



DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.144

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁ HƯỜNG (*Helostoma temminckii*) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Dương Thủy Yên^{1*}, Nguyễn Phương Thảo², Tiêu Văn Út³ và Trần Đắc Định¹

¹Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Lớp Cao học Nuôi trồng Thủy sản khóa 22, Trường Đại học Cần Thơ

³Khu Bảo tồn đất ngập nước Láng Sen – Long An

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Dương Thủy Yên (email: thuyyen@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2018

Ngày nhận bài sửa: 29/05/2018

Ngày duyệt đăng: 29/10/2018

Title:

Genetic diversity of kissing gourami (*Helostoma temminckii*) in the Mekong Delta

Từ khóa:

Cá hường, đa dạng di truyền, gene mã vạch, *Helostoma temminckii*, ISSR

Keywords:

DNA barcoding, genetic diversity, *Helostoma temminckii*, ISSR, kissing gourami

ABSTRACT

Levels of genetic diversity were quantified for kissing gourami collected from several locations in the Mekong Delta using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. Fish were sampled from natural water bodies in the Lang Sen Wetland Reserve (Long An) and from cultured ponds in three provinces including Can Tho, Hau Giang, and Tra Vinh. First, random samples (one or two from each population) were analyzed DNA barcoding (gene COI) and compared their sequences to Genbank database to confirm species identification. Then, genetic diversity levels of four populations were quantified based on six ISSR primers (20-21 samples per population). Results of the DNA barcoding analysis indicated a high level of identity (99.2%) between COI sequences of kissing gourami in this study with sequences of the same species (*Helostoma temminckii*) reported to Genbank. Amplifications of ISSR primers on 82 individuals generated 86 fragments with the size ranges from 400 bp to 3,000 bp, polymorphic ratios 55.42-90.36%, expected heterozygosity 0.180-0.245, and Shannon index 0.269-0.386. In general, genetic diversity was relatively high in all kissing gourami populations. In which, parameters of genetic diversity were found highest in Hau Giang population and lowest in Lang Sen population. Therefore, the Lang Sen wild population needs to be conserved and applied appropriate supplementary programs.

TÓM TẮT

Mức độ đa dạng di truyền của các đàn cá hường ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long được đánh giá dựa vào chỉ thị inter-simple sequence repeats (ISSR). Cá được thu từ thủy vực tự nhiên ở khu bảo tồn Láng Sen (Long An) và từ các ao nuôi thuộc ba tỉnh: Cần Thơ, Hậu Giang và Trà Vinh. Trước hết, mẫu và nghiên cứu (một hoặc hai mẫu được lấy ngẫu nhiên từ mỗi đàn) được kiểm tra định danh loài bằng phương pháp phân tích trình tự gene DNA mã vạch (gene COI) và so sánh với ngân hàng gene (Genbank). Sau đó, mức độ đa dạng di truyền của bốn đàn cá được phân tích (20-21 mẫu/đàn) với sáu chỉ thị ISSR. Kết quả phân tích trình tự gene COI cho thấy cá hường trong nghiên cứu có mức độ tương đồng cao 99,2% so với các mẫu cùng loài (*Helostoma temminckii*) được công bố ở Genbank. Kết quả khuếch đại ISSR trên tổng số 82 cá thể đã tạo ra 86 vạch có kích thước dao động từ 400 bp đến 3.000 bp, tỉ lệ gene đa hình dao động 55,42-90,36%, tỉ lệ dị hợp mong đợi 0,180-0,245 và chỉ số Shannon 0,269-0,386. Nhìn chung, cá hường có mức độ đa dạng di truyền tương đối cao. Trong đó, các thông số đa dạng di truyền cao nhất ở đàn cá Hậu Giang và thấp nhất ở đàn cá tự nhiên Láng Sen. Do đó, đàn cá Láng Sen cần được bảo tồn và áp dụng chương trình bổ sung quần đàn hợp lý.

Trích dẫn: Dương Thủy Yên, Nguyễn Phương Thảo, Tiêu Văn Út và Trần Đắc Định, 2018. Đa dạng di truyền của cá hường (*Helostoma temminckii*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(7B): 86-93.

1 GIỚI THIỆU

Đa dạng di truyền có vai trò quan trọng đối với quần thể nuôi và tự nhiên, thể hiện khả năng thích nghi của quần thể với sự thay đổi của môi trường (Allendorf and Luikart, 2007). Trong điều kiện nuôi, nguồn cá bố mẹ có đa dạng di truyền thấp có thể dẫn đến chất lượng con giống thấp, biểu hiện tỉ lệ chết cao, miễn cảm với mầm bệnh, tăng trưởng chậm,... (Tave, 1993). Trong tự nhiên, quần thể có đa dạng di truyền thấp sẽ có nguy cơ cao giảm số lượng cá thể và có thể dẫn đến diệt chủng trong điều kiện môi trường khắc nghiệt (Frankham, 2005). Vì vậy, thông tin về mức độ đa dạng di truyền của quần thể giúp cho người quản lý có những biện pháp thích hợp trong chọn giống đối với quần thể nuôi cũng như trong bảo tồn đối với quần thể tự nhiên.

