

THE GENETIC DIVERSITY OF DUSKY LABIATE-BARBEL FISH *Semilabeo obscurus* IN THAI NGUYEN PROVINCE BASED ON MITOCHONDRIAL COI GENE SEQUENCES

Pham Hong Nhat^{1*}, Vu Thi Trang¹, Tran Viet Vinh²

La Van Cong², Tran Thi Mai Huong¹, Nguyen Duc Tuan¹

¹Research Institute for Aquaculture No.1 (RIA1), ²Thao Van Agricultural Development Co., Ltd

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 24/11/2022	Dusky Labiate-barbel fish (Anh Vu) is one of the indigenous species with economic value, distributed in the rivers of the Northern mountainous region, including Thai Nguyen province. In this study, four populations of Anh Vu in Song Cong city, Vo Nhai district, Dai Tu district and Thai Nguyen city were investigated for genetic diversity and phylogenetic based on analysing and sequencing the mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. The results show that the genetic relationship between populations is relatively proportional to the geographical distance of rivers in Thai Nguyen province. Haplotype diversity and nucleotide diversity in the Vo Nhai and Song Cong city population were higher than those in others. The genetic difference of Anh Vu population between Vo Nhai-Dai Tu and Dai Tu-Song Cong city was. The phylogenetic tree indicated the distant genetic relationship between Dai Tu population and other's. The results of genetic diversity of Anh Vu in Thai Nguyen are the scientific basis for proposing solutions to conserve and develop genetic resources of this fish.
Revised: 14/4/2023	
Published: 19/4/2023	
KEYWORDS	
Dusky Labiate-barbel fish	
Genetic diversity	
Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene	
Haplotype	
Thai Nguyen province	

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA LOÀI CÁ ANH VŨ *Semilabeo obscurus* TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH THÁI NGUYÊN DỰA VÀO TRÌNH TỰ GEN COI

Phạm Hồng Nhật^{1*}, Vũ Thị Trang¹, Trần Việt Vinh²

La Văn Công², Trần Thị Mai Hương¹, Nguyễn Đức Tuấn¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I, ²Công ty TNHH Phát triển Nông nghiệp Thảo Vân

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 24/11/2022	Cá Anh vũ (<i>semilabeo obscurus</i>) là một trong những loài bản địa có giá trị kinh tế, phân bố chủ yếu trên các sông của miền núi phía Bắc, trong đó có tỉnh Thái Nguyên. Trong nghiên cứu này, 4 quần đàn cá Anh vũ thu tại thành phố Sông Công, Võ Nhai, Đại Từ và thành phố Thái Nguyên được phân tích đánh giá đa dạng và phát sinh loài dựa vào phân tích trình tự đoạn gen Cytochrome C oxidase subunit I (COI) của vùng gen ty thể. Kết quả nghiên cứu cho thấy, quan hệ di truyền giữa các quần thể là tương đối tỷ lệ thuận với khoảng cách địa lý của các con sông trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên. Đa dạng di truyền haplotype và đa dạng nucleotide trong quần đàn Võ Nhai và thành phố Sông Công cao hơn so với đàn cá Đại Từ và thành phố Thái Nguyên. Sai khác di truyền lớn theo cặp giữa đàn cá Anh vũ Võ Nhai - Đại Từ và Đại Từ - thành phố Sông Công. Cây phát sinh loài phân tử thể hiện quan hệ di truyền xa giữa đàn cá Đại Từ với các đàn cá khác. Kết quả đánh giá đa dạng di truyền loài cá Anh vũ tại Thái Nguyên là cơ sở khoa học để đưa ra giải pháp bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cá này.
Ngày hoàn thiện: 14/4/2023	
Ngày đăng: 19/4/2023	
TỪ KHÓA	
Cá Anh vũ	
Đa dạng di truyền	
Gen COI	
Haplotype	
Thái Nguyên	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6985>

* Corresponding author. Email: hongnhat@ria1.org

1. Mở đầu

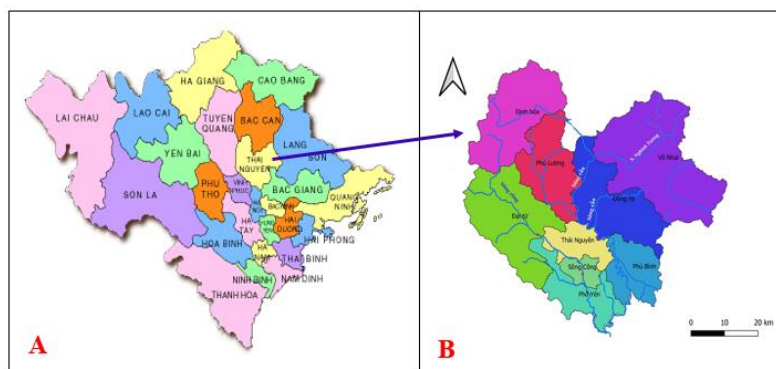
Cá Anh Vũ *S. obscurus* là một trong những loài cá bản địa đặc sản ở nước ta, được coi là một trong những loài cá ngon nhất của sông Hồng (cá tiến vua) [1]. Trên thế giới, cá Anh vũ phân bố tự nhiên tại Bắc Việt Nam và Nam Trung Quốc [2], [3]. Tại Việt Nam, cá phân bố tập trung ở trung du và miền núi như trên Sông Thao (Lào Cai, Yên Bái), sông Kỳ Cùng (Lạng Sơn), sông Lô Gâm (Hà Giang, Tuyên Quang, Phú Thọ), sông Cầu (Bắc Cạn, Thái Nguyên), sông Đà (Hòa Bình, Sơn La, Lai Châu), sông Mã (Thanh Hóa) và sông Lam (Nghệ An - vùng Con Cuông) [4]. Hiện nay, do điều kiện môi trường bị biến đổi theo chiều hướng xấu đi, nhưng chủ yếu là do bị khai thác quá mức bằng các phương tiện mang tính huỷ diệt như xung điện, thuốc nổ, nên sản lượng cá Anh vũ bị giảm sút nghiêm trọng. Cá Anh vũ đã được xếp vào mức nguy cấp tuyệt chủng bậc II, cần phải bảo vệ gấp [4].

Ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể trên đối tượng thủy sản đã và đang được ứng dụng rộng rãi; một trong các chỉ thị đó là chỉ thị COI ty thể (Cytochrome C oxidase subunit I). Chỉ thị COI có nhiều ưu điểm như vùng gen COI là đoạn trình tự ngắn, có thể giải trình tự một cách nhanh chóng và không tốn kém; trật tự nucleotide trong đoạn COI có tính bảo tồn và tỷ lệ tiến hóa tương đối cao; tồn tại số lượng lớn bản sao trong tế bào, vùng không mã hóa chiếm tỷ lệ nhỏ, nên được chọn làm chỉ thị phân tử trong di truyền mã vạch để xác định sự đa dạng sinh học, phân tích các mối quan hệ tiến hóa và biến động di truyền trong loài và giữa các loài sinh vật [5], [6]. Trên cá Anh vũ, rất ít các nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền ứng dụng chỉ thị COI ty thể, chủ yếu là nghiên cứu định danh và phân tích đặc điểm bộ gen ty thể như ở Trung Quốc [7]-[9]; ở Việt Nam chỉ duy nhất nghiên cứu định danh loài cá Anh vũ của Trần Thị Thủy Hà và cộng sự (2018) [10].

Để bảo tồn nguồn gen động thực vật, thủy sản và tài nguyên sinh vật quý hiếm trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên, từ năm 2021, UBND tỉnh Thái Nguyên đã ra Quyết định thực hiện các nhiệm vụ Khoa học và công nghệ về quỹ gen cấp tỉnh [11], [12]. Chính vì thế, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm thu thập, định danh, đánh giá đa dạng di truyền, giúp cho công tác bảo tồn, khai thác và phát triển giá trị nguồn gen cá Anh vũ tại tỉnh Thái Nguyên.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu



Hình 1. Sơ đồ địa điểm thu mẫu cá Anh Vũ trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên

Ghi chú: A- Sơ đồ một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, B-Sơ đồ tỉnh Thái Nguyên.

Hình tròn đỏ tương ứng với địa điểm thu mẫu. Biểu đồ được vẽ trên phần mềm QGIS 3.22.15

Sông Công bắt nguồn từ Đèo Khế - Thái Nguyên, chảy qua Đại Từ - TP. Sông Công - TP. Phố Yên, nối với sông Cầu tại ranh giới ba xã, phường Tân Phú, Thuận Thành (Phố Yên), Đại Thành (Hiệp Hòa, Bắc Giang). Sông Cầu có nhiều phụ lưu, những phụ lưu chính đều nằm trong tỉnh Thái Nguyên. Sông Cầu chảy qua nhiều huyện của Thái Nguyên như TP. Thái Nguyên, Phú Bình, Đồng Hỷ, Phú Lương. Sông Nghinh Tường chảy qua các xã Nghinh Tường, Sảng Mộc, Thượng Nung, Thần Sa thuộc huyện Võ Nhai, rồi đổ ra sông Cầu tại địa bàn xã Văn Lăng, thuộc huyện Đồng Hỷ (theo <https://vi.wikipedia.org/>)

Mẫu vây cá Anh vũ *S. obscurus* thu tại 04 huyện/thành phố trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên, trong thời gian từ tháng 02/2022 - tháng 3/2022, bằng lưới bện, lưới chài và bát quai; 15 mẫu/quần đàn (hình 1, bảng 1). Mẫu vây cá được bảo quản trong dung dịch cồn 96%, ở 4°C trước khi tách chiết DNA.

Bảng 1. Bảng thông tin mẫu cá Anh vũ *S. obscurus* thu tại một số địa điểm trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên

STT	Điểm thu mẫu	Ký hiệu mẫu	Số lượng mẫu
1	Phường Châu Sơn - Thành phố (TP) Sông Công	TPSC	15
2	Xã Tân Thái - huyện Đại Từ	DT	15
3	Xã Sáng Mộc - huyện Võ Nhai	VN	15
4	Xã Huống Thượng - Thành phố Thái Nguyên	TPTN	15
Tổng cộng			60

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

DNA được tách chiết bằng kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Đức). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Định lượng và định tính các mẫu ADN tổng số sau khi tách chiết bằng điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và đo trên máy Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, Mỹ).

