THÔNG BÁO KHOA HỌC

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN QUẦN THỂ CÁ SONG DA BÁO (*PLECTROPOMUS LEOPARDUS*) Ở VÙNG BIỂN VIỆT NAM SỬ DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ CYTOCHROM B CỦA DNA TI THỂ (Cyt b mtDNA)

STUDY THE GENETIC POPULATION OF LEOPAD CORAL GROUPER (*PLECTROPOMUS LEOPARDUS*) IN VIETNAMESE COASTAL WATER USING THE CYTOCHROM B OF MITOCHONDRIAL DNA (Cyt b mtDNA)

Nguyễn Văn Hùng[1] và Đặng Thúy Bình[2]

[1]Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III;

[2]Viện Nghiên cứu CNSH & MT, Trường Đại học Nha Trang

TÓM TẮT

Cá song da báo Plecropomus leopardus (Serranidae: Epinepheline) là một trong những loài cá biển có giá trị kinh tế cao. Trình tự của gen cytochrome b của DNA ti thể được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng loài của 2 quần thể cá song da báo ở Hải Phòng và Khánh Hòa Việt Nam. Trong số 24 trình tự của gen cytochrom b thu từ hai vùng địa lý, quan sát có k = 18 haplotype với đa dạng haplotype là tương đối cao (h=0,8600) và đa dạng nucleotide (π =0,0156). Kết quả sự tương đồng giữa các trình tự (sequence similarity) cho thấy giá trị tương đồng rất cao (phần lớn >90 %). Quần thể cá song da báo ở 2 vùng địa lý Khánh Hòa và Hải Phòng phân thành 2 nhánh rõ rệt trên cây đa dạng loài. Quần thể Khánh Hòa thể hiện sự đa dạng cao hơn quần thể Hải Phòng, bao gồm 10 haplotype và cùng nhánh với trình tự của loài này từ Genbank. Sự phân tách rõ nhất đối với haplotype 1, 3 và 6 với giá trị độ tin cậy cao (PR 100%, PP100%). Còn các haplotype khác tuy có sự phân tách nhưng giá trị độ tin cậy thấp (<70%). Quần thể Hải Phòng phân tách đối với quần thể Khánh Hòa, nhưng sự khác biệt giữa các haplotype trong quần thể tương đối thấp (<70%).

Từ khóa: Cá song da báo, Plecropomus leopardus, Cytochrome b

ABSTRACT

Plectropomus leopardus (*Seranidae: Epinepheline) is one of the high value marine fish in Vietnam. The present study has used the sequences of Cytochrome b mtDNA as the molecular marker for detecting the genetic variation of two populations of P. leopardus in Hai Phong and Khanh Hoa provinces, Vietnam. Among 24 sequences obtained, 18 haplotypes were detected (haplotype diversity h=0,8600, and nucleotide diversity π =0,015). Sequence similarity between the current sequences is high (mostly over 90%). The populations of P. leopardus in Hai Phong and Khanh Hoa provinces were splited into two clades in the phylogenetic tree. Khanh Hoa population displays higher genetic diversity in compẩtion to Hai Phong population, which included 10 haplotypes amd placed in the same clade with the sequence of the same species retrieved from the Genbank. Haplotype 1, 3 and 6 appear separately with high bootstrap support (PR 100%, PP100%). The other haplotype showed separately, but low bootstrap support. Hai Phong population was clustered as sister group to Khanh Hoa*

Keywork: leopard coral grouper, Plecropomus leopardus, Cytochrome b

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá song thuộc họ Serranidae, dưới họ Epinepheline bao gồm 15 giống và 159 loài (Heemstra và Randall, 1993). Cá song phân bố ở các rạn san hô thuộc biển nhiệt đới, á nhiệt đới, nhiều loài tập trung ở vùng biển Ấn Độ - Thái Bình Dương (Indo-pacific) (110 loài), Đông Đại Tây Dương và biển Địa Trung Hải (14 loài) và vùng Bác Mỹ cận nhiệt đới (35 loài), chủ yếu thuộc 2 giống *Epinephelus* và *Plectropomus* (Heemstra và Randall, 1993, Pierre và ctv, 2008).

Giống Plectropomus ở vùng biển Indo-Pacific bao gồm 7 loài và phổ biến ở khu vực đông bắc Australia (Mapstone và ctv, 1996). Trong đó, *Plectropomus leopardus* (Lacepede), *P. maculatus* (Bloch), *P. laevis* (Lacepede), *P. areolatus* (Ruppel) và *P. oligacanthus* (Bleeker) là những loài phổ biến và có ý nghĩa kinh tế, đặc biệt là *P. leopardus* (tên tiếng Anh leopard coral grouper) (Heemstra và Randall, 1993; Van Herwerden và ctv, 2006).

