

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁ ĐỐI MỤC (*MUGIL CEPHALUS*) Ở VÙNG BIỂN PHÍA BẮC - TRUNG BỘ VIỆT NAM DỰA TRÊN TRÌNH TỰ GEN CO1

Trần Thị Việt Thanh¹, Phan Kế Long^{1,4}, Jean Dominique Durand^{2,3}

¹Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Đại học Khoa học tự nhiên Tp HCM

³Viện Nghiên cứu phát triển - IRD, Đại học Tổng hợp Montpellier, Pháp

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Biển Việt Nam ở trong vùng nhiệt đới gió mùa, đường đẳng nhiệt 20°C (đường ranh giới giữa hai vùng nhiệt đới và á nhiệt đới) chạy qua nửa phía bắc vịnh Bắc Bộ. Mũi Varella (Mũi Nạy - 12°30' vĩ độ Bắc) là đường ranh giới phân cách hai khu hệ động vật khác nhau và coi đây là ranh giới phân bố cực nam của những loài cận nhiệt đới di cư đến đây từ vùng biển Nhật Bản và là đường ranh giới phía bắc của vùng phân bố của nhiều loài cá ôn đới điển hình. Theo phân vùng thủy sản của FAO, Việt Nam thuộc vùng 61 (lạnh) hay còn gọi vùng ôn đới và vùng 71 (nóng) là vùng nhiệt đới. Ranh giới giữa 2 vùng này là dãy Hải Vân ở đó vùng 61 gồm vùng biển Đông Bắc đến Huế và vùng 71 được tính từ vùng biển Đà Nẵng đổ về phía nam. Ở Việt Nam cá Đối mục có phân bố từ Bắc đến Nam, tập trung nhiều nhất ở vùng cửa sông (Luu Xuân Hòa, 2011). Theo Nguyễn Khắc Hường, Trương Sĩ Kỳ, 2007 họ cá Đối (Mugilidae) ở Việt Nam có khoảng 6-7 loài có giá trị kinh tế cao trong đó loài cá Đối mục đã được Tổng cục Thủy sản xác định là một trong 27 loài cá biển kinh tế được phép xuất khẩu.

Kết quả nghiên cứu mới đây về cá Đối mục ở vùng biển Đài Loan, Nhật Bản và Tây Bắc Thái Bình Dương đã xác định cá Đối mục (*Mugil cephalus*) gồm 3 dòng NWP1, NWP2, NWP3 (Ke *et al.*, 2009; Durand 2012). Trong đó dòng NWP1 phân bố ở Bắc Thái Bình Dương, biển Nhật Bản và vùng biển Hoa Đông Trung Quốc và được cho là dòng có nguồn gốc ôn đới, dòng NWP2 bị giới hạn với vĩ độ thấp và được ghi nhận vùng đảo Hải Nam, Trung Quốc được cho là dòng có nguồn gốc nhiệt đới, dòng NWP3 phân bố ở vùng biển Đài Loan, đảo Hải Nam là dòng hỗn hợp của dòng NWP1 và NWP2. Trên vùng gen CO1, dòng NWP1 khác dòng NWP2 ở 10 vị trí nucleotide; dòng NWP1 khác dòng NWP3 ở 24 vị trí nucleotide; và dòng NWP2 khác dòng NWP3 ở 21 vị trí nucleotide (Durand 2012). Bài báo này trình bày đa dạng di truyền các dòng cá Đối mục *Mugil cephalus* ở vùng biển Bắc - Trung Bộ Việt Nam trên cơ sở phân tích đặc điểm vùng gen *cytochrome c oxidase subunit 1* (CO1).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tổng số 59 mẫu cá Đối mục thu được từ 21 điểm thuộc 6 tỉnh: Quảng Ninh (6 điểm, 21 mẫu), Hải Phòng (4 điểm, 17 mẫu), Nam Định (5 điểm, 13 mẫu), Hà Tĩnh (1 điểm, 1 mẫu), Quảng Bình (3 điểm, 3 mẫu), Thừa Thiên - Huế (2 điểm, 4 mẫu) (Bảng 1). Sau khi được phân loại bằng hình thái dựa trên tài liệu như: Động vật chí Việt Nam của Nguyễn Khắc Hường, Trương Sĩ Kỳ (2007) và đối chiếu với cơ sở dữ liệu của các loài cá Đối của Froese and Pauly (2005) và mẫu nghiên cứu DNA được lấy từ cơ lưng hoặc vây bụng và bảo quản trong ethanol (75%) ở nhiệt độ phòng.

