

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁ NHÁI VÀ CÁ LÌM KÌM BẰNG KỸ THUẬT ĐIỆN DI PROTEIN SDS-PAGE

Nguyễn Ngọc Hoàng Anh¹, Tăng Đức Hùng² và Võ Công Thành²

ABSTRACT

*In order to evaluate the genetic diversities of Nhai and Lim Kim fish, 65 Lim Kim fishes were collected in Ha Tien town's market, nine Nhai and 39 Lim Kim fishes in Can Tho city. All these samples were analyzed by protein SDS-PAGE method. Results showed that the genetic population of the Nhai species in Can Tho city were less diverse ($H_o=0.57, H_{EP}=0.1, SENA=0.11$). The poor genetic diversity of the Lim Kim population in Can Tho city were also detected (0.94, 0.27, 0.38). In comparison to the Lim Kim fish in Can Tho city, that of Ha Tien town were rather diverse (2.82, 0.53, 1.11). The sample of the Lim Kim fish in Ha Tien town had the protein content far lower than of those at Can Tho City, in other words, the Lim Kim fish inhabiting in fresh water taste better than those in brackish water. Moreover, based on protein profile allowing us to name them as follows: Lim Kim in Can Tho is *Hemiramphus canthoensis*, Lim Kim in Ha Tien is *Hemiramphus hatienensis*. The above genetic diversification showed that the Lim Kim, Nhai species are underway to be extincted.*

Keywords: SDS-PAGE, Lim Kim fish, Nhai fish

Title: Evaluation on genetic diversities of Nhai fish (*Xenentodon canciloides bleeker*) and Lim Kim fish (*Hemiramphus spp.*) by protein SDS-PAGE

TÓM TẮT

*Bài nghiên cứu nhằm đánh giá đa dạng di truyền của cá Lìm Kìm và cá Nhái, 65 con cá Lìm Kìm được thu thập tại chợ Hà Tiên, 9 con cá nhái và 39 con cá Lìm Kìm được thu thập tại Cần Thơ. Kết quả phân tích trên phổ điện di cho thấy vốn gen của loài cá Nhái và Lìm Kìm tại Cần Thơ khá đồng nhất: Độ đa dạng kiểu hình $H_o=0.57$, độ đa dạng kiểu gen $H_{EP}=0.10$, tổng số allene có hiệu quả $SENA=0.11$. Tương tự, cá Lìm Kìm tại Cần Thơ cũng khá đồng nhất $H_o=0.94, H_{EP}=0.27$, và $SENA=0.38$, và Lìm Kìm tại thị xã Hà Tiên còn khá đa dạng: $H_o=2.82, H_{EP}=0.53, SENA=1.11$. Mẫu protein của cá Lìm Kìm tại vùng cửa biển thị xã Hà Tiên có hàm lượng protein thấp hơn nhiều so với mẫu thu thập tại Cần Thơ, hay nói cách khác cá Lìm Kìm sống vùng nước ngọt ngon, nhiều protein hơn vùng nước lợ. Thông số đa dạng di truyền trên cho thấy hai loài cá Nhái và Lìm Kìm tại thành phố Cần Thơ đang trên đà bị tuyệt chủng. Ngoài ra, dựa vào phổ điện di protein cho phép chúng tôi phân loại và đặt tên khoa học cho cá Lìm Kìm Hà Tiên là *Hemiramphus hatienensis* và cá Lìm Kìm Cần Thơ là *Hemiramphus canthoensis*.*

Từ khoá: SDS-PAGE, cá Lìm Kìm, Cá Nhái

1 GIỚI THIỆU

Những năm gần đây, đa dạng di truyền của các loài cá ngày càng giảm mà nguyên nhân chủ yếu là do khai thác quá mức, môi trường sống bị ô nhiễm do thuốc bảo vệ thực vật... Các loài cá sống tự nhiên ngày càng mất đi và thay vào đó là những

¹ Sinh viên lớp Công nghệ Sinh Học K28, Khoa Khoa Học, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng Dụng

loại cá nuôi ao, nuôi bè...trường hợp đặc biệt mà chúng ta thấy rõ nhất là trước đây, cá Lìm Kìm và cá Nhái sống vùng nước ngọt chiếm mật độ cao quanh năm, nhưng hiện nay chỉ xuất hiện theo mùa, không thấy vào mùa nắng và chỉ có vào mùa mưa. Ví dụ cụ thể này cho thấy nguy cơ tuyệt chủng của các loài thủy sản nói chung và hai loài cá khảo sát nói riêng đang ở mức báo động cao. Đề tài “Đánh giá đa dạng di truyền của cá Nhái và cá Lìm Kìm bằng kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE” được thực hiện nhằm mục đích đánh giá độ đa dạng di truyền của hai loài cá này từ đó cảnh báo nguy cơ tuyệt chủng loài mà có chính sách bảo vệ nguồn lợi thủy sản nói riêng hay nguồn lợi sinh vật nói chung.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1 Phương tiện thí nghiệm

