

Ứng dụng chỉ thị phân tử microsatellite trong truy xuất phả hệ quần đàn cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chọn giống

Trần Thị Phương Dung^{1,2*}, Nguyễn Hồng Lộc³, Nguyễn Hoàng Thông³,
Lê Hoàng Khôi Nguyên⁴, Nguyễn Văn Sáng³

¹Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II

⁴Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 22/7/2021; ngày chuyển phản biện 26/7/2021; ngày nhận phản biện 26/8/2021; ngày chấp nhận đăng 31/8/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu sử dụng bộ chỉ thị gồm 10 microsatellite để truy xuất phả hệ quần đàn cá tra chọn giống thế hệ đầu tiên. Kết quả cho thấy: (1) Khi phân tích 50 mẫu cá tra bố mẹ G0 và 50 mẫu cá con G1 thì hiệu suất PCR đạt 98-100% và số lượng alen (N_A) dao động 5-14 mỗi locus. Hệ số đa dạng di truyền (PIC) trung bình của các microsatellite trên G0 và G1 lần lượt là 0,71 và 0,67, trung bình tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_o) và tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_e) trên tất cả các locus lần lượt là 0,73, 0,76, 0,73, 0,71. 10 microsatellite khảo sát đều ổn định và đa hình phù hợp với việc truy xuất phả hệ; (2) Sau khi sàng lọc các chỉ thị và truy xuất phả hệ trên 50 gia đình cá chọn giống cho thấy bộ chỉ thị với 9 microsatellite (loại trừ Pahy-02) truy xuất phả hệ cao, đạt được truy xuất bố mẹ chính xác 93,4%, trong đó truy xuất các gia đình con bố không có half-sib đạt 93,0% và các gia đình con bố có half-sib đạt 94,0%. Qua các kết quả cho thấy, bộ chỉ thị với 9 microsatellite có thể ứng dụng để truy xuất phả hệ trong các chương trình chọn giống trên cá tra.

Từ khóa: microsatellite, multiplex PCR, *Pangasianodon hypophthalmus*, truy xuất phả hệ.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Nuôi trồng thủy sản hiện là ngành sản xuất phát triển nhanh nhất nhằm cung cấp thực phẩm cho con người trên toàn thế giới [1]. Trong lĩnh vực quan trọng này, chọn giống là phương pháp ưu tiên hàng đầu được mong đợi vận dụng [2]. Một trong những nguyên nhân liên quan đến sự phát triển của các chương trình chọn giống là thông tin phả hệ còn hạn chế và chi phí cao [2, 3]. Bằng cách khai thác các công nghệ mới trong di truyền phân tử, nghiên cứu truy xuất phả hệ trên thủy sản đã phát triển để phục vụ các chương trình chọn giống [4]. Nghiên cứu chỉ thị phân tử dùng để xác định phả hệ cho chọn giống, cụ thể là truy các cá thể con theo bố mẹ đã được thực hiện trên các đối tượng thủy sản như trên cá thân dẹt (*Scophthalmus maxim*), cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), cá hồi (*Salmo salar*), hàu Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas*) và cá trắm (*Ctenopharyngodon idella*) [3, 5-7]. Việt Nam là nước sản xuất thủy sản lớn trên thế giới, trong đó, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là đối tượng nuôi quan trọng và xuất khẩu chủ lực ở Việt Nam. Năm 2019, diện tích nuôi cá tra tăng 4% so với 2018 (6.675 ha năm 2019 so với 6.418 ha năm 2018) nhưng sản lượng tăng đến 10% (1,58 triệu tấn năm 2019 so với 1,42 triệu tấn năm 2018). Nếu tính từ năm 2015, diện tích nuôi cá

