TẠP CHÍ KHOA HỌC
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM TP HỒ CHÍ MINH
Tập 17, Số 9 (2020): 1575-1587
ISSN: 1859-3100
HO CHI MINH CITY UNIVERSITY OF EDUCATION
JOURNAL OF SCIENCE
Vol. 17, No. 9 (2020): 1575-1587
Website: *http://journal.hcmue.edu.vn*

Bài báo nghiên cứu

HIỆU CHỈNH CÁC THÀNH PHẦN CHO PHẢN ỨNG PCR CỦA CÁC MICROSATELLITE VÀ NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC QUẦN THỂ CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Trần Thị Phương Dung[1*], Bùi Thị Liên Hà[2], Nguyễn Hoàng Thông[2], Nguyễn Ngọc Thùy Trang[2], Trần Hoàng Gia Linh[2], Nguyễn Văn Sáng[2]

[1]Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

[2]Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, Việt Nam

[*]Tác giả liên hệ: Trần Thị Phương Dung – Email: dungttp@hcmue.edu.vn

Ngày nhận bài: 26-3-2020; ngày nhận bài sửa: 28-4-2020, ngày chấp nhận đăng: 21-9-2020

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các chỉ thị microsatellite khảo sát đặc hiệu cho bộ gen cho cá Tra (Pangasianodon hypophthalmus) kế thừa từ các nghiên cứu trước đã được chọn lọc được để tối ưu nhằm có thể tạo tổ hợp microsatellite có cùng điều kiện PCR tương đồng dùng trong quy trình phản ứng multiplex PCR (một nhóm các microsatellite trong cùng một phản ứng PCR) phục vụ phân tích đa dạng di truyền các quần thể cá Tra tại Việt Nam. Các chỉ thị sử dụng trong nghiên cứu là bộ 7 chỉ thị microsatellite đơn (Ph07, Ph09, Ph41, CB12, CB15, CB18 và PSPG579) được tối ưu phản ứng PCR thành công và thử nghiệm đánh giá đa dạng một số quần thể cá Tra nhằm kiểm tra hiệu quả ứng dụng trong nghiên cứu tiếp theo. Phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu này là phản ứng PCR đơn khảo sát và tối ưu riêng cho từng chỉ thị microsatellite khi điện di agarose 4% cho việc phân tích đa hình. Kết quả cho thấy tất cả chỉ thị đã được tối ưu thành công cho các phản ứng PCR trên cá Tra và các chỉ thị có sự đa hình cao với trung bình số đoạn khuếch đại 7,11, Na=6,19, He=0,78, PIC=0,77 trên mỗi chỉ thị trong 3 nhóm mẫu. Nghiên cứu làm nền tảng cơ sở cho các bước khảo sát tiếp theo (Multiplex PCR) và có ý nghĩa khoa học trong trong việc hỗ trợ các nghiên cứu đa dạng di truyền khác trên cá Tra.

Từ khóa: *microsatellite*; phản ứng PCR; đa dạng di truyền

1. Đặt vấn đề

Cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những loài cá da trơn nước ngọt có giá trị kinh tế cao được nuôi phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long (Nguyen, 2018). Hiện nay, việc sản xuất và cung ứng giống cá Tra tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long phần lớn vẫn mang tính tự phát, thiếu sự phù hợp giữa số lượng và chất lượng con

Cite this article as: Tran Thi Phuong Dung, Bui Thi Lien Ha, Nguyen Hoang Thong, Nguyen Ngoc Thuy Trang, Tran Hoang Gia Linh, & Nguyen Van Sang (2020). Optimal rection pcr for research genetic diversity of Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science, 17*(9), 1575-1587.

giống. Một trong những nguyên nhân là phả hệ cũng như cấu trúc đa dạng di truyền của các thể cá bố mẹ chưa được các trại sản xuất thực sự quan tâm. Đây là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến sự suy giảm chất lượng con giống như sinh trưởng chậm, tỉ lệ dị hình cao. Thêm vào đó, các nghiên cứu về đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể cá Tra ở hạ lưu sông Mekong còn hạn chế và thiếu sự kết nối (Tran, 2017). Vì vậy, việc đánh giá đa dạng di truyền cá Tra giúp định hướng quản lí tốt và nâng cao chất lượng di truyền thể cá bố mẹ phục vụ phát triển bền vững đối tượng thủy sản là cần thiết. Hiện nay, có nhiều chỉ thị phân tử như allozyme, mtDNA, AFLP, microsattelite sử dụng trong nhiều nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền trên các loài cá như nhóm cá da trơn thuộc họ Pangasidae và Clariidae, nhóm cá hồi *Oncorhynchus tshawytscha, Oncorhynchus keta, Salmo satar, Salmo trutta, Salvelius confluentus* và *S. alpinus*, cá rô phi và tôm thẻ chân trắng (Bui, 2017; Cruz, 2004). Tuy nhiên, theo Miah (2013) thì tần suất sử dụng chỉ thị microsatellite trong nghiên cứu cấu trúc di truyền quần thể cá là cao nhất so các chỉ thị phân tử khác. Theo nghiên cứu của Hogan (2002), đã phát triển 27 chỉ thị microsatellite cho ứng dụng nghiên cứu di truyền của 5 loài cá thuộc họ Pangasiiae, So (2006) đã phát triển 7 chị thị microsatellite đánh giá đa dạng di truyền trên cá Tra bố mẹ tự nhiên. Na-Nakorn (2009) đã sử dụng 5 chỉ thị microsatellite đánh giá biến dị di truyền của nguồn cá Tra từ các trại giống lưu trữ trên 10 năm. Việc phát triển các chî thị phân tử trên các loài cá trong các nghiên cứu thường mất thời gian tối ưu và tốn kém kinh phí chọn lựa ra được bộ chỉ thị hiệu quả đối với đối tượng mẫu nghiên cứu. Nghiên cứu này thực hiện tối ưu lại các chỉ thị microsatellite có các điều kiện PCR tương đồng để có thể kết hợp thành nhóm trong cùng một phản ứng PCR (Multiplex PCR) góp phần xây dựng quy trình phân tích phục vụ đánh giá đa dạng di truyền cá Tra tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu cá Tra

