

## PHÂN TÍCH ĐA HÌNH RFLP-mt DNA CỦA MỘT SỐ ĐỒNG CÁ RÔ PHI NUÔI TẠI VIỆT NAM

NGUYỄN THỊ THANH BÌNH, ĐINH THỊ NGỌC THÚY, QUYÊN ĐÌNH THI

*Viện Công nghệ sinh học*

PHẠM ANH TUẤN

*Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản I*

Rô phi là một trong những loài cá có giá trị kinh tế cao, được nuôi ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt tại các nước thuộc vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới [1, 7]. Ở Việt Nam, các đồng cá rô phi được nuôi làm giống có nguồn gốc và thời gian nhập nội khác nhau. Cho đến nay, việc đánh giá, nhận dạng các đồng cá rô phi chỉ dựa vào đặc điểm hình thái nên còn nhiều hạn chế, để phân biệt các đồng người ta phải gọi tên theo suất sứ như vằn Đài Loan, vằn Trung Quốc, hay xanh Trung Quốc, xanh Israel vì theo ngoại hình chúng chỉ được phân thành loại vằn *Oreochromis Niloticus* và loại xanh *Oreochromis Areus*. Trong một thời gian dài, việc lưu giữ và phát triển các đồng thuần của cá rô phi chưa được chú ý nên nhiều đồng bị lẫn hoặc tạp giao hay lai cận huyết, do đó chất lượng cá giống bị ảnh hưởng. Việc chọn lọc nhằm nâng cao chất lượng giống cá chỉ thực hiện theo phương pháp truyền thống nên hiệu quả đạt được chưa cao.

Những năm gần đây, với thành tựu nổi bật của công nghệ sinh học, nhiều hạn chế trong chọn lọc giống cá rô phi đã được khắc phục. Người ta đã sử dụng khá thành công một số chỉ thị phân tử như allozyme, RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragment Polymorphism DNA), SSR [(Simple Sequence Repeats hay microsatellite - tiểu vệ tinh] và các chỉ thị khác để đánh giá đa dạng di truyền, nhận dạng đồng giống, xác định độ thuần trong quá trình thuần dòng [3, 5, 8, 9, 11, 12]. Đặc biệt chỉ thị DNA ty thể (mitochondrial DNA sử dụng phương pháp PCR-RFLP: mt DNA-RFLP) của vùng điều khiển D-loop và microsatellite được

áp dụng rộng rãi và hiệu quả trong các nghiên cứu đánh giá sự thuần hóa của các đồng cá rô phi, cá chép [1, 2, 4, 5, 9] và loài khác như tầm đầu [6, 9]. Các marker phân tử này tập trung vào các vùng gien có tính đa dạng cao [8] nên được chú ý nghiên cứu. Ngoài ra, marker mt-RFLP còn cho phép xác định những biến dị di truyền phục vụ chọn tạo giống và nhận dạng được đến loài phụ của cá rô phi *Oreochromis Niloticus* và cá chép [11, 12], có thể nghiên cứu tính đa hình để chọn ra các đồng rô phi lớn nhanh, có khả năng chống chịu stress, bệnh tật và khí hậu [1].

Với mục đích trợ giúp cho công tác chọn lọc giống cá rô phi, góp phần cải tạo chất lượng giống chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử mt-RFLP để nhận dạng các đồng cá rô phi đang nuôi tại Việt Nam.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu là 189 mẫu vây cá của 7 đồng cá rô phi khác nhau (bảng 1) do Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản I (Đình Bảng, Từ Sơn, Bắc Ninh) cung cấp, mẫu được ngâm trong cồn 70°C và bảo quản ở 4°C cho đến khi tách DNA tổng số.

Các môi sử dụng theo tài liệu của Bernatchez & Danzmann [2] và có trình tự, nhiệt độ gắn môi, nồng độ muối trình bày ở bảng 2.