Khóa phân loại của hầu hết các loài cá song chủ yếu dựa trên các đặc điểm hình thái và đo đạc của cá thể trưởng thành (Heemstra và Randall 1993) và ấu trùng (Leis 1986). Hiện nay việc định danh một số loài cá song vẫn còn là vấn đề vì đặc điểm hình thái chồng chéo giữa các loài và sự biến động màu của cơ thể tại những giai đoạn khác nhau của chu trình sống (Koedprang và ctv, 2007). Hơn nữa, đặc điểm hình thái ấu trùng của một số loài cá song trông khác xa với cá thể trưởng thành. Vì vậy, việc nhầm lẫn trong định danh loài, dẫn đến những bàn cãi về vị trí phân loại của chúng vẫn đang tồn tại.

Do những khó khăn trên hiện tượng các loài khác nhau được đặt cùng tên (homonyms) hoặc một loài bị định danh nhầm dưới các tên khác nhau (synonyms) là rất phổ biến. Loài *Epinephelus coioides* được nuôi rộng rãi ở khu vực Đông Nam Á thường bị nhầm lẫn với loài *E. tauvina* và đôi khi với loài *E. malabaricus.* Một số ví dụ khác như loài *E. guaza* phân bố ở khu vực Đại Trung Hải và Đại Tây Dương thường bị nhầm lẫn với loài *E. tauvina* ở khư vực Indo-Pacific; và loài *E. fuscoguttatus* thường bị nhầm với loài *E. polyphekadion* .

Thông tin về sự đa dạng di truyền của cá song vẫn còn hạn chế, đặc biệt là đối với các loài ở khu vực Đông Nam Á. Phần lớn các nghiên cứu đều cho thấy sự hình thành cấu trúc quần thể (population structure) chỉ có ý nghĩa thống kê đối với những quần thể cá song cư trú ở những khu vực địa lý rộng lớn (De Innocentiis và ctv, 2001). Hiện nay, trình tự của gen hay một phần trình tự của các gen được sử dụng rộng rãi để xác định mối quan hệ tiến hóa ở mức độ loài, giống hoặc cao hơn. DNA ti thể (mtDNA) đã được sử dụng như một marker phân tử quan trọng trong những nghiên cứu về mối quan hệ loài và cấu trúc di truyền quần thể. DNA ti thể có cấu trúc đơn giản, di truyền theo hệ mẹ, tiến hóa nhanh hơn so với DNA bộ gen và có tỉ lệ tiến hóa khác nhau giữa các gen. Trong các gen mã hóa cho DNA ti thể, cấu trúc và chức năng của gen cytochrome b (*cyt b*) được biết đến nhiều nhất. Đặc biệt, tỉ lệ tiến hóa của gen *cyt b* là rất phù hợp cho việc đánh giá mối quan hệ tiến hóa ở mức độ giống. Vì vậy, nó được xem là một trong những chỉ thị (marker) quan trọng trong nghiên cứu tiến hóa của cá

(Zardoya và ctv, 1996). Bên cạnh đó, kỹ thuật microsatellites đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong việc xác định cấu trúc quần thể và sự biến động di truyền của các loài cá song (Maggio và ctv, 2006, Chen và ctv, 2008, Silva-Oliveira và ctv, 2008).

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng chỉ thị phân tử cyt b mtDNA để xác định sự đa dạng di truyền của quần thể cá song da báo (*P. leopardus*) ở vùng biển Khánh Hòa và Hải Phòng, cũng như xác định cấu trúc quần thể của cá song da báo theo sự phân bố địa lý. Nghiên cứu này sẽ rất hữu ích cho việc quản lý nguồn lợi và hoạt động nuôi trồng thủy sản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Địa điểm và phương pháp thu mẫu

Cá song da báo *(Plectroponus leopardus*) được thu ngẫu nhiên ngoài tự nhiên tại Khánh Hoà (44,9±6,9 trọng lượng thân (g) và 1.42±0,48 chiều dài thân (cm), n=12) và Hải Phòng (60±8,59 trọng lượng thân (g) và 3.49±1,33 chiều dài thân, n=12). Từng cá thể cá được cân do, chụp hình và ghi lại các tính trạng hình thái, màu sắc. Cá sau đó được gây mê bằng MS222, một phần nhỏ ở góc vây được cắt và giữ trong các tube eppendorf vô trùng. Mẫu được bảo quản ở -40^{0}C hoặc giữ trong cồn tuyệt đối 99%.