tra tăng trung bình 3%/năm trong khi sản lượng thu hoạch tăng trung bình 6%/năm [8]. Từ năm 2001, chọn giống trên cá tra với các tính trạng tăng trưởng, tỷ lệ phôi, khả năng kháng bệnh... đã được tiến hành nghiên cứu [9, 10]. Trong các chương trình chọn giống cá tra theo phương pháp chọn lọc gia đình, chủ yếu áp dụng phương pháp đánh dấu vật lý, cụ thể là đánh dấu từ PIT (Passive integrated transponder) nhằm phân biệt các cá thể trên cá giống 15-20 g và ương trong 3-4 tháng. Chính phải chờ ương đến kích cỡ cá giống cho đánh dấu nên ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ ở các gia đình phải được tính toán và phần nào ảnh hưởng đến độ chính xác của chọn lọc. Các nghiên cứu về bộ chỉ thị phân tử microsatellite nhằm truy xuất phả hệ trên cá tra chọn giống đã được phát triển cho *P. hypophthalmus* với khả năng truy xuất đạt đến 90,7% [11-13]. Năm 2018, thông tin hệ gen của cá tra đã được công bố với công nghệ giải trình tự thế hệ mới [14]. Dựa trên các thông tin này, bộ chỉ thị phân tử đặc hiệu multiplex PCR phục vụ cho chọn giống cá tra đã được xây dựng [15]. Mục tiêu của nghiên cứu này là dùng bộ chỉ thị phân tử đã sàng lọc thử nghiệm truy xuất phả hệ với kết quả cao hơn các nghiên cứu trước nhằm tiến đến thay thế đánh dấu vật lý, giúp ước tính các thông số di truyền chính xác hơn phục vụ chọn lọc.

*Tác giả liên hệ: Email: dungtpp@hcmue.edu.vn

The application of microsatellite markers for parentage analysis in selective population of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Thi Phuong Dung Tran^{1,2*}, Hong Loc Nguyen³,
Hoang Thong Nguyen³, Hoang Khoi Nguyen Le⁴,
Van Sang Nguyen³

¹Nong Lam University of Ho Chi Minh city

²Ho Chi Minh University of Education

³Research Institute for Aquaculture No.2

⁴International University, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 22 July 2021; accepted 31 August 2021

Abstract:

The research used ten newly developed microsatellites markers set which were assigned offsprings to their parents on the first generation of selection on striped catfish. The result shows: (1) When analysing 50 samples of parents (G0) and 50 samples of offsprings (G1), the PCR ratio was from 98-100%, the allele number (NA) ranged from 5-14 per locus. The average Polymorphic Information Content (PIC) of microsatellites on G0 and G1 were 0.71 and 0.67, respectively. The average observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) all over loci were 0.73, 0.76, and 0.73, 0.71, respectively. Ten microsatellites are stable and polymorphic that are suitable for parentage analysis. (2) After makers screening, parentage analysis on 50 selective families, the initial set of nine microsatellites (excluded Pahy-02) for parentage analysis was effective with 93.4% of offspring allocated unambiguously to their parental pairs, of which families with the father not having half-sib, 93.0% of offspring was allocated unambiguously to their parental pairs and families with the father having half-sib, 94.0% of offspring allocated unambiguously to their parental pairs. The results show that the maker set with nine microsatellites can be used in parentage analysis for the breeding program on striped catfish.

Keywords: microsatellite, multiplex PCR, *Pangasianodon hypophthalmus*, parentage analysis.

Classification number: 4.5

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Mẫu cá tra

Cá tra bố mẹ thuộc quần thể chọn giống kháng bệnh gan thận mủ ban đầu (G0) được thành lập trong đề tài nghiên cứu chọn giống kháng bệnh gan thận mủ giai đoạn 2012-2015 tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (Viện II) tại 116 Nguyễn Đình Chiểu, Đa Kao, Quận 1, TP Hồ Chí Minh và quần thể G1 là cá con của quần thể G0. Các nhóm cá bố mẹ G0 (3,5-8 kg) và cá con G1 (20-25 g) được thu mẫu vây ngực tại Trung tâm Quốc gia giống Thủy sản nước ngọt Nam Bộ (xã An Thái Trung, Cái Bè, Tiền Giang) thuộc Viện II. Sau đó, mẫu vây của các nhóm mẫu được đựng trong eppendorf có dán nhãn riêng biệt mã hóa theo từng gia đình.

Phương pháp tiến hành

Tách chiết DNA tổng số: các mẫu vây ngực được thu thập và ngâm trong ethanol 80% và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Phương pháp kết tủa muối được sử dụng để ly trích ADN [16].

Kỹ thuật multiplex PCR: các cặp mồi microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu.