Hóa chất dùng cho tách chiết DNA, các thành phần khuếch đại gen và các loại enzym hạn chế mua của hãng Fermentas, agarose của hãng Promega, Taq polymerase của Viện Công nghệ sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bảng 1

Tên mẫu và số cá thể của các dòng cá rô phi

STT	Tên mẫu	Ký hiệu	Số cá thể
1	<i>O. niloticus</i> Thái Lan	R1	09
2	<i>O. areus</i> Phi-líp-pin	R2	30
3	<i>O. areus</i> Trung Quốc	R3	30
4	<i>O. areus</i> Israel	R4	30
5	<i>O. niloticus</i> Israel	R5	30
6	<i>O. niloticus</i> Trung Quốc	R6	30
7	<i>O. niloticus</i> Đài Loan	R7	30

Bảng 2

Trình tự nucleotid, nhiệt độ gắn môi, nồng độ muối Mg<sup>2+</sup> của mt RFLP

Tên môi	Trình tự đoạn môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi	Nồng độ Mg <sup>2+</sup>
12S	CAA ACT GGG ATT AGA TCA CCC ACT AT AGG GTG ACG GGC GGT GTG GT	55°C	2,5 mM
16S	GTG CAA AGG TAG CAT AAT CA TGT CCT GAT CCA ACA TCA AG	55°C	2,5 mM
D-loop	ACC ACT AGC ACC CAA AGC TA GTG TTA TGC TTT AGT TAA GC	55°C	2,5 mM

Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ vây cá rô phi theo Đào Thị Tuyết [3]. Độ tinh sạch và nồng độ DNA được kiểm tra bằng máy đo quang phổ kết hợp với điện di trên agarose 0,8% so với DNA chuẩn. PCR-mtRFLP được thực hiện trong thể tích 20 µl hỗn hợp chứa đệm PCR 10x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 2 mM, primer 2,5 mM, Taq polymerase 5 u/1µl, 20ng DNA khuôn. Thực hiện khuếch đại gen trên máy PCR-Thermal Cycler theo chế độ: biến tính DNA trong 3 phút ở 94°C-95°C, sau đó lặp lại 35 chu kỳ 94°C 40 giây đến 1 phút, 55°C 45 giây đến 1 phút, 72°C 1 phút 30 giây, cuối cùng 72°C 7 đến 10 phút và lưu giữ ở 4°C [2]. Sản phẩm PCR-mt RFLP được điện di phân tích trên gel agarose 1,2%, nhuộm bằng

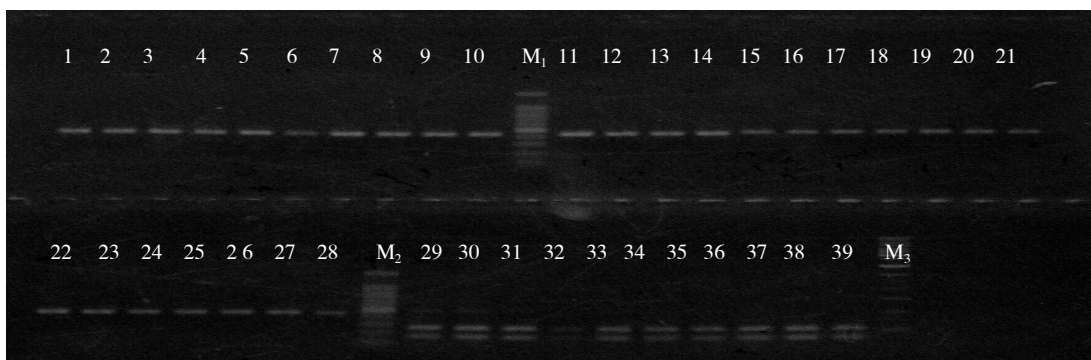
ethidium bromide, soi và chụp ảnh trên máy Gen Doc và máy ảnh kỹ thuật số. Số liệu xử lý theo thống kê sinh học.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu vây của 189 cá thể thuộc 7 dòng cá rô phi được dùng để tách chiết DNA tổng số theo phương pháp như Đào Thị Tuyết [3] đã mô tả. Chỉ những mẫu DNA có kết quả kiểm tra bằng đo quang phổ và điện di trên agarose 0,8% đủ chất lượng mới được dùng trong các phân tích tiếp theo.

### 2. Phân tích phân đoạn 12S rRNA và 16S rRNA của các dòng cá rô phi



**Hình 1.** Ảnh điện di sản phẩm 12S rRNA cắt với hai enzym hạn chế  
1. Đối chứng; 2-28. mẫu các dòng cắt với *Hin*I;  
M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>. Marker 100bp; M<sub>3</sub>. Marker 1kb; 29-39. mẫu các dòng cắt với *Taq*I.