2. Ly trích DNA, khuếch đại và giải trình tự

DNA được tách chiết từ mẫu vây của từng cá thể cá song bằng bộ kit Wizard SV genomic DNA purification (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen cytochrom b của DNA ti thể trong bộ gen cá song da báo được khuếch đại bằng đoạn mồi phổ biến cho các loài cá biển, bao gồm môi xuôi (5' CGAACGTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3'), và mồi ngược 5' AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTT GTCCTCA 3') (Cantatore và ctv, 1994). PCR master mix bao gồm 5 µl 10x buffer (Itag), 1,0 µl của từng mồi (10 µM), 1,5 µl $MgCl_2$ (10mM), 1,0 µl dNTP (10mM) và 0,5 µl Taq polymerase (5 unit/1 µl), 2 µl khuôn DNA và 38 µl nước cất cho đủ hỗn hợp 50 µl phản ứng. Chương trình nhiệt được tiến hành như sau: biến tính tại 94^{0}C trong 4 phút, sau đó phản ứng được tiến hành trong 35 chu kỳ. Mỗi chu kỳ bao gồm: biến tính ở 94^{0}C trong 45 giây, 45 giây tại 54^{0}C và 1 phút tại 72^{0}C. Phản ứng được kéo dài tại 72 ^{0}C trong 10 phút. Sản phẩm PCR (3 µl) sau đó được kiểm tra trên thạch agarose 1,5 %, nhuộm với ethidium bromide và chụp hình bằng hệ thống đọc và phân tích hình ảnh gel (GelDoc–Biorad).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PCR clean up system (Promega) như hướng dẫn của nhà sản xuất. 1- 2 μl sản phẩm PCR đã tinh sạch được tiến hành phản ứng tiền giải trình tự theo phương pháp gián đoạn chuỗi (Big Dye Terminator v. 3.1, Applied Biosystems) với các đoạn mồi tương tự như phản ứng PCR theo chương trình nhiệt như sau: 96^{0}C trong 20 giây, 50^{0}C trong 20 giây, cuối cùng là 60^{0}C trong 4 phút. Sản phẩm sau đó được phân tích bằng thiết bị ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems). Các trình tự được kết nối bằng kỹ thuật Contig Express trong phần mềm Package Vector NTI v.9, sau đó kiểm chứng bằng chương trình BLAST (ancbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Các trình tự được chỉnh sửa bằng phần mềm BioEdit 7.0.1 (Hall, 1999)

và sử dụng tính năng dóng hàng với nhiều trình tự (multiple sequence alignment) bằng phần mềm Clustal X Ver. 1.8 (Thompson và ctv, 1997), sau đó được kiểm tra và chỉnh sửa bằng mắt thường.

3. Phân tích đa dạng di truyền dựa trên haplotype và cây tiến hóa

Đa dạng di truyền (Genetic diversity) giữa các quần thể được tính bằng tổng số haplotype (k), đa dạng haplotype - haplotype diversity (h) và đa dạng nucleotide – nucleotide diversity (π).

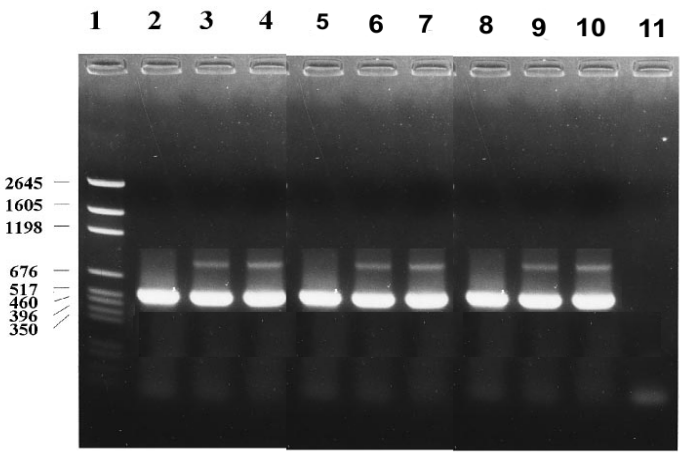
Phân tích di truyền được tiến hành đối với 24 trình tự gene *cyt b* của *P. leopardus* ở Hải Phòng và Khánh Hòa và trình tự các loài cá song khác thuộc giống *Plectroponus* từ Genbank. Trình tự gen *cyt b* của các loài cá song thuộc giống *Epinephelus* (*E. bruneus* và *E. bleekeri*), *Cephalopholis argus* và *Variola albimanginata* được sử dụng làm nhóm ngoại (outgroup).

Phân tích được tiến hành dựa trên 3 thuật toán: maximun parsimony (MP), maximum likelihood (ML) và Bayesain inference (BI). Các phương pháp được phân tích bằng phần mềm PAUP 4.0 (Swofford, 2001) và MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck và Ronquist. 2001). Đối với thuật toán MP, 1000 độ lặp lại ngẫu nhiên được áp dụng. Tuy nhiên, đối với thuật toán ML, độ lập lại là 100 vì tổng số trình tự nghiên cứu quá lớn. Trước khi tiến hành thuật toán ML và BI, các mô hình tiến hóa đã được kiểm tra bằng phần mềm Modeltest 3.7 (Posada và Crandall, 1998) và MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004). Model tối ưu là GTR+G với tần suất các base nitơ là A=0,2903; C=0,1560; G=0,2798; T=0,2739, và thông số dạng phân bố gama là 0,2689.