Cá hường (*Helostoma temminckii*) là một trong những đối tượng nuôi nước ngọt phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Tuy nhiên, những thông tin về nguồn gốc và mức độ đa dạng di truyền của loài chưa được nghiên cứu. Trên thế giới, theo Rainboth (1996), cá hường phân bố ở châu Á, từ Thái Lan đến Indonesia và chúng được tìm thấy ở các vùng nước chảy chậm hoặc nước đứng ở các con kênh, vùng ngập nước, ao, hồ,.... Song, ở ĐBSCL nói riêng và ở Việt Nam nói chung, nguồn gốc cá hường chưa được báo cáo rõ ràng. Cá được cho là loài di nhập, nhưng không có tài liệu nào đề cập vấn đề này. Ở ĐBSCL, chúng thường được nuôi ghép trong ao với một số loài khác. Cá cũng tìm thấy ở khu bảo tồn đất ngập nước Láng Sen (Long An), chúng sống thành bầy đàn và một số cá thể có kích thước lớn hơn 500 g, trong khi cá ở các ao nuôi thường có khối lượng nhỏ hơn 200g (Nguyễn Phương Thảo và Dương Thúy Yên, 2017).

Hiện nay, chỉ thị DNA được dùng phổ biến trong nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống, loài thủy sản như ISSR (Inter simple sequence repeats) (Casu *et al.*, 2008; Maltagliati *et al.*, 2006), RAPD (random amplified polymorphic DNA), microsatellite, SNP (single nucleotide polymorphism),... (Liu and Cordes, 2004). Trong đó, chỉ thị ISSR có ưu điểm nổi bật là yêu cầu kỹ thuật đơn giản, dễ ứng dụng nhưng cũng có nhược điểm là chỉ thị trội nên không phân biệt được cá thể dị hợp và đồng hợp tử trội. Một vài nghiên cứu cho thấy, ISSR có thể cho số lượng các đoạn gene đa hình trên mỗi loại môi (primer) nhiều hơn RAPD (Esselman *et al.*, 1999).

Trong nghiên cứu này, chỉ thị ISSR được ứng dụng để đánh giá sự đa dạng di truyền của cá hường sống trong môi trường tự nhiên và trong ao

nuôi ở các địa phương vùng ĐBSCL, nhằm cung cấp thông tin cho các chương trình chọn giống và bảo vệ nguồn lợi cá hường. Đồng thời, việc định danh chính xác loài cá nghiên cứu cũng được kiểm chứng bằng phương pháp phân tích gene DNA mã vạch.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu mẫu cá

Cá hường được thu từ một quần thể cá tự nhiên ở Khu bảo tồn đất ngập nước Láng Sen (tỉnh Long An) và ba quần thể nuôi trong ao ở các tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang và Trà Vinh. Mẫu cá được giữ sống hoặc giữ lạnh và được chuyển về phòng thí nghiệm di truyền Khoa Thủy Sản. Trước hết, mẫu cá được định danh bằng phương pháp hình thái (Nguyễn Phương Thảo và Dương Thúy Yên, 2017). Sau đó, mỗi quần thể được lấy ngẫu nhiên 20-21 cá thể cho phân tích ISSR, bằng cách cắt một mẫu nhỏ khoảng 0,1 – 0,2 g vi đuôi (hoặc cơ) và giữ mẫu trong tuýp 1,5 mL chứa ethanol 95% đến khi phân tích.

2.2 Phương pháp phân tích gene mã vạch và chỉ thị ISSR

2.2.1 Phương pháp ly trích DNA

DNA được ly trích từ vi đuôi hoặc cơ thịt cá bằng phương pháp phenol chloroform (Taggart *et al.*, 1992) có hiệu chỉnh (Dương Thúy Yên, 2014). Mẫu vi đuôi cá được nghiền nhỏ trong 650 μ L dung dịch ly trích cùng với 10 μ L proteinase K (20mg/mL). Sau khi ủ qua đêm ở 60°C, mẫu được tách protein và các chất khác ra khỏi DNA bằng dung dịch chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) và phenol : chloroform : isoamyl (25 : 24 : 1). DNA được kết tủa bằng 600 μ L ethanol 100% lạnh và đặt vào tủ đông (-20°) trong 1 giờ hoặc có thể lâu hơn, sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Tiếp đến, rửa DNA kết tủa với Ethanol 70% (2 lần) và ethanol 100% (1 lần). DNA được phơi khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó hòa tan DNA với 80 μ L dung dịch TE và bảo quản ở -20°C.