Phân đoạn 12S rRNA và 16S rRNA của các dòng cá rô phi đã được khuếch đại và cắt với các enzym hạn chế *AluI*, *HinfI*, *HindIII*, *PstI*, *TaqI*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*, *SacI*. Trong số 12 enzym sử dụng để cắt 12S rRNA, chỉ có duy nhất *TaqI* cắt 2 băng đơn hình ở tất cả các mẫu, các enzym khác không cắt (hình 1). Còn phân đoạn 16S rRNA không cắt bởi bất cứ enzym nào. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với công bố của Shekhar và cộng sự [11], theo đó phân đoạn 12S rRNA cắt đơn hình với một vài enzym hoặc không cắt ở các mẫu cá rô phi. Như vậy, RFLP của 12S rRNA và 16S rRNA không cho đa hình.

### 3. Phân tích phân đoạn D-loop của các dòng cá rô phi

Các enzym hạn chế *AluI*, *HinfI*, *MspI*, *TaqI*, *AvaII* và *EcoRI* được sử dụng để cắt phân đoạn D-loop của các dòng cá rô phi. Trong số đó, *EcoRI* không cắt bất cứ mẫu nào, còn *AluI* cắt hai băng đơn hình ở tất cả các dòng. Các enzym khác cho các kiểu allen khác nhau và biểu diễn ở bảng 3. Kết quả bảng 3 cho thấy, trong các dòng rô phi phân tích có mười kiểu allen được ký hiệu a, b, c, d, e, g, h, i, k, n. Trong đó cắt bằng *AvaII* cho hai kiểu allen, kiểu a không cắt với kích thước phân đoạn khoảng 1000 bp, kiểu b có hai phân đoạn 550 bp và 450 bp. Cắt bằng *HinfI* cho bốn kiểu allen, kiểu c có hai phân đoạn 820 bp và 180 bp, kiểu d gồm

hai phân đoạn 660bp và 340bp, kiểu e cho ba phân đoạn 440bp, 320bp, 240bp, kiểu g hiển thị hai phân đoạn 680bp và 320bp. Cắt bằng *MspI* cho hai kiểu allen, kiểu h cho hai phân đoạn 820bp và 180bp, kiểu i có ba phân đoạn 520bp, 300bp và 180bp. Cắt bằng *TaqI* cho hai kiểu allen, kiểu k cho hai phân đoạn 520bp và 480bp, kiểu n có hai phân đoạn 700bp và 300bp.

Các phân tích của chúng tôi lặp lại kết quả của Agnese và cộng sự [1] trong các phân tích di truyền quần đàn cá rô phi, theo đó D-loop cắt với *AvaII* cho hai kiểu allen A và B, tương tự kiểu a và b, *MspI* có hai kiểu allen A và B tương đương với h và i, còn *TaqI* cho hai kiểu allen A và B giống như k và n. Riêng với *HinfI* họ nhận được ba kiểu allen là A, B, C, còn chúng tôi nhận được bốn kiểu c, d, e, g, trong đó kiểu allen A gồm hai phân đoạn 660 bp và 320bp gần giống với c có hai phân đoạn 660 bp và 340 bp, khả năng mẫu chưa cắt hoàn toàn hoặc kết quả đọc dựa vào marker chưa sát, theo chúng tôi khả năng kiểu allen A tương tự như kiểu c, còn kiểu C giống như kiểu e. Riêng hai kiểu c và g xuất hiện trong các phân tích của chúng tôi nhưng không thấy trong công bố của họ và kiểu allen B gồm 400 bp và 290 bp không quan sát thấy trên các mẫu cá rô phi nuôi tại Việt Nam. Liệu đây có phải là những khác biệt của các dòng cá rô phi khi nuôi ở các vùng địa lý khác nhau? Cần tiếp tục tìm hiểu để có thể khai thác sử dụng.

Bảng 3

Tổng hợp các kiểu gene mt-RFLP trên các dòng cá rô phi

Enzim	<i>AvaII</i>		<i>HinfI</i>				<i>MspI</i>		<i>TaqI</i>	
Kiểu allen	A	b	c	d	e	g	h	i	k	n
	A	B	A	B	C	D	A	B	A	B
	1000	550 450	820 180	660 340	440 320 240	680 320	820 180	520 300 180	520 480	700 300