Danh mục các mẫu cá Đồi mục dùng trong nghiên cứu

Tỉnh	Tổng số mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm	Tọa độ
Quảng Ninh	4	Q16 - Q19	Đảo Ba Mùn	20°55'05'' N; 107°40'10'' E
	3	Q20 - Q22	Vân Đồn	21°06'94'' N; 107°42'02'' E
	5	Q29 - Q33	Đảo Minh Châu	21°04'19'' N; 107°25'30'' E
	5	Q34, Q38, Q39, Q41, Q42	Hạ Long	20°52'24'' N; 107°05'23'' E
	3	Q43 - Q45	Đảo Cô Tô	21°05'21'' N; 107°52'19'' E
	1	S3	Quảng Yên	20°55'40'' N; 106°51'05'' E
Hải Phòng	7	P6 - P12	Cửa sông Văn Úc	20°40'25'' N; 106°42'48'' E
	3	P13, P14, P16	Đảo Cát Bà	20°50'40'' N; 106°55'15'' E
	2	E32, E33	Đồ Sơn	20°44'25'' N; 106°47'28'' E
	5	H6 - H10	Cảng Hải Phòng	20°51'59'' N; 106°40'57'' E
Nam Định	1	ND27	VQG Xuân Thủy	20°11'15'' N; 106°25'05'' E
	4	F5 - F8,	Giao Thiện	20°16'45'' N; 106°35'05'' E
	3	F10 - F12	Cửa sông Ba Lạt	19°53'25'' N; 106°10'37'' E
	2	F14, F16	Giao Tiến	20°16'19'' N ; 106°23'30'' E
	3	X4, X7, X15	Quất Lâm	20°11'10'' N; 106°21'36'' E
Hà Tĩnh	1	Hà Tĩnh	Thiên Cầm	18°16'32'' N; 106°07'05'' E
Quảng Bình	1	QB40	Bố Trạch	17°28'06'' N; 106°15'15'' E
	1	QB41	Đồng Hới	17°26'55'' N; 106°35'08'' E
	1	QB46	Hàm Ninh	17°23'05'' N; 106°35'28'' E
Thừa Thiên - Huế	4	K1	Phú Lộc	16°16'59'' N; 107°26'19'' E
		K2- K4	Cầu Hai	16°40'05'' N; 107°51'35'' E
Tổng cộng	59 mẫu		21 điểm thu	

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mô cơ theo quy trình cải tiến từ phương pháp của Zang & Shi., 1989. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ hóa chất Genomic DNA Purification kit (#KO512, Fermentas).

Nhân bản gen đích bằng PCR và đọc trình tự: Cặp mỗi xuôi Fish F1 (TCAACCAACCAC ACCGACATTGGCAC); Fish F2 (TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC) và mỗi ngược

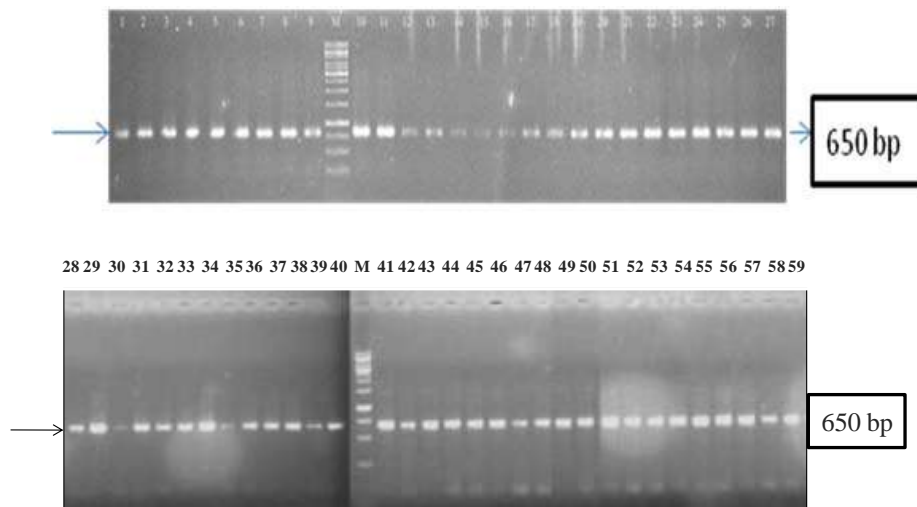
Fish R1 (TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC) (Ward *et al.*, 2005) được sử dụng để nhân bản vùng gen CO1 với kích thước khoảng 650 bp. Hỗn hợp PCR 25 µl bao gồm 12,5 µl Master mix 2X; 1 µl MgCl₂ 25 mM; 0,5 µl Taq polymerase 5 u/µl; 2 µl DNA mẫu; 1,25 µl mỗi xuôi 10 pM; 1,25 µl mỗi ngược 10 pM; và bổ sung H₂O. PCR được thực hiện trên máy PCR system 9700 theo chu trình nhiệt: 94°C/2 phút, sau đó là 35 chu kỳ lặp lại: 95°C/30 giây; 52°C/1phút; 72°C/ 1phút; cuối cùng là 72°C trong 10 phút để kết thúc phản ứng và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%, chụp ảnh trên hệ thống máy chiếu ánh sáng UV. Sản phẩm PCR được tinh sạch trước khi gửi đọc trình tự trực tiếp 2 chiều tại công ty Macrogen, Hàn Quốc.

