

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC DÒNG CÁ
RÔ PHI ĐỎ (*Oreochromis spp*) BẰNG MICROSATELLITE
GENETIC DIVERSITY OF RED TILAPIA BROODSTOCK POPULATIONS
(*OREOCHROMIS SPP*) USING MICROSATELLITE**

Bùi Thị Liên Hà¹, Lê Chính¹, Nguyễn Điền¹ và Trịnh Quốc Trọng²

¹ Phòng Sinh học Thực nghiệm, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2

² Trung Tâm Quốc gia Giống TS Nước ngọt Nam Bộ, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2

Email: nguyen.dien1809@gmail.com

SUMMARY

Six microsatellite markers were applied to estimate genetic diversity within and between four red tilapia strains originated from Ecuador, Malaysia Taiwan and Thailand for use in subsequent breeding program. Six microsatellite loci were found to be polymorphic in all accessions. The number of alleles produced from each marker ranged from three to six. The loci UNH216, UNH231 and UNH159 produced the highest number of alleles at six. The lowest number of alleles was observed at locus OM05 and UNH216 with three alleles. The observed heterozygosity of the six loci ranged from 0.26 to 0.82. F_{IS} value ranged from 0.09 at locus OM05 to 0.41 at locus UNH231. A statistically significant heterozygosity deficit was detected across almost all of loci that showed the risk of inbreeding level within the two strains. F_{ST} value showed no significant genetic differentiation between the four red tilapia strains. Results suggest that it should make cross breeding between the four red tilapia strains or other populations to improve genetic variation for better breeding programs and to manage and conserve diversity of genetic source for selection of other traits in the future.

Keywords: red tilapia, microsatellite, genetic diversity, heterozygosity

TÓM TẮT

Sáu microsatellite được sử dụng để khảo sát mức độ đa dạng di truyền của bốn dòng cá rô phi đỏ có nguồn gốc từ Đài Loan, Thái Lan, Ecuador và Malaysia nhằm phục vụ cho công tác chọn giống. Sáu microsatellite sử dụng đều cho đa hình trên các mẫu phân tích, số lượng allele dao động từ 3 đến 6 allele trên một locus. Các locus có số lượng allele lớn nhất là UNH216, UNH231 và UNH159 với số allele là 6. Locus có số lượng allele ít nhất là OM05 và UNH216 với 3 allele. Giá trị allele trung bình của dòng 1 là 5,3 lớn hơn so với giá trị allele trung bình của dòng 2 là 4,8. Dị hợp tử phát hiện có ý nghĩa của sáu locus từ 0,26 đến 0,82. Giá trị F_{IS} dao động từ thấp nhất là 0,09 tại locus OM05 và cao nhất là 0,41 tại locus UNH231. Sự thiếu hụt dị hợp tử có ý nghĩa được phát hiện trên hầu hết các locus cho thấy một mức độ cận huyết đáng quan tâm trên bốn dòng cá nghiên cứu. Giá trị F_{ST} cho thấy không có nhiều sự khác biệt di truyền có ý nghĩa giữa bốn dòng cá. Từ kết quả đề tài cho thấy nên tiến hành lai chéo bốn dòng cá này hoặc lai với những dòng khác có biến dị tương đương hoặc cao hơn nhằm làm tăng biến dị di truyền phục vụ cho công tác chọn giống được tốt hơn và góp phần giữ nguồn gene đa dạng cho việc chọn lọc các tính trạng khác trong tương lai.

Từ khóa: cá rô phi đỏ, microsatellite, đa dạng di truyền, dị hợp tử.