Các dòng cá rô phi có những đặc tính sinh học và kinh tế khác nhau, do đó việc tìm kiếm các chỉ thị để nhận dạng dòng có ý nghĩa quan trọng trong chọn giống. Phân tích tần số xuất hiện các kiểu allen trong các dòng cá rô phi nuôi ở Việt Nam trình bày trong bảng 4 và hình 3, 4, 5, 6 có thể thấy, một số kiểu allen xuất hiện với tần suất cao nhất như kiểu allen a ở dòng R3, R4 (hình 2A), kiểu allen b ở dòng R1, R7 (hình 2B), kiểu allen i ở dòng R1, R5, R7

(hình 3A), kiểu allen e và h ở dòng R3 (hình 3B), kiểu allen h và n ở dòng R4 (hình 4A) và R3 (hình 4B), kiểu allen d, k, i ở dòng R5 (hình 5). Từ hình 2 còn quan sát thấy enzym hạn chế *AvaII* có thể dùng để nhận dạng dòng R3 khi tất cả các cá thể của dòng đều không cắt - hình 2A, và dòng R5 cắt đơn hình ở 100% cá thể - hình 2B. Ngoài ra, kiểu allen i ở dòng R2 xuất hiện với tần suất 0,17, kiểu allen h hiển thị với tần suất cao hơn 0,83 trong khi đó ở

dòng R1 toàn bộ các cá thể cho kiểu allen i (hình 3). Như vậy những kiểu allen xuất hiện với tần suất tuyệt đối 100% trên các dòng cá rô phi có thể sử dụng để nhận dạng và phân loại chúng.

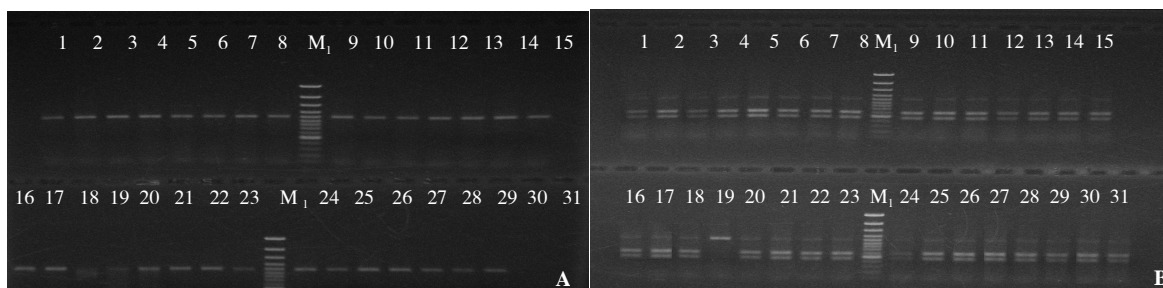
Tổng thể quan sát thấy ba dòng R3, R4, R5 phân biệt rõ ràng với bốn dòng còn lại khi các kiểu allen xuất hiện ở các dòng này đạt tần suất 100%. Trên một góc độ khác, có thể thấy một số

kiểu allen không hiển hiện ở một số dòng cá rô phi cũng có thể sử dụng để phân biệt với các dòng khác như kiểu allen a không có ở R1, R5, R7, kiểu allen b, i và k không quan sát thấy ở R3, R4, kiểu allen c không tồn tại ở R3, R4, R5, R6, kiểu allen d không có ở các dòng R2, R3, R4, R6, R7, kiểu allen e và n không thấy ở R1 và R5, kiểu allen g không phát hiện được ở R1 đến R5, kiểu allen h không xuất hiện ở R1, R3, R5, R7.

Bảng 4

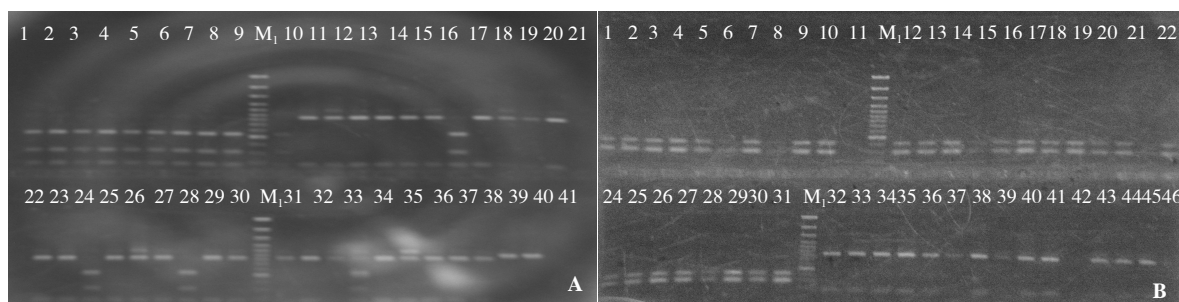
Tần số xuất hiện các kiểu allen trong các dòng cá rô phi