Phản ứng PCR khuếch đại gen COI (PCR1)

Phản ứng PCR thực hiện trên máy PCR Mastercycler ProS được dùng để khuếch đại đoạn gen COI của gen ty thể sử dụng cặp mồi universal đặc hiệu cho gen COI, mồi FishF1 xuôi và ngược, với kích thước dự kiến khoảng 700bp (F: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' và R: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') [13].

Thành phần phản ứng PCR được thiết lập dựa trên kit My Taq Mix 2× (Meridian Bioscience, Đức); với thể tích 50μl gồm 25μl MyTaq Mix 2×; 2μl mồi 10μM mỗi loại; 1-3μl DNA khuôn (~200 ng) và nước đệm ion. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR khuếch đại gen COI như sau: Giai đoạn khởi đầu ở 94°C trong 2 phút; sau đó là 35 chu kỳ (giai đoạn biến tính ở 94°C trong 15 giây; giai đoạn gắn mồi ở 58°C trong 15 giây; giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 30 giây); cuối cùng giai đoạn kết thúc kéo dài ở 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1,5% với thang DNA chuẩn 50bp (Hyper Ladder™ 50 bp - Bioline, Mỹ).

Tinh sạch sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR gen COI được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Đức), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Giải trình tự đoạn gen COI

- *Phản ứng PCR giải trình tự (PCR2)*: Thành phần của phản ứng PCR giải trình tự trong tổng thể tích 20 μl bao gồm: 8 μl DTCS Quick Start Kit; 0,5-10 μl sản phẩm PCR1 đã tinh sạch đảm bảo nồng độ 50 ng/100 fmol; 2 μl Primer (1,6 pmol/μl hoặc 1,6 μM) và nước đệm ion. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR2 là 30 chu kỳ bao gồm: 96°C trong 20 giây, 50°C trong 20 giây và 60°C trong 4 phút. Cuối cùng giữ ở 4°C.

- *Tinh sạch sản phẩm PCR2*: Tinh sạch bằng Ethanol (Merk, Đức) theo quy trình sau: Chuyển toàn bộ sản phẩm PCR2 (20 μl) sang ống eppendorf đã chứa 5 μl dung dịch ngừng phản ứng bao gồm: 2 μl 3M Natri Acetat pH 5,2; 2 μl EDTA 100 mM; pH 8,0, 1 μl Glycogen 20 mg/ml. Thêm 75 μl Ethanol 95% lạnh bảo quản trong -20°C, vortex, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút tại 4°C. Bỏ dịch nổi phía trên, giữ lại DNA kết tủa ở đáy ống. Rửa kết tủa bằng 200 μl Ethanol 70% lạnh bảo quản trong -20°C, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút tại 4°C. Bỏ dịch nổi phía trên, giữ lại DNA kết tủa ở đáy ống. Bước này thực hiện 2 lần. Để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Hòa tan DNA kết tủa bằng 40 μl SLS.

- *Thực hiện giải trình tự trên máy GenomeLab GeXP*: Chuyển toàn bộ dung dịch DNA hòa tan trong SLS từ bước tinh sạch vào giếng tương ứng trên đĩa chạy mẫu. Đặt đĩa mẫu và đĩa đệm vào máy giải trình tự. Cài đặt và chạy chương trình.

Phân tích và xử lý số liệu đánh giá đa dạng di truyền quần đàn cá Anh vũ *S. obscurus*

Trình tự gen được đánh giá tín hiệu các nucleotide, được chỉnh sửa, loại bỏ tín hiệu nhiễu và căn chỉnh bằng phần mềm Finch TV 1.4.0 (<http://www.geospiza.com>) và công cụ ClustalW trong BioEdit 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>). Trình tự gen COI của mẫu cá nghiên cứu sẽ được so sánh mức độ tương đồng (Percentage of Identities) với các trình tự gen đã công bố trên Ngân hàng GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information), sử dụng công cụ BLAST, để xác định loài tương đồng.

Đa dạng di truyền và cấu trúc di truyền của bốn nhóm cá Anh vũ *S. obscurus* được tính toán và so sánh. Nghiên cứu đa hình DNA được phân tích dựa vào phần mềm DnaSP v6.10.01 [14], để xác định các thông số về đa dạng haplotype (Haplotype diversity - Hd), đa dạng nucleotide (Nucleotide diversity - π) và sơ đồ mạng lưới haplotype được xây dựng bằng phần mềm Network 4.6.1 [15]. Phân tích phương sai phân tử AMOVA và sai khác di truyền F_{ST} giữa các nhóm cá nghiên cứu được tính toán sử dụng phần mềm Arlequin v.3.11 [16].