2.2.2 Phương pháp phân tích DNA mã vạch

Mẫu cá nghiên cứu được kiểm chứng định danh loài bằng phương pháp DNA mã vạch. Năm mẫu cá được lấy ngẫu nhiên từ 4 đàn cá (2 mẫu từ đàn cá Láng Sen) và được phân tích gene Cytochrome C oxydae subunit I (COI) trên ti thể. Gene COI được khuếch đại với cặp mồi Fish F2 – t1/ Fish R2 – t1 (Ward *et al.*, 2005) có trình tự như sau:

Fish F2 – t1:

5'TGTAACACGACGGCCAGTCGACTAAT
CATAAAGATATCGGCAC 3'

Fish R2 – t1:

5'CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGG
TGACCGAAGAATCAGAA 3'

Thành phần các chất và chu kỳ phản ứng khuếch đại tương tự như trong nghiên cứu trước đây của Dương Thúy Yên (2014). Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại Malaysia (First BASE Laboratories Sdn Bhd), theo phương pháp Sanger

(Sanger *et al.*, 1977).

2.2.3 Phương pháp PCR với các môi ISSR

Sau khi sàng lọc và chuẩn hóa 10 môi ISSR, sáu môi (Bảng 1) cho kết quả vạch rõ ràng và đa hình cao được chọn để phân tích đa dạng di truyền của cá hường.

Bảng 1: Sáu loại môi ISSR được dùng trong nghiên cứu

Tên môi	Trình tự	Nguồn tham khảo
ISSR11	5'[CAC] ₃ GC 3'	Sharma <i>et al.</i> , (2011)
Chiu-SSR1	5'[GGAC] ₃ A 3'	Pazza <i>et al.</i> , (2007)
Chiu-SSR2	5'[GGAC] ₃ C 3'	Pazza <i>et al.</i> , (2007)
Micro11	5'[GGAC] ₄ 3'	Fernandes-Matioliet <i>et al.</i> , (2000)
17898B	5' [CA] ₆ GT 3'	Saad <i>et al.</i> , (2012a)
844A	5' [CT] ₈ AC 3'	Kumla <i>et al.</i> , (2012)

Nồng độ các chất trong PCR giống nhau cho sáu loại môi: trong tổng thể tích 10µl PCR có chứa 50 ng DNA, 0,3 µM primer, 0,2 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 0,5U taq polymerase và 1X buffer.

Chu kỳ nhiệt trong phản ứng khuếch đại giống nhau ở bốn loại môi, trừ môi 17898B và 844 A (Bảng 2).

Bảng 2: Chu trình nhiệt (nhiệt độ - thời gian) trong phản ứng PCR

Chu kỳ nhiệt	ISSR11, Chiu-SSR1, Chiu-SSR2 và Micro11	17898B	844A
Duỗi xoắn ban đầu	94° - 2m	94° - 2m	94° - 3m
Duỗi xoắn*	94° - 30s	94° - 30s	94° - 40s
Gắn môi*	46°-45s	48°-45s	44°-45s
Nối dài*	72° -1m30s	72° -1m30s	72° -1m30s
Nối dài cuối cùng	72° - 10m	72° - 10m	72° - 5m

* Các bước này được lặp lại 35 chu kỳ (ISSR11, chiu-SSR1, chiu-SSR2, micro11, 17898B) và 41 chu kỳ (844A) (m: phút, s: giây)

2.2.4 Điện di và đọc kết quả ISSR

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,2%. Cho vào mỗi giếng gel hỗn hợp DNA (5 µL) và Loading dye (2.5 µL) và đặt gel vào trong môi trường điện di (TBE 1X với dòng điện 60V trong 35 - 40 phút). Sau đó, gel được nhuộm trong Ethidium bromide (0,5 µg/mL) ít nhất 15 phút và kết quả điện di được chụp hình qua máy chụp gel (hiệu ETX-20.C, BioTech-Tây Ban Nha).

Kích thước của các vạch điện di được xác định dựa vào thang DNA chuẩn 100-10.000 bp (Abm, Canada). Những mẫu xuất hiện vạch được đọc là 1, mẫu không xuất hiện vạch tại vị trí tương ứng là 0.

2.2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Trình tự gene COI được phân tích bằng các chương trình Finch TV 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/>), MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) và BLAST (Basis Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Chương trình Finch TV và MEGA7 được dùng để kiểm tra chất lượng trình tự (giá trị Q) và so sánh trình tự giữa các mẫu phân tích. Sau đó,

trình tự của mẫu được so sánh với cơ sở dữ liệu của Genbank với công cụ BLAST và BOLDsystems (www.boldsystems.org).

Đối với số liệu ISSR, tính toán các thông số di truyền cho mỗi quần thể được thực hiện bằng chương trình GenAIEx 6,5 (Peakall and Smouse, 2012), bao gồm số lượng alen quan sát (na) và mong đợi (ne), phần trăm của gene đa hình (%P), tỉ lệ dị hợp mong đợi (He), chỉ số Shannon, và phân tích PCoA (Principal Coordinates Analysis). Chương trình Popgene 1,3 (Yeh *et al.*, 1999) được sử dụng để đánh giá mức độ tương đồng về di truyền (genetic identity) (Nei, 1972), khoảng cách di truyền (genetic distance) giữa các quần thể và vẽ cây di truyền theo phương pháp Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