Chỉ thị	NST	Motif	Trình tự mồi (5'-3')	Loại huỳnh quang	Vùng kích thước alen dự kiến (bp)	Nồng độ mồi tối ưu (μM)
Pahy-01	Số 1	(TCA)11	F: GCACGTTTCACCTCCATCCA R: GTTGCAGAAAACACCACGG	6FAM	104-119	0,2
Pahy-02	Số 4	(TG)24	F: AGCGTTTCTATCCCGCCTC R: CAGACAGTTTCCCTGGTGGT	PET	286-317	0,4
Pahy-03	Số 5	(TG)23	F: AGGTGAAAATCCCGAGCAG R: TCCCGATGCCAGAACCTA	VIC	204-232	0,2
Pahy-04	Số 6	(GT)15	F: TCAGTGCACGTCTACCCAC R: CGTTGTGTGCCCTCAAAGTG	6FAM	271-291	0,2
Pahy-06	Số 8	(AC)20	F: TGAAGCGTGGAGAGAAGCTG R: GTAACCGTTTCTGGGGCTCA	NED	304-324	0,2
Pahy-10	Số 16	(TC)20	F: TCTTGAACACGTGGAGGAGC R: TATGGCTATGGCTGCTGAGC	NED	216-226	0,2
Pahy-13	Số 19	(AC)17	F: CACGCTGAGTGTGAAATGCC R: TGCTTTCCCATGATGCACCT	6FAM	194-206	0,2
Pahy-15	Số 21	(AC)20	F: ACCCTCTGGTGTGCTTCA R: GGGACTCTGTGGAGCGTAAC	VIC	308-338	0,4
Pahy-17	Số 23	(AC)17	F: GCGCTGATGTGCTTTTATACTGA R: GATGCTGCCAGACACTGAGT	PET	205-223	0,2
Pahy-18	Số 25	(GT)20	F: CTTGACTTCCAAGGCACCT R: TGTGAGCTCATCCTCCCTCA	VIC	114-136	0,2

Nguồn: [15].

Phản ứng multiplex PCR có thể tích 10 μ l được tối ưu với các thành phần gồm 1,0 μ l DNA khuôn, 5 μ l multiplex PCR Master Mix (Qiagen) và 0,2 μ l hỗn hợp primer, nước khử ion 3,8 μ l. Chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 15 phút, 30 chu kỳ bao gồm 95°C trong 30 giây, 55°C trong 90 giây, 72°C trong 60 giây và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 60°C trong 30 phút.

Điện di và đọc kết quả PCR: sản phẩm PCR được phân tích kích thước đoạn DNA trên hệ thống điện di mao quản 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Công ty Nam Khoa, 793/58 Trần Xuân Soạn, Quận 7, TP Hồ Chí Minh. Xác định các alen được thực hiện thông qua phần mềm GeneMapper 5 (Applied Biosystems).

Phương pháp sàng lọc các microsatellite phục vụ cho truy xuất phả hệ

Khảo sát tính ổn định và đa hình của bộ chỉ thị trên nguồn mẫu nghiên cứu: khảo sát tính ổn định và đa hình của bộ chỉ thị trên 50 cá thể bố mẹ G0 và 50 cá thể cá con G1 qua hiệu suất PCR [12]. Mức độ sai lệch khỏi cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) của các microsatellite được kiểm định Bonferroni và các thông số di truyền trên quần đàn G0 và G1 như số lượng alen (N_A), hệ số đa dạng di truyền (PIC), tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_o), tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_e) và tần số null-alen được tính toán bằng phần mềm Cervus 3.0.7 [17]. Microsatellite có hiệu suất PCR trên 90%, tuân theo quy luật Hardy-Weinberg và có số lượng alen trên 5 alen phù hợp để truy xuất phả hệ [12, 13].

Truy xuất thử nghiệm phả hệ bằng bộ chỉ thị microsatellite trên 50 gia đình cá giống và đánh giá năng lực truy xuất của bộ chỉ thị:

- Phân tích thứ nhất: truy xuất thử nghiệm phả hệ bằng bộ chỉ thị gồm 10 microsatellite trên 50 gia đình (40 con bố và 50 con mẹ tham gia sinh sản tạo ra 50 gia đình gồm 20 gia đình con bố có half-sib và 30 gia đình con bố không có half-sib) có 500 cá thể cá con G1 (10 cá con/gia đình). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm COLONY 2.0.6.6 với thuật toán Maximum Likelihood kết hợp với Pair Likelihood. Các tỷ lệ để đánh giá năng lực truy xuất được tính toán theo Fu và cs (2013) [7] và Nguyen và cs (2019) [13] cho chung tất cả 50 gia đình (hay tính riêng trên hai nhóm gia đình: bố có half-sib (a), bố không có half-sib (b)).