Enzyme	Các dòng		n	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	Kiểu allen									
<i>AvaII</i>	a	A	90,0	-	0,87	1,0	1,0	-	0,13	-
	b	B	100	1,0	0,13	-	-	1,0	0,87	1,0
<i>HinfI</i>	c	A	26,0	0,67	0,13	-	-	-	-	0,52
	d	B	33,0	0,33	-	-	-	1,0	-	-
	e	C	99,0	-	0,87	1,0	1,0	-	0,3	0,03
	g	D	35,0	-	-	-	-	-	0,7	0,45
<i>MspI</i>	h	A	83,0	-	0,83	1,0	1,0	-	0,93	-
	i	B	77,0	1,0	0,17	-	-	1,0	0,07	1,0
<i>TaqI</i>	k	A	94,0	1,0	0,17	-	-	1,0	0,67	0,97
	n	B	96,0	-	0,83	1,0	1,0	-	0,33	0,03



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm D-loop cắt với enzym hạn chế *AvaII*

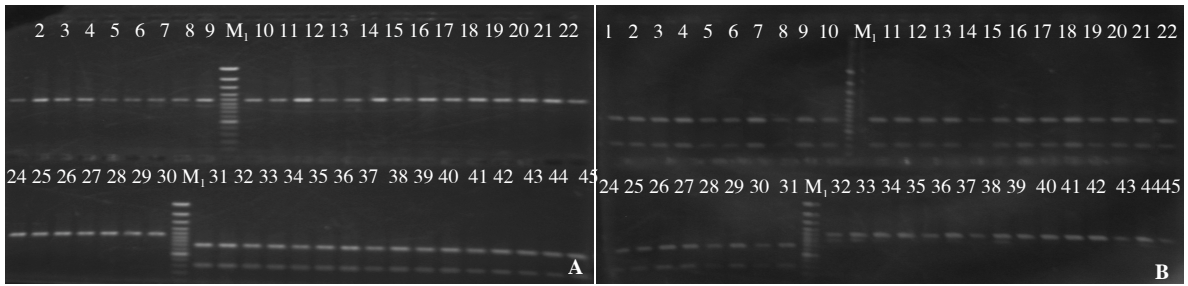
A: 1-30. dòng R3; 31. Đối chứng; M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>. Marker 100bp; B: 1-30. dòng R7; 31. Đối chứng.



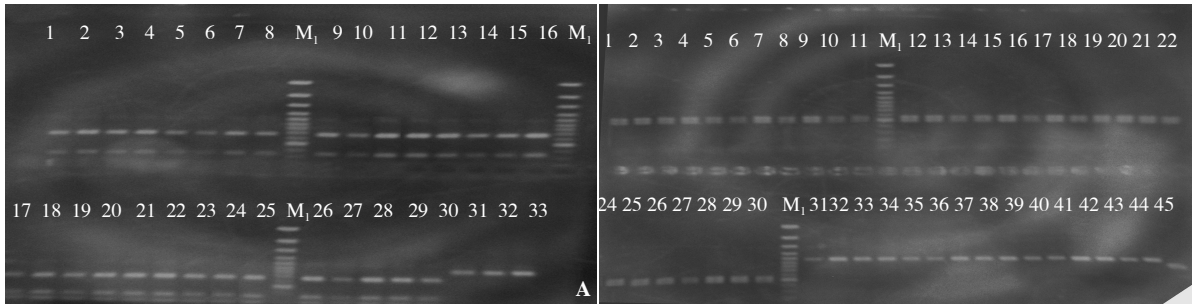
Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm D-loop cắt với enzym hạn chế *MspI* và *HinfI*

A. Cắt với *MspI*: 1-9. dòng R1; 10-39. dòng R2; 40-41. Đối chứng; M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>. Marker 100bp; B: 1-30. dòng R3 cắt với *HinfI*; 31-46. dòng R3 cắt với *MspI*; 32. Đối chứng.