3 KẾT QUẢ

3.1 Kết quả định danh cá hường bằng DNA mã vạch

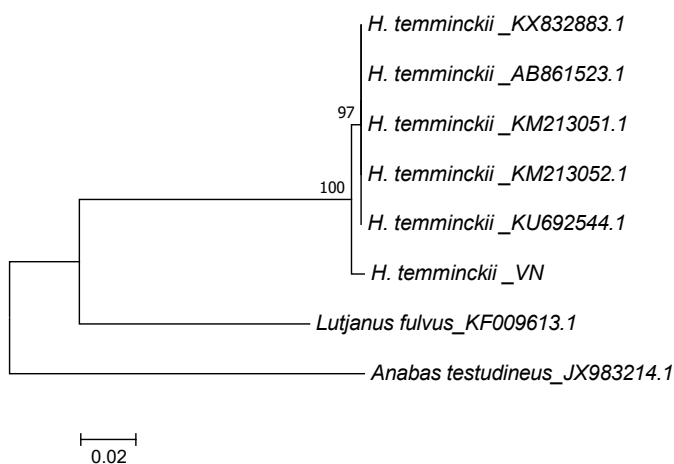
Đoạn gene COI của cá hường có chiều dài là 630 bp được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank và BOLDsystems. Kết quả cho thấy năm

mẫu cá nghiên cứu giống nhau 100% và giống với năm mẫu cùng loài (*Helostoma temminckii*) từ 97,7% (số truy cập AB861523.1) đến 99,2% (KM213051.1, KM213052.1; KU692544.1 và KX832883.1, truy cập ngày 03/03/2018). Kết quả so sánh trình tự (alignment) giữa mẫu cá nghiên cứu với mẫu Genbank (KM213052.1) có mức tương đồng cao nhất (99,2%) được thể hiện ở Hình 1. Những vị trí nucleotide khác biệt giữa hai mẫu (5/630) đều là những đột biến đồng hoán (giữa A và G hay T và C). Tại thời điểm truy cập, hai hệ thống dữ liệu Genbank và BOLDsystems chỉ có năm trình tự cá hương nêu trên trong họ

Helostomatidae (trong đó có mẫu KU692544.1 thu từ Indonesia, bốn mẫu còn lại không có thông tin nguồn gốc thu mẫu). Khi so với cá khác loài có dữ liệu ở Genbank và BOLDsystems, cá hương có mức độ tương đồng gần nhất với loài *Lutjanus fulvus* (thuộc bộ Perciformes) là 83,6% và so với cá rô đồng (*Anabas testudineus*) cùng thuộc bộ Anabantiformes là 78,6%. Mức độ tương đồng của các loài được thể hiện qua cây di truyền ở Hình 2. Như vậy, mẫu cá hương trong nghiên cứu có tên khoa học *Helostoma temminckii*, đúng như định danh hình thái ban đầu.

Range 1: 34 to 663		GenBank	Graphics	Next Match	Pre
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1136 bits(615)	0.0	625/630(99%)	0/630(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GATAGTTGGCACAGCTTTAAGCTTGCTCATTGAGCCGAATTAAGCCAACAGGAGCCCT	60			
Sbjct 34	93			
Query 61	TCTGGGAGACGACCAAATTTATAATGTAATCGTTACAGCACATGCCTTTGTAATAATTTT	120			
Sbjct 94	153			
Query 121	CTTTATAGTAAATCAATTATGATGGGAGGCTTTGGGAAGTATTGATCCCACTAATACT	180			
Sbjct 154C.....A.....	213			
Query 181	GGGCGCCCCGATATAGCATTCCCTCGAATGAACAACATAAGCTTTTGACTTCTTCCCCC	240			
Sbjct 214	273			
Query 241	CTCCTTCTACTTTTAGCTTCTCCCGAGTAGAGGCTGGGGCTGGGACCGGATGAAC	300			
Sbjct 274	333			
Query 301	CGTATATCCCCACTCGCCGAAACTTAGCTCATGCAGGCGCATCCGTTGACTTAACAT	360			
Sbjct 334	393			
Query 361	CTTCTCTGCAATTAGCAGGGTTTCTTCAATTTTAGGCTCTATCACTTTATTACAAC	420			
Sbjct 394	T.....C.....	453			
Query 421	TATTATTAACATGAAGCCTCCAGCCGTCTCCAGTATCAAACACCCCTGTTTGTCTGAGC	480			
Sbjct 454G.....	513			
Query 481	TGTAATAATTACTGCTGTTCTCTTAGTCTCTCCCTCCAGTCTAGCTGCCGATTATAC	540			
Sbjct 514	573			
Query 541	AATGCTTCTGACTGATCGAAATCTAAATACAACCTTTTACCCTGCGAGCGGAGGAGA	600			
Sbjct 574	633			
Query 601	CCCAGTCCTTACCAACACTTATTCTGATT	630			
Sbjct 634	663			

Hình 1: Kết quả so sánh trình tự mẫu cá hương trong nghiên cứu (Query) với mẫu cùng loài (*Helostoma temminckii*) có số truy cập Genbank là KM213052.1 (Sbjct)