Xử lý số liệu: Trình tự sau khi đọc được hiệu chỉnh bằng phần mềm Chromas (Technelysium., 2013), tìm kiếm các trình tự tương đồng trên Genbank bằng phần mềm BLAST, sắp xếp các trình tự tương đồng bằng phần mềm ClustalW (Thompson *et al.*, 1997), chỉnh sửa bằng phần mềm Bioedit và xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Maximum Likelihood bằng phần mềm Mega 5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nhân bản đoạn gen đích

DNA tổng số được tách chiết cho chất lượng tốt. Hình ảnh điện di cho một băng đậm rõ nét. Tất cả các mẫu thu được đều có chỉ số OD nằm trong giới hạn 1,8 - 2,0 DNA có độ sạch cao, không bị đứt gãy đảm bảo cho các thí nghiệm tiếp theo. Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi phức FishF1- Fish F2/Fish R1 cho kết quả 1 băng vạch rõ ràng với kích thước khoảng 650 bp (hình 1) phù hợp với kích thước lý thuyết của vùng gen CO1.



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR của 59 mẫu nghiên cứu trên gel agarose 1,2% (Ký hiệu: giếng 1-59 ; M: marker phân tử 1kb)

2. Xác định trình tự nucleotide

Tất cả các sản phẩm PCR đều được giải trình tự trực tiếp. Sau khi được chỉnh sửa trên cơ sở đối chiếu trình tự sợi đôi, loại bỏ trình tự đoạn mồi, vùng gen CO1 có chiều dài 641 bp với thành phần nucleotide: T=30,6%; C=26,8%; A=24,3%; G=18,3% (Bảng 2). Đã xác định được 597/641 vị trí nucleotide bảo thủ (Conserved), 39/641 vị trí biến đổi (Variable), 36/641 vị trí mang thông tin di truyền Pi (Parsimony informative), 3/341 vị trí Si (Singleton).

Bảng 2

Thành phần nucleotide (%) trong vùng gen CO1 của 59 mẫu cá Đồi mực

Địa điểm	Số mẫu	T	C	A	G	Kích thước (bp)
Quảng Ninh	21	30,8	26,3	24,4	18,1	641
Hải Phòng	17	30,8	26,6	24,4	18,2	641
Nam Định	13	30,4	27,1	24,2	18,5	641
Hà Tĩnh	1	30,4	27,1	24,1	18,6	641
Quảng Bình	3	30,9	26,6	24,5	18,0	641
Thừa Thiên - Huế	4	30,4	27,1	24,2	18,5	641
<i>Trung bình</i>		30,6	26,8	24,3	18,3	641

Trình tự gen CO1 có mức độ khác biệt trong loài giữa các mẫu trong từng vùng nghiên cứu là rất nhỏ $P < 0,02$; giá trị sai khác lớn nhất được ghi nhận ở Hải Phòng 2,7%, thấp nhất ở Quảng Bình 0,3%. Không có sự sai khác nucleotide giữa các mẫu trong từng dòng cá Đồi mực nghiên cứu, cụ thể với 18 mẫu thuộc dòng NWP1 không có bất cứ vị trí biến đổi nucleotide nào, kết quả tương tự với 26 mẫu thuộc dòng NWP2 và 15 mẫu thuộc dòng NWP3. Sự sai khác nucleotide giữa các dòng là rất nhỏ, vì vậy chúng tôi cho rằng sự khác biệt về địa lý không ảnh hưởng đến các dòng cá Đồi mực trong khu vực này (Bảng 3).

