

SO SÁNH ĐA HÌNH MICROSATELLITE VÙNG PROMOTOR GEN PRL-1 VÀ SINH TRƯỞNG Ở CÁ RÔ PHI VẦN (*Oreochromis niloticus*) NUÔI TRONG NƯỚC MẶN

Preliminary Investigation into Polymorphism of Microsatellite in Prl-1 Promotor and Growth Performance of Nile Tilapia in Saline Water

Phạm Anh Tuấn¹ và Quyền Đình Thi²

¹ Viện Nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản I, Đình Bảng, Từ Sơn, Bắc Ninh

² Viện Công nghệ Sinh học, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

TÓM TẮT

Cá rô phi là một trong những loài cá nuôi quan trọng nhất trên thế giới. Cá rô phi được nuôi trong cả hệ thống nuôi nước ngọt và nước mặn. Nuôi cá rô phi trong môi trường nước mặn có tiềm năng rất lớn ở Việt Nam. Tuy nhiên mỗi dòng cá rô phi thể hiện tốc độ sinh trưởng rất khác nhau trong các môi trường có độ mặn khác nhau. Bài báo này trình bày kết quả bước đầu nghiên cứu sự liên kết giữa kiểu gene vệ tinh trong vùng điều khiển Prl-1 với tính trạng sinh trưởng của dòng cá rô phi chọn giống (dòng cá của Viện thủy sản 1) trong môi trường nước mặn. Thế hệ con của 7 gia đình cá rô phi được nuôi 87 ngày trong hai môi trường có độ muối 14-15‰ và 20-22‰. Tốc độ sinh trưởng và kiểu gene vệ tinh trong vùng điều khiển Prl-1 được so sánh và thảo luận nhằm tìm hiểu mối tương quan giữa chỉ thị phân tử với tính trạng sinh trưởng của cá rô phi nuôi trong môi trường nước mặn.

Từ khóa: Cá rô phi, microsatellite, nước mặn, sinh trưởng.

SUMMARY

Tilapia are among the world's most important aquacultural fin fish. Tilapia have been farmed in both fresh- and saline aquaculture systems. Aquaculture of Tilapia in saline water has a very high potential in Vietnam. However, available strains of Tilapia differ greatly in their growth in different salinities. This paper presents preliminary investigation into association of genotype of microsatellite in Prl-1 promoter and growth performance of the selected RIA-I strain of Nile tilapia cultured in saline water. Progeny of 7 tilapia families were grown in two different salinities of 14-15‰ and 20-22‰ for a period of 87 days. Growth performance and genotype of microsatellite in Prl-1 promoter of fish were compared and further research towards better understanding relationship between molecular marker and growth performance of tilapia in saline environment is briefly discussed.

Key words: Growth, microsatellite, saline water, tilapia.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô phi với khả năng thích ứng rộng, có thể nuôi trong nước ngọt, lợ và mặn đang ngày càng được nuôi phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Trong hơn thập kỷ qua, cá rô phi được nuôi ở nhiều địa phương trong cả nước. Năm 2005, sản lượng cá rô phi nuôi ở nước ta ước đạt khoảng 54.000 tấn, trong đó gần 90% sản lượng được nuôi ở các vùng nước ngọt (Phạm Anh Tuấn và CS., 2006).

Nước ta có tiềm năng phát triển nuôi cá rô phi ở các vùng nước mặn. Tuy nhiên khi nuôi cá rô phi ở các vùng nước mặn tốc độ sinh trưởng của cá rô phi thường chậm, tỷ lệ hao hụt cao hạn chế khả năng mở rộng và hiệu quả nuôi cá rô phi ở các vùng nước ven

biển. Nghiên cứu chọn giống nâng cao tốc độ sinh trưởng của cá rô phi khi nuôi trong môi trường nước mặn là hết sức cần thiết, góp phần phát triển nuôi trồng thủy sản có hiệu quả ở các vùng nước ven biển nước ta.