- Phân tích thứ hai: sau khi truy xuất phả hệ với 10 microsatellite, tần số null-alen cao có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ lỗi kiểu gen, tỷ lệ mismatch cao khi truy xuất phả hệ với 2 mismatch được tính bằng phần mềm CERVUS 3.0.7, MICROCHECKER, COLONY 2.0.6.6, VITAGGIGN 8.5.

Do chỉ thị Pahy-02 có tần số null-alen cao có ý nghĩa thống kê (0,063), sai số ghi nhận và tỷ lệ mismatch cao nhất trong 10 chỉ thị (lần lượt là 0,007 và 0,134) (kết quả không trình bày cụ thể trong nghiên cứu này) nên Pahy-02 được loại bỏ khi tiến hành truy xuất phả hệ, bộ chỉ thị truy xuất còn lại với 9 microsatellite.

Kết quả và bàn luận

Kết quả đánh giá tính ổn định và đa hình của bộ microsatellite trên quần đàn nghiên cứu

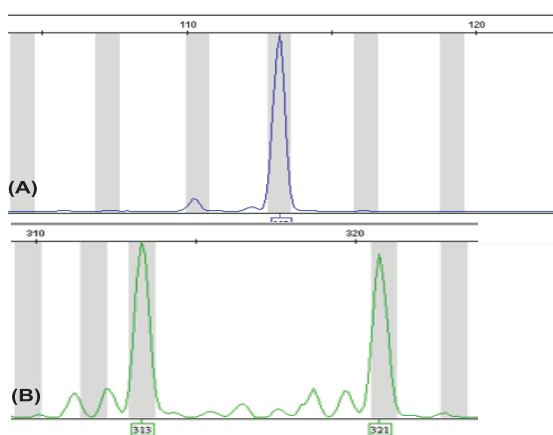
Tỷ lệ khuếch đại và thông tin đa dạng di truyền các microsatellite khảo sát trên 50 mẫu bố mẹ G0 và 50 mẫu đàn con G1 được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thông tin đa dạng di truyền chung của 10 microsatellite trên quần đàn bố mẹ G0 và đàn con G1 trong nghiên cứu.

Quần đàn	Locus										Trung bình
	Pahy-01	Pahy-02	Pahy-03	Pahy-04	Pahy-06	Pahy-10	Pahy-13	Pahy-15	Pahy-17	Pahy-18	
Nhóm mẫu bố mẹ G0 (n=50)											
Hiệu suất PCR (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Số lượng alen (N _k)	6	14	11	14	7	7	8	13	8	9	9,70
Dị hợp tử quan sát (H _o)	0,68	0,68	0,74	0,72	0,70	0,66	0,74	0,70	0,92	0,72	0,73
Dị hợp tử mong đợi (H _e)	0,74	0,83	0,81	0,83	0,72	0,62	0,73	0,69	0,83	0,75	0,76
Thông tin đa hình (PIC)	0,69	0,80	0,78	0,80	0,67	0,57	0,68	0,64	0,79	0,70	0,71
Cân bằng di truyền Hardy-Weinberg (HWE)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND	NS	ND
Tần số Null-alen	0,04	0,09	0,04	0,06	0,02	-0,03	-0,03	-0,02	-0,06	0,02	0,01
Nhóm mẫu cá con G1 (n=50)											
Hiệu suất PCR (%)	100	100	98,00	100	100	100	100	100	100	98,00	99,60
Số lượng alen (N _k)	6	10	8	10	5	5	7	7	8	5	7,10
Dị hợp tử quan sát (H _o)	0,68	0,78	0,57	0,70	0,80	0,70	0,80	0,66	0,90	0,74	0,73
Dị hợp tử mong đợi (H _e)	0,69	0,75	0,76	0,83	0,65	0,62	0,70	0,60	0,83	0,71	0,71
Thông tin đa hình (PIC)	0,63	0,72	0,72	0,80	0,58	0,55	0,66	0,55	0,79	0,65	0,67
Cân bằng di truyền Hardy-Weinberg (HWE)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	ND	NS	ND
Tần số Null-alen	0,00	-0,03	0,15	0,08	-0,13	-0,06	-0,08	-0,08	-0,05	-0,02	-0,02

NS: cân bằng di truyền Hardy-Weinberg với mức ý nghĩa ($p < 0,01$) sau khi hiệu chuẩn với kiểm định Bonferroni; ND: không tính được cân bằng Hardy-Weinberg.

