

ĐA HÌNH MICROSATELLITE LIÊN KẾT VỚI GEN HEPCIDIN/HAMP TIỀM NĂNG TRONG CHỌN GIỐNG CÁ RÔ PHI VẦN KHÁNG BỆNH DO *Streptococcus iniae*

Phạm Hồng Nhật^{1*}, Chia-Hui Ho², Po-Chun Tseng², Hong-Yi Gong²

¹Trung tâm Công nghệ sinh học Thủy sản, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I;

²Khoa Nuôi trồng thủy sản, Đại học Quốc gia Hải dương Đài Loan (NTOU), Đài Loan.

*Tác giả liên hệ: hongnhat@ria1.org

Nhận bài: 24/05/2021 Hoàn thành phản biện: 17/08/2021 Chấp nhận bài: 21/08/2021

TÓM TẮT

Bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus* sp là mầm bệnh truyền nhiễm chính gây thiệt hại đáng kể đến sản lượng cá rô phi toàn cầu. Hecpidin/HAMP ở cá đã được báo cáo có liên quan đến miễn dịch bẩm sinh chống lại các mầm bệnh vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích mối quan hệ giữa tính đa hình microsatellites/SSRs liên kết với gen hepcidin/HAMP và khả năng kháng bệnh do *Streptococcus iniae* trên cá rô phi vằn dòng NT1 (Đài Loan). 17 chỉ thị SSRs và cặp mồi đặc hiệu đã được thiết kế dựa trên WebSat. Kết quả đánh giá trên 95 cá thể cho thấy 9/17 chỉ thị SSRs có tính đa hình cao và tuân theo định luật Hardy-Weinberg. Các chỉ thị này sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *S. iniae*. 29 cá rô phi NT1 thế hệ thứ nhất (khối lượng $23,59 \pm 5,388$ g/con) đã được cảm nhiễm với vi khuẩn *S. iniae* 89353 bằng phương pháp tiêm, với liều tiêm LD₅₀ là $1,3 \times 10^5$ cfu/mL. Kết quả phân tích cho thấy, có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về kiểu gen và tần số alen giữa nhóm sống và nhóm chết sau cảm nhiễm vi khuẩn ở 3 chỉ thị SSRs (SSR7, SSR9 và SSR16) ($p < 0,05$). Đây là marker có tiềm năng cho chọn giống cá rô phi Đài Loan kháng bệnh do *S. iniae*.

Từ khóa: Hecpidin, Microsatellite, Rô phi vằn NT1, *Streptococcus iniae*

MICROSATELLITES POLYMORPHISM ASSOCIATED WITH HEPCIDIN/HAMP GENES POTENTIAL FOR SELECTIVE BREEDING OF DISEASE-RESISTANT BY *Streptococcus iniae* IN NILE TILAPIA

Pham Hong Nhat^{1*}, Chia-Hui Ho², Po-Chun Tseng², Hong-Yi Gong²

¹Centre of Aquaculture Biotechnology, Research Institute for Aquaculture No.1;

²Aquaculture Department, National Taiwan Ocean University (NTOU), Taiwan.

ABSTRACT

Streptococcus has been recognized as a major infectious disease-causing significant economic loss in tilapia aquaculture in many countries. The hepatic antimicrobial peptide hepcidin/HAMP was reported to be associated with innate immunity which defends against various bacterial pathogens and viruses. In this study, we analyzed the correlation between the microsatellites/SSRs polymorphism in the hepcidin/HAMP genes and the resistance to *Streptococcus iniae* in the NT1 strain (tilapia strain in Taiwan). Seventeen of hepcidin/HAMP-related SSRs and 17 SSR-specific PCR primer were designed using WebSat. The result showed that 9/17 hepcidin/HAMP-related SSRs were polymorphic markers and there is significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ($p < 0,05$). These SSRs were examined for disease resistance to *S. iniae*. Twenty-nine the First generation (G1) tilapia of NT1 strain (average weight of $23,59 \pm 5,388$ g/fish) were challenged with virulent *S. iniae* 89353 through intraperitoneal injection at dose of LD₅₀ ($1,3 \times 10^5$ cfu/ml). In this study, the genotype and the allele frequency in three SSRs (SSR7, SSR9 và SSR16) were significantly different between two groups (death fish with infected signals of *S. iniae* and alive fish infected with *S. iniae*) ($p < 0,05$). Three SSRs (SSR7, SSR9 và SSR16) are considered as potential molecular markers for selective breeding of Taiwanese tilapia which resists to *S. iniae*.

Keywords: Hecpidin, Microsatellite, NT1 Nile tilapia strain, *Streptococcus iniae*

1. MỞ ĐẦU

Cá rô phi là một trong những loài nuôi thủy sản quan trọng trên thế giới, phổ biến trên hơn 140 quốc gia (Fitzsimmons, 2016). Trong những năm gần đây, dịch bệnh xuất huyết (Streptococcosis) gây ra bởi vi khuẩn *S. agalactiae* và *S. iniae*, ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành công nghiệp cá rô phi toàn cầu, trong đó 26% là do vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu 1, 56% là *S. agalactiae* kiểu 2 và 18% là *S. iniae*. Vi khuẩn *S. iniae* gây bệnh trên cá rô phi ở các nước như Trung Quốc, Đài Loan, Ecuador, Honduras, Indonesia, Thái Lan và Philippin (Seehan và cs., 2009). Ở Đài Loan, dịch bệnh do *S. iniae* bùng phát trên cá rô phi nuôi tại Cao Hùng năm 2000 và xuất hiện hàng năm khi nhiệt độ môi trường nuôi cao (Gong và cs., 2017). Để chống lại vi khuẩn, cá đã hình thành nhiều cơ chế chống lại sự xâm nhập và lây lan của vi khuẩn với sự tham gia của các gen miễn dịch khác nhau. Hecpidin/HAMP là một gen như thế. Hecpidin/HAMP ở cá là chất kháng khuẩn (Antimicrobial peptide - AMPs), peptide kháng khuẩn biểu hiện ở gan (LEAP-1) hoặc peptide chống vi khuẩn ở gan (HAMP) (Krause và cs., 2000; Park và cs., 2001; Falco và cs., 2012). Bên cạnh đó, hecpidin/HAMP còn tham gia điều hòa sự hấp thụ và giải phóng sắt từ các đại thực bào và tế bào máu (Krause và cs., 2000; Robertson, 2009; Ganz và Nemeth, 2012). Hecpidin/HAMP ở cá đã được báo cáo là có liên quan đến miễn dịch bẩm sinh chống lại các mầm bệnh vi khuẩn (cả vi khuẩn Gram âm, Gram dương) và vi rút, như vi khuẩn *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae*, *Vibrio vulnificus*, vi rút gây hoại tử (IHNV), vi rút gây bệnh