Mẫu cá Tra được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm 3 nhóm: nhóm cá bố mẹ thuộc quần thể tự nhiên 1 (TN1: 24 cá thể) có nguồn gốc từ Biển Hồ, Campuchia do ngư dân địa phương đánh bắt và nuôi trong các ao tại trại giống An Giang, Mừng Liên, Thái Dương tỉnh Đồng Tháp; (ii) nhóm cá bố mẹ thuộc quần thể tự nhiên 2 (TN2: 24 cá thể) có nguồn gốc từ tự nhiên Campuchia nuôi tại trại giống Ba Hoàng tỉnh An Giang; (iii) Nhóm cá bố mẹ thuộc quần thể tự nhiên 3 (TN3: 24 cá thể) có nguồn gốc từ thác Kratie, Campuchia được nuôi tại trung tâm giống, huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang. Tất cả mẫu vây được bảo quản và ghi nhãn trong từng eppendof 1,5ml trong ethanol 70%.

2.1.2. Chỉ thị phân tử microsatellite

Các chỉ thị microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu này được tham khảo và kế thừa từ bộ chỉ thị microsatellite trong nghiên cứu của nhóm tác giả Bui và cộng sự (2017), trong đó nhóm chỉ thị microsatelltie (CB12, CB15, CB18) được phát triển đặc trưng cho

mẫu cá Tra Việt Nam do Công ty Sinh học Thái Lan phát triển cho chương trình cá Tra chọn giống (2005); Nhóm chỉ thị (Ph07, Ph09, Ph41) được phát triển từ Trường Đại học QueenLand, Úc cho đề tài chọn giống cá Tra tăng trưởng (2013) và cá Tra kháng bệnh (2016); chỉ thị microsatellite còn lại là PSPG579 được tham khảo từ nghiên cứu của Hogan và May (2002);

Bảng 1. *Danh sách các thông số kĩ thuật các chỉ thị microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu*

STT	Microsatellite	Primer xuôi	Primer ngược	F_Tm (^{0}C)	R_Tm (^{0}C)
1	CB12	5'-GCGATAGAGACAGAGAGTCATGG-3'	5'-ATCTGGGTCAAAATGATTGGAAC-3'	62,0	60,0
2	CB18	5'AGAAGGAACGCTGGACTGAGG-3'	5'TATACCTGCTGGGAGAATGGATG-3'	53,0	55,0
3	CB15	5'-CGGGGGAGTGTTGTCTGTCAG-3'	5'-CCCTTAGTCCGAATTACTGGAAGC-3'	60,0	61,0
4	Ph-7	5'-GGAGGAGCAGCTTCAGAGTC-3'	5'-AGCGTGTCATGAAGAGGGTG-3'	57,3	57,3
5	Ph-9	5'-TTGCGTGATGACTTTGCGTG-3'	5'-ACGATGGCTTCAGTTACGGATC-3'	56,6	56,9
6	Ph-41	5'-TGTCTCAGGATCGGTCTGTG-3'	5'-TTCCTGTTGCATGGTTTCGG-3'	56,2	56,0
7	PSP-G579	5'-GAGAGGGGGTGAAATAATGATAGG-3'	5'-ATGGTTCTCCTGCAAGCAATGTCT-3'	54,6	59,0

F_Tm: nhiệt độ bắt cặp của primer xuôi theo lí thuyết, R_Tm: nhiệt độ bắt cặp của primer ngược theo lí thuyết

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu vây ngực của các nhóm mẫu được thu và bảo quản trong cồn 70% có gắn nhãn riêng biệt. Vây ngâm cồn được thấm khô bằng giấy thấm và được tiến hành tách chiết DNA theo quy trình tách chiết bằng muối của Miller và cộng sự (1988) có hiệu chỉnh. Mẫu vây ngực cá Tra (5mm^2) được ủ ở 55^{0}C trong 2 giờ trong 500µl dung dịch 1 (50 mM Tris HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0); 2% SDS) và 5µl proteinase K (20 mg/ml) so với ủ qua đêm của Miller. DNA sau tách chiết được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra, đồng thời đo $OD_{260/280}$ để kiểm tra độ tinh sạch của DNA. Kết quả OD_{260} được tính ra nồng độ DNA để xác định lượng mẫu cho vào phản ứng PCR.

2.2.2. Kĩ thuật PCR

Kĩ thuật PCR các chỉ thị microsatellite được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Di truyền Phân tử, thuộc Viện NCNTTS II. Nghiên cứu này sử dụng QIAGEN® Multiplex PCR Kit để tiến hành khuếch đại các microsatellite. Kit được cung cấp dưới dạng master mix với nồng độ các hóa chất thành phần như sau: Taq polymerase 5 units/µl; $MgCl_2$ 3 mM; dNTP 10 mM. Chu kì nhiệt tiến hành theo chu kì nhà sản xuất công bố, chu trình cụ thể như sau: 95^{o}C trong 15 phút; lặp lại 30 lần lần lượt 3 bước 94^{o}C trong 30 giây, nhiệt độ bắt cặp của từng primer trong 90 giây, 72^{o}C trong 90 giây; 72^{o}C trong 10 phút; lưu mẫu ở 10^{o}C nếu để qua đêm.