MỞ ĐẦU

Cá rô phi nói chung và cá rô phi đỏ nói riêng hiện đang được nuôi rộng rãi trên thế giới, trong đó sản lượng cá rô phi của Trung Quốc và Đông Nam Á là lớn nhất. Hiện nay, nhu cầu cá giống tăng cao, do đó nhiều trại giống cho sinh sản quá nhiều đợt trong năm trên cùng cá thể bố mẹ, điều này góp phần làm giảm chất lượng con giống (Phạm Anh Tuấn, 2004). Bên cạnh đó, xét về mặt di truyền, nguyên nhân chủ yếu dẫn tới sụt giảm chất lượng giống là do

giao phối cận huyết (Mair, 1997). Trong quần thể chọn lọc, giao phối cận huyết gây ra các tác động tiêu cực như tăng đồng hợp tử, dẫn đến cơ hội gia tăng biểu hiện của gene lặn gây chết, suy thoái cận huyết và giảm biến dị di truyền (Falconer, 1989). Các nghiên cứu cho thấy giao phối cận huyết làm giảm tăng trưởng, khả năng tồn tại và số lượng cá thể dị thường tăng (Pante *et al.*, 2001). Những nguyên nhân nêu trên dẫn đến việc suy thoái chất lượng con giống. Do đó, việc lựa chọn con giống tốt là yếu tố quan trọng hàng đầu không những đảm bảo hiệu quả kinh tế của việc sản xuất mà góp phần giữ được nguồn gene đa dạng cho việc chọn lọc các tính trạng khác trong tương lai.

Cá rô phi là đối tượng nuôi rất triển vọng, thị trường có nhu cầu tăng nhanh, do đó cần nhanh chóng đầu tư phát triển. Để sản phẩm cá rô phi nuôi có tính cạnh tranh cao, cần tiếp tục nâng cao chất lượng con giống, tạo phẩm giống có khả năng lớn nhanh hơn và thích ứng với các vùng nước khác nhau, nhanh chóng xây dựng các công nghệ sản xuất giống và nuôi cho sản phẩm sạch (Phạm Anh Tuấn, 2004). Microsatellite là một công cụ đắc lực để đánh giá mức độ đa dạng di truyền, góp phần thiết thực để phục vụ cho công tác chọn giống. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Cá Rô phi do thu từ các gia đình Rô phi thuộc đề tài “Đánh giá các thông số di truyền và hình thành vật liệu ban đầu cho chọn giống cá rô phi đỏ *Oreochromis spp.*” từ Trung tâm quốc gia giống thủy sản nước ngọt Nam Bộ, Cái Bè, Tiền Giang.

Các dòng cá rô phi đỏ nghiên cứu bao gồm bốn dòng cá nhập từ Ecuador (dòng 1), Đài Loan (dòng 3) và Thái Lan (dòng 4) (60 mẫu/dòng) và dòng cá nhập từ Malaysia (dòng 2) (53 mẫu). Các mẫu được thu có chọn lọc để đại diện cho các dòng cá nhập nội. Mẫu cá cho thí nghiệm là những cá thể cá rô phi trưởng thành, khỏe mạnh, được thu một phần vây ngực của cá, bảo quản trong cồn 70°. Mẫu sau khi thu tại Cái Bè được chuyển về Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II, bảo quản trong tủ - 24°C cho đến khi tiến hành ly trích DNA.

Bảy cặp microsatellites sử dụng cho nghiên cứu có chiều dài từ 17 - 24 bp. Các cặp primer OM02 (GenBank No: GU391021) và OM05 (GenBank No: GU391024) được tham khảo từ bài báo của tác giả Saju và đồng tác giả (2010). Bên cạnh đó, các cặp primer UNH216 (GenBank No: G12367), UNH231 (GenBank No: G12382), UNH172 (GenBank No: G12324) và UNH159 (GenBank No: G12311) được tham khảo lần lượt từ hai bài báo của các tác giả Palti và đồng tác giả (2002); Romana và đồng tác giả (2004).

Bảng 1: Các primer microsatellite dùng trong thí nghiệm

Primer	Trình tự	GenBank Accession No.
OM02 a	5'TGTGAATTTGACAACCTTCCTTTC3'	GU391021
OM02 b	5'ATCCTTGCAATAAGGTTACAG3'	GU391021
OM05 a	5'GTAAAGTTTGGAAACAGAAATGCT3'	GU391024
OM05 b	5'GATCACTTTTGGACAGACTGG3'	GU391024
UNH216 a	5'GGGAAACTAAAGGTGAAATA3'	G12367
UNH216 b	5'TGCAAGGAATATCAGCA3'	G12367
UNH231 a	5'GCCTATTAGTCAAAGCGT3'	G12382
UNH231 b	5'ATTTCTGCAAAAGTTTCC3'	G12382
UNH172 a	5'AATGCCTTTAAATGCCTTCA3'	G12324
UNH172 b	5'CTTTTATAGTCGCCCTTTGTTA3'	G12324
UNH159 a	5'TTGTTTTAGGAGCTTCTTTTGTC3'	G12311
UNH159 b	5'ATATTCATCTGGATTTGGCTCTAA3'	G12311