Tổng số 07 trình tự gen COI gồm có 4 trình tự phổ biến (consensus sequence) của 4 quần đàn cá nghiên cứu; và trình tự gen COI của 03 loài cá Anh vũ *S. obscurus* ở Trung Quốc (với số hiệu GenBank MG560823, GU086581 và MN229748) đã được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài phân tử. Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các quần thể nghiên cứu được xây dựng dựa trên phương pháp UPGMA [17] và mô hình khoảng cách Tamura-Nei [18], thực hiện trên phần mềm MEGA X [19] với giá trị bootstrap (1000 lần lặp lại) để đánh giá độ tin cậy của sự phân nhánh trên cây phân loài UPGMA.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả giải trình tự gen COI của cá Anh vũ

Kết quả giải trình tự gen cho tín hiệu đỉnh cao, rõ nét, không bị nhiễu. Trình tự gen COI hoàn chỉnh của cá Anh vũ trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên đã được xác định gồm 652 bp. Các trình tự gen COI cá Anh vũ thu được có độ tương đồng cao ($\geq 99,37\%$) với các trình tự gen COI cá Anh vũ *Semilabeo obscurus* của Trung Quốc (với số hiệu là GU086581) đã công bố trước đó khi so sánh BLAST trên ngân hàng GenBank [7]. Các trình tự COI của 60 mẫu cá Anh vũ đạt yêu cầu cho các phân tích tiếp theo.

3.2. Đa dạng các haplotype và các nucleotide

Tính đa dạng haplotype và nucleotide là các chỉ số quan trọng của sự đa dạng di truyền trong một quần thể. Kết quả phân tích về đa dạng haplotype và đa dạng nucleotide của 4 quần đàn cá Anh vũ tại Thái Nguyên dựa trên trình tự gen COI được thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

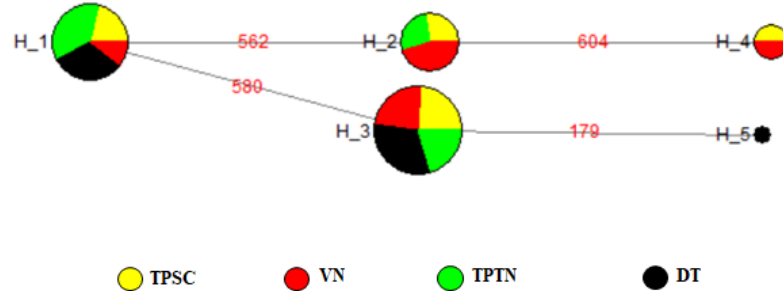
Bảng 2. Đa dạng vùng gen COI trên quần đàn cá Anh vũ *S. obscurus* tại Thái Nguyên

Quần đàn	N	n	p	h$\pm$SD	$\pi\pm$SD
Thành phố Sông Công	15	4	0	0,762 $\pm$ 0,066	0,00190 $\pm$ 0,00029
Võ Nhai	15	4	0	0,743 $\pm$ 0,070	0,00199 $\pm$ 0,00024
Đại Từ	15	3	1	0,590 $\pm$ 0,077	0,00099 $\pm$ 0,00019
Thành phố Thái Nguyên	15	3	0	0,676 $\pm$ 0,070	0,00126 $\pm$ 0,00021
Tổng số/ Trung bình	60	5	1	0,699$\pm$0,031	0,00160$\pm$0,00015

Ghi chú: N: số trình tự được phân tích; n: số lượng haplotype; p: số lượng haplotype đặc trưng; h: đa dạng haplotype; π : đa dạng nucleotide

Tổng số 5 haplotype khác nhau cho 4 quần đàn cá Anh vũ *S. obscurus* tại Thái Nguyên đã được xác định, trình tự các haplotype này đã được công bố trên ngân hàng GenBank với số hiệu OP269716 - OP269720. Trong đó, haplotype 3 có tần số xuất hiện lớn nhất (41,7%), tiếp theo là haplotype 1 (31,7%), cả 2 haplotype này đều xuất hiện ở tất cả các quần đàn nghiên cứu, đây là những haplotype chung cho các quần đàn nghiên cứu; chỉ duy nhất haplotype 5 là haplotype đặc trưng chỉ xuất hiện ở quần đàn cá Anh vũ ở Đại Từ (hình 2 và kết quả chi tiết về các haplotype

gen COI của cá Anh vũ không hiển thị trong bài báo này). Giá trị đa dạng haplotype và đa dạng nucleotide trung bình tương ứng là $0,699 \pm 0,031$ và $0,00160 \pm 0,00015$, được coi là có sự đa dạng haplotype tương đối cao và ít có sự đa dạng nucleotide. Đa dạng haplotype cao hơn trong khi đa dạng nucleotide thấp phản ánh việc hình thành sự sai khác của các quần đàn nghiên cứu mới chỉ xảy ra gần đây [20]. Quần đàn cá Anh vũ ở TP. Sông Công và ở Võ Nhai thể hiện sự đa dạng di truyền cao hơn 2 quần đàn cá Anh vũ còn lại, có 4 haplotype, với đa dạng haplotype và đa dạng nucleotide trung bình tương ứng là $0,762 \pm 0,066$; $0,00190 \pm 0,00029$ và $0,743 \pm 0,070$; $0,00199 \pm 0,00024$ (bảng 2).