Chỉ tiêu được khảo sát trong nghiên cứu này là nhiệt độ bắt cặp của primer và nồng độ DNA mẫu dùng cho phản ứng PCR. Những primer dùng cho 1 phản ứng multiplex PCR thường có nhiệt độ bắt cặp gần tương đồng với nhau. Vì vậy, một trong những mục tiêu của nghiên cứu là chọn được các nhóm primer có khoảng nhiệt độ bắt cặp phù hợp nhằm tạo vật liệu ban đầu cho việc xây dựng quy trình multiplex PCR.

2.2.3. Điện di và đọc kết quả PCR

Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose với nồng độ 4%. Điện di ở điều kiện hiệu điện thế 120V, thời gian 90 phút. Hình ảnh được chụp trên máy GelDoc It2 (UVP, USA). Xác định kích thước allen theo phương pháp của Barker và cộng sự (1997) có sự điều chỉnh là so sánh với thang DNA chuẩn HyperLadderTM (100bp) của Bioline (Anh) để đọc và phân tích kết quả.

2.2.4. Phương pháp thu thập số liệu và xử lí số liệu

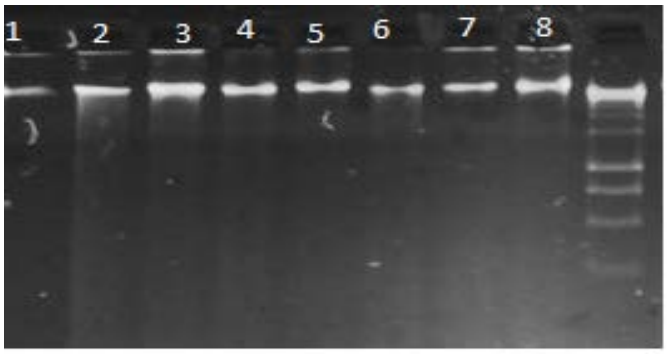
Các băng sản phẩm điện di được ghi nhận dưới dạng kích thước băng vạch DNA thể hiện trên bảng gel theo phương pháp của McDanie (2002). Các băng vạch microsatellite được ghi nhận lại trong một ma trận nhị phân với 1 đại diện cho sự xuất hiện và 0 đại diện cho sự thiếu vắng của băng vạch trên bản gel. Các số liệu thu được sẽ được xử lí và phân tích trong chương trình NTSYSpc 2.1 (Nei, 1972) và Popgene 1.32. NTSYSpc 2.1 dùng các số liệu ma trận nhị phân băng vạch và phân tích, truy xuất ra dạng biểu đồ hình cây (còn gọi là cây tiến hóa) để tìm ra tương quan giữa các quần thể thông qua hệ số tương đồng di truyền và xây dựng cây phát sinh loài. Sử dụng phần mềm Popgene 1.32 (Yeh et al., 1997) để tính toán tần số allen tại mỗi locus cho mỗi quần thể, số lượng allen trung bình trên quần thể và độ dị hợp tử quan sát và mong đợi. Các thông số: Số lượng allen quan sát được của mỗi chỉ thị microsatellite (Na) và allen hiệu quả (Ne) tính theo phương pháp Kimura và Crow (1964). Thông tin đa hình PIC đánh giá theo phương pháp Botstein (1980), khoảng cách di truyền (genetic distance) được phân tích theo phương pháp của Nei (1972) giữa các quần thể.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả tối ưu của 7 chỉ thị microsatellite trên nhóm mẫu khảo sát ban đầu

3.1.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số

Mẫu vây cá Tra sau khi tách chiết sẽ được kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 1) và đo quang phổ ở bước sóng 260 nm, 280 nm để kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ DNA của sản phẩm tách chiết. Sản phẩm DNA sau tách chiết được có nồng độ cao, sạch và ít bị đứt gãy. Kết quả kiểm tra hàm lượng DNA tách chiết trên máy đo quang phổ cho thấy các mẫu cá Tra có hàm lượng tương đối cao từ 169,6-474,4 ng/ml và độ tinh sạch đo được từ 1,862-1,981. Kết quả tách chiết DNA mẫu cá Tra dùng trong nghiên cứu cho thấy những mẫu cho vạch sản phẩm điện di đậm, rõ nét, DNA ít bị đứt gãy, độ tinh sạch cao $1,7<OD_{260nm}/OD_{280nm}<2$ được sử dụng cho phản ứng PCR (Tran, 2013). Vì vậy, kết quả li trích DNA này cho thấy DNA có độ tinh sạch cao phù hợp cho phản ứng PCR tiếp theo.



Hình 1. *Hình ảnh đại diện kết quả điện di sản phẩm tách chiết trên gel Agarose 1%*

3.1.2. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn primer

Gắn primer là quá trình primer xuôi và primer ngược bắt chuyên biệt vào mạch khuôn DNA theo nguyên tắc bổ sung: A với T; G với C. Nhiệt độ gắn primer thường thấp hơn 3-5^{o}C so với nhiệt độ nóng chảy (T*m*) của primer. Nếu nhiệt độ quá cao thì hiệu suất bắt primer sẽ thấp làm cho lượng sản phẩm khuếch đại thu được thấp thậm chí không có sản phẩm khuếch đại. Nhiệt độ quá thấp sẽ xảy ra hiện tượng bắt primer không đặc hiệu dẫn đến xuất hiện những sản phẩm không mong muốn. Nhiệt độ gắn primer tối ưu cho thấy có sự chênh lệch trong khoảng 1^{0}C so với nhiệt độ chuẩn của microsatellite, sự chênh lệch này là do sự khác nhau về điều kiện thiết bị và hóa chất tại nơi nghiên cứu. Kết quả tối ưu phản ứng PCR đã cho thấy 7 chỉ thị microsatellite có hoạt động khuếch đại ở nhiệt độ gắn primer tối ưu từ 52,9-60,7^{o}C tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tích các bước tiếp theo.