Microsatellite allele sau đó được kiểm tra và sửa lỗi bằng phần mềm Micro-Checker version 2.2.3. ARLEQUIN version 3.1 được sử dụng cho các chỉ tiêu phân tích di truyền: cân bằng Hardy-Weinberg, mất cân bằng di truyền (linkage disequilibrium), số lượng allele/locus, dị hợp tử phát hiện và mong đợi (H_o và H_e), hệ số cận huyết (F_{IS}), giá trị khác biệt di truyền (F_{ST}). Phong phú allele (Allelic richness) (A_r) được tính bằng phần mềm FSTAT version 2.9.3 bằng cách chuẩn hóa biến dị allele về nhóm mẫu có số lượng thấp nhất.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm đa dạng di truyền của các mẫu

Sau khi xử lý số liệu bằng phần mềm Arlequin và Fstat, chúng tôi đã tổng hợp các giá trị về số allele trên locus (N_a), dị hợp tử phát hiện (H_o), dị hợp tử mong đợi (H_e), phong phú allele (A_r), chỉ số cận huyết F_{IS} . Các chỉ số trên được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm đa dạng di truyền trên microsatellite của 4 dòng cá rô phi đỏ trong nghiên cứu

Locus	Mẫu				
	Dòng 1	Dòng 2	Dòng 3	Dòng 4	
OM02	N	59	48	54	57
	N_a	5	4	5	4
	H_o	0,64	0,50	0,76	0,56
	H_e	0,74	0,71	0,71	0,69
	A_r	5,00	4,00	5,00	4,00
	F_{IS}	0,13	0,30	-0,08	0,19
OM05	N	54	47	59	57
	N_a	5	5	3	5
	H_o	0,89	0,66	0,75	0,61
	H_e	0,76	0,72	0,67	0,73
	A_r	5,00	5,00	3,00	5,00
	F_{IS}	-0,17	0,09	-0,12	0,16
UNH216	N	59	50	58	54
	N_a	6	5	3	3
	H_o	0,51	0,50	0,62	0,31
	H_e	0,81	0,70	0,51	0,30
	A_r	6,00	5,00	3,00	3,00
	F_{IS}	0,37	0,29	-0,21	-0,05
UNH231	N	58	52	53	48
	N_a	6	5	6	5
	H_o	0,47	0,54	0,42	0,71
	H_e	0,77	0,70	0,69	0,74
	A_r	5,81	4,90	5,89	5,00
	F_{IS}	0,40	0,23	0,41	0,05
UNH159	N	60	49	56	55
	N_a	6	6	6	5
	H_o	0,57	0,63	0,82	0,75

Locus	Mẫu				
	Dòng 1	Dòng 2	Dòng 3	Dòng 4	
	H_e	0,75	0,74	0,78	0,77
	A_r	6,00	6,00	6,00	5,00
	F_{IS}	0,25	0,15	-0,06	0,03
UNH172	N	58	47	56	55
	N_a	4	4	4	4
	H_o	0,26	0,43	0,59	0,60
	H_e	0,42	0,68	0,73	0,75
	A_r	4,00	4,00	4,00	4,00
	F_{IS}	0,39	0,38	0,20	0,20
Trung bình	N_a	5,33	4,83	4,50	4,33
	H_o	0,56	0,54	0,66	0,59
	H_e	0,71	0,71	0,68	0,66
	A_r	5,30	4,82	4,48	4,33
	F_{IS}	0,22	0,24	0,03	0,11

Chú thích: số lượng cá thể phân tích (N), số lượng allele trên locus (N_a), dị hợp tử phát hiện (H_o), dị hợp tử mong đợi (H_e), phong phú allele (A_r), chỉ số cận huyết (F_{IS}).