Prolactin thuộc nhóm gen hormone sinh trưởng GH/Prl, có vai trò thích nghi với độ mặn môi trường, tăng độ thẩm thấu plasma thông qua điều tiết hoạt tính Na⁺, K⁺ và ATPase. Tuyến yên cá rô phi tổng hợp 2 dạng prolactin có khối lượng phân tử (24 và 20 kDa) và số amino acid (188 và 177) khác nhau, do 2 gen prolactin 1 (Prl-1) và prolactin 2 (Prl-2) mã hoá. Streelman và Kocher (2004) cho rằng có mối liên hệ giữa tính đa hình microsatellite vùng promotor gen prolactin và tốc độ sinh trưởng của cá rô phi khi sống ở các môi trường có độ mặn khác nhau.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tìm hiểu mối liên hệ giữa sinh trưởng và tính đa hình của microsatellite vùng promotor gen prolactin 1 (Prl - 1) của cá rô phi vằn chọn giống khi nuôi ở hai môi trường độ mặn: 14 - 15‰ và 20 - 22‰.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và bố trí thí nghiệm

Vật liệu thí nghiệm là đàn cá rô phi chọn giống thế hệ thứ 7 do Viện Nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản I tiến hành, cá rô phi vằn dòng GIFT được sử dụng làm vật liệu khởi đầu, chọn giống theo gia đình, trong điều kiện môi trường nước ngọt.

Thí nghiệm được bố trí tại Trung tâm quốc gia giống Thủy sản nước ngọt miền Bắc (Gia Lộc, Hải Dương). Bảy (07) cặp cá rô phi bố mẹ được sinh sản thu thế hệ con của từng gia đình, cá con của từng gia đình được ương nuôi riêng rẽ trong các giai có kích thước 3 x 2 x 3 m, khi cá đạt cỡ 10 - 20 g/con dùng dấu PIT đánh dấu từng cá thể.

Cá của từng gia đình sau khi đánh dấu được chia nuôi trong 2 bể xi măng có độ mặn 14 - 15‰ và 20 - 22‰. Nước mặn dùng trong bể thí nghiệm là nước ngọt được bổ sung muối ăn đạt độ mặn cần thiết. Mỗi bể

có dung tích 50 m³, mật độ thả 1-1,5 con/m³. Các bể được sục khí, duy trì cùng mức nước đảm bảo tương đồng về nhiệt độ nước và oxy hoà tan đáp ứng nhu cầu của cá thí nghiệm. Thời gian nuôi 87 ngày. Khi thu hoạch cân đo từng cá thể, tính tỷ lệ sống của từng gia đình. Các cá thể thuộc cùng gia đình khi thu hoạch từ mỗi bể được phân chia thành 2 nhóm kích thước: nhóm nhỏ nhất và nhóm lớn nhất. Phân tích ANOVA (Gomez & Gomez, 1984) được sử dụng so sánh sinh trưởng của các gia đình cá thí nghiệm.

Bốn (04) cặp cá bố mẹ cho đàn con có tốc độ sinh trưởng tốt hơn khi nuôi ở 2 môi trường độ mặn và các cá thể thuộc 2 nhóm kích thước ở thế hệ con của 4 gia đình được phân tích đa hình microsatellite vùng promotor gen Prl - 1. Mỗi nhóm kích thước phân tích 10 cá thể.

2.2. Phân tích đa hình microsatellite vùng promotor gen Prl - 1

Tách chiết ADN: ADN tổng số được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp được Đào Thị Tuyết và CS., (2004) miêu tả.

Môi sử dụng: Sử dụng cặp môi PrlF và PrlR tham khảo từ GenBank để nhân vùng promotor của gene Prl -1 của cá rô phi (Cnaani và CS., 2004, Romana-Eguia và CS., 2005).

Bảng 1. Trình tự môi PrlF và PrlR dùng nhân vùng promotor gen Prl-1

Locus	Trình tự lặp lại	Tên môi	Trình tự môi 5'-3'	Tài liệu tham khảo
Vùng promoter gen Prl-1	(CA) _n	PrlF	CATTTCCACCTTCACGCCTCAC	X92380
		PrlR	CTTGCTCCATTTTATAGTTCCTT	

Phương pháp khuếch đại và điện di

Phản ứng PCR khuếch đại vùng promoter gen Prl-1 được thực hiện trên máy Eppendorf Personal Cycloer (Eppendorf, Đức) với điều kiện phản ứng: 1x 95°C/3'; 35x (95°C/1', 50°C/30', 72°C/1'); 72°C/10'.

Thành phần phản ứng trong thể tích 25 µl gồm 20-50 ng DNA khuôn; 1 unit Taq polymerase; 3,75 mM MgCl₂; 5 mM dNTP và 15 pM môi. Sau đó sản phẩm PCR được chạy điện di kiểm tra trên gel 2% agarose.