Hình 2: Cây di truyền* của cá hương nghiên cứu (VN) so với cùng loài có trình tự ở Genbank và hai loài cá khác – *A. testudineus* (cùng bộ Annatinidae) và *L. fulvus* (Bộ Perciformes)

(*Ghi chú: Cây di truyền được ước tính theo phương pháp Neighbor-Joining. Giá trị bootstrap bên cạnh nhánh phân loại. Ký hiệu sau tên khoa học là số truy cập Genbank)

3.2 Đa dạng di truyền của cá hường

3.2.1 Các thông số đa dạng di truyền của các đàn cá hường

Bốn đàn cá được đánh giá sự đa dạng di truyền gồm có 82 cá thể. Sáu môi đã sử dụng tạo ra 86 vạch, số vạch của mỗi môi ISSR từ 10-18 vạch với kích thước dao động từ 400 bp (ISSR11, 17898B, 844A) đến 3000 bp (Micro 11, 844A). Nhìn chung,

ti lệ gene đa hình và ti lệ dị hợp của các quần thể cá hường tương đối cao với giá trị dao động lần lượt là 55,42-90,36% và 0,18-0,245 (Bảng 2). Trong đó, đàn cá Hậu Giang có các thông số đa dạng di truyền cao nhất, như ti lệ gene đa hình 90,36%, số alen hiệu quả 1,387, ti lệ dị hợp mong đợi 0,245 và chỉ số Shannon 0,386. Trong khi đó, đàn cá ở Long An (Láng Sen) có các thông số đa dạng di truyền thấp nhất (Bảng 2).

Bảng 2: Các thông số đa dạng di truyền (TB ± ĐLC) của các quần thể cá hường

Các thông số	Long An	Trà Vinh	Cần Thơ	Hậu Giang
Số mẫu	21	21	20	20
Ti lệ gen đa hình (%P)	55,42	60,24	86,75	90,36
Số alen quan sát được (na)	1,241±0,099	1,301±0,1	1,759±0,07	1,843±0,055
Số alen mong đợi (ne)	1,314±0,042	1,318±0,04	1,295±0,031	1,387±0,034
Ti lệ dị hợp (He)	0,180±0,022	0,188±0,022	0,196±0,017	0,245±0,017
Chỉ số Shannon (I)	0,269±0,032	0,285±0,031	0,321±0,023	0,386±0,023

3.2.2 Khoảng cách di truyền của các đàn cá hường

Khoảng cách di truyền của bốn đàn cá hường dao động trong khoảng từ 0,023 – 0,102. Trong đó, khoảng cách di truyền giữa hai đàn Cần Thơ và Trà

Vinh là lớn nhất so với các cặp đàn khác và cặp Cần Thơ - Hậu Giang là thấp nhất. Ngược lại, mức độ tương đồng di truyền của các đàn cá dao động từ 0,903-0,978, trong đó mức độ tương đồng lớn nhất là giữa đàn Cần Thơ và Hậu Giang (Bảng 3).

Bảng 3: Mức độ tương đồng di truyền – Nei's genetic identity (phía dưới dấu *) và khoảng cách di truyền – Nei's genetic distance (phía trên dấu ***) của bốn đàn cá**

	Long An	Trà Vinh	Cần Thơ	Hậu Giang
Long An	***	0,033	0,092	0,056
Trà Vinh	0,968	***	0,102	0,067
Cần Thơ	0,912	0,903	***	0,023
Hậu Giang	0,946	0,935	0,978	***

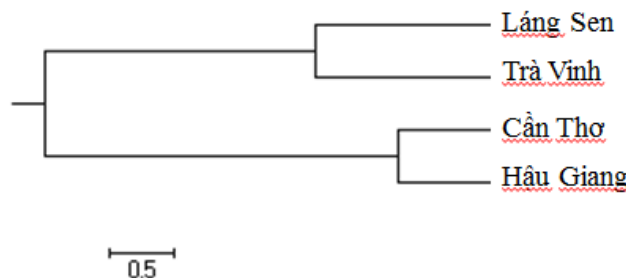
Kết quả phân tích biến động di truyền cấp phân tử (AMOVA) của cá hường cho thấy sự biến động

di truyền trong cùng một đàn chiếm 83% và giữa các đàn chiếm 17% (Bảng 4).