Các microsatellite có sản phẩm được khuếch đại cao từ 98-100% với sản phẩm đặc hiệu (hình 1) phù hợp cho truy xuất phả hệ [18]. Ngoài ra, truy xuất phả hệ yêu cầu các chỉ thị phân tử phải có độ đa hình cao [19]. Tổng số alen của từng chỉ thị trên nhóm mẫu cá tra từ 5-14 alen, trong đó thấp nhất là chỉ thị Pahy-06, Pahy-10, Pahy-18 khuếch đại 5 alen trên quần đàn G1, cao nhất là chỉ thị Pahy-02, Pahy-04 khuếch đại 14 alen trên quần đàn G0, tương đồng các công bố trên cá da trơn *Pangasius* là 7-10 alen [11] và trên cá tra là 1-9 alen [12], 4-7 alen [13]. Các microsatellite khảo sát trên quần đàn G0 và G1 đều tuân theo quy luật Hardy-Weinberg ngoại trừ Pahy-17. Trong nghiên cứu này, hệ số đa dạng di truyền (PIC) trung bình của các microsatellite trên G0 và G1 lần lượt là 0,71 và 0,67, tỷ lệ dị hợp tử quan sát trung bình (H_o) và tỷ lệ dị hợp tử mong đợi trung bình (H_e) trên tất cả các locus lần lượt là 0,73, 0,76 và 0,73, 0,71 (bảng 1). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về mức độ đa hình của chỉ thị microsatellite trên cá tra và các loài cá thuộc họ *Pangasius* [12, 13, 20]. Như vậy, 10 chỉ thị microsatellite trong nghiên cứu này đều đa hình, đáp ứng được các yêu cầu để được sử dụng trong truy xuất phả hệ. Ngoài ra, khi đánh giá đa dạng di truyền trên hai quần đàn cũng cho thấy, các chỉ thị có tồn tại null-alen với tần số từ -0,13 đến 0,15. Vì vậy, việc sử dụng chỉ thị trong truy xuất phả hệ cần kiểm tra tỷ lệ lỗi ghi nhận alen, null-alen và tỷ lệ mismatch trong truy xuất, tránh làm ảnh hưởng đến kết quả truy xuất.



Hình 1. Một số alen đặc hiệu được khuếch đại trong phản ứng Multiplex PCR. (A) Alen 113 của Pahy-01 và (B) Alen 313, 321 của Pahy-15.

Kết quả thử nghiệm truy xuất phả hệ

Kết quả truy xuất phả hệ trên 50 gia đình với 10 microsatellite và 9 microsatellite được trình bày ở bảng 3. Các phân tích chi tiết về truy xuất phả hệ theo nhóm các gia đình (gia đình con bố có half-sib và con bố không có half-sib) với 10 microsatellite và 9 microsatellite được trình bày ở bảng 4.

Bảng 3. Kết quả xác định phả hệ 50 gia đình cá tra chọn giống.

Các chỉ tiêu phân tích	Phân tích 1 (10 microsatellite)	Phân tích 2 (9 microsatellite)
Số cá con được truy xuất bố mẹ (con)	500	500
Tỷ lệ cá con truy xuất được bố mẹ (%)	91,0	94,8
Tỷ lệ cá con truy xuất bố đúng (P_f) (%)	94,8	96,0
Tỷ lệ cá con truy xuất mẹ đúng (P_m) (%)	85,0	94,2
Tỷ lệ cá con được truy xuất cả bố và mẹ đúng (P_{fm}) (%)	83,0	93,4

Bảng 4. Kết quả xác định phả hệ 20 gia đình bố có half-sib và 30 gia đình bố không có half-sib.