Phương pháp nhân dòng và đọc trình tự ADN

Phản ứng gắn dính và đọc trình tự ADN được thực hiện như Quyền Đình Thi và CS. (2005) đã mô tả. Sản phẩm PCR được gắn vào vector tách dòng pTZ57R/T (Fermentas). Sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến E. coli DH5α (Invitrogen) với mục đích chọn lọc được các dòng tế bào mang vector tách dòng pTZ57R/T đã gắn thêm sản phẩm PCR. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell và được sử dụng để đọc trình tự theo phương pháp Sanger trên máy xác định trình tự tự động ABI Prism 3100 Avant (Mỹ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Bảng 2. Khối lượng (W) và tỷ lệ sống cá nuôi trong nước mặn 14 - 15‰ và 20 - 22‰

Gia đình	Độ mặn 14 - 15‰			Độ mặn 20 - 22‰		
	W(g) cá thả	W(g) cá thu	Tỷ lệ sống (%)	W(g) cá thả	W(g) cá thu	Tỷ lệ sống (%)
53	20,0 ± 5,4	180,2 ± 45,6	95,7	19,8 ± 4,8	144,3 ± 64,7	44,9
55	20,9 ± 3,9	191,1 ± 38,7	100	19,8 ± 4,3	249,3 ± 64,7	98,0
58	17,8 ± 4,2	191,5 ± 35,6	97,1	19,7 ± 4,7	194,5 ± 105,1	62,0
73a	7,8 ± 5,6	102,6 ± 33,1	92,9	5,97 ± 2,6	97,2 ± 48,8	44,4
73b	8,6 ± 2,3	125,9 ± 22,7	100	8,7 ± 2,6	179,1 ± 104,3	69,4
77a	25,1 ± 6,6	116,4 ± 41,7	98,6	27,4 ± 7,9	95,5 ± 39,9	36,0
77b	7,4 ± 4,0	116,8 ± 35,2	100	6,5 ± 2,4	62,6 ± 58,5	23,4

Tỷ lệ sống và khối lượng cá các gia đình thí nghiệm nuôi trong môi trường nước mặn 14-15‰ có tỷ lệ sống khá cao, dao động từ 92,9-100%, trung bình 97,7%. Khi đó, nuôi trong môi trường nước mặn 20-22 ‰ cá ở các gia đình thí nghiệm có tỷ lệ sống thấp, dao động từ 23,4-98,0%, trung bình là 54%. Trong môi trường độ mặn 14-15‰, các gia đình 53,

55 và 58 có khối lượng cá khi thu hoạch lớn hơn các gia đình khác. Khi đó trong môi trường có độ mặn 20 -22 ‰, các gia đình 55, 58 và 73b có khối lượng cá khi thu hoạch lớn hơn các gia đình khác. Các gia đình 55 và 58 khi nuôi ở cả 2 môi trường 14-15‰ và 20-22‰ đều có khối lượng cá khi thu hoạch lớn hơn các gia đình khác (Bảng 2).

Bảng 3. Kiểu allele microsatellite vùng promotor gen Prl-1 của 4 cặp cá bố mẹ

Gia đình	Mẫu	Số lặp lại	Kiểu allele	Ký hiệu trong phụ lục đọc trình tự
53	Con bố	39/23	Dị hợp tử	QDT_1.4, QDT_1.5
	Con mẹ	36/35	Dị hợp tử	QDT_2.4
55	Con bố	25/15	Dị hợp tử	QDT_3.3.1
	Con mẹ	39/33	Dị hợp tử	QDT_4.4.1
58	Con bố	36/36	Đồng hợp tử	QDT_5.5.1
	Con mẹ	39/21	Dị hợp tử	QDT_6.1.1
73b	Con bố	36/21	Dị hợp tử	QDT_7.2, QDT-7.5
	Con mẹ	39/26	Dị hợp tử	QDT_9.2.2

Bảng 4. Các kiểu allele microsatellite vùng promotor gen Prl-1 ở nhóm kích thước lớn (L) và nhóm kích thước nhỏ (N) gia đình 53

