồng trội khác như RFLP (Genet 1983).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Với hai chỉ thị phân tử RAPD và ISSR, cả bốn quần thể cá rô đồng tại ĐBSCL của Việt Nam đều cho thấy mức độ đa dạng di truyền tương đối cao, trong đó, quần thể cá rô Cà Mau thể hiện sự đa

dạng di truyền cao nhất. Đây có thể là nguồn vật liệu tốt cho các chương trình chọn giống.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chỉ thị phân tử RAPD và ISSR có thể sử dụng trong phân tích đa dạng di truyền. Hơn nữa, hai chỉ thị này rất đơn giản và ít tốn kém nên khả năng ứng dụng trong thực tế cao.

4.2 Đề xuất

Kết hợp nhiều chỉ thị phân tử trong đánh giá sự đa dạng di truyền và cung cấp thêm thông tin về các thông số di truyền quan trọng như kích cỡ quần thể hiệu quả, hệ số cận huyết,... của các dòng cá rô đồng, đặc biệt là dòng cá rô đầu vuông. Bên cạnh đó, quần thể cá nuôi cần được nuôi cách ly với quần thể cá tự nhiên để hạn chế sự trao đổi gene giữa quần thể nuôi và tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abbot P., Withgott, J. H., and Moran, N. A. 2001. Genetic conflict and conditional altruism in social aphid colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 98 (21).
2. Bardakci, F. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. *Turkish Journal of Biology*, 25, 185-196.
3. Casu, M., Lai, T., Curini-Galletti, M., Ruiui, A., and Pais, A. 2009. Identification of Mediterranean *Diplodus spp.* and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 368 (2009) 147–152.
4. Chen, H. and Leibenguth, F. 1995. Studies on Multilocus Fingerprints, RAPD marker, and Mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). *Biochemical genetics*, Volume 33, number 9, 10.
5. Duong Thuy Yen, Pham Thanh Liem, Huynh Ky and Tran Ngoc Hai. 2013. Strain evaluation of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) based on morphology and genetic diversity. The proceedings of the International Fisheries Symposium, organized at Can Tho University, Vietnam, 6-8th December, 2012, 239-244. Agricultural Publishing House.
6. Esselman, E. J., Jianqiang, L., Crawford, D. J., Winduss, J. L., and Wolfe, A. D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis*

- porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*. 8: 443-451.
7. Fernandes-Matioli F.M.C, Matioli, S.R., and Almeida-Toledo L.F. 2000. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* through analysis of nuclear (GGAC)_n microsatellites. *Genet Mol Biol* 23:803-807.
 8. Ford, J.S. and Myers, R.A. 2008. Global assessment of aquaculture impacts on wild salmon. *PLoS Biology* 6(2): e33.
 9. Frost, L. A., Evans, B. S., and Jerry, D. R. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 261 (3). pp. 1056-1064.
 10. Genet, A. J. H. 1983. Utility and efficiency of linked marker genes for genetic counseling. III. Proportion of informative families under linkage disequilibrium. *Journal list. Volumn* 35(4): 592-610.
 11. Godwin, I.D., Aitken, E.A., Smith L.W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *National Center for Biotechnology Information. Electrophoresis*, 18 (9): 1524-8
 12. Hasselman, D.J., Ricard, D., Bentzen, P. 2013. Genetic diversity and differentiation in a wide ranging anadromous fish, American shad (*Alosa sapidissima*), is correlated with latitude. *Molecular Ecology*. 2013 Blackwell Publishing Ltd.
 13. Hidayat, S. and Senanan, W. 2010. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA to differentiate populations of climbing perch (*Anabas testudineus*) in Thailand. *Burapha journal of science*. 15 (2553) 2 : 87-98.
 14. Holsinger K. E., Lewis, P.O., Dipak, D. 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* 11: 1157-1164.
 15. Hutchings J.A 2000. Collapse and recovery of marine fishes. *Nature*. 406, 882-885. doi:10.1038/35022565.
 16. Jamsari, A.F.J., Muchlisin, Z.A., Musri, M., and Siti Azizah, M.N. 2010. Remarkably low genetic variation but high population differentiation in the climbing perch, *Anabas testudineus* (Anabantidae), based on the mtDNA control region. *Genetics and Molecular Research* 9 (3): 1836-1843.
 17. Kol, N. V. and Lazebny, O. E. 2006. Polymorphism of ISSR-PCR markers in a Tuvinian population of reindeer *Rangifer tarandus* L. *Russian Journal of Genetics* 42:1464-1466.
 18. Kosman, E. and Leonard, K.J. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology* 14, 415-424.
 19. Li, A. and Ge, S. 2001. Genetic Variation and Clonal Diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) Detected by ISSR Markers. *Annals of Botany* 87: 585-590.
 20. Maltagliati, F. 1998. A preliminary investigation of allozyme genetic variation and population geographical structure in *Aphanius fasciatus* from Italian brackish water habitats. *Journal of fish biology* 52, 1130-1140.
 21. Miguel *et al.* 2007. Genetic divergence detected by ISSR Markers and characterizations of microsatellite regions in *Mytilus* mussels. *Biochemical genetic*, 45: 565-578. Doi: 10.1007/s10528-007-9097-7.
 22. Mondini, L., Noorani, A., and Pagnotta, M.A. 2009. Accessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 2009, 1, 19-35; doi:10.3390/d1010019
 23. Nagaoka, T. and Ogihara, Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Volume 94, Issue 5, pp 597-602.
 24. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American naturalist* 106, 283-292.
 25. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583- 590.
 26. Nie, C., Wu, X., Li, Y. and Zhao, Z. 2012. ISSR markers as a tool for assessing genetic diversity in the Chinese *Alligator (Alligator sinensis)*. *Asian Herpetological Research* 3(4): 310-315.