Đối với thuật toán BI, các mô hình thay thế được tính toán. Chương trình được chạy trên 4 kênh với một triệu thế hệ, với tần suất tính toán trên 100 thế hệ. Phân tích được lặp lại 2 lần để xác định độ chính xác của phương pháp. Giá trị tin cậy (posterior probability (PP)) được biểu hiện trên các nhánh của cây tiến hóa (Huelsenbeck và Ronquist, 2001). Giá trị bootstrap (độ tin cậy (BT) được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán MP với độ lập lại 1000 (PR). Cây đa dạng loài được biểu hiện và hiệu chỉnh bằng phần mềm TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sản phẩm PCR thu được là đoạn DNA có kích thước ~ 460 bp (base pair) (Hình 1). Sau khi so sánh và dóng trình tự, 463 bp được dùng cho những phân tích về di truyền.



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn gen *cyt b* mtDNA của các mẫu cá song da báo. Giếng 1: DNA marker, giếng 2-10: sản phẩm PCR; giếng 11: chứng âm

Trong số 24 trình tự của gen *cyt b* của cá song da báo thu từ hai vùng địa lý, quan sát có k=18 haplotype với đa dạng haplotype là tương đối cao (*h*=0,8600) và đa dạng nucleotide (π =0,156). Sự tương đồng giữa các trình tự (sequence similarity) cho thấy giá trị tương đồng rất cao (phần lớn >90 %). Các haplotype được đánh số từ 1-18 (PLH1-PLH18).

Kết quả phân tích đối với các dữ liệu dựa trên 3 phương pháp đều cho kết quả tương tự về cây đa dạng loài. Phương pháp phân tích MP cho kết quả cây đa dạng loài với 367 bước (Consistency index (CI)=0,6866, Retention index (RI)=0,6933. Cây đa dạng loài được trình bày ở hình 2 với giá trị BT và giá trị tin cậy (PP) của thuật toán MP và BI được biểu hiện trên các nhánh.

Qua hình 2 ta thấy, cá song da báo tạo thành một nhánh riêng biệt với giá trị tin cậy lớn (PR 100% PP 100%) và thể hiện mối quan hệ gần gũi với các loài cùng giống *Plectroponus,* đặc biệt là nhánh chứa loài *P. maculatus* và *P. pessuliferus*. Quần thể cá song da báo ở hai vùng địa lý Khánh Hòa và Hải Phòng phân thành 2 nhánh rõ rệt trên cây đa dạng loài (Hình 2). Quần thể Khánh Hòa bao gồm 10 haplotype và cùng nhánh với trình tự của loài này từ Genbank. Sự phân tách rõ nhất đối với haplotype 1, 3 và 6 với giá trị độ tin cậy cao (PR 100% PP100%). Còn các haplotype khác tuy có sự phân tách nhưng giá trị độ tin cậy thấp (<70%). Quần thể Hải Phòng phân tách đối với quần thể Khánh Hòa, nhưng sự khác biệt giữa các haplotype là tương đối thấp (<70%), qua đó cho thấy sự đa dạng loài của quần thể này không cao.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Trong những thập niên gần đây, nghề nuôi cá song rất phát triển ở các nước thuộc khu vực châu Á, Australia và Địa Trung Hải. Mặc dù cá song có ý nghĩa kinh tế quan trọng, những nghiên cứu về cấu trúc quần thể cũng như sư đa dạng di truyền của chúng còn nhiều hạn chế (Antoro và ctv, 2005). Đa dạng di truyền giữa các quần thể là một nguồn nguyên liệu quí giá cho sự ổn định của loài.

Ding và ctv (2006) tiến hành nghiên cứu với gen *cyt b* mtDNA của 28 loài cá song thuộc 6 giống của dưới họ Epinephelinae ở vùng biển Trung Quốc. Kết quả cho thấy trong quá trình tiến hóa, giống *Plectropomus* phân nhánh sớm nhất, sau đó là *Variola* và *Cephalopolis. Epinephelus* được sắp xếp trên cùng của cây phát sinh loài, là nhóm phân hóa sau cùng và cũng là giống có nhiều loài nhất trong dưới họ Epinephelinae. Giống *Epinephelus* được phân làm 2 nhánh trên cây tiến hóa, các nhánh này không liên quan đến khu vực cư trú của các loài cá song.

