

## Genetic characteristics in four farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) populations evaluated by microsatellite markers

Ha T. T. Tran<sup>1\*</sup>, Trang T. Vu<sup>1</sup>, Nam P. Nguyen<sup>2</sup>, Giang T. H. Luu<sup>1</sup>,  
Nhat H. Pham<sup>1</sup>, & Diep H. Nguyen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Aquaculture No. 1, Bac Ninh, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture, Ha Noi, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: May 16, 2019

Revised: October 03, 2019

Accepted: October 07, 2019

#### Keywords

Genetic diversity

Microsatellite

Nile tilapia

#### \*Corresponding author

Trần Thị Thúy Hà

Email: thuyha@rial.org

### ABSTRACT

In this study, genetic characteristics of four tilapia strains including NOVIT4, 13<sup>th</sup> GIFT generation, China and Philippine were investigated by analysis the genotype at 6 microsatellite loci. It was found that all loci showed high polymorphism with 51 identified alleles, in which GM139 and UNH995 loci were the highest polymorphism with the appearance of 14 and 11 alleles, respectively. Deficiency of expected heterozygosity occurred in all tilapia strains, the  $H_o$  value of which was lower than the  $H_e$  one. Besides, 17/24 loci was significantly different from the Hardy-Weinberg principle ( $P < 0,05$ ). The  $F_{st}$  ranging from 0.012 to 0.025 indicated that the genetic difference among populations was small. However, the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic diversity at the molecular level among individuals within the same population and among individuals were high, corresponding to 36.69% and 61%, respectively. The findings of this study are useful in term of giving the genetic information of four Nile tilapia strains for the selective breeding program.

**Cited as:** Tran, H. T. T., Vu, T. T., Nguyen, N. P., Luu, G. T. H., Pham, N. H., & Nguyen, D. H. (2019). Genetic characteristics in four farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) populations evaluated by microsatellite markers. *The Journal of Agriculture and Development* 18(5), 52-61.

## Đặc điểm di truyền một số quần đàn cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) qua phân tích chỉ thị microsatellite

Trần Thị Thúy Hà<sup>1\*</sup>, Vũ Thị Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Nam<sup>2</sup>, Lưu Thị Hà Giang<sup>1</sup>,  
Phạm Hồng Nhật<sup>1</sup> & Nguyễn Hồng Điệp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản I, Bắc Ninh

<sup>2</sup>Khoa Công Nghệ Sinh Học, Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam, Hà Nội

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 16/05/2019

Ngày chỉnh sửa: 03/10/2019

Ngày chấp nhận: 07/10/2019

#### Từ khóa

Cá rô phi vằn  
Đa dạng di truyền  
Microsatellite

#### \*Tác giả liên hệ

Trần Thị Thúy Hà  
Email: thuyha@rial.org

### TÓM TẮT

Đặc điểm di truyền của cá rô phi vằn các dòng NOVIT4, GIFT thể hệ thứ 13, Trung Quốc và Philippine đã được tìm hiểu trong nghiên cứu này qua phân tích kiểu gen tại 06 vị trí microsatellite. Tất cả các vị trí nghiên cứu đều thể hiện tính đa hình cao với 51 alen được xác định, trong đó locus GM139 và UNH995 có tính đa hình alen cao nhất với sự xuất hiện tương ứng 14 và 11 alen. Hiện tượng thiếu hụt dị hợp tử mong đợi xuất hiện ở các dòng cá rô phi nghiên cứu với giá trị Ho thấp hơn He. Di truyền của 17/24 vị trí microsatellite ở bốn dòng cá sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ). Giá trị Fst dao động từ 0,012 đến 0,025 thể hiện sự sai khác di truyền nhỏ giữa các dòng nghiên cứu. Tuy nhiên, kết quả phân tích biến đổi phân tử (AMOVA) thể hiện đa dạng di truyền ở mức độ phân tử giữa các cá thể trong cùng một dòng và giữa các cá thể với nhau là cao, lần lượt đạt 36,69% và 61%. Kết quả nghiên cứu này cung cấp các thông tin di truyền của các dòng cá rô phi vằn phục vụ các nghiên cứu về lựa chọn các quần đàn cá bố mẹ thích hợp khi đưa vào chương trình chọn giống tiếp theo.

### 1. Đặt Vấn Đề

Cá rô phi là đối tượng thủy sản nước ngọt quan trọng trên thế giới và ở Việt Nam. Chọn giống cá rô phi đã thực hiện từ rất sớm, như chọn giống cá rô phi sinh trưởng nhanh, chịu lạnh, và màu sắc. Thông thường, trước khi thực hiện chương trình chọn giống, tìm hiểu đặc điểm di truyền của các quần đàn ban đầu là cần thiết và sẽ góp phần phục vụ công tác lai tạo có hiệu quả.

Cho đến nay, đã có không ít nghiên cứu sử dụng chỉ thị microsatellite trong đánh giá đa dạng di truyền trên cá rô phi. Hassanien & Gilbey (2005) nghiên cứu đa dạng di truyền của 5 quần đàn cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) qua phân tích kiểu gen của 6 chỉ thị microsatellite. Kết quả cho thấy các chỉ thị này rất hữu hiệu trong đánh giá đa dạng và ứng dụng trong chọn lọc các tính trạng chọn giống mong muốn. Bên cạnh đó, Boris & ctv. (2011) đã sử dụng 5 microsatellite (UNH106, UNH222, UNH172, UNH123 và UNH216) nghiên

cứu đặc điểm di truyền của cá rô phi đen (*O. mossambicus*) và đã chọn lọc được các đàn cá vật liệu ban đầu cho chọn giống.