Mẫu	L (20 - 22 ‰)	N (20 - 22 ‰)	L (14 - 15 ‰)	N (14 - 15 ‰)
1	36/23	39/39	39/36	39/36
2	39/36	39/36	39/23	39/39
3	39/23	39/36	36/23	39/36
4	39/36	36/23	39/39	39/23
5	36/23	36/23	39/39	36/23
6	36/23	39/23	39/36	35/35
7	35/23	36/23	36/23	39/39
8	39/36	39/36	39/36	39/39
9	39/36	39/36	39/23	-
10	39/39	39/36	39/36	36/23

Bảng 5. Các kiểu allele microsatellite vùng promotor gen Prl-1 ở nhóm kích thước lớn (L) và nhóm kích thước nhỏ (N) gia đình 55

Mẫu	L (20 - 22 ‰)	N (20 - 22 ‰)	L (14 - 15 ‰)	N (14 - 15 ‰)
1	39/15	33/25	33/15	33/15
2	33/15	39/15	39/15	39/25
3	39/25	33/25	33/25	39/15
4	39/15	39/15	39/15	39/15
5	33/25	33/15	39/15	39/25
6	33/25	39/15	39/15	33/15
7	39/15	33/15	39/15	39/25
8	33/15	33/25	33/25	39/15
9	33/15	39/33	39/15	33/15
10	39/25	-	33/25	33/25

Bảng 6. Các kiểu allele microsatellite vùng promotor gen Prl - 1 ở nhóm kích thước lớn (L) và nhóm kích thước nhỏ (N) gia đình 58

Mẫu	L (20 - 22 ‰)	N (20 - 22 ‰)	L (14 - 15 ‰)	N (14 - 15 ‰)
1	36/36	39/36	36/15	36/15
2	36/15	36/15	36/15	39/15
3	36/36	39/15	36/36	36/15
4	36/15	36/15	36/36	36/15
5	36/36	39/36	36/15	39/36
6	39/15	39/15	36/36	39/15
7	36/36	36/36	36/36	39/36
8	36/15	39/15	36/36	36/21
9	39/15	39/36	36/36	36/36
10	36/36	36/36	36/36	39/15

Bảng 7. Các kiểu allele microsatellite vùng promotor gen Prl-1 ở nhóm kích thước lớn (L) và nhóm kích thước nhỏ (N) gia đình 73b

Mẫu	L (20 - 22 ‰)	N (20 - 22 ‰)	L (14 - 15 ‰)	N (14 - 15 ‰)
1	39/36	39/21	39/36	26/21
2	36/26	36/26	26/21	39/21
3	39/21	39/36	26/21	39/36
4	26/21	39/36	26/21	26/21
5	26/21	36/26	39/36	39/36
6	26/21	39/36	26/21	39/21
7	26/21	36/26	36/26	36/26
8	26/21	36/26	36/26	26/21
9	36/26	26/21	26/21	39/21
10	-	39/21	26/21	39/21

Cá nuôi trong môi trường độ mặn 20 - 22 ‰ có tỷ lệ sống thấp, giảm đáng kể so với nuôi trong môi trường 14 - 15 ‰, tương tự kết quả Phạm Anh Tuấn và CS. (2008) thu được khi nuôi so sánh dòng cá này với các dòng cá rô phi khác trong các môi trường có cùng độ mặn.

Kết quả phân tích microsatellite vùng promotor gen Prl - 1 của các cá bố, cá mẹ 4

gia đình 53,55, 58 và 73b (Bảng 3) và kết quả phân tích vùng promoter gen Prl - 1 các cá thể thuộc 2 nhóm kích thước: lớn và nhỏ thế hệ con của các gia đình 53, 55, 58 và 73b nuôi ở độ muối 20 - 22 ‰ và 14 - 15 ‰ (Bảng 4, 5, 6 và 7) cho thấy tính đa hình cao, kiểu allele ở cá bố, cá mẹ và đàn con của chúng có quan hệ rất chặt chẽ với nhau.

Theo Streelman và Kocher (2002), gen prolactin thuộc nhóm gen hormone sinh trưởng, sự biểu hiện của gene Prl - 1 mã hóa prolactin khác nhau liên quan mật thiết với tính chịu mặn của cá, những cá thể có allele dài 39 và 36 sẽ có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối thấp, hay ở nước ngọt. Các cá thể có allele ngắn 15, 21 sẽ có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối cao, hay ở nước mặn. Các kết quả nghiên cứu này dù các cá thể có sự khác nhau rõ rệt về tốc độ sinh trưởng thể hiện ở sự sai khác về khối lượng cá khi thu hoạch, nhưng những kết quả phân tích vùng promoter gen Prl - 1 không tìm thấy sự thể hiện rõ ràng ở các cá thể lớn chỉ có các allele ngắn, các cá thể có khối lượng nhỏ chỉ có các allele dài, ngay tần số các allele dài và allele ngắn cũng không thể hiện sự sai khác rõ rệt giữa 2 nhóm kích thước lớn và nhỏ. Điều này phản ánh các tính trạng số lượng nói chung, tốc độ sinh trưởng của cá nói riêng có thể còn chịu chi phối của nhiều gen, một gen đơn lẻ không chi phối trực tiếp tính trạng.