Có thể thấy các giá trị về số lượng allele trên locus (N_a), hệ số dị hợp tử phát hiện và mong đợi (H_o và H_e), phong phú allele (A_r) và tần suất allele trung bình không có nhiều biến động giữa 4 dòng cá (Bảng 2). Trên tổng số mẫu phân tích, N_a dao động từ 3 đến 6 allele. Số lượng allele tổng số của dòng 1 lớn nhất với 32 allele, tiếp theo là dòng 2 và dòng 3 với 29 và 27 allele. Số lượng allele tổng số của dòng 4 là thấp nhất với 26 allele. Tương tự như vậy, dòng 1 có giá trị allele trung bình lớn nhất là 5,3; tiếp theo là dòng 2, dòng 3. Giá trị allele trung bình của dòng 4 là thấp nhất với chỉ số 4,3. Giá trị phong phú allele (A_r) trung bình của dòng 1 là 5,3; chúng tôi nhận thấy giá trị này lớn hơn so giá trị phong phú allele trung bình của ba dòng còn lại lần lượt là 4,8 (dòng 2), 4,5 (dòng 3) và 4,3 (dòng 4). Chỉ số A_r được xác định bằng cách chuẩn hóa biến dị allele về nhóm mẫu có số lượng thấp nhất. Sau khi phân tích kết quả, chúng tôi nhận thấy locus có số lượng allele lớn nhất là UNH216, UNH231, UNH159 với số allele là 6. Locus có số lượng allele ít nhất là OM05 và UNH216 với 3 allele.

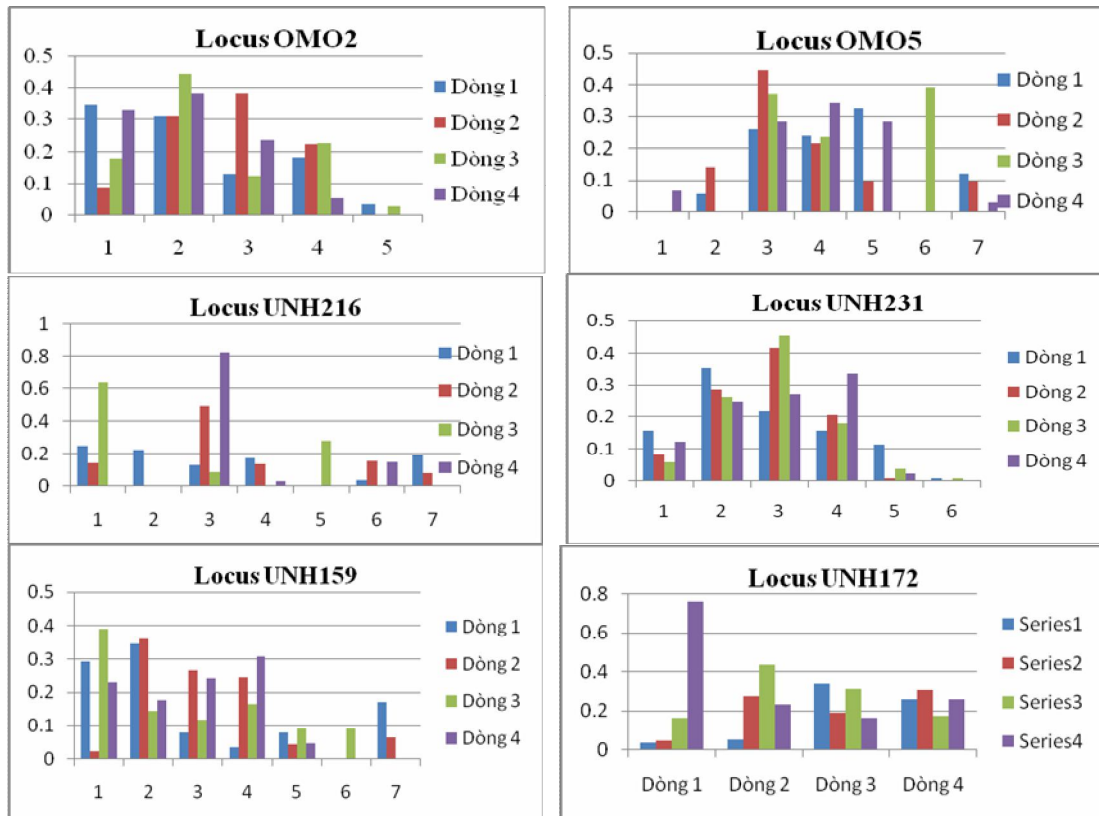
Có thể nhận thấy ở cả 6 locus của 4 dòng cá rô phi đỏ nghiên cứu trong đề tài đều tồn tại các allele có tần số xuất hiện rất thấp, với giá trị nhỏ hơn 0,1 (Hình 1). Các allele này đều có thể dễ dàng bị mất đi nếu không tiến hành lai bốn dòng cá rô phi đỏ này với những quần thể cá rô phi đỏ khác có biến dị di truyền cao hơn hoặc lai chéo giữa các dòng nhằm làm giảm nguy cơ bị mất các allele này, từ đó cũng giúp hạn chế sự thiếu hụt allele ở 4 dòng cá rô phi đỏ nghiên cứu trong đề tài.