hoại tử gan tụy (IPNV), vi rút gây bệnh NNV (Douglas và cs., 2003; Shike và cs., 2004; Chen và cs., 2005; Hirono và cs., 2005; Kim và cs., 2005; Rodrigues và cs., 2006; Wang và cs., 2006; Chen và cs., 2007; Huang và cs., 2007; Martin-Antonio và cs., 2009; Chang và cs., 2011; Pan và cs., 2011; Gong và cs., 2016). Trên cá rô phi, nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, hecpidin ở cá rô phi Mozambica (TH1-5 và TH1-3 peptide) có hoạt tính kháng khuẩn đối với một số vi khuẩn Gram âm và dương gây bệnh như *S. agalactiae* và *V. vulnificus* (Huang và cs., 2007); gen hecpidin của cá rô phi vằn (HAMP1, HAMP2 và HAMP3) có vai trò chống lại vi khuẩn *S. iniae* (Gong và cs., 2016).

Chỉ thị microsatellite là một trong những chỉ thị phân tử hữu hiệu hỗ trợ chọn giống (MAS) bởi những ưu điểm vượt trội của chúng. Microsatellites là những chỉ thị đồng trội; có tính đa hình, biến dị cao; số lượng chỉ thị rất lớn, phân bố ngẫu nhiên trong toàn bộ hệ gen; dễ dàng xác định bằng phương pháp PCR. Vì vậy, chỉ thị microsatellite đã được ứng dụng rộng rãi trong xác định QTL liên quan đến tính trạng kháng bệnh trong chọn giống một số đối tượng thủy sản (Fuji và cs., 2007) và là công cụ hữu hiệu để kiểm soát bệnh (Moen và cs., 2015). Microsatellite hữu hiệu trong phát hiện QTL đối với bệnh hoại tử máu do truyền nhiễm (IHN) trên cá hồi lai (Barroso và cs., 2008); với bệnh hoại tử tuyến tụy do nhiễm trùng, bệnh thiếu máu do nhiễm trùng, kháng IHNV ở cá hồi Đại Tây Dương (Rodriguez và cs., 2004; Gilbey và cs., 2006; Moen và cs., 2007; Houston và cs., 2008). Chỉ thị microsatellite liên kết với tính trạng kháng bệnh được nghiên cứu trên một số loài thủy

sản quan trọng. Ozaki và cs. (2001) đã nghiên cứu chỉ ra 51 chỉ thị microsatellites liên quan tới gen qui định tính kháng IPN trên cá hồi. Ở cá bơn Nhật Bản, locus microsatellite Poli9-8TUF được phát hiện có liên quan đến khả năng kháng bệnh lymphocystis (LD-R) (Fuji và cs., 2006). Bên cạnh đó, các nghiên cứu chỉ ra mối quan hệ giữa microsatellite với bệnh vi rút đốm trắng (WSSV) trên tôm chân trắng (Dong và cs., 2008).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá các chỉ thị microsatellite/SSRs liên kết với gen hepcidin/HAMP, và kiểm tra liệu sự đa hình trong các gen này có liên quan đến sự kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn dòng NT1 của Đài Loan.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là cá rô phi vằn sinh trưởng nhanh của Đài Loan (dòng NT1); được tạo ra bằng phương pháp PCR-RFLP vùng gen D-loop và 4 chỉ thị microsatellites bởi Trường Đại học Quốc gia Hải dương Đài Loan (Gong và cs., 2017).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA

DNA mẫu vây cá rô phi vằn được tách chiết theo phương pháp sử dụng kit tách chiết MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre). Quy trình tách chiết DNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2. Xác định chỉ thị microsatellites/SSRs và thiết kế mỗi đặc hiệu

17 chỉ thị microsatellites/SSRs liên kết với gen hepcidin/HAMP và mỗi đặc hiệu với từng SSR đã được xác định và thiết kế dựa trên công cụ WebSat tools (Martins và cs., 2009) trên cơ sở 18 gen hepcidin của cá rô phi đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI với mã số ASM185804v2 ([GCF_001858045.1](#)). Mỗi được thiết kế với nhiệt độ gắn mỗi 60°C, tỷ lệ GC dao động 40 - 60%, kích thước sản phẩm PCR dao động 200 - 400bp. Mỗi xuôi được đánh dấu huỳnh quang là một trong bốn loại (FAM, TAMDA, HEX, ROX). Thông tin chi tiết chỉ thị SSRs được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các chi thị microsatellites sử dụng nghiên cứu