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

9 cá Nhái, 9 cá Lìm Kìm mua ở chợ Cần Thơ, 30 cá Lìm Kìm được đánh bắt tại khu thực nghiệm Trường Đại học Cần Thơ, 65 cá Lìm Kìm mua tại chợ cửa biển Hà Tiên.

2.1.2 Thời gian thí nghiệm

Đề tài được thực hiện từ tháng 11/2004 đến tháng 02/2005.

2.1.1 Địa điểm thí nghiệm

Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Chọn giống và Ứng dụng Công nghệ Sinh học, Bộ môn Khoa học Cây trồng, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1.4 Dụng cụ và hoá chất

Máy ly tâm, máy lắc, khung điện di và kính dạng mini, bộ nguồn, tủ lạnh, cân điện tử, pipets, beaker, ống hút, ...

Các hoá chất sử dụng trong điện di protein như Acrylamide, Bis- acrylamide, Tris, SDS...

2.2 Phương pháp

2.2.1 Quy trình điện di protein mẫu cá

- Cân 5 mg thịt cá.
- Bơm 150 µl dịch ly trích LM1.
- Lắc hai giờ ly trích hoặc ngâm qua đêm.
- Chạy điện di protein:
 - + Mỗi giếng bơm 15 µl mẫu, tương đương với mỗi con.
 - + Gel cô 5%, gel phân tách 12%.
 - + Hiệu điện thế 30 volt ở gel cô và 60 volt ở gel phân tách
- Kết quả gel điện di được scan vào máy để lưu hình ảnh.

2.2.2 Phương pháp xử lý số liệu

Độ đa dạng kiểu hình

$$H_o = -\sum(f_i \ln f_i)$$

Độ đa dạng kiểu gen

$$H_{EP} = 1 - \sum(f_i)^2$$

Tổng số alen có hiệu quả

$$SENA = \frac{1}{\sum(f_i)^2} - 1$$

Trong đó: f_i là tần số trung bình quan sát được

Đa dạng kiểu hình protein H_o phụ thuộc vào tần suất xuất hiện band protein trên phổ điện di, và H_o biến thiên từ 0 đến vô cực. Giá trị H_o càng lớn thì quần thể đó càng đa dạng, ngược lại, H_o có giá trị tiến về 0 thì quần thể loài đó được kết luận là thuần.

H_{EP} là giá trị đa dạng kiểu gene nhưng khoảng biến thiên khác H_o , H_{EP} trong khoảng 0 đến 1, nếu H_{EP} bằng 0 thì quần thể sẽ thuần về kiểu gen, điều này rất rõ qua mức độ ăn màu các band protein đều nhau và ít khác biệt, càng tiến về 1 thì quần thể càng đa dạng kiểu gen.

Khoảng biến thiên của SENA cũng giống H_o , nhưng ý nghĩa khác, SENA là tổng số allene có hiệu quả trên mỗi locus và có giá trị phản ảnh số allene trung bình có tác động kiểm soát protein dự trữ.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

2.3 3.1 Cá Lìm Kìm ở các sông rạch tại Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang

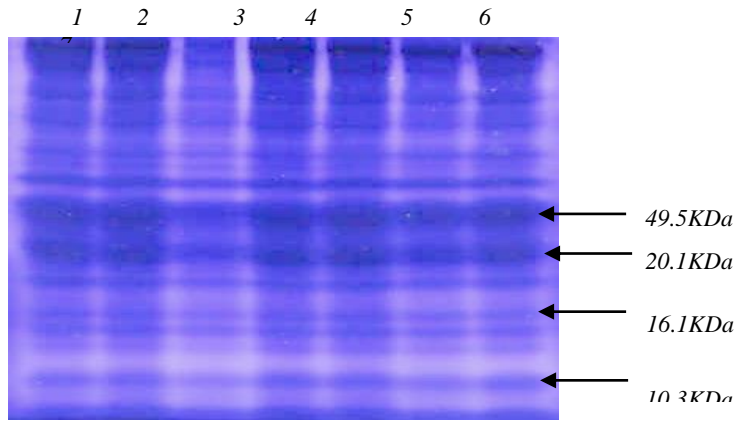
Kết quả phân tích về hình thái cá Lìm Kìm (hình 1) cho thấy chúng khá đa dạng về hình dạng và kích thước (bảng 1). Mặt khác, về mặt di truyền thì quần thể của loài này biểu hiện ở mức độ phân tử protein (hình 2) cũng khá đa dạng với các thông số đa dạng như đa dạng kiểu hình protein $H_o = 2.82$, đa dạng di truyền $H_{EP} = 0.53$, và tổng số allene có hiệu quả $SENA = 1.11$. Như vậy, quần thể cá Lìm Kìm tại Hà Tiên còn khá đa dạng.