Các chỉ tiêu phân tích	Phân tích 1 (10 microsatellite)		Phân tích 2 (9 microsatellite)	
	Gia đình con bố có half-sib	Gia đình con bố không có half-sib	Gia đình con bố có half-sib	Gia đình con bố không có half-sib
Tỷ lệ cá con truy xuất bố đúng (P_f) (%)	91,5	95,5	95,5	96,3
Tỷ lệ cá con truy xuất mẹ đúng (P_m) (%)	73,5	89,0	94,5	94,0
Tỷ lệ cá con được truy xuất cả bố và mẹ đúng (P_{fm}) (%)	69,5	88,0	94,0	93,0

Trong phân tích thứ nhất với 10 microsatellite thì tỷ lệ cá con truy xuất được bố mẹ, bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng lần lượt là 91,0, 94,8, 85,0 và 83,0%. Kết quả tỷ lệ truy xuất gia đình con bố có half-sib (a) bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng lần lượt là 91,5, 73,5 và 69,5%, thấp hơn các gia đình con bố không có half-sib (b) bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng lần lượt là 95,5, 89,0 và 88,0%. Trong phân tích thứ hai, kết quả truy xuất cho thấy tỷ lệ cá con truy xuất được bố mẹ, bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng tăng lên so với truy xuất bằng 10 microsatellite lần lượt là 94,8, 96,0, 94,2 và 93,4%. Tỷ lệ truy xuất bố đúng, mẹ đúng, cả bố và mẹ đúng của các gia đình (a) là 95,5, 94,5 và 94,0%, không chênh lệch nhiều so với trong gia đình (b) là 96,3, 94,0 và 93,0%.

Bàn luận

Ở phân tích thứ nhất, khả năng truy xuất cả bố và mẹ đúng trong các gia đình chọn giống với 10 microsatellite chưa cao (83,0%) có thể do sự tồn tại của lỗi kiểu gen và đột biến dẫn đến sự không tương thích giữa alen bố mẹ và con cái [19]. Khi truy xuất 50 gia đình, các chỉ thị có sự tồn tại null-alen trên quần đàn G0 và G1 với tần số -0,029 đến 0,064, có thể ảnh hưởng đến kết quả truy xuất theo khuyến cáo của Dakin và Avise (2004) [21]. Đồng thời, lỗi kiểu gen của các chỉ thị cũng tồn tại với tần số thấp từ 0,000 đến 0,009 (các kết quả tần số null-alen, lỗi kiểu gen các chỉ thị không trình bày cụ thể trong nghiên cứu này). Mặc dù lỗi kiểu gen có thể cho phép nhỏ hơn 0,01 vẫn ảnh hưởng đến kết quả truy xuất [22]. Vì vậy, khi truy xuất phả hệ cần xử lý

các vấn đề này để có kết quả truy xuất chính xác nhất [17]. Một trong những phương án có thể là loại bỏ các chỉ thị có tần số null-alen và sai số ghi nhận alen cao là giải pháp để nâng cao hiệu suất truy xuất phả hệ [13]. Do đó, nghiên cứu này loại trừ microsatellite Pchy-02 trong truy xuất. Kết quả truy xuất với 9 microsatellite thì cho kết quả chính xác hơn (93,4%) so với khi truy xuất với 10 microsatellite (83,0%).

Ở phân tích thứ hai, kết quả truy xuất với 9 microsatellite tương đương so với một số nghiên cứu đã được báo cáo trên cá hồi vân (93,0-95,0%), cao hơn cá tra hiện nay (81,3-94,0%) [12, 13, 23-25]. Ngoài ra, khả năng truy xuất phả hệ cũng phụ thuộc vào cấu trúc các gia đình khi truy xuất [19]. Trong các chương trình chọn giống hiện nay, phương pháp phối thứ bậc tạo ra các gia đình có con bố half-sib được áp dụng chủ yếu [26]. Vì vậy, việc truy xuất được cá thể của các gia đình con bố có half-sib (a) đóng vai trò quan trọng hơn gia đình con bố không half-sib (b). Các cá con thuộc các gia đình (a) có thể có các alen giống nhau từ bố dẫn đến khó truy xuất bố mẹ đúng hơn các gia đình (b). Cho nên, bộ chỉ thị có khả năng truy xuất tốt các gia đình (a) so với gia đình (b) có ý nghĩa áp dụng thực tế trong chương trình chọn giống. Với kết quả truy xuất cả bố và mẹ đúng các gia đình (a) và các gia đình (b) cao (94,0 và 93,0%) thì bộ chỉ thị phân tử với 9 microsatellite phù hợp áp dụng vào thực tiễn cho việc truy xuất phả hệ trên quần đàn chọn giống tiếp theo.