**Hình 4.** Ảnh điện di sản phẩm D-loop cắt với enzym hạn chế *MspI*, *TaqI*  
**A:** 1-30. dòng R4 cắt với *MspI*; 31-45. dòng R4 cắt với *TaqI*; 40-41. Đối chứng;  $M_1, M_2$ . Marker 100bp;  
**B:** 1-30. dòng R3 cắt với *TaqI*; 32-45. dòng R3 cắt với *MspI*; 31. Đối chứng.



**Hình 5.** Ảnh điện di sản phẩm D-loop dòng R5 cắt với một số enzym hạn chế  
**A:** 1-30. dòng R5 cắt với *HinFI*; 31-33. Đối chứng;  $M_1, M_2$ . Marker 100bp;  
**B:** 1-30. dòng R5 cắt với *TaqI*; 31-45. dòng R5 cắt với *MspI*; 46. Đối chứng.

### III. KẾT LUẬN

7 dòng cá rô phi có nguồn gốc và đặc tính sinh học khác nhau đã được phân tích bằng chỉ thị mt-RFLP. Với phân đoạn 12S rRNA và 16S rRNA không cho đa hình ở tất cả các dòng. Với D-loop xác định được 10 kiểu allen trong đó kiểu allen a, c, h, n có thể nhận dạng dòng R3, R4, kiểu allen b, i - nhận biết dòng R1, R5, R7, kiểu allen d nhận dạng dòng R5, kiểu allen k - nhận biết dòng R1 và R5 khi chúng xuất hiện với tần suất 100%. Cần phát triển hướng nghiên cứu này để ứng dụng vào chọn lọc giống.

**Lời cảm ơn:** Công trình thực hiện với kinh phí của đề tài cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn 2008-2010 thuộc chương trình phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực thủy sản.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agnese J. F., Adepo-Gourene B., Abban E. K., Fermon Y., 1997: Heredity 79(1): 88-96.
2. Bernatchez L., Danzmann R. G., 1993:

Charr. Mol. Biol. Evol., 10: 1002 -1014.

3. Đào Thị Tuyết, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Bẩy, Phạm Anh Tuấn, 2003: Đánh giá tính đa hình các quần đàn cá tra nuôi (*Pangasius hypophthalmus*) ở Việt Nam bằng phương pháp RAPD: 616 - 620. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
4. McAndrew B. J. et al., 1988: Genetica, 76: 127-137.
5. Ezaz M. T. et al., 2004: Mar. Biotechnol, 6: 435-445.
6. Edward K. N., Keiko KO., 2005: J. of Insect Biotechnology and Sericology, 74: 5-13.
7. Lee B-Y., Hulata G., Kocher T. D., 2004: Heredity, 92: 543-549.
8. Lee B-Y. et al., 2005: Genetics, 170: 237-244.
9. Kocher T. D. et al., 1998: Genetica, 148: 1225-1232.
10. Hara W., 1996: Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., 16: 21-30.

11. Shekhar M. S. et al., 2005: Asian Fisheries Science, 18: 39-48.      12. Seyoum S., Kornfield I., 1992: Aquaculture, 102: 29-42.

## **POLYMORPHISM OF THE TILAPIA'S POPULATIONS USING RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA**

**NGUYEN THI THANH BINH, DINH THI NGOC THUY,  
QUYEN DINH THI, PHAM ANH TUAN**

### **SUMMARY**

We analyzed the genetic differentiation among seven populations of the tilapia reared in Vietnam by using restriction fragment length polymorphism (RFLP) of mitochondrial DNA (mtDNA).

The PCR products of 12S rRNA from all the above samples were digested with *AluI*, *HinfI*, *HindIII*, *PstI*, *TaqI*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*, *SacI* restriction enzymes. The result showed that eleven enzymes did not cleave and *TaqI* had identical mono-banded phenotypes. In all samples of populations 16S rRNA, PCR product did not show any restriction sites with twelve above restriction enzymes. The PCR amplification of D-loop gene was digested with *AluI*, *HinfI*, *MspI*, *TaqI*, *AvaII* and *EcoRI*. The enzyme *EcoRI* did not digested and *AluI* gave homomorphism. In another enzymes, ten different haplotypes was found, among them the genes types a, e, n could identify the populations R3, R4; the types b, i - to define populations R1, R5, R7; the types d - to determine populations R5; the types k - to specify R1, R5. This field can be developed for practical purpose.

**Key words:** Tilapia, 12S rRNA, 16S rRNA, D-loop, PCR, population identification, mt DNA.

*Ngày nhận bài: 14-1-2009*