Bảng 1: Khối lượng, chiều dài thân, và chiều dài hàm dưới của cá Lìm Kìm sưu tập tại thị trấn Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang

Đặc tính	Tối thiểu	Tối đa	Trung bình
Khối lượng (g)	10.1	152.9	27.9
Dài thân (cm)	12.7	34.0	18.4
Hàm dưới (cm)	0.0	7.2	2.9



Hình 1: Hình dạng loài cá Lìm Kìm sống ở các cửa sông Thị trấn Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang



Hình 2: Phổ điện di protein của loài cá Lìm Kìm tại Hà

2.4 Cá Lìm Kìm ở các sông rạch vùng thành phố Cần Thơ

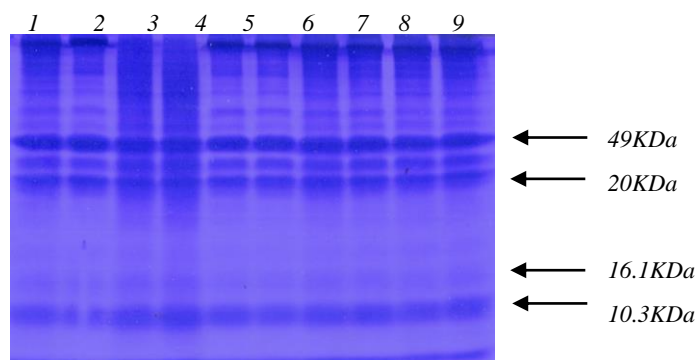
Kết quả phân tích về hình thái loại cá Lìm Kìm Cần Thơ (hình 3) cho thấy chúng ít đa dạng về hình dạng và kích thước (bảng 2), chẳng hạn chiều dài thân biến thiên rất hẹp, 13-13.8 cm. Mặt khác, về mặt di truyền thì quần thể của cá này biểu hiện ở mức độ phân tử protein (hình 4) cũng ít đa dạng, các band xuất hiện ngang nhau, ít chênh lệch về hàm lượng protein, và các thông số đa dạng như đa dạng kiểu hình protein $H_o = 0.94$, đa dạng di truyền $H_{EP} = 0.27$, và tổng số allele chỉ hiệu quả $SENA = 0.38$. Kết quả này chứng tỏ cá Lìm Kìm Cần Thơ ngày càng bị cận huyết, hậu quả dẫn đến là cá chậm lớn hay giảm sức sống, quần đàn sinh sản ngày càng ít, như vậy chuỗi thức ăn trong tự nhiên sẽ dẫn đến sự mất cân bằng, và chúng ta chưa thể lường trước được hậu quả gì sẽ xảy ra. Nếu không có biện pháp khôi phục, nhất là tình trạng ô nhiễm môi trường, không lâu loài cá này sẽ bị tuyệt chủng.

Bảng 2: Khối lượng, chiều dài thân, và chiều dài hàm dưới của cá Lìm Kìm sưu tập tại Cần Thơ

Đặc tính	Tối thiểu	Tối đa	Trung bình
Khối lượng (g)	3.2	4.9	3.9
Dài thân (cm)	13.0	13.8	13.4
Hàm dưới (cm)	1.3	3.9	2.9