Trong phân tích truy xuất phả hệ với 10 chỉ thị microsatellite, khả năng truy xuất được bố đúng (94,8%) cao hơn truy xuất mẹ đúng (85,0%), chủ yếu không truy xuất được mẹ từ gia đình con bố có half-sib (73,5%). Kết quả này cho thấy đây là hạn chế trong việc truy xuất phả hệ với bộ chỉ thị phân tử này trong chọn giống. Trong khi đó, truy xuất phả hệ với 9 microsatellite tăng khả năng truy xuất được bố và mẹ đúng đạt 96,0 và 94,2%. Tỷ lệ truy xuất bố, mẹ, cả bố và mẹ đúng với bộ chỉ thị 9 microsatellite của gia đình con bố không có half-sib (b) lần lượt là 96,3, 94,0, 93,0%, không chênh lệch nhiều so với truy xuất gia đình con bố có half-sib (a) là 95,5, 94,5 và 94,0% đã cải thiện được việc truy xuất bố hay mẹ đúng. Vì vậy, bộ chỉ thị bao gồm 9 microsatellite này phù hợp cho truy xuất phả hệ trên cá tra. Khả năng truy xuất cao này có tiềm năng thay thế đánh dấu từ PIT phục vụ chọn giống, nhằm làm giảm ảnh hưởng của môi trường ương riêng rẽ các gia đình đến kích cỡ đánh dấu, từ đó tăng độ chính xác của chọn lọc. Các nghiên cứu cho thấy khi tăng số lượng các chỉ thị thì làm tăng khả năng truy xuất như trên cá trắm cỏ *Ctenopharyngodon idella* (khả năng truy xuất có thể đạt 99,6%), tôm Kuruma (khả năng truy xuất có thể đạt 92,0%). Vì vậy, cần phát triển thêm các bộ chỉ thị đa hình cao từ bộ gen cá tra kết hợp với các microsatellite trong nghiên cứu này nhằm tiếp tục nâng cao hiệu quả truy xuất phả hệ.

Kết luận

Nghiên cứu này đã sàng lọc một bộ chỉ thị gồm 9 microsatellite và thử nghiệm truy xuất phả hệ đàn cá tra chọn giống với tỷ lệ truy xuất cả bố và mẹ đúng trong tất cả các gia đình cao, đặc biệt trên gia đình có half-sib theo bố. Các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu ổn định và có tính đa hình cao phù hợp với nghiên cứu truy xuất phả hệ trên cá tra. Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng truy xuất phả hệ bằng chỉ thị microsatellite nhằm thay thế phương pháp đánh dấu từ PIT truyền thống trong chọn giống là khả thi, đặc biệt nếu chúng ta tiếp tục sàng lọc và phát triển bổ sung thêm một số chỉ thị mới vào bộ chỉ thị hiện có thì khả năng truy xuất sẽ cao hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Chương trình VLIR-UOS South Initiatives, Vương quốc Bỉ (mã số SI-2019-01-26). Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Phòng Thí nghiệm Đa dạng Di truyền và Tiến hóa (Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics), Khoa Sinh học, Đại học KU Leuven (Vương quốc Bỉ) và Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II với những hỗ trợ về công nghệ và kỹ thuật cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] FAO (2014), *The State of the World Fisheries and Aquaculture*.
- [2] M. Vandeputte, P. Haffray (2014), "Parentage assignment with genomic markers: a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals", *Frontier in Genetic*, **5**, p.432.
- [3] A.T. Norris, D.G. Bradley, E.P. Cunningham (2000), "Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers", *Aquaculture*, **182**, pp.73-83.
- [4] M. Vandeputte, M.N. Rossignol, C. Pincent (2011), "From theory to practice: empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding", *Aquaculture*, **314**, pp.80-86.
- [5] A. Estoup, K. Gharbi, M. SanCristobal, C. Chevalet, P. Haffray, R. Guyomard (1998), "Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, pp.715-725.
- [6] N. Kong, Q. Li, H. Yu, L.F. Kong (2015), "Heritability estimates for growth-related traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree", *Aquaculture Research*, **46**, pp.499-508.
- [7] J. Fu, Y. Shen, X. Xu, Y. Chen, D. Li, J. Li (2013), "Multiplex microsatellite PCR sets for parentage assignment of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)", *Aquaculture International*, **21**(6), pp.1195-1207.