Hình 2. Mạng lưới haplotype của các quần đàn cá Anh vũ *S. obscurus* dựa trên gen COI

Ghi chú: Kích thước của các vòng tròn tỷ lệ thuận với số lượng haplotype. Con số trên các nhánh thể hiện các bước đột biến. Màu sắc của các vòng tròn tương ứng với từng địa điểm thu mẫu. Mạng haplotype tích hợp các màu cho biết sự phân bố của các nhóm hay quần đàn cá Anh vũ trong mỗi haplotype

Đa dạng haplotype hay gọi là đa dạng về gen/alen, biểu thị xác suất mà hai alen được lấy ngẫu nhiên là khác nhau. Trong khi đa dạng nucleotide được định nghĩa là số lượng nucleotide khác biệt trung bình trên mỗi vị trí trong so sánh từng cặp giữa các trình tự DNA. Trong nghiên cứu này, xuất hiện những haplotype chung và riêng biệt, có sự kết nối, chia sẻ chung kiểu haplotype, thể hiện mối quan hệ gần gũi về mặt di truyền giữa các quần đàn nghiên cứu. Nguyên nhân của sự kết nối này có thể do cá Anh vũ thu thập trong nghiên cứu này phân bố trên vùng sông Công (Tân Thái - huyện Đại Từ, Châu Sơn - TP. Sông Công), sông Cầu (Huống Thượng - TP. Thái Nguyên) và sông Nghinh Tường (Sáng Mộc - huyện Võ Nhai). Giữa 3 con sông này có mối giao lưu thủy vực trực tiếp, Sông Công và Sông Nghinh Tường đều có nhánh sông chảy vào sông Cầu, nên có mối liên quan mật thiết với nhau về dòng chảy, sinh học và môi trường, nên việc di cư, trao đổi nguồn gen cá Anh vũ giữa các vùng là điều dễ hiểu.

3.3. Cấu trúc di truyền quần thể cá Anh vũ *S. obscurus* tại Thái Nguyên

Cấu trúc di truyền

Kết quả phân tích phương sai phân tử (AMOVA) được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Phân tích AMOVA của các đàn cá Anh vũ *S. obscurus* dựa trên phân tích đoạn gen COI

Gen	Nguồn biến động	Độ tự do (df)	Tổng bình phương (SS)	Thành phần biến động	Phần trăm biến động	F _{ST}
COI	Giữa các dòng	3	2,700	0,02667 Va	5,06	0,05063**
	Trong một dòng	56	28,000	0,50000 Vb	94,94	
	Tổng	59	30,700	0,52667		

Ghi chú: Va, Vb: số lượng thành phần phương sai, ** $P < 0,0001$

Kết quả bảng 3 cho thấy phần trăm biến động trong một dòng (94,94%) lớn hơn sự biến động giữa các dòng (5,06%). Kết quả đó chỉ ra rằng, có sự sai khác về di truyền xảy ra giữa các cá thể trong cùng một dòng. Giá trị F_{ST} là 0,05063 cho thấy sự biến đổi di truyền tổng thể giữa 4 dòng cá Anh vũ nghiên cứu ở mức độ trung bình. Nghiên cứu của chúng tôi cũng có kết quả tương tự như nghiên cứu biến động di truyền trên cá Chình hoa *Anguilla marmorata* ở Việt Nam và cá

Chép *Cyprinus carpio* ở Trung Quốc, ngược lại với cá Bống *Spinibarbus denticulatus* ở Việt Nam. Ở cá Chình hoa thu tại miền Trung Việt Nam, khi phân tích AMOVA cho thấy phần lớn biến dị di truyền cũng xảy ra giữa các cá thể trong một quần thể (99,26%), trong khi sự biến động giữa các quần thể là 0,74%; giá trị thống kê F_{ST} là 0,007 [21]. Nghiên cứu của Zhao và cộng sự (2020) đánh giá biến dị di truyền của các dòng cá Chép tự nhiên và dòng cá Chép nhập nội ở Trung Quốc, cũng cho kết quả sự biến động giữa các cá thể trong một quần thể (72,71%) cao hơn sự biến động giữa các quần thể (26,32%) [22]. Ngược lại, biến dị di truyền cá Bống ở một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam giữa các quần thể (64,83%) cao hơn biến dị di truyền giữa các cá thể trong một quần thể (35,17%) [23].

Sai khác di truyền

Kết quả phân tích sai khác di truyền (F_{ST}) của 4 quần đàn cá Anh vũ khi so sánh từng cặp với nhau được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Sai khác di truyền giữa các đàn cá Anh vũ *S. obscurus* dựa trên phân tích đoạn gen COI

Địa điểm thu mẫu	TP. Sông Công	Võ Nhai	Đại Từ	TP. Thái Nguyên
TP. Sông Công		0,92793	0,03604	0,61261
Võ Nhai	-0,05556		0,01802	0,27928
Đại Từ	0,10488*	0,18138*		0,12613
TP. Thái Nguyên	-0,02857	0,02116	0,08333	

Ghi chú: Giá trị F_{ST} dựa trên gen COI (phía dưới đường chéo) và sai số chuẩn (phía trên đường chéo) giữa các quần đàn cá Anh vũ; * Giá trị F_{ST} sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá trị F_{ST} dao động từ -0,05556 đến 0,18138; có sự sai khác di truyền rõ rệt giữa đàn cá cá Anh vũ ở Đại Từ và cá Anh vũ ở Võ Nhai ($F_{ST} = 0,18138$); sai khác di truyền ở mức trung bình giữa đàn cá Anh vũ ở Đại Từ và cá Anh vũ ở TP. Sông Công ($F_{ST} = 0,10488$) xét trên gen COI ($P < 0,05$). Các nhóm cá Anh vũ còn lại phần lớn đều là sai khác nhỏ và không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