Epinephelus marginatus (dusky grouper) là loài cá có trong sách đỏ ở biển Địa Trung Hải, vì vậy cấu trúc di truyền quần thể của chúng được chú trọng nghiên cứu trong thời gian gần đây. De Innocentiis và ctv (2001) sử dụng kỹ thuật microsatelite và alozyme để nghiên cứu cấu trúc quần thể của *E. marginatus* ở các khu vực khác nhau ở biển Địa Trung Hải. Kết quả cho thấy sự đa dạng di truyền cao hơn khi dùng kỹ thuật microsatelite so với alozyme (mean H_E=0,78 và 0,07). Cả hai kỹ thuật đều cho thấy sự khác biệt di truyền giữa các quần thể địa lý. Bên canh đó, Gilles và ctv (2000) sử dụng gen *cyt b* để xác định quan hệ tiến hóa theo vùng địa lý (phylogeography) của cùng loài cá thu từ

khu vực phía tây biển Địa Trung Hải. Cây phát sinh loài cho thấy các cá thể *E. marginatus* được phân tách thành hai nhóm; một nhóm là các cá thể có nguồn gốc từ Algeri và nhóm kia có nguồn gốc từ Pháp, Tunisia và phần còn lại của các cá thể từ Algeri. Mặc dù về mặt hình thái *E. marginatus* được cho là một loài duy nhất, tuy nhiên, nghiên cứu trên cho thấy nhóm cá có nguồn gốc từ Algeri (subgroup) thể hiện loài cận giống và cần được mô tả chi tiết. Maggio và ctv (2006) cũng tiến hành nghiên cứu với loài *E. marginatus* thu ở biển Đại Trung Hải và Thái Bình Dương sử dụng hai marker phân tử ND2 RFLP và *cyt b*. Dữ liệu phân tích bằng ND2 RFLP cho thấy sự khác biệt di truyền giữa quần thể ở biển Đại Trung Hải và Thái Bình Dương, trong khi đó marker *cyt b* lại không chỉ ra sự khác biệt này. Tuy nhiên, cả hai marker lại cho thấy sự đa dạng di truyền giữa các quần thể ở khu vực Địa Trung Hải. Sự khác biệt lớn nhất xảy ra ở đảo Ustica, có thể do nơi này là khu bảo tồn và các hoạt động đánh bắt qui mô lớn bị cấm hoàn toàn.

Loài *Epinephelus itajara* (Goliath grouper) cũng nằm trong sách đỏ và là một trong những loài có nguy cơ nhất của Epinephelinae. Đặc tính của loài này là phát triển chậm và sinh sản phụ thuộc vào môi trường rừng ngập mặn. Silva-Oliveir và ctv (2008) tiến hành nghiên cứu di truyền của quần thể ở khu vực phía bắc bờ biển Brazil. Các tác giả sử dụng vùng điều khiển (control region) của DNA ti thể (D-loop) từ 116 cá thể thu tại 5 khu vực (Bragança, Ajuruteua, Parnaíba, Fortaleza and Natal). Phân tích cho thấy sự đa dạng di truyền ở *E. itajara* nhìn chung thấp hơn so với những loài có nguy cơ khác của giống *Epinephelus*. Sự phân tách về cấu trúc di truyền không được quan sát thấy giữa các quần thể. Mối quan hệ giữa sự đa dạng di truyền và sự phân bố địa lý chỉ xảy ra ở 3 khu vực (Ajuruteua, Parnaíba và Natal). Trong khi đó, đa dạng di truyền cao nhất ở quần thể vùng Amazon, có thể phản ánh sự bảo tồn rừng ngập mặn ở khu vực này.

Giống *Epinephelus* rất đa dạng, bao gồm trên 100 loài, rất nhiều loài trong số chúng có ý nghĩa kinh tế quan trọng. Vì vậy, cấu trúc quần thể và sự đa dạng di truyền của chúng được nghiên cứu sâu và trên diện rộng. Tuy nhiên, các nghiên cứu này đối với các loài thuộc giống *Plectroponus* còn nhiều hạn chế.

Trên thực tế, hai loài *Plectroponus leopardus* và *P. maculates* thường bị nhầm lẫn dựa trên số liệu đo đạc (Heemstra và Randall, 1993), nhưng hai loài này có thể phân biệt dựa trên tính trạng màu sắc và sự phân tách về mặt sinh thái. *P. leopardus* thường phổ biến ở giữa hoặc mặt ngoài của rạn san hô, trong khi đó *P. maculates* sống ở vùng rạn ven bờ (Heemstra và Randall, 1993). *Plectropomus maculatus* đôi khi cũng bị nhầm lẫn với dạng hình thái chấm xanh đậm (dark blue spot) của loài *P. laevis* (Heemstra và Randall, 1993).