Bảng 4: Biến động di truyền (AMOVA) của các quần thể cá hường

Nguồn	Df*	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Biến động ước tính	Ti lệ phần trăm (%)
Giữa các quần thể	3	163,978	54,659	2,259	17
Trong cùng quần thể	73	833,619	11,419	11,419	83
Tổng cộng	76	997,597		13,678	100

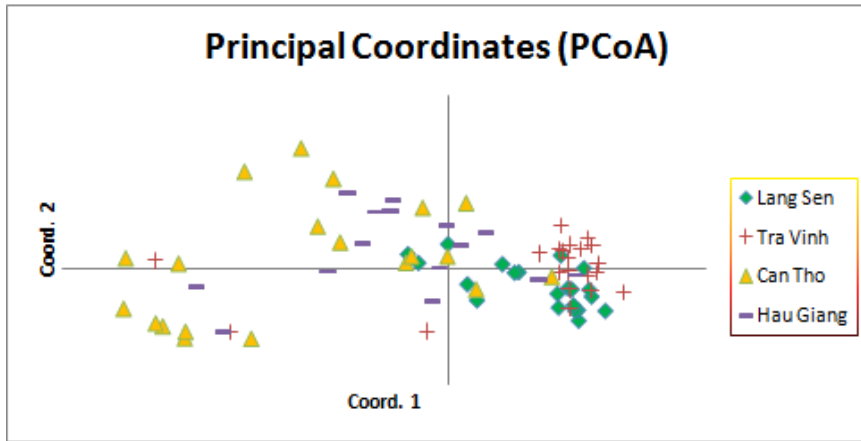
(*): Độ tự do



Hình 3: Cây di truyền theo phương pháp UPGMA của cá hường ở bốn quần thể

Mối quan hệ di truyền giữa các đàn cá được thể hiện qua cây di truyền (Hình 3). Bốn đàn cá được chia làm 2 nhánh, nhánh Long An (Láng Sen) – Trà Vinh và nhánh Cần Thơ – Hậu Giang. Hai quần thể cùng một nhánh (Cần Thơ – Hậu Giang và Long An (Láng Sen) – Trà Vinh) có khoảng cách di truyền thấp nhất hay mức độ tương đồng lớn nhất (Bảng 4). Ngoài ra, mối quan hệ giữa các đàn cá còn được thể hiện thông qua kết quả phân tích nhóm (Hình 4). Trên trục tọa độ, đàn cá Cần

Thơ có xu hướng nằm cạnh cá Hậu Giang, trong khi đó nhóm cá Long An (Láng Sen) và Trà Vinh nằm ở vị trí sát nhau. Đồng thời, các cá thể của đàn Cần Thơ và Hậu Giang phân bố rộng trên trục tọa độ, thể hiện mức độ đa dạng di truyền cao hơn so với các cá thể ở hai đàn cá còn lại. Sự khác biệt giữa cặp Láng Sen-Trà Vinh và Cần Thơ-Hậu Giang thể hiện rõ ở trục tọa độ 1 với tỉ lệ 38,1%. Trục tọa độ 2 với tỉ lệ 19,8% thể hiện sự khác biệt giữa các cá thể rõ hơn giữa các quần thể.



Hình 4: Kết quả phân tích nhóm (PCoA) giữa các đàn cá hường dựa trên 6 chỉ thị ISSR

4 THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy bốn quần thể cá hường thể hiện sự đa dạng di truyền tương đối cao (tỉ lệ gene đa hình 55,42-90,36%, tỉ lệ dị hợp mong đợi 0,180-0,245 và chỉ số Shannon 0,269-0,386) và cao hơn khi so sánh với các loài cá khác được đánh giá dựa trên cùng loại chỉ thị ISSR. Ở ba loài cá mú giống *Plectropomus*, tỉ lệ gene đa hình và tỉ lệ dị hợp mong đợi từ 9 môi ISSR tương đối thấp, dao động tương ứng trong khoảng 25,11-33,63% và 0,07-0,19 (Saad *et al.*, 2012b). Một nghiên cứu khác của Ebied *et al.* (2014) cho thấy tỉ lệ đa hình của các loài cá hồng hải (*Lethrinus borbonicus*, *Siganus rivulatus* và *Mulloidichthys flavolineatus*) từ 25-44,4%. Ở Brazil, cá hải tượng long (*Arapaima gigas*) thu từ bốn quần thể khác nhau có tỉ lệ đa hình cao nhất là 56,5% và tỉ lệ dị hợp là 0,190 (Vitorino *et al.*, 2015). Nghiên cứu trên cá rô đồng ở ĐBSCL với năm chỉ thị ISSR và một RAPD; Phạm Thị Trang Nhung và Dương Thúy Yên (2014) báo cáo tỉ lệ gen đa hình và tỉ lệ dị hợp của bốn quần thể cá rô dao động trong các khoảng lần lượt là 78,87-85,92% và 0,192-0,258.

Trong bốn đàn cá hường, đàn cá Hậu Giang thể hiện sự đa dạng di truyền cao nhất và cá ở Long An (Láng Sen) thấp nhất. Sự đa dạng di truyền của mỗi quần thể phụ thuộc vào các yếu tố bên trong của quần thể (như kích cỡ quần thể [population size],