Bảng 2. *Nhiệt độ gắn Primer tối ưu*

Microsatellite	**CB12**	**CB15**	**CB18**	**Ph07**	**Ph09**	**Ph41**	**PSPG579**
T*a* chuẩn (^{o}C)	54,1	59,8	54,5	59,1	59,0	56,7	53,8
T*a* thực tế (^{o}C)	55,7	60,7	55,7	60,7	58,6	55,7	52,9

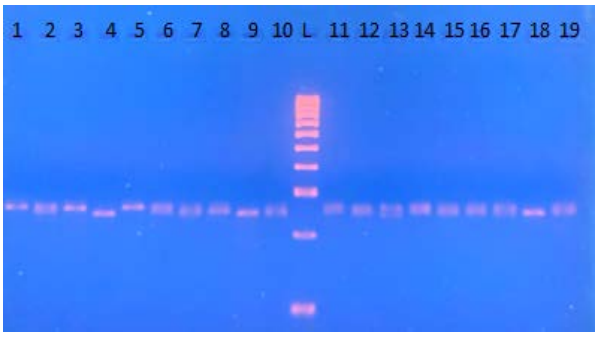
3.1.3. Kết quả khảo sát nồng độ DNA

Thực hiện khảo sát dãy hàm lượng DNA là 25 ng, 50 ng, 75 ng và 100 ng trong thể tích phản ứng là 20µl. Ở hàm lượng DNA 50 ng trong thể tích phản ứng là 20 µl cho band sản phẩm khuếch đại rõ nét, đậm nhất và có sản phẩm khuếch đại ở cả ba lần lặp lại thí nghiệm. Kết quả khảo sát hàm lượng DNA trong phản ứng PCR của các microsatellite còn lại, hàm lượng DNA 50 ng/20 µl cũng là hàm lượng DNA tối ưu.

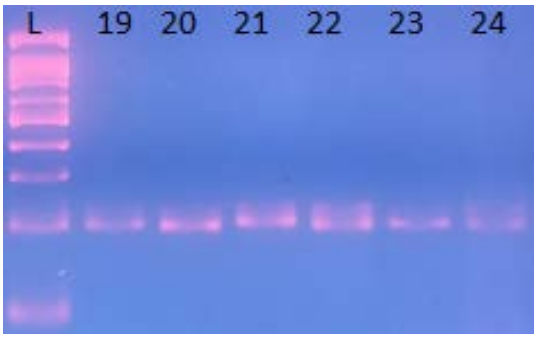
Dựa trên kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp primer, nghiên cứu chia được 2 nhóm lớn có nhiệt độ bắt cặp giống nhau. Nhóm 1 gồm CB12, CB14, Ph41; nhóm 2 gồm CB15, Ph07. Đối với 2 primer Ph09 và PSPG579, nhiệt độ bắt cặp không tương đồng với 2 nhóm lớn còn lại. nên không thể đưa 2 primer này vào phản ứng multiplex PCR của 2 nhóm primer trên.

3.2. Kết quả thử nghiệm đánh giá đa dạng di truyền các quần thể cá Tra

Trong nghiên cứu phân tích di truyền phân tử, việc lựa chọn các chỉ thị phân tử ngoài yếu tố đa hình thì yếu tố hiệu suất cho kết quả sản phẩm khuếch đại (hiệu suất PCR) cũng đóng góp vai trò quan trọng trong kết quả phân tích. Nói một cách khác, một microsatellite có số đa hình cao tuy nhiên chỉ có < 90% tổng số mẫu có sản phẩm khuếch đại thì kết quả số liệu không khuếch đại (missing data) cao. Số lượng missing data cho phép thường thấp hơn 5% (So, & Vockaert, 2006). Kết quả phân tích cho thấy hiệu suất PCR sau khi tối ưu các thành phần phản ứng PCR của bộ 7 chỉ thị microsatellite tương đối đạt yêu cầu từ 90,27-100%. Trong đó, 2 microsatellite là CB12 có hiệu suất PCR là 90,27%, CB18 có hiệu suất PCR là 97,20%, Ph07 và Ph09 là 97,2%, PSPG579, CB15, Ph41 có hiệu suất PCR là 100%. Bảy chỉ thị microsatellite đã được kế thừa từ một nhóm microsatellite được thiết kế trong nghiên cứu genome từ các nghiên cứu trước có kết quả khảo sát là không có liên kết gien. Kết quả cho thấy 7 chỉ thị này có hiệu suất PCR trên 90% là những microsatellite có tính ổn định và có phần trăm số mẫu không được khuếch đại là thấp.