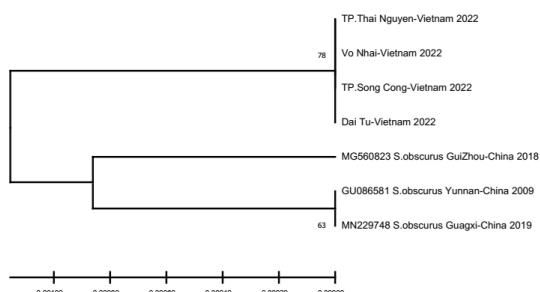
Sự khác biệt về di truyền các quần thể thường được đánh giá dựa trên khoảng cách di truyền giữa chúng [24], [25] và hệ số sai khác di truyền F_{ST} của Wright (1969) [26]. Theo Nei (1972), nếu giá trị $F_{ST} < 0,05$ được cho là sai khác di truyền nhỏ thì $0,05 < F_{ST} < 0,15$ được cho là sai khác di truyền trung bình và $F_{ST} > 0,15$ được cho là sai khác di truyền rõ rệt. Trong nghiên cứu này, giá trị F_{ST} rất thấp, chỉ có hai cặp (cá Anh vũ ở Đại Từ - cá Anh vũ ở Võ Nhai và cá Anh vũ ở Đại Từ - cá Anh vũ ở thành phố Sông Công) có sự sai khác di truyền trong so sánh cặp, có thể do hai đàn cá thu trên sông Công (cá Anh vũ ở Đại Từ) và sông Nghinh Tường (cá Anh vũ ở Võ Nhai), đây là hai con sông khác nhau, không có nhánh sông chảy vào nhau, nên ít có sự giao thoa nguồn gen. Giá trị sai khác di truyền thông thường tỷ lệ thuận với khoảng cách địa lý giữa các quần đàn cá, trong nghiên cứu này sai khác di truyền giữa đàn cá Anh vũ tại Võ Nhai - Đại Từ và tại Đại Từ - TP. Sông Công là nhóm có di truyền xa, ít có sự giao lưu nguồn gen, điều này cũng được phản ánh qua việc hình thành các haplotype đặc trưng của quần đàn cá này [27]. Tuy nhiên, như đã trình bày ở trên, hai sông này đều có nhánh chảy vào sông Cầu, nên cá Anh vũ tại Thành phố Sông Công, TP. Thái Nguyên và Võ Nhai đã có sự trao đổi nguồn gen hay trôi dạt di truyền, nên sai khác di truyền theo cặp giữa chúng là rất nhỏ. Theo Holsinger và Weir (2009) [28], sai khác di truyền là sự tích lũy biến động của tần số alen giữa các quần thể, ảnh hưởng bởi các lực tiến hóa như chọn lọc hoặc trôi dạt di truyền.

3.4. Mối quan hệ di truyền

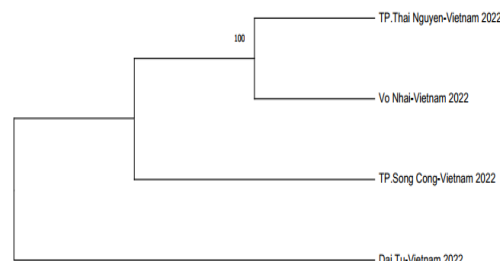
Cây phát sinh loài phân tử được xây dựng dựa trên phương pháp UPGMA với giá trị bootstrap 1000 lần lặp đã chỉ ra mối quan hệ di truyền của các dòng cá Anh vũ thu tại các huyện/thành phố ở Thái Nguyên được thể hiện qua hình 3.

Xét trên gen COI cho thấy cây phân loại phân tử phân thành 2 nhánh; trong đó 4 dòng cá Anh vũ nghiên cứu xuất hiện cùng một nhánh, nhánh còn lại là các loài cá Anh vũ của Trung Quốc

với tên khoa học là *Semilabeo obscurus*. Tuy nhiên, khoảng cách giữa các nhánh là rất nhỏ, điều đó có nghĩa là 4 dòng cá có mối quan hệ di truyền gần gũi và với cá Anh vũ *S. obscurus* của Trung Quốc. Để hiểu rõ hơn mối quan hệ di truyền của 4 dòng cá Anh vũ này, chúng tôi tiếp tục xây dựng cây phát sinh loài phân tử với phương pháp tương tự và dữ liệu chỉ loại bỏ các loài cá Anh vũ *S. obscurus* từ Trung Quốc (hình 4).