Ở Việt Nam, việc phân tích đa dạng di truyền sử dụng chỉ thị microsatellite đã được thực hiện trên một số đàn cá rô phi. Nghiên cứu sử dụng 04 chỉ thị microsatellite đánh giá 16 tổ hợp lại từ 4 dòng cá rô phi vằn (dòng Thái Lan, Đài Loan, Israel và dòng cá chọn giống NOVIT-4), đã lựa chọn 5/16 tổ hợp lại để hình thành vật liệu ban đầu phục vụ chọn giống cá rô phi (Tran & ctv., 2013). Bên cạnh đó, Nguyen & ctv. (2014) đã sử dụng ba dòng cá rô phi GIFT, Đài Loan và NOVIT4 làm vật liệu ban đầu để chọn giống cá có khả năng chịu mặn (15 - 20 ppt). Sau bốn thế hệ chọn lọc, giá trị chọn giống cho tính trạng trọng lượng tăng dao động từ 1,1 - 1,6.

Trong các nghiên cứu trên, chỉ thị phân tử microsatellite được sử dụng nhiều do có tính ưu việt (Liu & Cordes, 2004). Microsatellite có tính đa hình rất cao, là marker đồng trội và tuân theo

định luật Mendel. Vì vậy, hiệu quả và độ chính xác của những phép tính di truyền quần thể dựa trên chỉ thị này so với một số chỉ thị phân tử khác được tăng lên. Vị trí của microsatellite có thể dễ dàng xác định bằng PCR từ một lượng DNA rất nhỏ. Ở cá, một microsatellite được tìm thấy trên mỗi 1,87 kb của DNA. Bên cạnh đó, với số lần lặp lớn ( $\geq 10$ ), trình tự lặp lại thường đơn giản (2 - 4 nucleotide), microsatellite đã và đang được sử dụng nhiều trong nuôi trồng thủy sản (Deepak & ctv., 2017).

Nghiên cứu này đánh giá đa dạng di truyền 4 dòng cá rô phi vằn dựa trên 6 chỉ thị microsatellite theo các nghiên cứu của Hassanien & Gilbey (2005) và Boris & ctv. (2011). Kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở cho việc hình thành quần đàn ban đầu phục vụ công tác chọn giống.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu cá rô phi vằn được thu từ 4 quần đàn cá rô phi có nguồn gốc khác nhau, đang được nuôi giữ tại Trung tâm chọn giống cá rô phi Quảng Nam, thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I (Viện NCNT Thủy sản I), bao gồm: Cá rô phi vằn dòng NOVIT-4 thế hệ thứ 12; Cá rô phi vằn chọn giống dòng GIFT thế hệ thứ 13; Cá rô phi vằn chọn giống sinh trưởng nhanh dòng Trung Quốc và dòng Philippine.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu mẫu

Mẫu vây ngực được thu từ 4 quần đàn cá rô phi (30 cá thể/quần đàn), bảo quản trong cồn 98% và vận chuyển về phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Trung tâm Công nghệ sinh học Thủy sản, Viện Nghiên cứu Nuôi Trồng Thủy Sản I. Mẫu được giữ ở 4°C cho đến khi phân tích.

#### 2.2.2. Tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Sambrook & Russell (2001). DNA tổng số được kiểm tra định tính bằng cách điện di trên thạch agarose 0,8% trong dung dịch đệm TBE 1×, dưới hiệu điện thế 120 V, 60 mA, 30 phút. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được xác định bằng máy Nanodrop 2000C. Lượng DNA mỗi lần đo là 1  $\mu$ L. DNA được coi là sạch protein

và RNA nếu có các chỉ số như sau:  $OD_{260/280} = 1,8 - 2,0$ ;  $OD_{260/230} = 1,8 - 2,2$ .

#### 2.2.3. Tối ưu phản ứng PCR

Lựa chọn chỉ thị microsatellite: Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn 6 chỉ thị microsatellite: UNH136, UNH104, UNH203, UNH103, UNH995, GM139 (Bảng 1). Các chỉ thị được lựa chọn dựa vào kết quả của các nghiên cứu trước đây, tính đa hình của các chỉ thị và không có sự sai khác với quy luật di truyền Hardy-Weinberg.

Tối ưu phản ứng PCR: Phản ứng PCR được tối ưu dựa vào quy trình của bộ kit 2× Master mix (Thermo Scientific). Thành phần phản ứng trong thể tích 25  $\mu$ L gồm: 1  $\mu$ L (50 - 100 ng) DNA khuôn; 5  $\mu$ L PCR Master; 1  $\mu$ L mỗi 10× mỗi loại và 17  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O khử trùng. Phản ứng được tiến hành trên máy PCR Mastercycler proS (Eppendorf) với các điều kiện của phản ứng như sau: biến tính sợi khuôn ở 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, Ta (°C) trong 45 giây, 72°C trong 1 phút); 72°C trong 10 phút và giữ ở 4°C. Tuy nhiên, các điều kiện trên sẽ được điều chỉnh tối ưu để phù hợp với nhiệt độ gắn mỗi của từng môi cụ thể phụ thuộc vào đặc tính của môi và được trích dẫn ở Bảng 1.