Hình 2a. *Điện di sản phẩm PCR cặp chỉ thị microsatellite CB15 cho quần thể cá Tra tự nhiên 3 (TN3), L: thang đo 100 bp. Các mẫu TN3 từ 1 đến 19*



Hình 2b. *Điện di sản phẩm PCR cặp chỉ thị microsatellite PSPG579 cho quần thể cá Tra tại An Giang (TN2), L: thang đo 100 bp. Các mẫu TN2 từ 19 đến 24*

3.3. Kết quả đánh giá đa dạng di truyền của 7 chỉ thị microsatellite

Kết quả thử nghiệm xác định đa dạng di truyền bằng 7 chỉ thị microsatellite trên 3 nhóm mẫu cá Tra (72 mẫu). Tất cả các chỉ thị đều khuếch đại được các đoạn gen đa hình. Tổng số đoạn khuếch đại đa hình của từng chỉ thị trên 3 nhóm mẫu cá Tra từ 6-11 đoạn, trong đó thấp nhất là chỉ thị Ph09, CB18 khuếch đại 6 đoạn, tiếp đến là Ph07 và PSPG579 với số đoạn khuếch đại là 7, tiếp đến là chỉ thị Ph41 với 8 đoạn, CB15 là 9 đoạn và cao nhất là chỉ thị CB12 khuếch đại 11 đoạn. Qua kết quả khảo sát nhận diện đặc trưng từ 7 chỉ thị thì tất cả chỉ thị có kết quả đặc trưng khuếch đại được các DNA đa hình với tỉ lệ phần trăm trung bình các đoạn khuếch đại mỗi chỉ thị là 9,09-16% trên 3 nhóm mẫu (Bảng 3).

Bảng 3. *Kết quả phân tích di truyền các chỉ thị đặc hiệu trên 3 nhóm mẫu cá Tra*

Chỉ thị	Ph07	Ph09	Ph41	CB12	CB15	CB18	PSPG579
Tổng số đoạn khuếch đại đa hình, đơn hình của từng chỉ thị	7	6	8	11	9	6	7
Khoảng kích thước các đoạn khuếch đại của từng chỉ thị (bp)	136	148	158	191	239	338	194
	147	153	165	198	246	349	200
	152	160	170	203	251	371	206
	158	164	175	208	256	380	211
	167	169	190	217	262	412	218
	194	173	195	219	267	425	226
	217		198	231	271		232
			201	241	276		
				250	286		
				257			
				273			
Phần trăm (%) đoạn đa hình của từng chỉ thị tương ứng với kích thước các đoạn khuếch đại từ thấp đến cao	6,38	9,18	3,92	7,97	0,68	13,04	1,64
	9,56	19,08	4,38	8,70	2,04	19,13	2,74
	15,44	17,56	2,92	7,97	12,93	26,09	15,07
	19,12	19,08	13,14	11,59	17,69	20,00	24,66
	5,15	9,92	18,98	12,32	16,33	11,30	11,64
	13,97	2,29	21,90	13,04	12,24	10,43	22,60
	1,47		8,76	4,35	8,84		5,48
			1,46	10,87	9,52		
				13,04	3,40		
				5,07			
				5,07			

Số allen cao thể hiện tính đa hình của các chỉ thị microsatellite. Mức độ biến đổi được mô tả bởi số lượng allen ở mỗi chỉ thị đóng vai trò là thước đo biến đổi gen tác động trực tiếp đến sự khác biệt của các giống trong một loài (Buchanan, 1994). Kết quả Bảng 4 có thể thấy giá trị Na cao nhất của 7 microsatellite (6,43 allen) nhóm mẫu TN3 dao động từ 6 đến 9 allen. Trong đó giá trị Na thấp nhất là nhóm mẫu TN1 (5,86) giao động từ 4 đến 9 allen. Số lượng allen của một locus càng lớn thì sự mang thông tin của chỉ thị càng cao (Nguyen, & Geldermann, 2004). Theo khuyến cáo của Yue (2014) nên sàng lọc các microsatellite có hiệu suất PCR trên 90% và đa hình với 5 allen. Kết quả nghiên cứu này cho thấy 7 chỉ thị microsatellite đều có từ 5 allen trở lên có triển vọng

ứng dụng trên các quần thể để thay đổi di truyền, xây dựng kế hoạch lai tạo giống (Nguyen, 2019). Giá trị dị hợp tử quan sát được cũng là chỉ số đánh giá mức độ đa dạng, trong đó cao nhất ở quần thể TN3 (0,56) so với quần thể TN2 (0,44) và TN1 (0,42). Ngoài ra, số lượng allen hiệu quả (Ne) cũng là một chỉ số được sử dụng để đánh giá sự đa dạng di truyền của quần thể và Ne còn được sử dụng để phân tích sự ảnh hưởng của các allen trong mỗi quần thể (Kimura, & Crow, 1964). Số lượng allen hiệu quả được tính toán và trình bày ở Bảng 4. Giá trị Ne cao nhất ở nhóm mẫu TN3 (5,04) giao động từ 3,61 đến 7,58 thấp nhất ở nhóm mẫu TN2 (4,24) từ 3,21 đến 5,28. Vì vậy, nhóm TN3 các allen hiệu quả phản ánh mức độ dị hợp tử nhiều hơn 2 nhóm mẫu còn lại. Nguyên nhân có thể giải thích do quá trình thu mẫu TN3 sau khi điều tra cho thấy ngư dân bắt từ tự nhiên trực tiếp về trại giống nuôi lúc cá trưởng thành chưa qua sinh sản và tiến hành thu mẫu vây cá trực tiếp nên có độ đa dạng cao hơn so với các nhóm mẫu TN1, TN2 còn lại là từ các trại giống bắt cá từ tự nhiên từ lúc còn cá bột về thuần và nuôi cho sinh sản qua nhiều thế hệ nên có sự giao phối làm giảm tỉ lệ dị hợp tử tăng hơn.