Đánh giá chỉ số cận huyết

Giá trị F_{IS} cần phải lưu ý hơn ở dòng 1, những trường hợp có giá trị F_{IS} cao nhất trong quá trình khảo sát là tại locus UNH231 giá trị F_{IS} là 0,40; tại locus UNH172 giá trị F_{IS} là 0,39; tại locus UNH216 giá trị F_{IS} là 0,37. Trong khi đó ở dòng 2, dòng 3, dòng 4 các giá trị F_{IS} đều thấp hơn 0,3; chỉ có hai trường hợp duy nhất tại locus UNH172 giá trị F_{IS} là 0,38 của dòng 2 và tại locus UNH231 giá trị F_{IS} là 0,41 của dòng 3.

Có sự cảnh báo về mức độ thiếu hụt dị hợp tử ở dòng 1 (dòng cá rô phi nhập từ Ecuador), đặc biệt là ở 3 locus UNH231, UNH172 và UNH216. Việc cảnh báo về mức độ cận

huyết là điều cần thiết trong chương trình chọn giống bởi vì nếu quần thể mức độ cận huyết cao sẽ dẫn đến tình trạng thiếu hụt dị hợp tử, không đảm bảo tiêu chuẩn chọn làm con giống để tiến hành lai tạo trên một số tính trạng đang và sẽ tiến hành chọn lọc.



Hình 1: Đồ thị so sánh tần số allele tại các locus ở 4 dòng cá rô phi đỏ

Kiểm tra cân bằng Hardy - Weinberg

Từ Bảng 2, chúng tôi nhận thấy tất cả các locus ở 4 dòng cá rô phi đỏ đều có sự thiếu hụt dị hợp tử mong đợi có ý nghĩa ($p < 0,05$) căn cứ vào giá trị dị hợp tử quan sát (H_o) và dị hợp tử mong đợi (H_e). Cụ thể, giá trị H_o trung bình của dòng 1 là 0,56 và của dòng 2 là 0,54; giá trị H_e trung bình của dòng 1 là 0,71 và của dòng 2 là 0,71. Giá trị dị hợp tử quan sát (H_o) thấp hơn so với dị hợp tử mong đợi (H_e) trong 2 dòng cá nghiên cứu. Sự xuất hiện của null allele hoặc băng vạch giả (stutter bands) hoặc kỹ thuật điện di sử dụng trong nghiên cứu không có khả năng phát hiện những allele có kích thước gần nhau (khác biệt $< 10bp$) của các microsatellite loci sử dụng có thể giải thích cho hiện tượng trên. Như vậy nhìn tổng thể ở cả bốn dòng cá đều lệch khỏi cân bằng Hardy – Weinberg ($P = 0,0001 < 0,05$).