#### 2.2.4. Phản ứng phân tích đoạn

Phân tích đoạn được thực hiện trên hệ thống phân tích di truyền đa năng GenomeLab GeXP (Beckman Coulter). Sản phẩm PCR được pha loãng theo tỷ lệ 1  $\mu$ L sản phẩm PCR với 3  $\mu$ L nước tinh khiết. Chuẩn bị dung dịch hỗn hợp cho 8 mẫu phân tích đoạn bao gồm: 240  $\mu$ L SLS (Solution Loading Sample) và 2  $\mu$ L Size Standard 600, trộn đều. Sau đó lấy 29  $\mu$ L dung dịch hỗn hợp vào mỗi giếng trên đĩa mẫu. Thêm 1  $\mu$ l sản phẩm PCR đã được pha loãng vào mỗi giếng, trộn đều. Thêm 1 giọt dầu lên trên mỗi giếng chứa mẫu.

#### 2.2.5. Phân tích số liệu

Mẫu sau khi chạy xong được ghi nhận alen bằng phần mềm GeneMarker V.2.2.0. Các thông số di truyền (tần số alen, số alen ở mỗi vị trí microsatellite, Ho, He, Fis và HWE test) được phân tích bằng phần mềm GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006). Mức độ đa hình của các locus microsatellite (PIC) được tính dựa trên Website online: PIC calculator. Nghiên cứu biến dị di

**Bảng 1.** Chỉ thị microsatellite sử dụng đánh giá đa dạng di truyền cá rô phi vằn

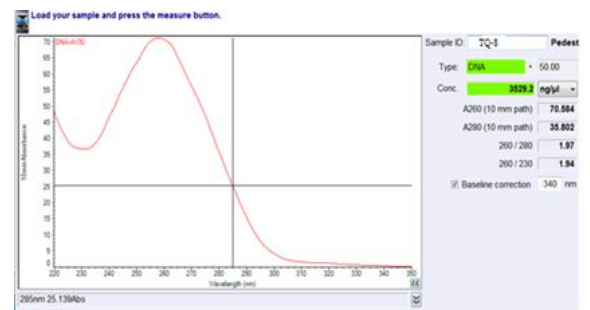
Môi	Trình tự motif (5'-3')	Kiểu lặp	Ta (°C)	Kích thước dự kiến (bp)	Số hiệu GenBank	Tác giả
UNH136	F: TGTGAGAATTCACATATCACTA R: TACTCCAGTGACTCCTGA	(CA) <sub>n</sub>	44,8	173	G12288.1	Ukenye & ctv., 2016
UNH104	F: GCAGTTATTTGTGGTCACTA R: GGTATATGTCTAACTGAAATCC	(CA) <sub>n</sub>	43,7	138 - 189	G12257.1	Cnaani & Kocher, 2008
UNH203	F: CACAAGAAGATGCTAAACATGT R: GAATTTGACAGTTTGTGTTTAC	(CA) <sub>n</sub>	43,4	103	G12354.1	Fessehaye & ctv., 2006
UNH995	F: CCAGCCCTTCGCATAAAGAC R: GAATTTGACAGTTTGTGTTTAC	(CA) <sub>n</sub>	52,6	137 - 236	G68274.1	Carleton & ctv., 2002
GM139	F: GTGGGATCTACCAAGAAGAG R: TTTGAGTAACCCACCTAACAC	(GT) <sub>n</sub>	48,2	155 - 267	BV005327.1	Cnaani & Kocher, 200
UNH103	F: CAATGTCCATCCTTCCT R: CTGCTGACTGCAAATGTAA	(CA) <sub>n</sub>	45,8	171 - 260	G12256.1	Lee & ctv., 2005

truyền qua chỉ số FST và khoảng cách di truyền của các quần đàn được kiểm định bằng phân tích AMOVA trên phần mềm Arlequin 3.1 (Excoffier & ctv., 1992).

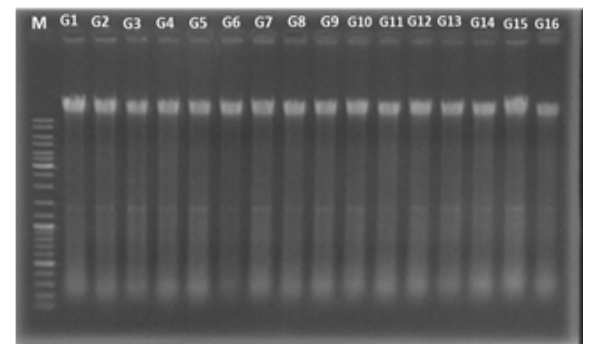
**3. Kết Quả và Thảo Luận**

**3.1. Kết quả DNA tổng số**

Kết quả kiểm tra định lượng DNA (Hình 1) cho thấy các mẫu DNA tổng số có nồng độ dao động trong khoảng 60 ng/μL đến 3.108 ng/μL. Nồng độ DNA khác nhau là do chất lượng và lượng mẫu đầu vào khác nhau. Tỷ lệ OD260/280 và OD260/230 của tất cả các mẫu đều dao động trong khoảng cho phép là 1,8 đến 2,2; chứng tỏ DNA không lẫn tạp protein và RNA. Kết quả điện di (Hình 2) đều cho các băng DNA sáng rõ, đảm bảo tốt cho phản ứng khuếch đại DNA (PCR).



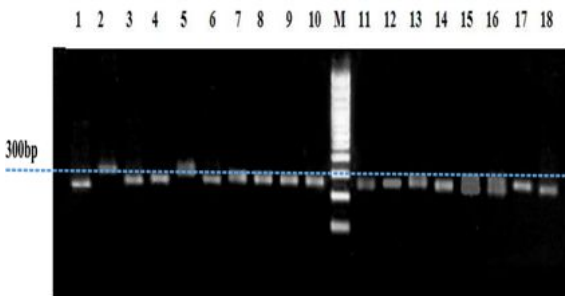
**Hình 1.** Kết quả định lượng và kiểm tra độ tinh sạch của DNA tổng số mẫu TQ-5 (Trung Quốc-5).