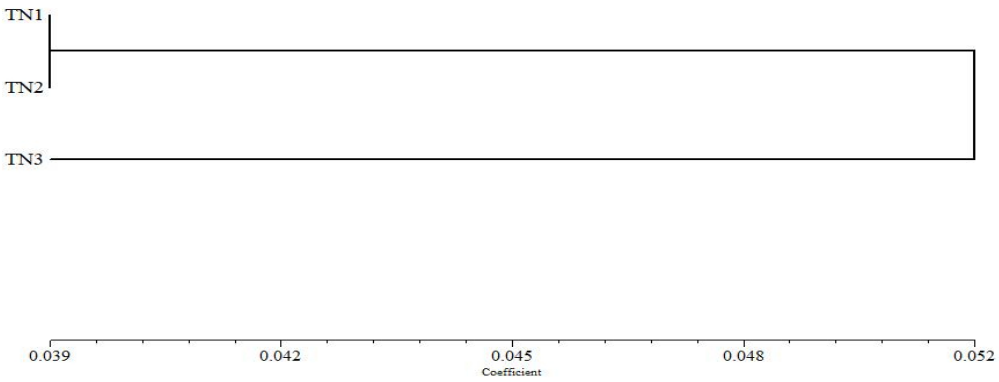
Bảng 4. *Giá trị Ho, He, PIC trên 3 nhóm mẫu cá Tra*

Nhóm cá	Locus	Ph-7	Ph-9	Ph-41	CB-12	CB-15	CB-18	PHPG579	TB	SD
TN1	Na	5,00	5,00	4,00	9,00	6,00	6,00	6,00	5,86	1,57
	Ne	3,93	3,09	3,10	7,89	5,28	4,52	3,75	4,51	1,68
	Ho	0,25	0,29	0,33	0,29	0,67	0,29	0,79	0,42	0,22
	He	0,76	0,69	0,69	0,89	0,83	0,80	0,75	0,77	0,07
	PIC	0,75	0,68	0,68	0,87	0,81	0,78	0,73	0,76	0,07
	I	1,45	1,29	1,20	2,11	1,73	1,62	1,44	1,55	0,31
TN2	Na	6,00	6,00	5,00	9,00	6,00	6,00	6,00	6,29	1,25
	Ne	4,70	3,85	3,21	5,14	3,96	5,28	3,50	4,24	0,81
	Ho	0,25	0,29	0,50	0,46	0,71	0,29	0,58	0,44	0,17
	He	0,80	0,76	0,70	0,82	0,76	0,83	0,73	0,77	0,05
	PIC	0,79	0,74	0,69	0,81	0,75	0,81	0,71	0,76	0,05
	I	1,67	1,51	1,31	1,87	1,51	1,72	1,40	1,57	0,19
TN3	Na	6,00	6,00	6,00	9,00	6,00	6,00	6,00	6,43	1,13
	Ne	4,43	3,74	5,57	7,58	4,86	3,61	5,46	5,04	1,36
	Ho	0,54	0,54	0,38	0,38	0,71	0,67	0,71	0,56	0,14
	He	0,79	0,75	0,84	0,89	0,81	0,74	0,83	0,81	0,05
	PIC	0,77	0,73	0,82	0,87	0,79	0,72	0,82	0,79	0,05
	I	1,60	1,50	1,75	2,10	1,66	1,47	1,74	1,69	0,21

Giá trị He, PIC có thể cung cấp thông tin quan trọng trong việc phân biệt và đánh giá tính đa dạng di truyền giữa các cá thể và nhóm mẫu khác nhau. Theo Botstein (1980), PIC và He là các chỉ số sử dụng để đánh giá về đa dạng di truyền và mức biến đổi gen khi PIC>0,5 và He>0,6 locus có sự đa dạng cao; khi 0,25<PIC locus có sự đa dạng thấp;

0,25<PIC<0,5 locus có sự đa dạng trung bình. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy trong số bốn nhóm mẫu, nhóm mẫu TN3 có chỉ số He và PIC cao nhất chứng tỏ nhóm mẫu TN3 có độ đa dạng di truyền cao hơn các nhóm mẫu còn lại. PIC trung bình của tất cả các chỉ thị và nhóm mẫu là 0,771. Hệ số PIC của hầu hết các microsatellite lớn hơn 0,5 và He của hầu hết các microsatellite lớn hơn 0,6 điều này chỉ ra rằng các chỉ thị microsatellite được chọn có độ đa dạng cao và có thể áp dụng cho phân tích đa dạng di truyền của các nhóm mẫu khác nhau ở cấp độ phân tử. Theo Berthouly (2008), các chỉ thị microsatellite được sử dụng để ước tính tính đa dạng kiểu gen của dị hợp tử và thông tin giá trị PIC trong việc lựa chọn và lai tạo các giống vật nuôi. Các chỉ thị microsatellite có đa hình cao được chọn để nghiên cứu các mối quan hệ di truyền và sự khác biệt về giống và có ý nghĩa trong sử dụng phân tích đa dạng di truyền các nhóm mẫu cá Tra tại Việt Nam. Hầu hết các chỉ thị đều cho thấy tỉ lệ dị hợp tử mong đợi He tương đối cao phản ánh sự tồn tại của sự khác biệt trong nhóm mẫu.

Cây phân loài di truyền của các quần thể cá Tra được xây dựng dựa trên khoảng cách di truyền chuẩn của Nei (1972). Chương trình Dendrogam được xây dựng bằng phương pháp UPGMA của phần mềm NTSYSpc 2.11 cho kết quả khoảng cách di truyền gần nhất giữa nhóm mẫu TN1 và TN2, kế tiếp là TN3. Bốn nhóm mẫu được nhóm lại thành ba nhóm, nhóm gồm có TN1 và TN2, cùng chung nhóm với TN3 (Hình 3).