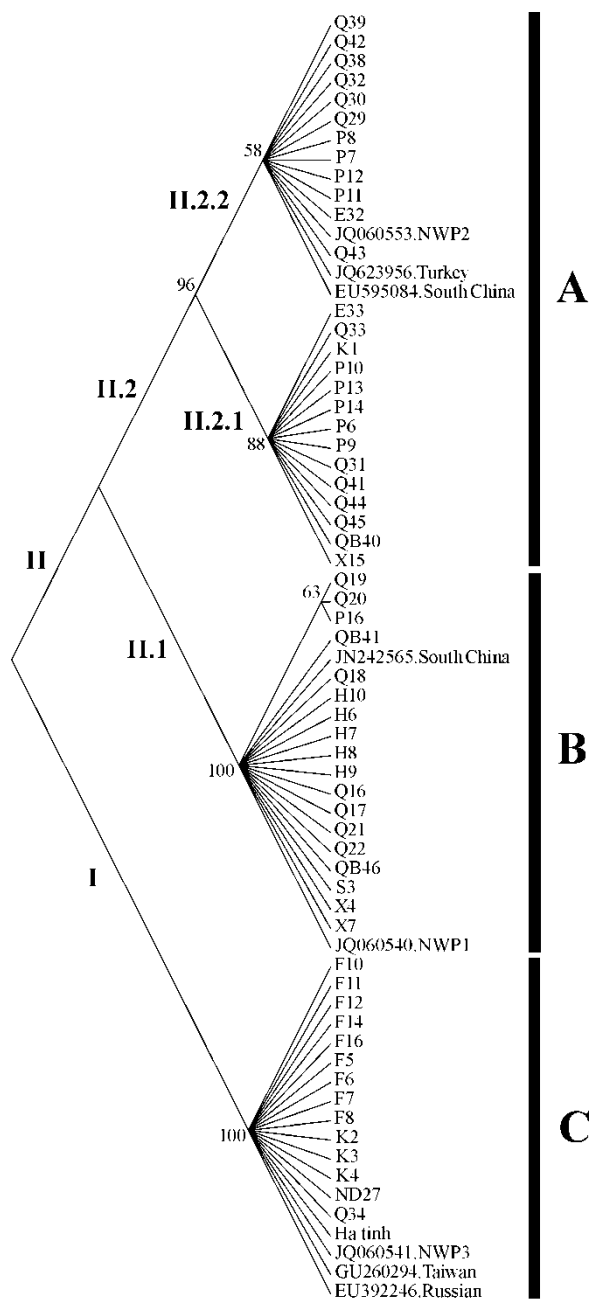
Bảng 3

Mức độ tương đồng nucleotide trong loài cá Đồi mực) theo vùng phân bố ở khu vực Bắc - Trung Bộ Việt Nam

Vùng	1	2	3	4	5	6
1. Quảng Ninh						
2. Hải Phòng	0,027					
3. Nam Định	0,027	0,002				
4. Hà Tĩnh	0,027	0,002	0,023			
5. Quảng Bình	0,027	0,002	0,000	0,003		
6. Thừa Thiên - Huế	0,027	0,002	0,000	0,003	0,014	

Trình tự vùng gen CO1 của các mẫu cá Đồi mực thu thập từ vùng biển phía Bắc -Trung bộ Việt Nam có độ tương đồng cao so với 8 trình tự loài cá Đồi mực (*Mugil cephalus*) trên ngân hàng Genbank với các mã số lần lượt là GU260294, EU595084, EU392246, JQ060540, JQ060553, JQ060541, JQ623956 và JN242565.