SSRs	Liên kết với gen	Trình tự môi (5'-3')	Trình tự lặp	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
SSR1	OnHAMP 2-SSR1 HAMP2 in LG11 5'end 3.8kb (ID: 100698871)	F:gagcacgaggacactgaCCACACAATCAACACACTGGTA R:TCAAACAGAAACAGGGACACAC	(TA) ₁₁	375
SSR2	OnHAMP 2-SSR2 HAMP2 in LG11 5'end 3.8kb (ID: 100698871)	F:gagcacgaggacactgaGCACAGACACAGTAACACATG C R: ACTCCCTGGTACATGCTTCCTA	(CAGG) ₆	368
SSR3	OnHAMP 2-SSR3 HAMP2 in LG11 5'end 3.8kb (ID: 100698871)	F:gagcacgaggacactgaTAGGAAGCATGTACCAGGGAG T R:AAAATCACTCAACCGTGCCTT	(GT) ₁₃	348
SSR4	OnHAMP 2-SSR4 HAMP2 in LG11 3'end 4.3kb (ID: 100698871)	F:gagcacgaggacactgaCACCCTGTCAACTGGCTAATG R:GTTACCTTCTTGATACCGCAGG	(CTAC) ₇	359
SSR5	OnHAMP 2-SSR5 HAMP2 in LG11 3'end 4.7kb (ID: 100698871)	F:gagcacgaggacactgaCTTTGGGTAGAGGAACACTCCA R:TGCAGGTCAATAGCAATACCAC	(TG) ₂₁	309
SSR6	OnHAMP 1a-SSR1 HAMP1 in LG11 5'end 2kb (ID: 109204280)	F:gagcacgaggacactgaCAGTGGGTGTTTGTTCCTTACA R:TAGTAGGCTTTGTGTGCATTCC	(GT) ₄₁	315
SSR7	OnHAMP 1a-SSR2 HAMP1 in LG11 3'end 4.7kb (ID: 109204280)	F:gagcacgaggacactgaCCACACGCACTCTCACCA R:CTGGTAGCCTTGACCCAGTTT	(AC) ₁₂	236
SSR8	OnHAMP 1b-SSR1 HAMP1 in LG11 5'end 1.3kb (ID: 109204256)	F:gagcacgaggacactgaCCCCATAGCACTCCTTTTATTG R:TCATTTGGAGGTGTTTTCACAG	(TG) ₂₂	322
SSR9	OnHAMP 1b-SSR2 HAMP1 in LG11 5'end 1.3kb (ID: 109204256)	F:gagcacgaggacactgaGCGCTGTATAAGATTCCCGTTA R:GGAAACACAAGAGACATGAGCA	(T) ₂₀	370
SSR10	OnHAMP 1b-SSR3 HAMP1 in LG11 3'end (ID: 109204256)	F:gagcacgaggacactgaGTTTGTAGCTTAACCCATTCCG R:TGCCTTTGTTTAGATGAACTGC	(TG) ₁₀	364

SSR1 1	OnHAMP 4a-SSR	HAMP4 in LG11 5'end 1kb (ID: 109204092)	F:gagcagaggacactgaAAGTGTCTCCACCCACAT R:ACAGAGTGTCTGGCTTTCACA	(TG) ₂₉	382
SSR1 2	OnHAMP 1c-SSR1	HAMP1 in LG11 reverse strand 5'end 2kb (ID: 109204255)	F:gagcagaggacactgaGTGCATTACAGAGTGTCTGGC R:GTCTGGAGCCAAGTGTCTGTT	(TG) ₂₇	395
SSR1 3	OnHAMP 1c-SSR2	HAMP1 in LG11 reverse strand 5'end 6.3kb (ID: 109204255)	F:gagcagaggacactgaTTAAAATGGGCTCAGGAGAAA G R:ACACACATAGATTCATCCGCAC	(ATTC) ₇	332
SSR1 4	OnHAMP 1d-SSR1	HAMP1 in LG11 reverse strand 3'end 6.2kb (ID: 100534415)	F:gagcagaggacactgaTCGGAATTGAGCATTAAGACCT R:GGTTCATAGAACTCCTTTT	(TG) ₂₂	245
SSR1 5	OnHAMP 1d-SSR2	HAMP1 in LG11 reverse strand 3'end 750bp (ID: 100534415)	F:gagcagaggacactgaCAACAAGTGAAGCGACCATATT R:TCACACACAAGCAGGTCAATTA	AC) ₁₃	300
SSR1 6	OnHAMP 1d-SSR3	HAMP1 in LG11 reverse strand intron2 (ID: 100534415)	F:gagcagaggacactgaGTGGGAAACACAAGAGACATG A R:CAGGGCTGAGATAGATTTTGGT	(T) ₂₃	232
SSR1 7	OnHAMP 1g-SSR	HAMP1 in LG11 3'end (ID: 109204285)	F:gagcagaggacactgaGGTTCATAGAACTCCTTTT R:TCGGAATTGAGCATTAAGACCT	(TG) ₁₅	261

2.2.3. Phản ứng PCR khuếch đại gen hepcidin

Phản ứng PCR khuếch đại gen hepcidin được thực hiện trên máy Professional Themrocycle (Biometra). Thành phần phản ứng PCR trong thể tích 25µl gồm: 5µl MyTaq™ Mix 2× (Bioline, Mỹ), 1µl mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược (nồng độ 10µM), 2µl DNA khuôn (~ 200 ng) và nước đề ion. Chu trình nhiệt được thực hiện như sau: Giai đoạn tiền biến tính ở 94°C trong 2 phút; tiếp đó là 35 chu kỳ bao gồm (biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn môi ở 60°C trong 45 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 30 giây); hoàn thành ở 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR

được kiểm tra bằng điện di trên gel 1,5% với thang DNA chuẩn 100bp (Invitrogen, Mỹ).

2.2.4. Đánh giá sự đa hình của các chỉ thị SSRs

Sau khi có sản phẩm PCR, các mẫu được phân tích đoạn trên hệ thống phân tích di truyền ABI3730xl của Công ty Taiwan Genomics (<https://en.genomics.com.tw>). Mẫu sau khi chạy xong được ghi nhận alen bằng phần mềm GeneMarker V.2.2.0.