**Hình 2.** Kết quả điện di DNA tổng số mẫu cá rô phi dòng GIFT trên gel agarose 0,8%. M: ladder 1kb, G1 đến G16 là DNA tổng số của cá rô phi dòng GIFT mẫu số 1 đến mẫu số 16.

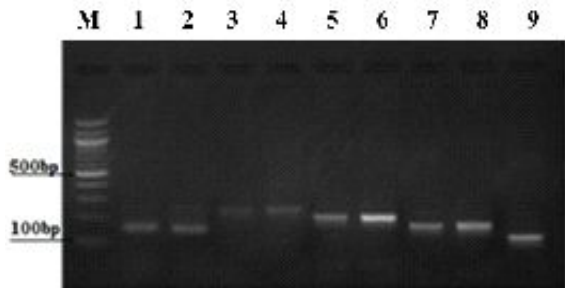
### 3.2. Tối ưu phản ứng PCR

Kết quả tối ưu PCR cho thấy 6 môi cho băng vạch sáng, rõ nét và không có sản phẩm phụ. Sản phẩm PCR có kích thước nằm trong khoảng 100-300 bp và phù hợp với kích thước dự kiến trong các nghiên cứu trước đây của Kocher & ctv. (1998); Pham & Quyen (2008); Nguyen & Luu (2013). Theo đó sản phẩm PCR mỗi GM139 và các môi UNH104, UNH103, UNH995, UNH136, UNH203 kích thước nằm trong khoảng như được trình bày ở Bảng 1 và minh họa ở Hình 3 và 4.



**Hình 3.** Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại bằng chỉ thị GM139 trên gel agarose 2%.

Giếng 1-10: sản phẩm PCR dòng GIFT; Giếng 11 - 18: sản phẩm PCR dòng Trung Quốc; M: ladder 100 bp



**Hình 4.** Kết quả điện di sản phẩm PCR với mỗi huỳnh quang trên gel agarose 2%.

Giếng M: ladder 100 bp; Giếng 1,2: sản phẩm PCR mỗi UNH 104; Giếng 3,4: sản phẩm PCR mỗi UNH 103; Giếng 5,6: sản phẩm PCR mỗi UNH 995; Giếng 7,8: sản phẩm PCR mỗi UNH 136; Giếng 9: sản phẩm PCR mỗi UNH 203.

### 3.3. Kết quả phân tích đoạn trên hệ thống GenomeLab GeXP

Nghiên cứu đã xác định được kích thước các alen của từng vị trí microsatellite mẫu phân tích

và được biểu thị bằng hình ảnh tín hiệu đồ. Hình ảnh tín hiệu đồ rõ nét và không nhiễu. Đối với các cá thể đồng hợp sẽ quan sát được duy nhất 1 đỉnh tín hiệu đồ. Ngược lại, với các cá thể dị hợp sẽ quan sát được 2 đỉnh của tín hiệu đồ riêng rẽ tương ứng với 2 alen tách biệt (Hình 5).

### 3.4. Đa dạng di truyền của các quần đàn cá rô phi vằn

#### 3.4.1. Đa hình các locus microsatellite (SSR)

- Tần số alen và độ đa dạng của alen

Kết quả 6 locus microsatellite (Bảng 2) trong nghiên cứu đều thể hiện tính đa hình cao với tổng cộng 51 alen được xác định, kích thước dao động từ 100 - 300 bp. Trong đó, 2 locus GM139 và UNH995 có tính đa hình alen cao nhất với sự xuất hiện tương ứng 14 alen và 11 alen; ít nhất là 3 alen tại locus UNH136. Nhìn chung, số lượng alen của từng locus SSR là nhiều hơn so với các nghiên cứu trước đây trên cá rô phi ở trong nước. Cụ thể, số alen tại locus UNH104 trong nghiên cứu của Pham & Quyen (2008) là 3 alen, trong nghiên cứu của Nguyen & Luu (2013) là 4 alen trên cá rô phi vằn.

Bên cạnh các alen xuất hiện với tần số cao, có một số alen hiếm, xuất hiện với tần số thấp. Cụ thể, tại locus UNH995, alen 172; alen 160 và alen 186 chỉ xuất hiện tương ứng ở quần đàn NOVIT-4, Trung Quốc và Philippin. Sự khác biệt này có thể do trong các chương trình chọn giống; như chọn giống sinh trưởng, chịu lạnh trên dòng NOVIT-4; chọn giống sinh trưởng nhanh trên dòng Philippin và Trung Quốc đã xuất hiện những alen mới khác biệt với các quần đàn chọn giống ban đầu thể hiện sự thích nghi với điều kiện môi trường. Bên cạnh đó, có thể do quá trình đột biến, tái tổ hợp, trôi dạt di truyền và chọn lọc tự nhiên. Với tần số xuất hiện rất thấp trong quần đàn, các alen này có thể dễ dàng mất đi nếu không có sự lai tạo để duy trì hoặc cũng có thể tạo ưu thế lai cho thế hệ sau nếu tiếp tục chọn lọc. Sự xuất hiện của các alen có tần số thấp ở tất cả các locus phân tích cũng xuất hiện trong nghiên cứu của Bui & ctv. (2011).