Kết quả khi phân tích mối quan hệ phát sinh chủng loại cho thấy 59 mẫu cá Đồi mực thu ở vùng biển Bắc - Trung Bộ được chia thành 3 nhóm theo các dòng NWP1 (ôn đới), NWP2 (nhiệt đới) và NWP3 (hỗn hợp NWP1 và NWP2) (Hình 2) với tỷ lệ bắt gặp lần lượt là 31%, 44% và 25% trong đó dòng NWP2 gồm 26 mẫu thu ở Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định và Thừa Thiên - Huế; dòng NWP1 gồm 18 mẫu được ghi nhận ở hầu hết các vùng thu mẫu như Quảng Ninh, Nam Định, Hải Phòng và Quảng Bình; dòng NWP3 gồm 15 mẫu thu tại Quảng Ninh, Nam Định, Hà Tĩnh và Thừa Thiên - Huế. Dòng NWP1 xuất hiện nhiều nhất ở Quảng Ninh (44,5%), dòng NWP2 cũng xuất hiện nhiều nhất ở Quảng Ninh (46%) và Hải Phòng (42%) và dòng NWP3 xuất hiện nhiều nhất ở Nam Định (67%). Cả 3 dòng NWP1, NWP2, NPW3 đều được ghi nhận ở vùng biển Bắc - Trung Bộ Việt Nam và với 2/6 khu vực nghiên cứu là Quảng Ninh và Nam Định xuất hiện cả 3 dòng cá Đồi mực.



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại của 59 mẫu cá đối mục nghiên cứu với 8 trình tự cá Đối mục tương đồng cao trên Genbank trên cơ sở phân tích dữ liệu vùng gen CO1 bằng phương pháp Maximum likelihood

III. KẾT LUẬN

Cả 3 dòng cá Đối mục (*Mugil cephalus*) NWP1, NWP2, NWP3 đều được ghi nhận ở vùng biển Bắc - Trung Bộ Việt Nam với tỷ lệ lần lượt là 31%, 44% và 25%.

Sai khác về trình tự gen CO1 giữa các mẫu cá Đồi mực tại Bắc - Trung Bộ là rất nhỏ, dao động từ 0,3% (Quảng Bình) đến 2,7% (Hải Phòng) và mức độ khác biệt giữa các mẫu nghiên cứu trong 6 khu vực thu mẫu là rất nhỏ ($P < 0,02$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Luu Xuân Hòa, 2011.** Đa dạng sinh học trong hệ sinh thái đầm phá Việt Nam. Bản tin Viện Nghiên cứu Hải sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn số 21, 7/2011.
2. **Nguyễn Khắc Hoàng, Trương Sĩ Kỳ, 2007.** Cá biển. Động vật chí Việt Nam, tập 20, Nxb. KHKT, Hà Nội.
3. **Ke H. M., Lin W. W., Kao H. W., 2009.** Genetic diversity and differentiation of gray mullet (*Mugil cephalus*) in the coastant of Taiwan. Zoological Science 26: 421 - 428.
4. **Durand J. D., Chen W. J., Shen K. N., Fu C., Borsa P., 2012.** Genus - level taxonomix changes implied by the mitochondrial phylogeny of grey mullets. Comptes Rendus Biologies 335: 687- 697.
5. **Froese R., Pauly D. (Eds), 2005.** FishBase: World Wide Web electronic publication.
6. **Zhang Y. P., Shi L. M., 1989.** Mitochondrial DNA polymorphism in five species of the genus Macaca. Acta Genetica Sinica 17: 23-33.
7. **Ward R. D., Zemplak T. S., Innner B H., Hebert P. R., 2005.** Barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B 360: 1847-1857.
8. **Technelysium, 2013.** Software for DNA sequencing. South Brisbane: Technelysium Pty Ltd.
9. **Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G., 1997.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25: 4876 - 4882.
10. **Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S., 2011.** MEGA 5.2.2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

GENETIC DIVERSITY OF *MUGIL CEPHALUS* IN NORTH - CENTRAL COAST OF VIETNAM BASED ON ANALYSIS OF CO1 SEQUENCE

Tran Thi Viet Thanh, Phan Ke Long, Jean Dominique Durand

SUMMARY

A total of 59 Flat head mullet (*Mugil cephalus*) samples collected from 21 locations belonging to 6 provinces along the North-Central coast of Vietnam were used for analyses of genetic diversity based on CO1 sequences. The genetic distance between the locations was very small, ranged from 0,3% (Quang Binh) to 2,7% (Hai Phong). The results also indicated that, the distribution of *Mugil cephalus* was not affected by geographical location. In addition, the results provided the new information about genetic diversity of Flat head mullet (*Mugil cephalus*) in the North - Central coast of Vietnam.