Sự thiếu hụt dị hợp tử (heterozygote deficiencies) đã thường xuyên được đề cập tới trong các nghiên cứu trên đối tượng thủy sản nuôi và tự nhiên bằng cả hai chỉ thị phân tử allozyme và microsatellite (Launey *et al.*, 2001). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã nhận ra sự mất đa dạng allele sẽ thường xảy ra nhanh hơn so với việc mất dị hợp tử bởi vì các allele có tần suất thấp vẫn thường đóng góp vào giá trị dị hợp tử tổng thể (Norris và *ctv.*, 1999). Thực tế, mức độ dị hợp tử có thể cao hơn tại một loci nhất định trong nhóm đã qua chọn lọc (ngay cả khi có sự mất đa dạng allele rất lớn) so với trong nhóm chưa qua chọn lọc (Bancroft và *ctv.*, 1995; Pemberton và *ctv.*, 1996). Do đó, đánh giá mức độ đa dạng allele có thể là một chỉ thị tốt hơn mức độ dị hợp tử, để đánh giá ảnh hưởng thực tế của các phương pháp áp dụng trong trại giống lên mức độ đa dạng di truyền trên quần đàn nuôi (Hedgcock và Sly, 1990).

KẾT LUẬN

Sau khi phân tích về dòng cá rô phi đỏ nhập từ Ecuador, Malaysia, Đài Loan và Thái Lan chúng tôi ghi nhận giá trị allele trung bình ở cả bốn dòng là 5 allele trên một locus. Từ kết quả đó, chúng tôi tiến hành so sánh với giá trị allele trung bình của cá rô phi đỏ trong nghiên cứu của tác giả Romana và ctv., (2004) và nhận thấy bốn dòng cá rô phi đỏ mà chúng tôi tiến hành nghiên cứu có giá trị allele trung bình thấp hơn so với giá trị allele trung bình của những dòng cá rô phi đỏ trong nghiên cứu của Romana và đồng tác giả (7 allele trên một locus). Như vậy hai dòng cá rô phi đỏ nghiên cứu trong đề tài có sự thiếu hụt allele, đồng thời cũng có sự thiếu hụt dị hợp tử mong đợi có ý nghĩa ($P = 0,0001$). Bên cạnh đó, chúng tôi nhận thấy bốn dòng cá rô phi đỏ này không có sự khác biệt di truyền lớn. Việc lai chéo giữa các dòng cá rô phi đỏ có thể là phương pháp tốt để tăng đa dạng di truyền và hạn chế tác động tiêu cực của cận huyết nhưng vẫn giữ được các đặc tính tốt của các dòng cá nhập nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Phạm Anh Tuấn. 2004. Công nghệ phục vụ nuôi cá rô phi xuất khẩu - Thuận lợi và khó khăn. *Tạp chí khoa học thủy sản*.

Tài liệu nước ngoài

Bancroft, D. R., Pemberton, J. M., Albon, S. D., Robertson, A., Maccoll, A. D. C., & Smith, J. A. 1995. Molecular genetic variation and individual survival during population crashes of an unmanaged ungulate population. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 347, 263-273.

Hedgecock, D., Sly, F., 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 88, 21-38.

Falconer, D. S. 1989. *Introduction to Quantitative Genetics*. 3rd edn. John Wiley and Sons, New York.

Launey, S., Barre, M., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., 2001. Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostrea*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genet. Res.* 78, 259-270.

Mair, G. 2002. Topical issues in genetic diversity and breeding Genes and Fish. *Aquaculture Asia*, 71, 15-29.

Norris, A. T., Bradley, D. G. & Cunningham, E. P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180, 247-264.

Palti, Y., Shirak, A., Cnaani, A., Hulata, G., Avtalion, R.R., Ron, M. 2002. Detection of genes with deleterious alleles in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture* 206, 151- 164.

Pante, M. J. R., Gjerde, B. & Mcmillan, I. 2001. Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 192, 213-224.

Pemberton, J. M., Smith, J. A., Coulson, T. N., Marshall, T. C., Slate, J., & Paterson, S. 1996. The maintenance of genetic polymorphism in small island populations: large mammals in the Hebrides. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 351, 745-752.

Romana-Eguia, M. R. R., Ikeda, M., Basiao, Z. U. & Taniguchi, N. 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, 236, 131-150.

Saju, J., Lee, W.J. & Orban, L. 2010. Characterization of nine novel microsatellites isolated from Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Conservation Genetics Resources*, 2, 385-387.