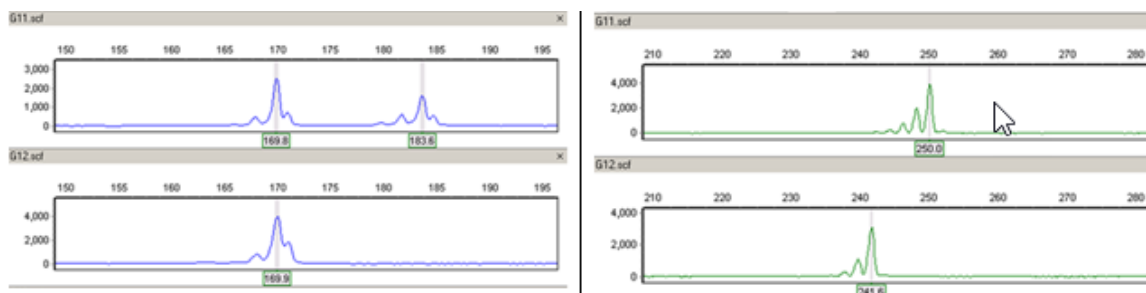
- Mức độ đa hình của mỗi locus, PIC

Chỉ số PIC thường được sử dụng trong di truyền học như một thước đo tính đa hình của các chỉ thị (Shete & ctv., 2000). Theo Botstein & ctv. (1980), PIC là chỉ số về mức độ biến đổi di truyền; PIC > 0,5 được coi là có mức độ đa hình cao; 0,25

**Bảng 2.** Đặc điểm đa dạng di truyền của 4 quần đàn cá rô phi vằn

Quần đàn	Locus	N	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	PIC	F <sub>is</sub>	HWE test
GIFT	UNH136	28	1	1,000	0,000	0,000	0	0,000	ns
	UNH104	29	7	3,468	0,310	0,712	0,666	0,565	***
	UNH203	28	5	3,516	0,500	0,716	0,675	0,302	*
	UNH103	30	8	6,593	0,933	0,848	0,830	-0,100	*
	UNH995	24	8	3,972	0,792	0,748	0,715	-0,059	*
	GM139	26	10	6,288	0,846	0,841	0,819	-0,006	ns
Trung bình ± SE		27,50 ± 0,89	6,5 ± 0,13	4,14 ± 0,84	0,56 ± 0,15	0,64 ± 0,13	0,62 ± 0,31	0,117	
Trung Quốc	UNH136	29	3	1,190	0,172	0,160	0,151	-0,075	ns
	UNH104	29	6	3,649	0,483	0,726	0,684	0,335	**
	UNH203	29	5	3,602	0,483	0,722	0,682	0,331	*
	UNH103	24	7	6,295	0,708	0,841	0,821	0,158	***
	UNH995	24	8	3,918	0,583	0,745	0,708	0,217	ns
	GM139	25	9	4,941	0,520	0,798	0,775	0,348	ns
Trung bình ± SE		26,67 ± 1,05	6,33 ± 0,88	3,93 ± 0,69	0,49 ± 0,07	0,67 ± 0,10	0,64 ± 0,24	0,219	
Philippin	UNH136	28	2	1,036	0,036	0,035	0,034	-0,029	ns
	UNH104	30	6	3,333	0,367	0,700	0,663	0,476	***
	UNH203	30	6	4,787	0,667	0,791	0,760	0,157	ns
	UNH103	25	9	7,143	0,560	0,860	0,844	0,349	***
	UNH995	27	6	4,326	0,889	0,769	0,735	-0,156	ns
	GM139	26	11	5,956	0,731	0,832	0,789	0,121	ns
Trung bình ± SE		27,67 ± 0,84	6,67 ± 1,26	4,43 ± 0,87	0,54 ± 0,12	0,67 ± 0,13	0,64 ± 0,33	0,153	
NOVIT4	UNH136	28	2	1,036	0,036	0,035	0,034	-0,029	ns
	UNH104	30	9	4,891	0,467	0,796	0,769	0,413	**
	UNH203	28	7	5,244	0,429	0,809	0,783	0,470	**
	UNH103	26	8	5,302	0,731	0,811	0,782	0,099	*
	UNH995	28	9	4,962	0,821	0,798	0,773	-0,029	ns
	GM139	30	9	5,325	0,767	0,812	0,794	0,055	ns
Trung bình ± SE		28,33 ± 0,62	7,33 ± 1,12	4,46 ± 0,69	0,54 ± 0,12	0,68 ± 0,13	0,66 ± 0,30	0,163	

N: số mẫu nghiên cứu; N<sub>a</sub>: số alen trên locus; N<sub>e</sub>: số alen hiệu quả; H<sub>o</sub>: dị hợp tử quan sát; H<sub>e</sub>: dị hợp tử mong đợi; PIC: mức độ đa hình; F<sub>is</sub>: Hệ số cận huyết; \*Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy - Weinberg (P < 0,05). \*\*Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy - Weinberg (P < 0,01). \*\*\*Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy - Weinberg (P < 0,001). ns: Sai khác không có ý nghĩa so với định luật Hardy - Weinberg.