Tuy nhiên, điểm đáng chú ý là thế hệ con các gia đình 55, 58 và 73b có khối lượng cá trung bình khi thu hoạch cao hơn các gia đình khác trong môi trường độ mặn 20 - 22 ‰ có tần số trung bình các allele ngắn (15 và 21) khá cao lần lượt là 0,31; 0,25 và 0,28, khi đó ở đàn con thuộc gia đình 53 hoàn toàn không phát hiện thấy allele ngắn trong các mẫu đã phân tích.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy để làm rõ mối quan hệ giữa đa hình microsatellite vùng promoter gen Prl - 1 và sinh trưởng của cá rô phi trong môi trường nước mặn cần phải có những nghiên cứu tiếp tục. Việc phân tích kiểu gen ở đàn con của các gia đình 73a, 77a và 77b có tốc độ sinh trưởng chậm hơn trong thí nghiệm này và tiến hành so sánh sinh trưởng với đa hình vùng promoter gen Prl - 1 ở đàn con được sản sinh từ các cá bố, cá mẹ đồng hoặc dị hợp tử về các cặp gen ngắn (15 và 21) sẽ giúp hiểu rõ hơn mối quan hệ giữa đa hình microsatellite vùng promoter gen Prl-1 và sinh trưởng của cá rô phi nuôi trong nước mặn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này là một phần của đề tài khoa học cấp Bộ: *Nghiên cứu nâng cao tốc độ sinh trưởng cá rô phi nuôi vùng nước lợ mặn*. Kinh phí do Bộ Nông nghiệp và PTNT

cấp. Phòng Di truyền chọn giống, Trung tâm quốc gia giống Thủy sản nước ngọt miền Bắc (Viện Nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản I) và Phòng Công nghệ sinh học Enzyme (Viện Công nghệ sinh học) đã hợp tác thực hiện, xin trân trọng cảm ơn.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cnaani A., Zilberman N., Tinman S., Hulata G., (2004). *Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F2 Tilapia hybrid*. Mol. Gen Genomics 272:162-172.
- Gomez K.A. & Gomez A.A. (1984). *Statistical Procedures for Agricultural Research*, 2nd Edition. John Wiley & Sons.
- Romana-Eguia M.R.R., Ekeda M., Basiao Z.U. and Taniguchi N., (2005). *Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.), assessed by microsatellites*. Aquaculture Res 36 (1): 69-78.
- Streelman J.T. & Kocher T.A., (2002). *Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged Tilapia*. Physiol Genomics 9: 1-4.
- Streelman J.T. & Kocher T.A., (2004). *Method for identifying fast-growing fish*. United States Patent 6,720,150.
- Quyền Đình Thi, Lê Thị Thu Giang và Vũ Hải Chi, (2005). *Biểu hiện cao lipase hoạt hóa chủng Ralstonia sp. M1 trong E. coli*.
- Phạm Anh Tuấn & CTV., (2006). *Quy hoạch phát triển nuôi cá rô phi giai đoạn 2008 - 2020*. Báo cáo quy hoạch ngành phát triển nuôi cá rô phi.
- Phạm Anh Tuấn, Lê Quang Hưng, Nguyễn Thị Tần (2008). *Đánh giá lựa chọn vật liệu chọn giống nâng cao tốc độ sinh trưởng cá rô phi nuôi vùng nước lợ mặn*. Tạp chí Khoa học và Phát triển. Tập VI, số 2: 161-165.
- Đào Thị Tuyết, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Bẩy và Phạm Anh Tuấn, (2004). *Đánh giá tính đa hình các quần đàn cá tra nuôi (Pangasius hypophthalmus) ở Việt Nam bằng phương pháp RAPD*. Báo cáo khoa học trình bày tại Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội 18-19/12/2004. NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội: 616-620.