sự biến đổi di truyền ngẫu nhiên [random genetic drift], chọn lọc tự nhiên và đột biến) và yếu tố bên ngoài của quá trình trao đổi gene giữa các quần thể (Allendorf and Luikart, 2007). Đàn cá ở khu bảo tồn Láng Sen sống thành bầy đàn với số lượng cá thể ít nên kích cỡ quần thể nhỏ trong một khoảng thời gian dài. Ở những quần thể nhỏ, quá trình biến đổi di truyền ngẫu nhiên tác động mạnh, làm cho một số gene mất đi hoàn toàn (Lacy, 1987) và quá trình mất gene xảy ra nhanh và mạnh hơn quá trình tạo biến dị mới do đột biến gene (Avise, 2000). Hơn nữa, đàn cá Láng Sen không có sự trao đổi gene với các quần thể khác nên không có nguồn cung cấp biến dị mới từ bên ngoài. Ngoài ra, mức độ đa dạng di truyền thấp còn có thể là do những biến động của kích cỡ quần thể qua các thế hệ (Turner *et al.*, 2004). Do sống trong môi trường tự nhiên nên cá hường Láng Sen phải đối phó với sự biến động của các yếu tố môi trường cũng như sự đe dọa của các loài cá ăn thịt khác (cá lóc bông). Số lượng cá thể trong quần thể quá ít dẫn đến khả năng lai cận huyết có thể xảy ra. Do đó, đa dạng di truyền của quần đàn nơi đây dần bị suy giảm theo thời gian. Trong khi đó, các đàn cá hường nuôi ở các tỉnh (đặc biệt là ở Hậu Giang) có thể được thay đổi, bổ sung qua các thế hệ (thu hoạch và thả mới) nên vẫn thể hiện sự đa dạng di truyền cao hơn. Tuy nhiên, mức độ chênh lệch về các thông số đa dạng di truyền giữa các quần thể là tương đối nhỏ.

Một số nghiên cứu sử dụng các chỉ thị khác cũng cho thấy cá nuôi có sự đa dạng di truyền cao hơn cá sống trong môi trường tự nhiên. Cụ thể, trong nghiên cứu so sánh về di truyền của cá tráp (*Sparus aurata*) nuôi và tự nhiên ở Tây Ban Nha, Alarcon *et al.* (2004) nhận thấy các mẫu cá ở 2 vùng nuôi có sự đa dạng di truyền cao nhất dựa trên kết quả phân tích ba loại chỉ thị allozyme, mtDNA và microsatellite. Marie *et al.* (2010) chứng minh các quần thể cá nuôi thể hiện sự đa dạng di truyền hơn cả ngoài tự nhiên, trong nghiên cứu về tương quan giữa sự mất gen và mật độ nuôi của cá hồi (*Salvelinus fontinalis*) bằng chỉ thị microsatellite. Kết quả nghiên cứu trên loài *Cirrhinus cirrhosus* ở Myanmar dựa trên chỉ thị microsatellite của Aung *et al.* (2010) cũng cho thấy các quần thể cá nuôi có sự đa dạng di truyền cao hơn các quần thể cá tự nhiên. Song nhiều nghiên cứu khác cũng chứng minh điều ngược lại, điển hình như nghiên cứu trên cá hồi (Waples, 1991).

Nguồn gốc ban đầu cùng với các quá trình di truyền xảy ra khác nhau ở mỗi quần thể và quá trình trao đổi gene giữa các quần thể ảnh hưởng đến sự khác biệt di truyền giữa các quần thể. Khoảng cách di truyền giữa bốn đàn cá hương (dao động 0,03 – 0,102) và nguồn biến động di truyền giữa các đàn (17%) là tương đối cao so với một số loài cá khác. Đối với cá rô, khoảng cách di truyền của quần thể nuôi (cá rô đầu vuông) và ba quần thể tự nhiên (thu ở Cà Mau, Đồng Tháp và Hậu Giang) là 0,019 – 0,036 và biến động di truyền giữa các đàn chiếm 8%. Hiện không có thông tin về nguồn gốc ban đầu của các đàn cá hương nuôi trong nghiên cứu, các hộ nuôi cho biết họ mua cá hương từ một số trại giống khác nhau.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy chỉ thị ISSR có tính đa hình cao, thể hiện ở tỉ lệ gene đa hình và biến động di truyền giữa các quần thể cá hương tương đối lớn. Do đó, chỉ thị này có thể ứng dụng trong nghiên cứu đánh giá và so sánh sự đa dạng di truyền trong cùng và giữa các quần thể trên các loài cá khác.