Hình 3. Cây phát sinh loài phân tử của các quần đàn cá Anh vũ *S. obscurus* dựa trên gen COI khi so sánh với các quần đàn cá Anh vũ khác trên thế giới



Hình 4. Cây phát sinh loài phân tử của 4 quần đàn cá Anh vũ *S. obscurus* dựa trên gen COI không sử dụng trình tự tham chiếu

Theo hình 4, dòng cá Anh vũ tại Đại Từ, sau đó là dòng TP. Sông Công là những dòng có mối quan hệ di truyền xa hơn với các dòng còn lại. Điều này có thể lý giải là do khoảng cách địa lý của các con sông trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

Theo điều tra hiện trạng phân bố, nguồn lợi cá Anh vũ tại Thái Nguyên trên 216 hộ dân thuộc 9 xã/thành phố trên địa bàn tỉnh [29] cho thấy rằng, cá Anh vũ rất hiếm gặp trên các sông của Thái Nguyên; theo đánh giá của người dân thì vẫn còn hiện tượng khai thác cá bằng phương tiện hủy diệt. Theo đó, chỉ có 25/216 hộ thuộc 4 xã (như Bảng 1) có đánh bắt được cá Anh vũ (chiếm 11,57%). Có 51,39% người dân được hỏi không biết cá Anh vũ thuộc loài cá quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng. Về tần số bắt gặp trong quá trình khai thác, phần lớn hộ dân không bắt gặp cá Anh vũ trong quá trình khai thác (84,43%), còn lại rất ít hoặc hiếm gặp. Kích thước cá Anh vũ thường bắt gặp trong quá trình khai thác từ 100-300g/con, trong khi cá thành thực khi khối lượng > 300g/con [30]. Điều này cho thấy, cá Anh vũ trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên cần được bảo tồn, phục tráng nguồn gen. Từ kết quả điều tra này cùng với kết quả trong nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền cá Anh vũ, chúng tôi đề xuất một số giải pháp sau nhằm bảo tồn và phát triển nguồn gen cá Anh vũ trên địa bàn tỉnh như sau:

(1) Tiếp tục đẩy mạnh công tác tuyên truyền, nâng cao nhận thức của người dân có sự huy động của các tổ chức đoàn thể (như Đoàn Thanh niên, Hội phụ nữ, Hội cựu chiến binh, Hội nông dân,...) về bảo tồn và phát triển nguồn lợi cá Anh vũ là loài quý hiếm đang có nguy cơ tuyệt chủng trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

(2) Về giải pháp kỹ thuật cho phục tráng nguồn gen cá Anh vũ: Tiếp tục hoàn thiện quy trình cũng như nhân rộng mô hình sản xuất giống và nuôi thương phẩm cá Anh vũ trên địa bàn tỉnh, giảm thiểu khai thác tự nhiên. Trong kết quả phân tích đa dạng di truyền của 4 dòng cá Anh vũ *S. obscurus* tại Thái Nguyên dựa trên trình tự gen COI, chúng tôi thấy rằng đàn cá Anh vũ ở Đại Từ có sai khác di truyền với đàn cá ở Võ Nhai và TP. Sông Công, nên trong sinh sản nhân tạo, có thể sử dụng lai tạo theo cặp đàn cá Anh vũ tại Võ Nhai với đàn ở Đại Từ và đàn cá ở Đại Từ với đàn cá ở TP. Sông Công để hạn chế cận huyết xảy ra ở đàn cá Anh vũ trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

(3) Về giải pháp bảo tồn nguồn lợi cá Anh vũ: Nên thả tái tạo nguồn lợi cá Anh vũ trên một số sông như sông Cầu, sông Công và sông Nghinh Tường.

4. Kết luận

Kết quả phân tích đa dạng di truyền của 4 dòng cá Anh vũ *S. obscurus* tại Thái Nguyên dựa trên trình tự gen COI cho thấy, đàn cá Anh vũ ở Võ Nhai và ở TP. Sông Công có độ đa dạng haplotype và