Đánh giá sự đa hình của các chỉ thị SSRs là bước đầu tiên để xác định chỉ thị SSRs tiềm năng liên quan đến khả năng kháng vi khuẩn *S.iniae*; và được đánh giá dựa trên các thông số sau: Mức độ đa hình

của các locus microsatellites (PIC-Polymorphism Information Content) được tính dựa trên Website online, PIC calculator. Các thông số di truyền (tần số alen, số alen ở mỗi vị trí microsatellite, giá trị dị hợp tử quan sát-Ho, dị hợp tử mong đợi-He và Đánh giá cân bằng Hardy-Weinberg, HWE) được phân tích bằng phần mềm GenAlex 6.5-Genetic Analysis in Excel (Peakall và Smouse, 2006). Tính đa hình của chỉ thị SSRs được đánh giá trên 95 cá thể dòng NT1.

2.2.5. Xác định chỉ thị SSRs tiềm năng liên quan đến khả năng kháng vi khuẩn *S.iniae*

Gây cảm nhiễm vi khuẩn *S.iniae* trên cá rô phi vằn: 29 cá rô phi vằn thể hệ G1 dòng NT1 (khối lượng $23,59 \pm 5,388$ g/con) đã được cảm nhiễm với vi khuẩn *S. iniae* 89353 bằng phương pháp tiêm, với liều tiêm là 0,1 mL dịch lọc vi khuẩn ($1,3 \times 10^5$ cfu/mL). Đối chứng âm và đối chứng dương: Số lượng 10 con/lô thí nghiệm. Liều tiêm lần lượt là 0,1 mL dung dịch PBS (sterile phosphate-buffered saline; pH 7,4) và 0,1 mL dịch lọc vi khuẩn ($1,3 \times 10^5$ cfu/mL). Thí nghiệm được bố trí trong bể 120 lít, nhiệt độ nước duy trì 28°C, sục khí 24 giờ/ngày. Cá được cho ăn 2 lần/ngày với thức ăn công nghiệp 35%P (Uni-president, Taiwan).

Mẫu cá chết với các triệu chứng lâm sàng như bơi không định hướng, xoay tròn, mất lời hoặc đục, da màu sẫm, xuất huyết ở gốc vây được thu hàng ngày. Mẫu vây của nhóm cá sống được thu sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *S. iniae*. Mẫu vây được

giữ trong ethanol 96 độ, bảo quản ở 4°C trước khi tách chiết DNA. Quy trình tách chiết DNA, phản ứng PCR khuếch đại gen hepcidin và phân tích đoạn được thực hiện như nội dung trên. Phân tích kiểu gen và tần số alen khác biệt giữa 2 nhóm sống-chết sau cảm nhiễm, xác định các SSRs tiềm năng dựa vào phần mềm SPSS 20, so sách Chi-square.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá sự đa hình của các chỉ thị SSRs

Kết quả phân tích đoạn của mẫu nghiên cứu được thể hiện qua biểu đồ đường tín hiệu. Kích thước các alen của từng vị trí SSR được xác định dựa vào các đỉnh (peak) tương ứng với các đoạn sản phẩm DNA dự kiến được nhân lên và được biểu thị bằng hình ảnh tín hiệu đồ. Tất cả các alen trước khi đưa vào phân tích bằng phần mềm đều được xác định tính nhiễu, độ rõ nét của tín hiệu đồ. Kết quả cho thấy, 12/17 chỉ thị SSRs có hình ảnh tín hiệu đồ rõ nét, ít nhiễu. Đối với các cá thể đồng hợp sẽ quan sát được duy nhất 1 đỉnh tín hiệu đồ, tương ứng với 2 alen có cùng kích thước. Ngược lại, với các cá thể dị hợp sẽ quan sát được 2 đỉnh của tín hiệu đồ riêng rẽ tương ứng với 2 alen tách biệt cách nhau trong khoảng từ 1 đến 30 alen tùy theo kiểu lặp của locus SSR.

Đánh giá sự đa hình của các chỉ thị SSRs là cơ sở quan trọng để xác định chỉ thị SSRs tiềm năng liên quan đến khả năng kháng vi khuẩn *S.iniae*. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2. Sự đa hình của các chỉ thị microsatellites sử dụng nghiên cứu

SSRs/ Microsatellites	N	Na	Ne	Ho	He	PIC	HWE test
SSR 1	95	2	1,35	0,31	0,26	0,23	ns
SSR2	95	2	1,34	0,29	0,25	0,22	ns
SSR3	95	1	1,00	0,00	0,00	0,00	Monomorphic
SSR 4	95	3	1,85	0,69	0,46	0,36	***
SSR 5	94	3	1,70	0,51	0,41	0,37	*
SSR 7	95	7	2,51	0,98	0,60	0,53	***
SSR 8	95	2	1,74	0,61	0,42	0,33	***
SSR 9	95	2	1,92	0,33	0,48	0,36	**
SSR 10	95	4	1,43	0,24	0,30	0,28	***
SSR 13	95	3	2,66	1,00	0,62	0,55	***
SSR 15	95	4	2,65	1,00	0,62	0,55	***
SSR 16	94	3	1,49	0,41	0,33	0,28	**
Mean	95	3,44	2,00	0,64	0,47	0,40	
SE	0,14	0,48	0,15	0,09	0,04	0,04	