Dạng cá thể lai giữa *P. leopardus* và *P. maculatus* cũng như *P. maculatus* và *P. laevis* đã được ghi nhận ở khu vực giữa rạn san hô ở Australia (Van Herwerden và ctv, 2002). Dạng lai có các băng ở mặt giống *P. maculatus*, thay vì các chấm vẫn thường được tìm thấy ở vùng mặt của loài *P. leopardus* và *P. laevis*. Phần còn lại của cơ thể của dạng lai có màu sắc giống như cá bố mẹ (*P. laevis* hoặc *P. leopardus*) (Van Herwerden và ctv, 2002). Nghiên cứu phát sinh loài dựa trên DNA bộ gen (ETS2) cho kết quả *Plectropomus areolatus, P. leopardus* và *P. maculatus* hình thành nhánh phân 3 và có

quan hệ gần gũi (sister clade) với *P. laevi*. Ngược lại, khi sử dụng vùng điều khiển của DNA ti thể, chỉ có ba nhóm chính được xác định, *P. laevis* là nhánh gốc, có mối quan hệ gần gũi với nhánh chứa *P. leopardus*/*P. maculatus*. Với marker DNA ti thể, không đủ dữ liệu về cấu trúc quần thể để phân biệt *P. leopardus* và *P. maculatus* là hai loài riêng biệt như trong trường hợp sử dụng marker DNA bộ gen. Và cũng không có đủ bằng chứng để phân biệt hai dạng hình thái của loài *P. laevis* (được gọi là 'footballer' và 'blue spot'). Tuy nhiên, trong cả hai trường hợp, dạng lai *P. leopardus/maculatus* được nhóm với nhánh chứa các hapøptype của *P. leopardus* và *P. maculatus,* trong khi đó, dạng lai *P. laevis*/*maculatus* được nhóm với nhánh chứa haplotype của *P. laevis* (Van Herwerden và ctv, 2002).

Sau dó, Van Herwerden và ctv (2006) tiếp tục tiến hành thí nghiệm trên *Plectroponus* spp. từ các vùng địa lý khác nhau với 1 marker DNA ti thể và 3 marker DNA bộ gen. Phân tích từ DNA ti thể và DNA bộ gen cho thấy kết quả đối nghịch về sự khác nhau giữa hai loài *P. leopardus* và *P. maculatus*. Ở phía đông Australia (Eastern Australia- EA) haplotype của hai loài nhập chung thành 1 nhánh, nhưng chúng lại phân tách thành hai nhóm riêng biệt đồng nhất đối với quần thể ở phía tây Australia (Western Australia –WA). Dẫn liệu này bổ sung cho sự tồn tại dạng lai giữa hai loài này ở bờ biển phía đông. Quần thể *P. leopardus* ở WA thể hiện quan hệ gần gũi với nhánh *P. leopardus-maculatus* ở EA, trong khi đó, WA *P. maculatus* lại nhóm với WA *P. leopardus*. Ngược lại, một trong ba marker DNA bộ gen (locus 7-90TG) lại phân tách hai loài thành hai nhóm đồng nhất và không có dẫn liệu bổ sung cho hiện tượng lai. Hai marker còn lại (2-22 and ETS-2) thì không thể phân tách hai loài trên, trong khi phân tách các loài còn lại của giống *Plectroponus*. Cả hai marker phân tử trên đều không thể giải quyết triệt để mối quan hệ tiến hóa của hai loài trên. Tuy nhiên, các kết quả trên cho thấy, con cái của loài *P. leopardus* đã lai với con đực của loài *P. maculatus*, và DNA ti thể (vốn di truyền theo hệ mẹ) của *P. maculatus* đã được thể hiện qua dạng lai và phổ biến trong quần thể của loài này ở rạn Great Barrier.

P. leopardus là loài đầu tiên của cá song mà toàn bộ trình tự của DNA ti thể (16714 bp) đã được xác định. Trình tự bao gồm 1077 bp vùng điều khiển (control region), 13 gen mã hóa protein (protein-coding genes), 2 gen của ribosom RNA (rRNA) và 22 gen của ARN vận chuyển (tRNA) (Zhu và Yue, 2008). Tác giả đã sử dụng trình tự gen NADH2 của 49 loài cá song từ 8 giống để xây dựng cây phát sinh loài. Kết quả cho thấy trình tự gen NADH2 có thể sử dụng để phân biệt các loài cá song, và loài *P. leopardus* có mối quan hệ loài gần gũi với loài *P. maculatus* phù hợp với sự tương tự về tính trạng hình thái giữa 2 loài này (Zhu và Yue, 2008).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cấu trúc quần thể hình thành theo hai vùng địa lý (Khánh Hòa và Hải Phòng), phù hợp với các nghiên cứu trước về cá song (De Innocentiis và ctv, 2001, Maggio và ctv, 2006, Chen và ctv, 2008, Silva-Oliveira và ctv, 2008). Quần thể Khánh Hòa thể hiện sự đa dạng di truyền cao hơn quần thể Hải Phòng (k=10 và 8 haplotype) và sự phân tách giữa các haplotype khá rõ rệt. Trình tự *cyt b* của các cá thể thuộc quần thể Khánh Hòa có giá trị tương đồng cao so với trình tự của loài này thu từ vùng biển Trung Quốc được đăng ký trên Genbank (ký hiệu là *PLgb* trên cây tiến hóa). Quần thể *P. leopardus* ở Việt Nam thể hiện mối quan hệ gần gũi với nhánh chứa