- [8] Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (VASEP) (2019), *Báo cáo ngành hàng hải sản 5 năm (2015-2019)*.
- [9] V.S. Nguyen, G. Klemetsdal, J. Ødegård, H.M. Gjøen (2012), “Genetic parameters of economically important traits recorded at a given age in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)”, *Aquaculture*, **344-349**, pp.82-89.
- [10] D.K. Pham, J. Ødegård, V.S. Nguyen, H.M. Gjøen, G. Klemetsdal (2021), “Genetic analysis of resistance in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to bacillary necrosis caused by *Edwardsiella ictaluri*”, *Journal of Fish Diseases*, **44(2)**, pp.201-210.
- [11] F.A.M. Volckaert, B. Hellemans, L. Pouyaud (1999), “Nine polymorphic microsatellite markers in the SE Asian catfishes *Pangasius hypophthalmus* and *Clarias batrachus*”, *Animal Genetics*, **30**, pp.383-384.
- [12] Bùi Thị Liên Hà, Lê Ngọc Thùy Trang, Nguyễn Văn Sáng (2017), “Thử nghiệm xác định phả hệ bằng chỉ thị phân tử microsatellite trên quần đàn chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **1**, tr.88-97.
- [13] M.T. Nguyen, N.T.P. Le, T.L. Nguyen, A.L. Duong (2019), “Parentage assignment in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) based on microsatellite markers”, *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, **71**, p.9.
- [14] O.T.P. Kim, P.T. Nguyen, E. Shoguchi, K. Hisata, V.T.B. Thuy, J. Inoue, N. Satoh (2018), “A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement”, *BMC Genomics*, **19(1)**, p.733.
- [15] Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Minh Thành, Nguyễn Hồng Lộc, Nguyễn Hoàng Thông, Lê Hoàng Khôi Nguyên (2020), “Kết quả bước đầu phát triển bộ chỉ thị microsatellite mới từ hệ gen cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng công cụ tin sinh học”, *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long*, **18**, tr.14-22.
- [16] J. Gaaib, A. Al-Assie (2011), “Simple salting - out method for genomic DNA extraction from whole blood”, *Tikrit Journal of Pure Science*, **16(2)**, pp.9-11.
- [17] T.C. Marshall, J. Slate, L.E.B. Kruuk, J.M. Pemberton (1998), “Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations”, *Molecular Ecology*, **7**, pp.639-655.
- [18] G.H. Yue, J.H. Xia (2014), “Practical considerations of molecular parentage analysis in fish”, *Journal of the World Aquaculture Society*, **45(2)**, pp.89-103.
- [19] A.G. Jones, C.M. Small, K.A. Paczolt, N.L. Ratterman (2010), “A practical guide to methods of parentage analysis”, *Molecular Ecology Resources*, **10**, pp.6-30.
- [20] Z.S. Hogan, B.P. May (2002), “Twenty-seven new microsatellites for the migratory Asian catfish family *Pangasiidae*”, *Molecular Ecology Notes*, **2**, pp.38-41.
- [21] E.E. Dakin, J.C. Avise (2004), “Microsatellite null alleles in parentage analysis”, *Heredity*, **93**, pp.504-509.
- [22] Q.T. Trinh, N. Van Bers, R. Crooijmans, B. Dibbits, H. Komen (2013), “A comparison of microsatellites and SNPs in parental assignment in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): the power of exclusion”, *Aquaculture*, **388-391**, pp.14-23.
- [23] A.G. Fishback (1999), *Genetic and Environmental Influences on the Spawning Time and Progeny Growth of Hatchery Rainbow Trout*, University of Guelph.
- [24] Nguyễn Hữu Ninh, Lưu Thị Hà Giang (2012), *Nghiên cứu xác định di truyền và huyết thống cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng chỉ thị Microsatellite*, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, 10 tr.
- [25] M. Van deputte, S. Mauger, M. Dupont-Nivet (2006), “An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion”, *Molecular Ecology Notes*, **6**, pp.265-267.
- [26] T. Gjedrem (2005), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, pp.180-181.