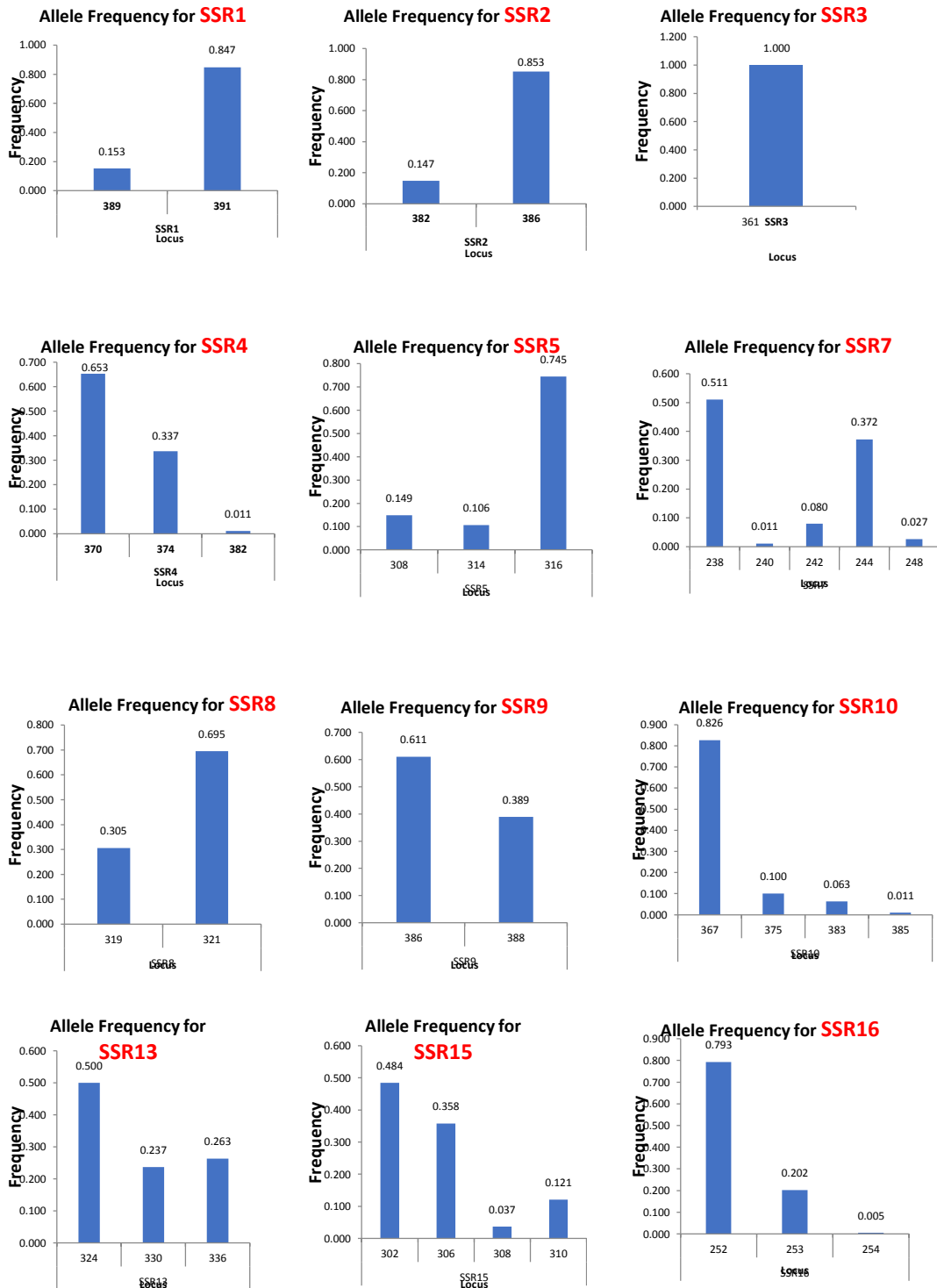
*N: số mẫu nghiên cứu; Na: số alen trên locus; Ne: số alen hiệu quả; Ho: dị hợp tử quan sát; He: Dị hợp tử mong đợi; PIC: mức độ đa hình; * Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy-Weinberg ($p < 0,05$); ** Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy-Weinberg ($p < 0,01$); *** Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy-Weinberg ($p < 0,001$)*

3.1.1. Tần số alen và độ đa dạng của alen

Kết quả ước tính đa hình các alen trên 12 locus SSRs ở các cá thể rô phi vằn dòng NT1 thấy rằng có tổng cộng 31 alen được xác định với kích thước dao động từ 200bp đến 400bp. Trong đó, 8/12 locus SSRs thể hiện tính đa hình cao với sự xuất hiện 3-5 alen/từng SSR; như locus SSR7 có tính đa hình alen cao nhất với sự xuất hiện 5 alen; tiếp theo là locus SSR10, SSR15 với 4 alen; tiếp theo 3 alen tại locus SSR4, SSR5, SSR9, SSR13, SSR16. 4/12 locus SSRs thể hiện tính đa hình thấp với sự xuất hiện 1-2 alen/từng SSR; cụ thể 2

alen tại locus SSR1, SSR2, SSR8; và ít nhất là 1 alen tại locus SSR3 (Hình 1).

Bên cạnh các alen xuất hiện với tần số cao, có một số alen hiếm và xuất hiện với tần số thấp, như alen 382 (locus SSR4), alen 240 (locus SSR7), alen 385 (locus SSR10), alen 254 (locus SSR16). Với tần số xuất hiện rất thấp trong quần đàn, các alen này có thể dễ dàng mất đi nếu không có sự lai tạo để duy trì hoặc cũng có thể tạo ưu thế lai cho thế hệ sau nếu tiếp tục chọn lọc.