**Hình 5.** Kết quả phân tích đoạn locus UNH995 (trái) và locus GM139 (phải) trên hai mẫu cá rô phi dòng GIFT (G11 và G12)

$< PIC < 0,5$  là có mức độ đa hình trung bình; và  $PIC < 0,25$  là mức độ đa hình nhỏ. Trong nghiên cứu này, chỉ số PIC dao động trong khoảng 0,6 - 0,8; trung bình là 0,68; 5 locus có mức độ đa hình cao và chỉ duy nhất locus UNH136 có mức độ đa hình nhỏ (dao động từ 0 - 0,1); có thể do locus này có mức độ đa dạng alen thấp (chỉ có một đến ba alen trong quần đàn). Do đó, 5 locus UNH103, UNH104, UNH203, UNH995 và GM139 phù hợp để sử dụng trong đánh giá đặc điểm đa dạng di truyền quần thể và xác định sự khác biệt về di truyền. Sun & ctv. (2015) đã nghiên cứu trên tổng số 120 chỉ thị SSRs, phát hiện 18 locus có tính đa hình cao (giá trị PIC trung bình là 0,5) được chọn để thử nghiệm tương quan với khả năng sinh trưởng ở một loài cá biển (Mandarin fish). Trong nghiên cứu đánh giá đa dạng các quần đàn cá rô phi tại tỉnh Quảng Châu, Trung Quốc đã sử dụng 10 locus microsatellite, trong đó 8 locus microsatellite có mức độ đa hình locus cao và 02 locus có mức độ đa hình locus vừa phải và cả 10 locus này đều được chọn để đánh giá đa dạng di truyền các quần đàn rô phi, trong đó có locus UNH995 (Gu & ctv., 2014).

### 3.4.2. Đa dạng di truyền của quần thể

- Tính dị hợp tử

Bảng 2 cho thấy, tất cả các locus ở 4 dòng cá rô phi đều có sự thiếu hụt dị hợp tử mong đợi, giá trị dị hợp tử quan sát ( $H_o$ ) thấp hơn giá trị dị hợp tử mong đợi ( $H_e$ ). Cụ thể, giá trị  $H_o$  trung bình của dòng GIFT, Trung Quốc, Philippine và NOVIT-4 lần lượt là 0,56; 0,49; 0,54; 0,54 tương ứng với giá trị  $H_e$  trung bình là 0,64; 0,67; 0,67; 0,68. Sự thiếu hụt dị hợp tử thường xuyên được đề cập trong các nghiên cứu trên đối tượng thủy sản qua phân tích kiểu gen bằng chỉ thị microsatellite (Launey &

ctv., 2001). Điều này có thể giải thích do giao phối cận huyết trong các chương trình chọn giống, nên xuất hiện các alen lặn. Sự xuất hiện của các alen “câm” hay lỗi trong phản ứng khuếch đại cũng có thể là nguyên nhân (Cruz & ctv., 2004). Các giá trị  $H_o$  và  $H_e$  trong nghiên cứu này tương đương so với nghiên cứu của Pham & Quyên (2008) khi xem xét sự biến đổi di truyền của các quần đàn cá rô phi vằn dòng GIFT, Đài Loan và Viện 1 sử dụng 4 cặp mồi UNH216; UNH104; UNH124 và IGF - MS03 (giá trị  $H_o$ ,  $H_e$  dao động tương ứng 0,64 - 0,69; 0,56 - 0,83).

- Hệ số cận huyết

Lai cận huyết là việc sinh ra con từ việc lai tạo của các cá thể hoặc sinh vật có quan hệ gần gũi về mặt di truyền. Hệ số cận huyết ( $Fis$ ) là xác suất để hai alen ở bất kỳ locus nào giống hệt nhau do có nguồn gốc từ một tổ tiên chung. Giá trị  $Fis$  dao động từ 0 đến 1.  $Fis$  bằng 0 có nghĩa quần thể đang ở trạng thái cân bằng Hardy-Weinberg hay nói cách khác là quần thể không có giao phối hay lai cận huyết.  $Fis < 0$  trong trường hợp có quá nhiều dị hợp tử quan sát được ( $H_o$ ) (Wright, 1950; Kincaid, 1983). Trong nghiên cứu này, giá trị  $Fis$  trung bình từ 6 locus của 4 dòng cá rô phi nhìn chung là thấp, có nghĩa là mức độ cận huyết thấp. Các giá trị  $Fis$  lần lượt là 0.117 (dòng GIFT); 0.153 (dòng Philippin); 0.163 (dòng NOVIT4) và 0.219 (dòng Trung Quốc) (Bảng 3).

- Cân bằng Hardy-Weinberg (HW)

Di truyền của 17/24 microsatellite trên các dòng cá nghiên cứu sai khác có ý nghĩa so với định luật cân bằng HW ( $P < 0,05$ ) (Bảng 2). Trong đó, di truyền của 3 locus UNH995 và GM139 và UNH136 đều lệch khỏi cân bằng HW ở cả bốn dòng cá nghiên cứu. Sự cân bằng HW trong quần đàn có ý nghĩa rất quan trọng trong xác định

**Bảng 3.** Hệ số sai khác di truyền ( $F_{ST}$ ) giữa các dòng cá rô phi vằn

GIFT	Trung Quốc	Philippine	NOVIT 4	
0,000				GIFT
0,025	0,000			Trung Quốc
0,018	0,012	0,000		Philippine
0,016	0,018	0,016	0,000	NOVIT 4

**Bảng 4.** Kết quả phân tích phương sai phân tử (AMOVA) của các quần đàn nghiên cứu dựa trên dữ liệu của 6 locus microsatellite