27. Pazza, R., Kavolco, K.F., Prioli Sonia, M.A.P., Prioli A.J, and Bertollo, L.A.C., 2007. Chromosom polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical systematic and ecology* Vol. 35, pp 843-851.
28. Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
29. Raghuvanshi, K.S., Huraje, B.A., Chimote, V.P., and Borkar, S.G. 2013. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Punicae* isolates from Western Maharashtra and their sensitivity to chemical treatments. *The Bioscan* 8(3): 845-850.
30. Rajasekar, M., Thangaraj, M., Barathkumar, T.R., Subburaj, J., and Muthazhagan, K. 2012. Genetic diversity analysis of *Lates calcarifer* (Bloch 1790) in captive and wild populations using RAPD markers. *Notulae Scientia Biologicae* 4 (3): 33-37.
31. Reddy, M. P., Sarla, N., and Siddiq, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
32. Rout, G.R., Senapati, S.K., Aparajita, S., Palai, S.K., 2009. Studies on genetic identification and genetic fidelity of cultivated babana using ISSR markers. *Plant Omics Journal* 2(6): 250-258. Saad, Y.M., Rashed, M.A., Atta, A.H., and Ahmed, N.E. 2012. Genetic Diversity among some tilapia species based on ISSR markers. *Life Science Journal* 9(4) : 4841-4846.
33. Sharma, S.K., Kumaria, S., Tandon, P., Rao, S.R. 2011. Single primer amplification reaction (SPAR) reveals inter- and intra-specific natural genetic variation in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Gene* 483: 54-62.
34. Sekino, M. and Hara, M. 2000. Genetic characteristics and relationships of climbing perch *Anabas testudineus* populations in Thailand. *Fisheries Science* 66: 840-845.
35. Sica, M., Gamba, G., Montieri, S., Gaudio, L., and Aceto, S. 2005. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *Biomed Central Genetics*. Volume 6:17.
36. Sverdrup-Jensen, S. 2002. Fisheries in the Lower Mekong Basin: Status and Perspectives. MRC Technical Paper, No. 6. Mekong River Commission, Phnom Penh. 103 pp. ISSN: 1683-1489
37. Taggart JB, Hynes RA, Prodohl PA, Ferguson A. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J Fish Biol.* 1992; 40:963–965.
38. Truong Thu Khoa and Tran Thi Thu Huong 1993. The freshwater fish species in the Mekong Delta. Faculty of Fisheries. Can Tho University.
39. UCSB (2010). RAPD PCR Primers. <http://www.lifesci.ucsb.edu/~genome/OldPage/database4.txt>
40. Yeh, F.C., Yang, R., and Boyle, T. 1999. POPGENE. Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.
41. Yoon, J.M. and Kim, G.W. 2001. Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction analysis of two different populations of cultured Korean catfish *Silurus asotus*. *Journal of Biosciences* 26, 641-647.