Hình 1. Tần số alen của 12 chỉ thị microsatellites

3.1.2. Mức độ đa hình của mỗi locus PIC

Chỉ số PIC thường được sử dụng trong di truyền học như một thước đo tính đa hình của các chỉ thị (Shete và cs., 2000). Theo Botstein và cs. (1980), PIC là một chỉ số về mức độ biến đổi di truyền; $PIC > 0,5$ được coi là có mức độ đa hình cao; $0,25 < PIC < 0,5$ được coi là có mức độ đa hình trung bình; và $PIC < 0,25$ được coi là mức độ đa hình nhỏ. Trong nghiên cứu này, chỉ số PIC dao động trong khoảng 0,0 - 5,5; trung bình là $0,40 \pm 0,04$; 3 locus được coi là đa hình cao ($PIC > 0,5$); 6 locus được coi là đa hình trung bình ($PIC > 0,25$) và chỉ có 3 locus SSR1, SSR2 và SSR3 được coi là có mức độ đa hình thấp (dao động từ 0 - 0,23), có thể do 3 locus này có độ đa dạng alen thấp (chỉ có một đến hai alen trong quần đàn). Kết quả PIC này có thể giải thích do dòng NT1 được tạo ra từ chọn giống dựa trên cá thể, mức độ đa hình sẽ thấp hơn so với chọn giống theo gia đình. Do đó, 9 locus có mức độ đa hình trung bình đến cao phù hợp để sử dụng trong đánh giá đặc điểm đa dạng di truyền quần thể và xác định chỉ thị SSRs liên kết với khả năng kháng bệnh. Trong nghiên cứu mối liên kết giữa chỉ thị microsatellite và tính trạng sinh trưởng ở loài cá biển (mandarin fish), Sun và cs. (2015) đã nghiên cứu trên tổng số 120 chỉ thị SSRs, phát hiện 18 locus có tính đa hình cao (giá trị PIC trung bình là 0,50), được chọn để thử nghiệm tương quan với khả năng sinh trưởng (cơ thể trọng lượng, chiều dài và chiều cao) dựa vào chỉ số PIC. Trong nghiên cứu đánh giá đa dạng các quần đàn cá rô phi tại tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc đã sử dụng 10 locus microsatellite, trong đó 8 locus microsatellite có mức độ đa hình locus cao và hai locus được coi là có mức độ đa hình locus vừa phải và cả 10 locus này đều được chọn để đánh giá đa dạng di truyền các quần đàn rô phi (Gu và cs., 2014).

3.1.3. Tính dị hợp tử

Trong nghiên cứu này, giá trị dị hợp tử quan sát (Ho) cao hơn so với dị hợp tử mong đợi (He), cho thấy tất cả các locus ở đều có sự đa dạng dị hợp tử. Cụ thể, giá trị Ho trung bình là $0,64 \pm 0,09$, giá trị He trung bình là $0,47 \pm 0,04$. Tính dị hợp tử trong một quần thể có thể coi là “thước đo” cho sự đa dạng di truyền của quần thể đó. Theo Kotzé và Muller (1994) nếu một quần thể có tính dị hợp tử cao ở một locus thì có thể đưa ra kì vọng rằng quần thể đó cũng có mức đa dạng di truyền cao ở nhiều locus khác nhau. Mức độ dị hợp tử càng cao thì có nhiều biến dị di truyền và ngược lại. Ngoài ra, so sánh mức dị hợp tử quan sát và mức dị hợp tử kì vọng có thể cho biết sự tác động của các dòng gen bên ngoài tới di truyền của một quần thể. Cụ thể, mức dị hợp tử quan sát lớn hơn mức dị hợp tử kì vọng, thì các dòng gen ngoại lai có ảnh hưởng lớn khiến tính dị hợp tử tăng cao trong quần thể (Crawford, 2007).

3.1.4. Đánh giá cân bằng Hardy-Weinberg (HWE)

Di truyền của 9/12 microsatellite trên quần đàn cá rô phi vằn NT1 sai khác có ý nghĩa so với định luật cân bằng HWE ($P < 0,05$) (Bảng 2). Ngược lại, di truyền của 3 locus SSR1, SSR2 và SSR3 đều lệch khỏi cân bằng HWE. Sự cân bằng HWE trong quần đàn có ý nghĩa rất quan trọng trong xác định tần số alen lặn, tần số của các “thể mang” và trong đánh giá di truyền thể hệ sau của quần đàn. Theo Nei (1978), lạc dòng di truyền, giao phối cận huyết, cách ly địa lý có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến không cân bằng di truyền của một quần đàn. Việc lai tạo giữa các dòng cá rô phi có nguồn gốc khác nhau là một giải pháp hữu hiệu giúp duy trì đa dạng alen và có thể phục hồi một phần sự đa dạng di truyền mất đi, cũng như hạn chế mức độ cận huyết như đề xuất của Freitas và cs. (2007) và Zou và cs. (2015).

Như vậy, tổng hợp các chỉ số đánh giá thấy rằng, 9/12 chỉ thị microsatellite có mức độ đa hình cao, trừ chỉ thị SSR1, SSR2 và SSR3. Các chỉ thị này sẽ tiếp tục được sàng lọc để xác định khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn.

3.2. Xác định chỉ thị SSRs tiềm năng liên quan đến khả năng kháng vi khuẩn *S.iniae*

Kết quả cảm nhiễm cho thấy, tỷ lệ chết của mẫu thí nghiệm (11/29) và mẫu đối

chứng dương (4/10) là tương đương 40%, trong khi mẫu đối chứng âm không xuất hiện cá chết. Trong quá trình theo dõi thí nghiệm, thấy rằng cá có biểu hiện lâm sàng đặc trưng của bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. iniae* như bơi không định hướng, xoay tròn, mắt lồi, da màu sẫm, xuất huyết ở gốc vây. Như vậy, tác nhân gây tử vong cá trong thí nghiệm là vi khuẩn *S. iniae* và các phân tích tiếp theo là cho kết quả tin cậy.

Bảng 3. Kiểu gen và tần số alen của 9 chỉ thị microsatellites của nhóm cá rô phi vằn kháng và nhiễm bệnh do *S.iniae* với so sánh Chi-squared