Hình 3. *Cây di truyền của 3 nhóm mẫu*

Khoảng cách di truyền nhỏ nhất được tìm thấy giữa TN1 và TN2 và cao nhất là giữa TN1 và TN3. Điều này cũng phù hợp với thực tế vì khi khảo sát các trại nuôi cá Tra trong nghiên cứu đều có nguồn gốc con giống xuất phát từ Campuchia. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Tran (2017) cho thấy cá Tra tự nhiên nuôi tại các trại giống có khoảng cách di truyền thấp. Bước đầu các chỉ thị này có khả năng phục vụ phân tích đa dạng di truyền quần thể và phân tách di truyền giữa các quần thể. Tuy nhiên, cũng cần phải xem xét đến tính chưa ưu việt về kĩ thuật điện di đang sử dụng trong nghiên cứu này so với với các nghiên cứu khác (Nguyen, 2019) và những ảnh hưởng phụ có thể xảy ra trong quá trình khuếch đại sản phẩm cùng với phương thức điện di trên gel agarose như đã chỉ ra trong

các nghiên cứu gần đây trên thế giới khi ứng dụng chỉ thị microsatellite (Harr, 2000; Brookes, 2012; Hosseinzadeh-Colagar, 2016). Vì thế, việc sử dụng các nguồn vật liệu di truyền từ nghiên cứu này là cơ sở cho những ứng dụng các công nghệ tiến bộ hơn trong phân tích chỉ thị là điều cần quan tâm (Nguyen, 2019).

4. Kết luận

Bộ 7 chỉ thị microsatellite (CB12, CB15, CB18, Ph07, Ph09, Ph41 và PSP-G579) đã được thiết kế các thành phần cho phản ứng PCR và có thể được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền. Qua kết quả khảo sát nhận diện DNA thì có 7 chỉ thị khuếch đại được những đoạn DNA đa hình trong 3 nhóm mẫu với Na cao (>4 allen/quần thể) và hệ số PIC của hầu hết các microsatellite lớn hơn 0,5; He của hầu hết các microsatellite lớn hơn 0,6 điều này chỉ ra rằng các chỉ thị microsatellite được chọn có độ đa dạng cao và có thể áp dụng cho phân tích đa dạng di truyền của các nhóm mẫu. Ngoài ra, quy trình thử nghiệm đánh giá đa dạng di truyền trên cá Tra trong nghiên cứu này đã được tiến hành với một số kết quả nhất định như nhóm mẫu TN3 có độ đa dạng di truyền cao nhất so với hai nhóm mẫu còn lại. Khoảng cách di truyền giữa các nhóm cá Tra trong nghiên cứu nhóm 1 và nhóm 3 là xa nhất và khoảng cách di truyền giữa nhóm 1 và nhóm 2 là gần nhất. Kết quả nghiên cứu phần nào phản ánh mức độ đa dạng di truyền cũng như mối quan hệ của các quần thể cá Tra ở đồng bằng sông Cửu Long. Các chỉ thị microsatellite đều thể hiện tính đa hình bước đầu có ý nghĩa khi sử dụng trong đánh giá đa dạng di truyền nguồn vật liệu cá Tra và là cơ sở hỗ trợ các nghiên cứu khác trong nghiên cứu về di truyền phân tử trên cá Tra.

❖ ***Tuyên bố về quyền lợi:*** *Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Berthouly, C., Bed'Hom, B., Tixier-Boichard, M., Chen, C. F., Lee, Y. P., Laloë, D., Legros, H., Verrier, E., & Rognon, X. (2008). Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. *Animal genetics, 39*(2), 121-129. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01703.x

Barker, J. S., Moore, S. S., Hetzel, D. J., Evans, D., Tan, S. G., & Byrne, K. (1997). Genetic diversity of Asian water buffalo *(Bubalus bubalis)*: microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal genetics, 28*(2), 103-115. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1997.00085.x

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.

Buchanan, F. C., Galloway, S. M., & Crawford, A. M. (1994). Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129 and OarFCB226 loci. *Animal genetics*, 25(1), 60.

Bui, T. L. H., Le, N. T. T., & Nguyen, V. S, (2017). Thu nghiem xac dinh pha he bang chi thi phan tu Microsatellite tren quan the chon giong ca Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) [Parentage assignment of selective population of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) using microsatellite. *Journal of Agriculture and Rural development*, I, 8-97.

Brookes, C., Bright, J. A., Harbison, S., & Buckleton, J. (2012). Characterising stutter in forensic STR multiplexes. Forensic science international. *Genetics*, *6*(1), 58-63. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.02.001

Cruz, P., Ibarra, A. M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P. M., & Pérez-Enríquez, R. (2004). Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp *(Litopenaeus vannamei*). *Marine biotechnology* (New York, N.Y.), *6*(2), 157-164. https://doi.org/10.1007/s10126-003-0017-5

Harr, B., Zangerl, B., & Schlötterer, C. (2000). Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from Drosophila. *Molecular biology and evolution*, *17*(7), 1001-1009. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026381

Hogan, Z. S., & May, B. P. (2002). Twenty-seven new microsatellites for the migratory Asian catfish family *Pangasiidae*. *Molecular Ecology*, 2, 38-41. doi:10.1046/j.1471-8286.2002.00139.x

Hosseinzadeh-Colagar, A., Haghighatnia, M. J., Amiri, Z., Mohadjerani, M., & Tafrihi, M. (2016). Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. *Molecular biology research communications*, *5*(3), 167-174.

Kimura M., & Crow J. F., (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population**.** *Genetic*, *49*(4), 725-738.