đa dạng nucleotide cao hơn các quần đàn cá Anh vũ còn lại. Đàn cá Anh vũ Võ Nhại - Đại Từ và Đại Từ - thành phố Sông Công có sai khác di truyền khi so sánh cặp giá trị F_{ST} . Kết quả phân tích AMOVA cho thấy đàn cá có biến đổi di truyền giữa các cá thể trong cùng một dòng. Cây phát sinh loài phân tử thể hiện quan hệ di truyền xa giữa đàn cá Đại Từ với các đàn cá khác.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ tỉnh Thái Nguyên trong đề tài mã số QGT 16.ĐT.05/2021.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] MARD, *Resources of Vietnam's Fisheries*. Hanoi Agricultural Publishing Press, p. 216-217, 1996.
- [2] S. Wang, "China red data book of endangered animals", *National Environmental Protection Agency. Endangered Species Scientific Commission*. Science Press, Beijing, China, 1998, p. 247.
- [3] T. D. P. Nguyen, T. H. T. Nguyen, V. T. Do, T. T. Nguyen, and H. D. Nguyen, *Report on highland aquatic ecosystem services and biodiversity values, including livelihoods, trade, policy, and conservation-oriented inputs to two global online databases. Highland Aquatic Resources Conservation and Sustainable Development (HighARCS)*, Research Institute for Aquaculture No.1, Viet Nam, p.313-363, 2011.
- [4] MSTE, *The Red book for animal in Viet Nam*, Ministry of Science, Technology and Environment, Hanoi Science and Technology Publishing press, 2007, pp. 127-139.
- [5] R. W. Taylor and D. M. Turnbull, "Mitochondrial DNA mutations in human disease," *Nature Reviews. Genetics*, vol. 6, no. 5, pp. 389-402, 2005.
- [6] A. Dudu, S. E. Georgescu, and M. Costache, *Evaluation of genetic diversity in fish using molecular markers*, *Molecular Approaches to Genetic Diversity*, 2015, pp. 165-193.
- [7] L. P. Zheng, J. X. Yang, X. Y. Chen, and W. Y. Wang, "Phylogenetic relationships of the Chinese Labeoninae (Teleostei, Cypriniformes) derived from two nuclear and three mitochondrial genes," *Zoologica Scripta*, vol. 39, no. 6, pp. 559-571, 2010.
- [8] W. Wang, S. Li, T. Liu, X. Wang, S. Zeng, W. Min, and L. Zhou, "Characterization of the complete mitochondrial genome of an endangered fish *Semilabeo obscurus* (Cyprinidae; Labeoninae; Semilabeo)," *Conservation Genetics Resources*, vol. 11, no. 2, pp. 147-150, 2019.
- [9] H. L. Han, Q.-H. Zhu, W.-J. Wu, A.-Y. He, J. Shi, and Y.-S. Li, "Characteristics of Mitochondrial Genomes of *Semilabeo obscurus* Analyzed Using Illumina HiSeq 4000 High-throughput Sequencing Technique," *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 35, no. 2, pp. 130-139, 2020.
- [10] T. T. H. Tran, T. T. T. Nguyen, and S. V. Ngo, "Identification of fish in *Semilabeo* genus using morphological taxonomy and molecular biology methods," *Genetics of Aquatic Organisms*, vol. 2, no. 1, pp. 23-28, 2018.
- [11] The People's Committee of Thai Nguyen province, *Decision No. 2861/QĐ-UBND dated September 16, 2020 on approving the scientific and technological framework project on the provincial gene fund for the period 2021-2025 of the People's Committee of Thai Nguyen province*, 2020.
- [12] The People's Committee of Thai Nguyen province, *Decision No. 1311/QĐ-UBND dated April 28, 2021 on approving the list of scientific and technological tasks on the provincial gene fund to be implemented from 2021 of the People's Committee of Thai Nguyen province*, 2021.
- [13] R. D. Ward, T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last, and P. D. Hebert, "DNA barcoding Australia's fish species," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 360, no. 1462, pp. 1847-1857, 2005.
- [14] J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, and A. Sánchez-Gracia, "DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 34, no. 12, pp. 3299-3302, 2017.
- [15] H. -J. Bandelt, P. Forster, and A. Röhl, "Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 16, no. 1, pp. 37-48, 1999.
- [16] L. Excoffier and H. E. Lischer, "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows," *Molecular Ecology Resources*, vol. 10, no. 3, pp. 564-567, 2010.

-
- [17] P. H. A. Sneath and R. R. Sokal, *Numerical taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*, WH Freeman and Co., San Francisco, p. 573, 1973.
- [18] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, no. 3, pp. 512-526, 1993.
- [19] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, no. 6, p. 1547, 2018.
- [20] J. Song, F. Hou, X. Zhang, B. Yue, and Z. Song, "Mitochondrial genetic diversity and population structure of a vulnerable freshwater fish, rock carp (*Procypris rabaudi*) in upper Yangtze River drainage," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 55, pp. 1-9, 2014.
- [21] A. T. Nguyen, H. T. Dao, H. T. Quang, S. Hagihara, P. M. Lokman, and E. L. Damsteegt, "Genetic diversity and population structure of the Giant mottled eel, *Anguilla marmorata* Quoy & Gaimard, 1824 in Central Vietnam," *Fishes*, vol. 7, no. 5, p. 286, 2022.
- [22] Y. Zhao, X. Zheng, X. Zhu, Y. Kuang, and X. Sun, "Genetic variation of common carp *Cyprinus carpio* l. in China based on mitochondrial COII gene," *Aquaculture Reports*, vol. 18, p. 100462, 2020.
- [23] T. T. Vu, T. H. Vu, H. N. Pham, T. H. G. Luu, and T. L. C. Cao, "Genetic diversity of *Spinibarbus denticulatus* populations using molecular marker," *NTU Journal of Science & Technology*, vol. 266, no. 14, pp. 114-121, 2021.
- [24] M. Nei, "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals," *Genetics*, vol. 89, no. 3, pp. 583-590, 1978.
- [25] G. Laval, M. SanCristobal, and C. Chevalet, "Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various short term evolution models," *Genetics Selection Evolution*, vol. 34, no. 4, pp. 1-27, 2002.
- [26] S. Wright, "Evolution and the Genetics of Populations", *The Theory of Gene Frequencies*, vol. 2, Sewall Wright, University of Chicago Press, Chicago, 1969, p. 512.
- [27] M. Jakobsson, M. D. Edge, and N. A. Rosenberg, "The relationship between F_{ST} and the frequency of the most frequent allele," *Genetics*, vol. 193, no. 2, pp. 515-528, 2013.
- [28] K. E. Holsinger and B. S. Weir, "Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} ," *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 9, pp. 639-650, 2009.
- [29] D. T. Nguyen, *An investigation report on the status of distribution and resources of Anh Vu in Thai Nguyen and conservation solutions*, Project of the genetic conservation of Anh vu *Semilabeo obscurus* in Thai Nguyen province, p. 53, 2022.
- [30] H. N. Nguyen, *Exploitation and conservation of Anh Vu genetic resources*, Final report, Research Institute for Aquaculture No.1, 2008.