Hình 3: Hình dạng loài cá Lìm Kìm sống ở Cần Thơ



Hình 4: Phổ điện di protein của loài cá Lìm Kìm tại Cần Thơ

2.5

2.6

2.7

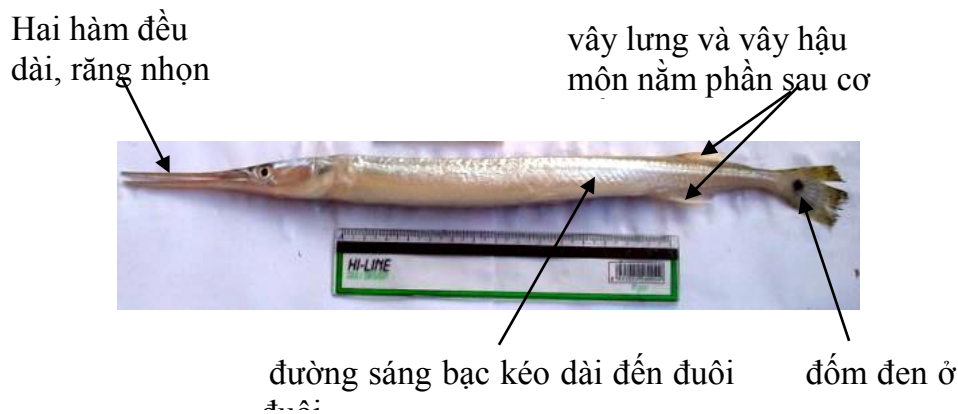
2.8

2.9 3.3 Cá Nhái ở sông rạch vùng Thành phố Cần Thơ

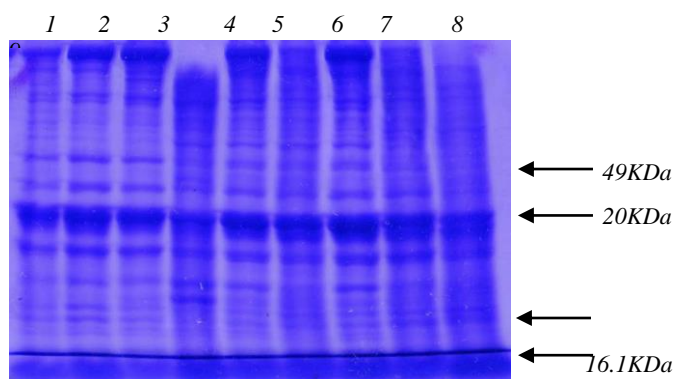
Kết quả phân tích về hình thái loại cá Nhái (hình 5) cho thấy chúng khá đa dạng về hình dạng và kích thước (bảng 3), chẳng hạn khối lượng biến thiên từ 3g đến 75g. Mặt khác, về mặt di truyền thì quần thể của loài này biểu hiện ở mức độ phân tử protein (hình 6) cũng ít đa dạng với độ ăn màu các band ở mỗi giếng đều nhau, sự khác biệt ít, do đó độ đa dạng thấp với các thông số đa dạng như đa dạng kiểu hình protein $H_o = 0,57$, đa dạng di truyền $H_{EP} = 0.10$, và tổng số alen có hiệu quả $SENA = 0.11$. Chứng tỏ độ đa dạng di truyền của cá Nhái tại Cần Thơ cũng bị suy thoái cận huyết ($H_{EP} = 0.10$), giảm sức sống và mất cân bằng di truyền ($SENA = 0.11$).

Bảng 3: Khối lượng, chiều dài thân, và chiều dài hàm dưới của cá Nhái sưu tập tại Cần Thơ

Đặc tính	Tối thiểu	Tối đa	Trung bình
Khối lượng (g)	3.05	74.62	22.79
Dài thân (cm)	3	16	6.06
Hàm dưới (cm)	12	36.5	21.5