5 KẾT LUẬN-ĐỀ XUẤT

Kết quả dựa trên chỉ thị ISSR cho thấy cá hương thu từ thủy vực tự nhiên và một số ao nuôi ở các tỉnh có mức độ đa dạng di truyền tương đối cao và khác biệt di truyền giữa các đàn tương đối lớn. Đàn cá hương ở khu bảo tồn Láng Sen (Long An) có đa dạng di truyền thấp hơn các đàn khác nên cần được bảo tồn và có biện pháp bổ sung số lượng đàn cá từ nơi khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài “Đánh giá hiện trạng và đề ra biện pháp quản lý phục hồi các loài thủy sản quý hiếm tại Khu Bảo tồn đất ngập nước Láng Sen” do Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Long An tài trợ. Nhóm tác giả xin chân thành Ban Giám đốc Khu Bảo tồn đất ngập nước Láng Sen đã tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình thu mẫu, đồng thời cảm ơn KS. Nguyễn Thị Ngọc Trân và một số sinh viên Khoa Thủy sản đã giúp đỡ trong quá trình thu và phân tích mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alarcon, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., and Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 230(1-4): 65–80.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*, First Edition, Blackwell Publishing, 642 pages.
- Aung, O., Nguyen, T.T.T., Poompuang, S., and Kamonrat, W., 2010. Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks and wild populations of mrigal, *Cirrhinus cirrhosus* in Myanmar. *Aquaculture*, 299(1-4): 37–43.
- Avice, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University press.
- Casu, M., Casu, D., Lai, T., Cossu, P., and Curini-Galletti, M., 2008. A molecular tool for genetic surveys in the red coral (*Corallium rubrum*): An Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) perspective. *Biochem. Syst. Ecol.* 36(2): 77–83.
- Chiu, T.H., Su, Y.C., Lin, H.C., Hsu, C.K., 2009. Molecular electrophoretic technique for authentication of the fish genetic diversity. *In: Magdeldin, S. (Ed.) Gel Electrophoresis - Advanced Techniques*. Intech, 83–96.
- 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*, (30b): 29-36
- Ebied, A.M., Aly, F.M., Abu-AlMaaty, A. H., and Allam, M., 2014. Assessment of genetic variation and changes in protein subunits ninduced by petroleum oil in three species of Red Sea fishes using SDS-PAGE and ISSRs markers. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 9, 16–22.
- Esselman, E.J., Jianqiang, L., Crawford, D.J., Windus, 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. *Mol. Ecol.* 8(3): 443–451.
- Fernandes-Matioli, F.M.C., Matioli, S.R., and Almeida-Toledo, L.F., 2000. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genet. Mol. Biol.* 23(4): 803–807.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126(2): 131–140.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.
- Kumla, S., Doolgindachbaporn, S., Sudmoon, R., and Sattayasai, N., 2012. Genetic variation, population structure and identification of yellow catfish, *Mystus nemurus* (C&V) in Thailand using RAPD, ISSR and SCAR marker. *Mol. Biol. Rep.* 39(5): 5201–5210.
- Lacy, R.C., 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects on drift, mutation, immigration, selection and population subdivision. *Conserv. Biol.* 1(2): 143–158.
- Liu, Y.G., Chen, S.L., Li, J., and Li, B.F., 2006. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. *Aquaculture.* 255(1-4): 565–572.
- Liu, Z.J., and Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture.* 238(1-4): 1–37.
- Maltagliati, F., Lai, T., Casu, M., Valdesalici, S., and Castelli, A., 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochem. Syst. Ecol.* 34(8): 626–634.
- Marie, A.D., Bernatchez, L., and Garant, D., 2010. Loss of genetic integrity correlates with stocking intensity in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Mol. Ecol.* 19(10): 2025–2037.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283–292.
- Nguyễn Phương Thảo và Dương Thủy Yên, 2017. Đa dạng về hình thái của cá hương (*Helostoma temminckii*) ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52: 78-85.
- Pazza, R., Kavalco, K., Prioli, F., P. S.M.A.P., Jose, A., and Bertollo, L.A.C., 2007. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 35(12): 843–851.
- Peakall, R., and Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Phạm Thị Trang Nhung và Dương Thủy Yên, 2014. 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. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, số chuyên đề Thủy sản 1*: 101–108.
- Rainboth, W.J., 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. FAO, Rome.
- Saad, Y.M., Rashed, M.A., Atta, A.H., and Ahmed, N.E., 2012a. Genetic diversity among some tilapia species based on ISSR markers. *Life Sci. J.* 9(4): 4841–4846.
- Saad, Y.M., AbuZinadah, O.A.H., El-Domyati, F.M., and Sabir, J.M., 2012b. Analysis of genetic signature for some *Plectropomus* species based on some dominant DNA markers. *Life Sci. J.* 9(4): 2370–2375.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(12): 5463–5467.
- Sharma, S.K., Kumaria, S., Tandon, P., and 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(1): 54–62.
- Shikano, T., 2005. Marker-based estimation of heritability for body color variation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 249(1-4): 95–105.
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöuhl, P.A., and Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.* 40(6): 963–965.
- Tave, D., 1993. Genetics for Fish Hatchery Managers, Second Edition. Van Nostrand Reinhold New York, 418 pages.
- Turner, T.F., McPhee, M.V., Campbell, P., and Winemiller, K.O., 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *J. Fish Biol.* 64(1): 186–201.
- Vitorino, C.A., Oliveira, R.C.C., Margarido, V.P., and Venere, P.C., 2015. Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. *Neotrop. Ichthyol.* 13(3): 557–568.
- Waples, R.S., 1991. Genetic Interactions between Hatchery and Wild Salmonids - Lessons from the Pacific-Northwest. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(S1): 124–133.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., and Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360(1462): 1847–1857.
- Yeh, F., Yang, R., and Boyle, T., 1999. Popgene version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Univ. Alberta Cent. Int. For. Res. Edmonton, Alto 1–29.