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Thành phần biến động	Phần trăm biến động
Giữa các quần đàn	3	6,042	0,01704 $V^a$	2,31
Giữa các cá thể trong một quần đàn	116	115,00	0,27069 $V_b$	36,69
Giữa các cá thể	120	54,000	0,45000 $V_c$	61,00
Tổng	239	175,042	0,73773	

tần số alen lặn, tần số của các “thể mang” và trong đánh giá di truyền thế hệ sau của quần đàn. Theo Nei (1978), lạc dòng di truyền, giao phối cận huyết, cách ly địa lý có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến không cân bằng di truyền của một quần đàn. Trong nghiên cứu này, locus UNH136 có mức độ đa hình các alen thấp, mức độ dị hợp tử thấp có thể là nguyên nhân làm mất cân bằng HW. Ở 2 locus UNH995 và GM 139 đều xuất hiện những alen có tần số rất thấp. Những alen này có thể dễ dàng mất đi nếu không có cách thức duy trì và quản lý tốt. Việc lai tạo giữa các dòng cá rô phi có nguồn gốc khác nhau là một giải pháp hữu hiệu giúp duy trì đa dạng alen và có thể phục hồi một phần sự đa dạng di truyền mất đi cũng như hạn chế mức độ cận huyết như đề xuất của Freitas & ctv. (2007) và Zou & ctv. (2015). Tình trạng mất cân bằng HW của các dòng cá rô phi chọn giống cũng được đề cập trong nghiên cứu của Bui & ctv. (2011) trên cá rô phi đỏ, với tất cả các dòng trên tất cả các locus nghiên cứu đều lệch khỏi định luật HW.

• Quan hệ di truyền và hệ số sai khác di truyền ( $F_{ST}$ )

Sự khác biệt về di truyền các quần thể thường được đánh giá dựa trên khoảng cách di truyền giữa chúng (Nei, 1987; Laval & Claude, 2002) và hệ số sai khác di truyền  $F_{ST}$  của Wright (1969). Theo Nei (1972) nếu giá trị  $F_{ST} < 0,05$  được cho là sai khác di truyền nhỏ;  $0,05 < F_{ST} < 0,15$  được cho là sai khác di truyền trung bình và  $F_{ST} > 0,15$  được cho là sai khác di truyền rõ rệt.

Bảng 3 cho thấy giá trị  $F_{ST}$  dao động từ 0,012 đến 0,025; không có sự sai khác di truyền lớn

giữa các quần đàn nghiên cứu. Quần đàn Trung Quốc và Philippin có quan hệ di truyền gần gũi hơn so với các quần đàn còn lại. Kết quả báo cáo của Bui & ctv. (2011) sử dụng 6 microsatellite (OM02; OM05; UNH216; UNH231; UNH159; UNH172) cũng cho thấy giá trị  $F_{ST}$  không có sự khác biệt di truyền có ý nghĩa giữa bốn dòng cá rô phi trong nghiên cứu. Theo Freitas & Galetti (2005) và Refstie & Gjedrem (2005) nhân giống dựa vào kiểu hình và giao phối cận huyết đã góp phần thúc đẩy đáng kể tạo nên sự tương đồng di truyền giữa các quần thể.

AMOVA là một phương pháp để phát hiện mức độ khác biệt di truyền giữa các quần thể khác nhau sử dụng các chỉ thị phân tử (Excoffier & ctv., 1992). Kết quả phân tích AMOVA (Bảng 4) cho thấy, đa dạng di truyền mức độ phân tử cao giữa các cá thể trong cùng một quần đàn (36,69%) và giữa các cá thể với nhau (61,00%). Mức độ đa dạng giữa 4 quần thể cá rô phi vằn tương đối thấp (2,31%). Điều này cho thấy không có cấu trúc quần thể rõ ràng ở 4 quần đàn nghiên cứu và hầu như không có sự biến đổi di truyền trên các locus được khảo sát. Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với kết quả của Eguia & ctv. (2004) và Boris & ctv. (2011) trên quần thể cá rô phi vằn và cá rô phi đỏ chọn giống có khác biệt di truyền thấp.

Qua đánh giá mức độ khác biệt di truyền giữa các quần thể và các cá thể, việc lai chéo giữa các cá thể khác nhau trong cùng hoặc khác quần thể là một giải pháp tối ưu nâng cao đa dạng di truyền và hạn chế tác động tiêu cực của cận huyết cũng như nâng cao ưu thế lai, những đặc tính tốt (sinh trưởng, chịu lạnh) của các dòng cá rô phi



vẫn trong nghiên cứu.

#### 4. Kết Luận

Trong nghiên cứu này 5 locus (UNH103, UNH104, UNH203, UNH995 và GM139) có tính đa hình cao với tổng số alen là 7-14 alen, mức độ đa hình các locus cao (chỉ số PIC trung bình là 0,6). Một số alen hiếm xuất hiện tần số thấp ở dòng cá NOVIT-4, Trung Quốc và Philippin. Sự sai khác di truyền của 4 quần đàn cá rô phi không rõ rệt, hệ số sai khác di truyền nhỏ. Bốn dòng cá rô phi đều có sự thiếu hụt dị hợp tử ở tất cả các locus do giá trị dị hợp tử quan sát (Ho) nhỏ hơn giá trị dị hợp tử mong đợi (He). Kết quả phân tích AMOVA thể hiện đa dạng di truyền ở mức độ phân tử giữa các cá thể trong cùng một quần đàn và giữa các cá thể với nhau là cao. Như vậy, 4 quần đàn cá rô phi vẫn sử dụng trong nghiên cứu này đều có tính đa dạng di truyền ở mức độ trung bình và chênh lệch không đáng kể. Kết quả này là cơ sở khoa học về di truyền phục vụ các nghiên cứu về chọn dòng cá bố mẹ thích hợp trong chương trình chọn giống.