Hình 5: Hình dạng loài cá Nhái sống ở Cần Thơ



Hình 6: Phổ điện di protein của loài cá Nhái tại Cần

2.10

2.11

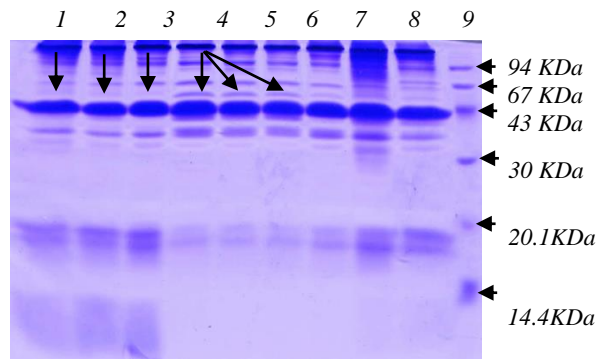
2.12

2.13

2.14

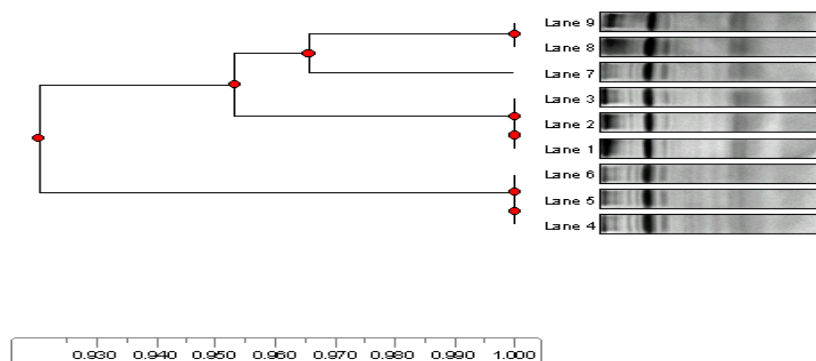
2.15 3.4 Phân biệt loài

Dựa trên phổ điện di protein (hình 7), hai loại cá Lìm Kìm có những khác biệt nhau rất rõ ở các band protein (mũi tên hình 7) có trọng khối và mức độ ăn màu khác nhau. Sự khác nhau trên chưa có thể phân loại được bằng hình thái (Kawamoto et al, 1972). Tuy nhiên, cách phân loại loài dựa vào trọng khối khác nhau là thế mạnh của phương pháp protein SDS-PAGE (Vo Cong Thanh et al, 2003). Với phổ điện di này cho phép chúng tôi đi đến kết luận là hai loại cá Lìm Kìm đã thu thập ở Hà Tiên và Cần Thơ là hai loài khác nhau, cho chúng tôi đặt tên khoa học cá Lìm Kìm Hà Tiên là *Hemiramphus hatienensis* và tên khoa học của Lìm Kìm Cần Thơ là *Hemiramphus canthoensis*. Qua sơ đồ phả hệ (Hình 8) phân tích bằng phần mềm Image Master 1D Version 2.01 cho thấy cá Lìm Kìm Cần Thơ có quan hệ gần với cá Nhái Cần Thơ hơn so với cá Lìm Kìm Hà Tiên, mặc dù chúng thuộc hai loài cá có hình thái khác nhau (hàm trên và hàm dưới). Đây là nghi vấn mới cho các nhà khoa học về đa dạng động vật, ảnh hưởng của môi sinh lên hệ gene nên trong phả hệ chúng nằm ở nhánh gần nhau?



Hình 7: Phổ điện di protein của hai loài cá Lìm Kìm và cá Nhái tại Hà Tiên và Cần Thơ

Giếng 1->3 cá Lìm Kìm tại Cần Thơ Giếng 7->9 cá Nhái tại Cần Thơ
Giếng 4->6 cá Lìm Kìm tại Hà Tiên Giếng 10: Protein chuẩn.



Hình 8: Sơ đồ phả hệ của 3 loài cá

Lane 1,2,3: Cá Lìm Kìm Cần Thơ Lane 4,5,6: Cá Lìm Kìm Hà Tiên Lane 7,8,9: Cá Nhái Cần Thơ

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

2.16 Kết Luận

Qua kết quả và thảo luận nêu trên cho phép chúng tôi đi đến kết luận như sau:

- Cá Lìm Kìm tại Hà Tiên còn khá đa dạng ($H_o = 2.82$, $H_{EP} = 0.53$, $SENA = 1.11$) trong khi cá Lìm Kìm ($H_o = 0.94$, $H_{EP} = 0.27$, $SENA = 0.38$) và cá Nhái ($H_o = 0,57$, $H_{EP} = 0.10$, $SENA = 0.11$) tại Cần Thơ đang bị suy thoái về mặt di truyền, sức sống giảm.
- Kỹ thuật điện di protein là công cụ phân biệt loài hiệu quả cao ở mức độ di truyền protein. Đây là hướng ứng dụng đặc biệt trong phân loại loài cá nói riêng và các loài động vật nói chung.

2.17 Đề nghị

- Tiếp tục đánh giá độ đa dạng di truyền trên các loài cá khác để có biện pháp bảo tồn và khai thác thích hợp
- Đánh giá đa dạng di truyền các loài cá nước ngọt và cá nước lợ để tìm ra những band đặc trưng riêng của cá nước ngọt và cá nước lợ làm cơ sở cho phân loại loài

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kawamoto, Nguyễn Viết Trương, và Trần Thị Túy Hoa, 1972. Illustrations of some freshwater fishes of the Mekong Delta, Việt Nam. Vol. No.1: 28-29.
- Phạm Văn Phương, 2001. Khả năng ứng dụng phương pháp điện di protein SDS_PAGE, tạp chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn tháng 6 năm 2001, trang 371-372.
- Vo Cong Thanh, Tran Ngoc Nguyen, Yutaka Hirata, and Nguyen Van Thuong, 2003. Antenna protein diversity of prawns(Macrobrachium) in the Mekong Delta. Biosphere Conservation 4(1): 12-15.
- Võ Công Thành, 2004. Giáo Trình Kỹ Thuật Điện Di, Trường Đại học Cần Thơ, trang 67.