loài *P. maculatus* và *P. pessuliferus*, cho thấy quan hệ gần gũi giữa *P. leopardus* và *P. maculatus* như các nghiên cứu của Van Herwerden và ctv (2002, 2006). Trong khi dó *P. laevis* được sắp xếp cùng nhánh với *P. oligocanthus*. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi có ghi nhận một số tính trạng đa hình trong kiểu màu sắc của các cá thể (chấm xanh, chấm đỏ, chấm dỏ và đen). Tuy nhiên, dữ liệu di truyền cho thấy sự tương đồng cao, vì vây không có cơ sở để phân tách chúng thành các nhóm hình thái khác nhau, cũng như không quan sát thấy tồn tại của các dạng lai.

IV. KẾT LUẬN

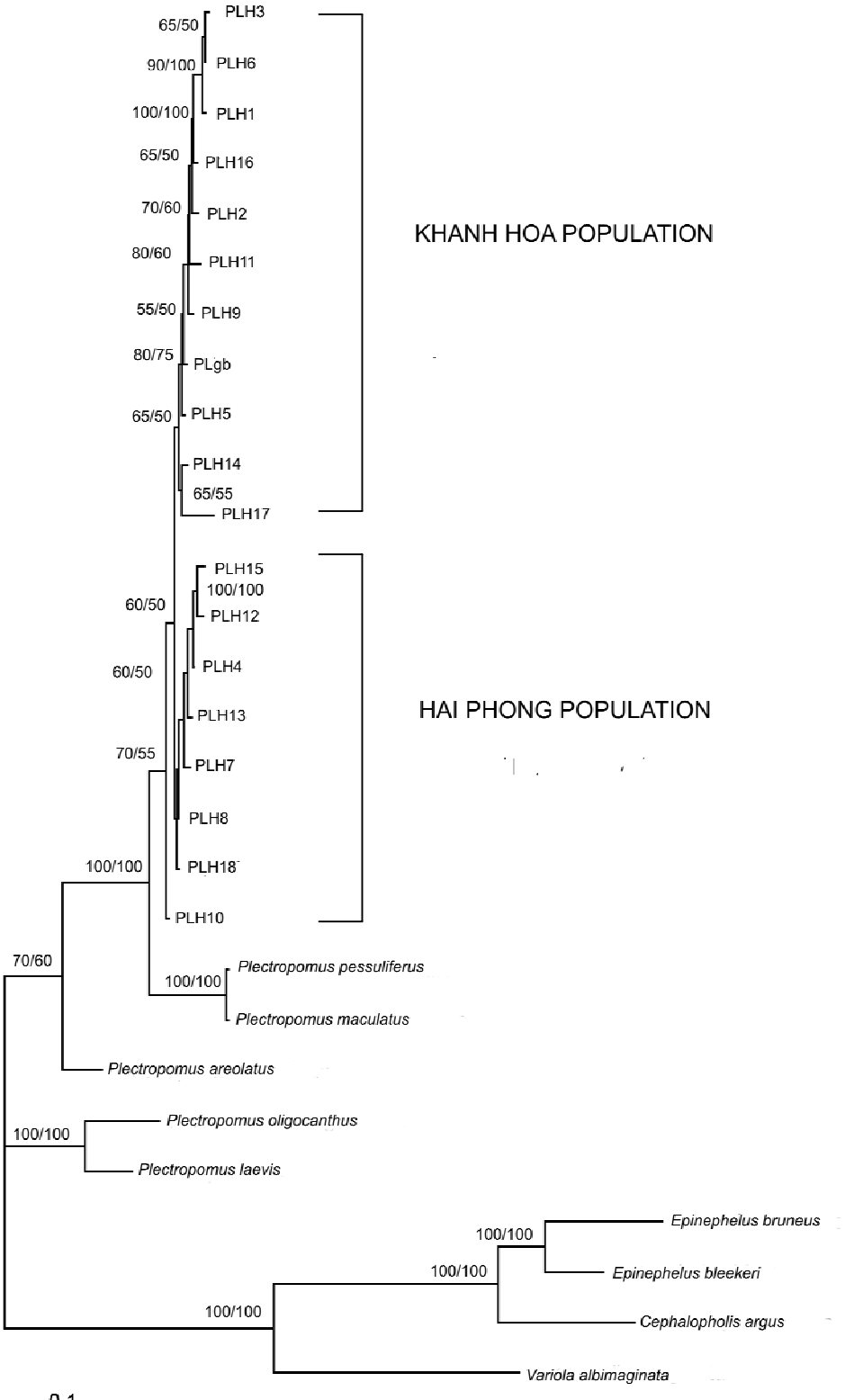
Quần thể cá song da báo ở Khánh Hòa và Hải Phòng thể hiện sự đa dạng di truyền tương đối cao và có sự phân tách quần thể theo vùng địa lý. Loài *P. leopardus* thể hiện mối quan hệ gần gũi với *P. maculatus* và *P. pessuliferus*. Tuy nhiên, do số cá thể trong nghiên cứu hiện tại còn ít nên cần có những nghiên cứu sâu và trên diện rộng để đánh giá mức độ đa dạng quần thể và đề xuất các biện pháp quản lý quần đàn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Antoro, S., Na-Nakorn, U., Koedprang, W. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. Marine Biotechnology **8:** 17–26.
2. Cantatore, P., Roberti, M., Pesole, G., Ludovico, A., Milella, F., Gadaleta, M.N., Saccore, G., 1994. Evolutionary analysis of cytochrome b sequence in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. Journal of Molecular Evolution. **39:** 589–597.
3. Chen, S. P., Liu, T., Li, Z. F., Gao, T. X. 2008. Genetic population structuring and demographic history of red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) in South and East China Sea. African Journal of Biotechnology **7:** 3554–3562.
4. De Innocentiis, S., Sola, L., Cataudella, S., Bentzen, P. 2001. Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea. Molecular Ecology **10:** 2163–2175.
5. Ding, S. X., Zhuang, X., Guo, F., Wang, J., Su, Y. Q., Zhang, Q., Li, Q. F. 2006. Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences. Science in China Series C-Life Sciences **49:** 235–242.
6. Gilles, A., Miquelis, A., Quignard, J. P., Faure, E. 2000. Molecular phylogeography of western Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus*. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences **323:** 195–205.
7. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nuclelic Acid Symposium Series, **41:** 95–98.
8. Heemstra, P., Randall, J. 1993. Groupers of the World. FAO Species Catalogue **125:** 1–382.
9. Koedprang, W., Na-Nakorn, U., Nakajima, M., Taniguchi, N. 2007. Evaluation of genetic diversity of eight grouper species *Epinephelus* spp. based on microsatellite variations. Fisheries Science **73:** 227–236.