#### Lời Cám Ơn

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu chọn giống nâng cao tốc độ tăng trưởng của cá rô phi vân *Oreochromis niloticus*” – Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm chọn giống cá rô phi Quảng Nam đã hỗ trợ thu mẫu cá để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Boris, B. R., Xenia, C. O., & Marcela, S. V. (2011). Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. *Revista MVZ Córdoba* 16(2), 2491-2498.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32(3), 314-331.
- Bui, T. L. H., Le, C., Nguyen, D., & Trinh, Q. T. (2011). Genetic diversity of Red Tilapia (*Oreochromis* spp) by microsatellite. *Collection of 35 years of Research Institute for Aquaculture No.2*. Ha Noi, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Carleton, K. L., Streelman, J. T., Lee, B. Y., Garnhart, N., Kidd, M., & Kocher, T. D. (2002). Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics* 33(2), 140-144.
- Cnaani, A., & Kocher, T. D. (2008). Sex-linked markers and microsatellite locus duplication in the cichlid species *Oreochromis tanganyicae*. *Biology letters* 4(6), 700-703.
- Cruz, A. M., Mills, K., Rodriguez, F., Schoua, C., Yurrita, M. M., Molina, E., Palmieri, M., & Black, W. C. (2004). Gene flow among *Anopheles albimanus* populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71(3), 350-359.
- Deepak, J., Ram, R. N., & Pushpa. (2017). Microsatellite markers and their application in fisheries International *Journal of Advances in Agricultural Science and Technology* 4 (10), 67-104.
- Eguia, M. R., Ikeda, M., U Basiao, Z., & Taniguchi, N. (2004). Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated fro microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236(1),131-150.
- Excoffier, L. E., Smouse, P., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction Data. *Genetics* 131(2), 479-491.
- Fessehaye, Y., Elbialy, Z., Rezk, M. A., Crooijmans, R. P., Bovenhuis, H., & Komen, H. (2006). Mating systems and male reproductive success in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: A microsatellite analysis. *Aquaculture* 256(1),148-158.
- Freitas, P. D., & Galetti, P. M. (2005). Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *African Journal of Biotechnology* 4, 1362-1367.
- Freitas, P. D., Calgaro, M. R., & Galetti Jr, P. M. (2007). Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. *Brazilian Journal of Biology* 67(4), 939-943.
- Gu, D., Mu, X., Song, H., Luo, D., Xu, M., Luo, J., & Hu, Y. C. (2014). Genetic diversity of invasive *Oreochromis* spp. (tilapia) populations in Guangdong province of China using microsatellite markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 55, 198-204.
- Hassanien, H. A., & Gilbey, J. (2005). Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research* 36(14), 1450-1457.
- Kincaid, H. L. (1983). Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture* 33(1), 215-227.
- Kocher, T. D., Lee, W. J., Sobolewska, H., Penman, D., & McAndrew, B. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148(3), 1225-1232.

- 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(3), 259-270.
- Laval, G., & Claude, C. (2002). Measuring genetic distances between breeds: Use of some distances in various short term evolution models. *Genetics Selection Evolution* 34(4), 481-507.
- Lee, B. Y., Lee, W. J., Streelman, J. T., Carleton, K. L., Howe, A. E., Hulata, G., Slettan, A., Stern, J. E., Terai, Y., & Kocher, T. D. (2005). A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics* 170(1), 237-244.
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238(1), 1-37.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic* 89(3), 585-590.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between population. *American Naturalist* 106, 283-292.
- Nguyen, H. N., & Luu, T. H. G. (2013). Genetic study of microsatellite markers on hybrid tilapia producing all male fish. *Journal of Agriculture and Rural Development* 2, 71-76.
- Nguyen, H. N., Ngo, P. T., Knibb, W., & Nguyen, H. N. (2014). Selection for enhanced growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water (15-20ppt) in Vietnam. *Aquaculture* 428-429, 1-6.
- Peakall, R. & Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1), 288-295.
- Pham, T. A., & Quyen, T. D. (2008). Comparison of microsatellite polymorphism on Prl-1 promoter gene and growth in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in salt water. *Journal of Science and Development* VI(4), 348-352.
- Refstie, T., & Gjedrem, T. (2005) Reproductive traits in aquatic animals. In: Gjedrem T. (Ed.) *Selection and breeding programs in aquaculture*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shete, S., Tiwari, H., & Elston, R. C. (2000). On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical Population Biology* 57(3), 265-271.
- Sun, L., Li, J., Liang, X., Yi, T., Fang, L., Sun, J., & Yang, M. (2015). Microsatellite DNA markers and their correlation with growth traits in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Genetics and Molecular Research* 14(4), 19128-19135.
- Tran, H. T. T., Vu, T. T., Nguyen, T. H., & Nguyen, H. N. (2013). Assessment of genetic characteristics for tilapia combinations (*Oreochromis niloticus*) by microsatellite markers. National Biotechnology Conference (854-858). Ha Noi, Vietnam.
- Ukenye, E. A., Taiwo, I. A., Oguntade, O. R., Oketoki, T. O., & Usman, A. B. (2016). Molecular characterization and genetic diversity assessment of Tilapia guineensis from some coastal rivers in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 15(1), 20-28.
- Wright, S. (1969). Evolution and the genetics of populations, volume 2: The theory of gene frequencies. University of Chicago Press.
- Wright, S. (1950). Genetic structure of populations. *British Medical Journal* 2(4669), 36-36.
- Zou, Z., Li, D., Zhu, J., Han, J., Xiao, W., Yang, H. (2015). Genetic variation among four bred populations of two tilapia strains, based on mitochondrial D-loop sequences. *Mitochondrial DNA* 26(3), 426-430.