McDaniel, J., & Pillai, S. D. (2002). Gel alignment and band scoring for DNA fingerprinting using Adobe Photoshop. *BioTechniques*, *32*(1), 120-123. https://doi.org/10.2144/02321bc03

Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam, K., & Latif, M. A. (2013). A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International journal of molecular sciences*, *14*(11), 22499-22528. https://doi.org/10.3390/ijms141122499

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, *16*(3), 1215. https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215

Na-Nakorn, U., Sriphairoj, K., Sukmanomon, S., Poompuang, S., Kamonrat, W., (2006). Polymorphic microsatellite from DNA of the endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Chevey) and cross-species amplification in three species of Pangasius. *Molecular Ecology*, *6*, 1174-1176.

Nei, M. (1972). Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*, *106*(949), 283-292. Retrieved September 26, 2020, from http://www.jstor.org/stable/2459777

Nguyen, T. D. T., & Geldermann H., (2004). Da dang di truyen mot so giong lon noi Viet Nam va Chau Au dua tren chi thi microsatellite [Genetic diversity of Vietnamese and European pig breeds based on microsatellite markers]. *VNU Journal of Science, Natural Science and Technology, 20*(4), 1-10.

Nguyen, H. N., & Luu, T. H. G., (2012). Nghien cuu xac dinh da dang di truyen va huyet thong ca Tra *(Pagasius hypophthalmus)* bang chi thi microsatellite [Assessment of genetic diversity and parental assignment of striped catfish *(Pagasius hypophthalmus)* using microsatellite markers], *Scientific report, Research Institute of Aquaculture No 1.*

Nguyen, N. T., Nguyen, T. K. N., Hoang, T. T., Vo, P. K. B. N., Phan, H. H. T., Nguyen, T. L. A. & Pham, C. T., (2019). Da dang di truyen mot so quan the trau noi Viet Nam [Genetic diversity of Vietnamese native buffaloes]. *Journal of Animal Science and Technology, 242.*

Nguyen, T. P., & Nguyen, A. T., (2018). 50 nam nuoi ca Tra o dong bang song Cuu Long thanh cong va thach thuc trong phat trien ben vung [The success of 50-year striped catfish farming in the Mekong Delta and challeges on sustainable development]. *Agricultural Pulishing House*.

Pham, A. T., & Nguyen, H. N., (2003). Nghien cuu bien di RFLPs mot so quan the ca Tra *(Pangasius hypophthalmus)* [Diversity of Tra catfish populations studied by RFLPs]. *National Conference on Biotechnology, Hanoi*. 724-726.

So, N., & Vockaert, A. M., (2006), Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. *Fisheries science*, *72*, 469-476.

Tran, N. H., & Phung, T. T., (2013). Danh gia da dang di truyen loai du sam da voi *Keteleeria davidiana (Bertrand) Beissn* bang ki thuat RAPD [Assessment of genetic diversity of *Keteleeria davidiana (Bertrand) Beissn* using RAPD technique]. *Journal of Forest Science and Technology*, (1), 22-27.

Tran, T. T. H, Nguyen, T. H, Ngo, P. T., & Tran, N. A. H. (2017). Muc do da dang di truyen cua mot so quan the ca Tra su dung chi thi phan tu cytochrome b [Genetic diversity of Tra catfish populations in Vietnam using cytochrome b gene]. *Journal of Science, Vinh University, 46*(4A), 21-31

Volckaert, F. A. M., Hellemans, B., & Pouyaud, L., (1999). Nine polymorphic microsatellite markers in the SE Asian catfishes *Pangasius hypophthalmus* and *Clarias batrachus*. *Animal Genetics*, 30, 383-384.

Yeh, F.C., Yang, R. C., Boyle, T. B. J., Ye, Z. H., & Mao, J. X. (1997). POPGENE, the User Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta. http://www.ualberta.ca/~fyeh

Yue, G. H., & Xia, J. H., (2014). Practical Considerations of Molecular Parentage Analysis in Fish. *Journal of The World Aquaculture Society*, *45*(2), 89-103.

OPTIMAL RECTION PCR FOR RESEARCH GENETIC DIVERSITY OF TRA CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Tran Thi Phuong Dung[1*], Bui Thi Lien Ha[2], Nguyen Hoang Thong[2]
Nguyen Ngoc Thuy Trang[2], Tran Hoang Gia Linh[2], Nguyen Van Sang[2]

[1]Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam
[2]Research Institute for Aquaculture No. 2, Vietnam
[*]Corresponding author: Tran Thi Phuong Dung – Email: dungttp@hcmue.edu.vn
Received: March 26, 2020; Revised: April 28, 2020; Accepted: September 21, 2020

ABSTRACT

In this experimental study, microsatellite markers for Tra catfish (Pangasianodon hypophthalmus) from previous studies were selected to optimize using the multiplex the process PCR to analyse the genetic diversity of Tra catfish populations in Vietnam. The markers used in the study is a set of seven single microsatellite markers (Ph07, Ph09, Ph41, CB12, CB15, CB18, and PSPG579) that have been optimized for successful PCR reactions in Tra catfish. The initial results of these markers were then applied to assess the genetic the diversity of Tra populations, showing that all microsatellite markers are polymorphic and meaningful when used to assess the genetic variation of Tra catfish populations. The method used in this study was single PCR and optimized for each microsatellite indicator with 4% agarose to analysis polymorphic' populations. The results show that all indicators have been successfully optimized for PCR reactions on Tra catfish and the markers have a high polymorphism with an averaged amplification of 7.11, Na = 6.19, He = 0.78, and PIC = 0.77 on each marker in the three sample groups. The results will be served as a foundation for next steps on applying the multiplex PCR and support other studies on genetic diversity on Tra catfish.

Keywords: *microsatellite*; PCR reaction; genetic diversity