10. Huelsenbeck, JP, Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic tres. Bioinformatic, **17:** 754–755.
11. Leis J. M. 1986. Larval development in four species of Indo-Pacific coral trout *Plectropomus* (Pisces, Serranidae: Epinephelinae) with an analysis of relationships of the genus. Bulletin of Marine Science. **38:** 525–552
12. Maggio, T., Andaloro, F., Arculeo, M. 2006. Genetic population structure of *Epinephelus marginatus* (Pisces, Serranidae) revealed by two molecular markers. Italian Journal of Zoology **73:** 275–283.
13. Mapstone, B. D., McKinlay, J. P., Davies, C. R. 1996. A Description of commercial reef line fishery logbook data held by the Queensland Fisheries Management Authority. Brisbane: Queensland Fish Management Authority.
14. Nylander, J. A., 2004. Mr Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre. Uppsala University, Uppsala, Sweden.
15. Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, 12, 357–358.
16. Pierre, S., Gaillard, S., Prevot-D'Alvise, N., Aubert, J., Rostaing-Capaillon, O., Leung-Tack, D., Grillasca, J. P. 2008. Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems **18:** 297–308.
17. Posada, D., Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics **14:** 817–818.
18. Silva-Oliveira, G. C., do Rego, P. S., Schneider, H., Sampaio, I., Vallinoto, M. 2008. Genetic characterisation of populations of the critically endangered Goliath grouper (*Epinephelus itajara*, Serranidae) from the Northern Brazilian coast through analyses of mtDNA. Genetics and Molecular Biology **31:** 988–994.
19. Swofford, D. L., 2001. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sinauer Associates, Sunderland. MA
20. 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 Research 24: 4876–4882.
21. Van Herwerden, L., Choat, J. H., Dudgeon, C. L., Carlos, G., Newman, S. J., Frisch, A., van Oppen, M. 2006. Contrasting patterns of genetic structure in two species of the coral trout *Plectropomus* (Serranidae) from east and west Australia: Introgressive hybridisation or ancestral polymorphisms. Molecular Phylogenetics and Evolution **41:** 420–435.
22. Zardoya, R., Meyer, A. 1996. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among Vertebrates. Molecular Phylogenetics and Evolution. **13:** 933–942.
23. Zhu, Z. Y., Yue, G. H. 2008. The complete mitochondrial genome of red grouper

Plectropomus leopardus and its applications in identification of grouper species. Aquaculture **276:** 44–49.



Hình 2: Cây đa dạng loài (từ phân tích Bayesian inference) của quần thể (population) cá song da báo (*Plectroponus leopardus*) tại khu vực Khánh Hòa và Hải Phòng. Giá trị tin cậy (bootstrap value) được thể hiện trên các nhánh từ phương pháp maximum parsimony (độ lặp lại 1000 lần) và phương pháp Bayesian.