Locus	Kiểu gen (Genotype)			Tần số alen				
	Genotype	Nhóm cá kháng bệnh	Nhóm cá bị bệnh	p-value	Alen	Nhóm cá kháng bệnh	Nhóm cá bị bệnh	p-value
SSR4	AA (n=16)	10	6	0,960 (p>0,05)	A	28	17	0,964 (p>0,05)
	AB (n=13)	8	5		B	8	5	
SSR5	AC (n=12)	7	5	0,836 (p>0,05)	A	7	5	0,682 (p>0,05)
	BC (n=12)	8	4		B	8	4	
	CC (n=4)	2	2		C	19	13	
	BD (n=5)	0	5		B	18	11	
SSR7	BE (n=24)	18	6	0,001 (p<0,05)	D	0	5	0,007 (p<0,05)
					E	18	6	
					B	12	5	
SSR8	BC (n=17)	12	5	0,277 (p>0,05)	C	24	17	0,389 (p>0,05)
	CC (n=12)	6	6		A	22	12	
	AA (n=10)	5	5					
SSR9	AC (n=14)	12	2	0,018 (p<0,05)	C	14	10	0,622 (p>0,05)
	CC (n=5)	1	4					
SSR10	AA (n=21)	15	6	0,099 (p>0,05)	A	33	17	0,238 (p>0,05)
	AC (n=8)	3	5		C	3	5	
SSR13	BD (n=17)	12	5	0,227 (p>0,05)	B	18	11	0,531 (p>0,05)
	BF (n=13)	6	6		D	12	5	
					F	6	6	
SSR15	AC (n=16)	9	7	0,660 (p>0,05)	A	18	11	0,822 (p>0,05)
	AD (n=5)	4	1		C	9	7	
	AE (n=8)	5	3		D	4	1	
					E	5	3	
SSR16	BB (n=18)	14	4	0,026 (p<0,05)	B	32	15	0,050 (p≤0,05)
	BC (n=11)	4	7		C	4	7	

Tổng số 29 cá rô phi thể hệ thứ nhất của dòng NT1 (khối lượng $23,59 \pm 5,388$ g/con) đã được cảm nhiễm với vi khuẩn *S. iniae* 89353 bằng phương pháp tiêm, với liều tiêm LD₅₀ là $1,3 \times 10^5$ cfu/mL. Kết quả phân tích cho thấy, có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa kiểu gen và tần số alen của 3 chỉ thị microsatellite (SSR7, SSR9, SSR16) giữa nhóm sống và nhóm bị bệnh sau cảm

nhiễm vi khuẩn *S. iniae* ($p \leq 0,05$). Ngược lại, 6 chỉ thị microsatellite còn lại có kiểu gen và tần số alen giữa 2 nhóm sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đây là kết quả sơ bộ ban đầu, cần nghiên cứu kiểm nghiệm chỉ thị trên số lượng lớn mẫu để đánh giá tổng hợp hơn. Như vậy, kết quả bước đầu đã xác định được 3 chỉ thị microsatellite liên kết với gen

hepcidin/HAMP liên quan đến khả năng kháng vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn sinh trưởng nhanh dòng NT1.

Trong nghiên cứu trên, 3 chỉ thị microsatellite (SSR7, SSR9, SSR16) có khả năng kháng vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn có thể do cả 3 chỉ thị này đều liên kết với gen *hepcidin*/HAMP1 (như Bảng 1) và nằm trên nhiễm sắc thể liên kết số 11 (LG 11) trong bản đồ liên kết gen của cá rô phi. Gen *hepcidin*/HAMP1 đã được chứng minh có cấu trúc tương tự như gen *hepcidin*/TH1-5 và có vai trò chống lại cả vi khuẩn gram âm và gram dương trên cá rô phi, như *S. iniae*, *S. aureus*, *Vibrio vulnificus* (Huang và cs., 2007; Pan và cs., 2011; Gong và cs., 2016). Trong 12 gen *hepcidin*/HAMP trên LG11, phát hiện 7 HAMP1, 1 HAMP2, 1 HAMP3 and 3 HAMP4 (Gong và cs., 2017; Ho và cs., 2017; Pham và cs., 2017). Vùng mã hóa protein của gen *hepcidin*/HAMP1 và gen *hepcidin*/TH1-5 chứa 22 acid amin GIKCRFCCGCCTPGICGVCCRF (Gong và cs., 2016; Huang và cs., 2007).

Nghiên cứu này là công bố đầu tiên về chỉ thị microsatellite liên quan đến khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn. Nghiên cứu này là cơ sở khoa học để ứng dụng 17 chỉ thị microsatellite này liên kết với các gen *hepcidin*/HAMP trong nghiên cứu chọn giống cá rô phi vằn kháng bệnh xuất huyết ở Việt Nam. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu 2 được coi là tác nhân chính gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi vằn ở Việt Nam (Sheehan và cs., 2009; Nguyễn Viết Khuê và cs., 2009; Đồng Thanh Hà và cs., 2011; Trương Thị Mỹ Hạnh và cs., 2020). Kiểm tra liệu sự đa hình trong các chỉ thị microsatellite này trên các gen *hepcidin*/HAMP có liên quan đến sự kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi vằn chọn giống của Việt Nam hay không cũng được thực hiện.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân tích phân tích tính đa hình của 17 chỉ thị SSRs liên kết với gen *hepcidin*/HAMP, và đánh giá mối tương quan kiểu gen, tần số alen của các chỉ thị SSRs đa hình đến khả năng kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn sinh trưởng nhanh dòng NT1 của Đài Loan. 9/17 chỉ thị SSRs có tính đa hình cao và tuân theo định luật Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) đã được sử dụng để đánh giá khả năng kháng bệnh. Nghiên cứu đã bước đầu xác định được 3 chỉ thị SSRs tiềm năng (SSR7, SSR9, SSR18) liên kết với gen *hepcidin*/HAMP liên quan đến khả năng kháng vi khuẩn *S. iniae* trên cá rô phi vằn sinh trưởng nhanh dòng NT1 ($p < 0,05$). Các chỉ thị tiềm năng này sẽ được ứng dụng là chỉ thị phân tử hỗ trợ chọn giống (MAS) trên cá rô phi thương mại của Đài Loan liên kết với khả năng kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. iniae*. Kết quả cho thấy có thể áp dụng 17 chỉ thị SSRs này cho nghiên cứu chọn giống trên cá rô phi vằn kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. agalactiae* ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học Công nghệ (MOST) của Đài Loan đã cấp kinh phí để thực hiện nghiên cứu này với mã số 104-2321-B-019-003-MY3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Nguyễn Viết Khuê, Nguyễn Thị Hà, Trương Thị Mỹ Hạnh, Đồng Thanh Hà và cs. (2009). Xác định nguyên nhân gây chết cá rô phi thương phẩm ở cá tỉnh miền Bắc. Báo cáo tổng kết Khoa học kỹ thuật Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.
- Đồng Thanh Hà, Nguyễn Viết Khuê, Nguyễn Thị Hạnh (2011). Một đặc điểm của *Streptococcus agalactiae* tác nhân gây bệnh *Streptococcosis* trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam.

Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Hạnh, Nguyễn Hữu Nghĩa, Phạm Hồng Nhật, Chu Chí Thiết và Phan Thị Vân (2020). Một số đặc điểm chính của *Streptococcus agalactiae* ở cá rô phi (*Oreochromis sp*) nuôi trong nước lợ. *Tap chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, (387), 73-79pp.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32, 314.
- Chang, W.T., Pan, C.Y., Rajanbabu, V., Cheng, C.W., Chen, J.Y. (2011). Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) antimicrobial peptide, *hepcidin* 1–5, shows antitumor activity in cancer cells. *Peptides*, 32, 342-352.
- Chen, S.L., Li, W., Meng, L., Sha, Z.X., Wang, Z.J., Ren, G.C. (2007). Molecular cloning and expression analysis of a *hepcidin* antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & shellfish immunology*, 22, 172-181.
- Chen, S.L., Xu, M.Y., Ji, X.S., Yu, G.C., Liu, Y. (2005). Cloning, characterization, and expression analysis of *hepcidin* gene from red sea bream (*Chrysophrys major*). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 1608-1612.
- Crawford, M.H. (2007). Anthropological Genetics: Theory, Methods and Applications. *Cambridge University Press*.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Liebscher, R.S., Dacanay, A., Tsoi, S.C. (2003). Identification and expression analysis of *hepcidin*-like antimicrobial peptides in bony fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 589-601.
- Falco, A., Martinez-Lopez, A., Coll, J., Estepa, A. (2012). The potential for antimicrobial peptides to improve fish health in aquaculture. *Infectious Disease in Aquaculture*. Elsevier, pp. 457-479.
- Fitzsimmons, K. (2016). Supply and demand in global tilapia markets 2016. *World Aquaculture Society Meetings (WAS)*, Las Vegas.
- Ganz, T., Nemeth, E. (2012). *Hepcidin* and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823, 1434-1443.
- Gong, H.Y., Ho, C.H., Wu, S.H., Lin, W.F., Kuo, Y.H., Chang, Y.H. (2016). Three HAMP genes of Nile tilapia were differentially activated in spleen to defend against *Streptococcus iniae* infection. Special Issue: ISFSI. *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 122.
- Gong, H.Y., Wu, S.H., Chen, C.Y., Huang, C.W., Lu, J.K., Chou, H.Y. (2017). Complete Genome Sequence of *Streptococcus iniae* 89353, a Virulent Strain Isolated from Diseased Tilapia in Taiwan. *Genome Announcements*, 5, 1516-1524.
- Gu, D., Mu, X., Song, H., Luo, D., Xu, M., Luo, J., Hu, Y.C. (2014). Genetic diversity of invasive *Oreochromis spp.* (tilapia) populations in Guangdong province of China using microsatellite markers.
- Hirono, I., Hwang, J.Y., Ono, Y., Kurobe, T., Ohira, T., Nozaki, R., Aoki, T. (2005). Two different types of *hepcidins* from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *The FEBS journal*, 272, 5257-5264.
- Huang, P.H., Chen, J.-Y., Kuo, C.M. (2007). Three different *hepcidins* from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: Analysis of their expressions and biological functions. *Molecular Immunology*, 44, 1922-1934.
- Kim, Y.O., Hong, S., Nam, B.H., Lee, J.H., Kim, K.K., Lee, S.-J. (2005). Molecular cloning and expression analysis of two *hepcidin* genes from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 1411-1414.
- Krause A., Neitz S., Magert H.J., Schulz A., Forssmann W.G., Knappe P.S., Adermann K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfe-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480, 147-150.
- Martin-Antonio, B., Jimenez-Cantizano, R.M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Machado, M. (2009). Genomic characterization and gene expression analysis of four *hepcidin* genes in the redbanded seabream (*Pagrus auriga*). *Fish & shellfish immunology*, 26, 483-491.
- Nathan A., Johnson and Roger L. Vallejo & Jeffrey T. Silvestri & Timothy J. Welch & Gregory D. Wiens & Eric M. Hallerman & Yniv Palti. (2008). Suggestive Association of Major Histocompatibility IB Genetic Markers with Resistance to Bacterial Cold Water Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol*, 10, 429 – 437.
- Pan, C.Y., Peng, K.C., Lin, C.H., Chen, J.Y.

- (2011). Transgenic expression of tilapia *hepcidin* 1-5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 275-285.
- Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T. (2001). *Hepcidin*, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 7806-7810.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006). *GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research.
- Robertson, L.S. (2009). Expression in fish of *hepcidin*, a putative antimicrobial peptide and iron regulatory hormone. *Proceedings of The Third Bilateral Conference Between the United States and Russia: Aquatic Animal Health: 12–20 July 2009; Sheperdstown, WV*, pp. 284-292.
- Rodrigues, P.N., Vázquez-Dorado, S., Neves, J.V., Wilson, J.M. (2006). Dual function of fish *hepcidin*: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 1156-1167.
- Sheehan, B., Labrie, L., Lee, Y., Lim, W., Wong, F., Chan, J., Komar, C., Wendover, N., Grisez, L. (2009). Streptococcal diseases in farmed tilapia. *Aqua Culture Asia Pacific*, 5, 26-29.
- Shike, H., Shimizu, C., Lauth, X., Burns, J.C. (2004). Organization and expression analysis of the zebrafish *hepcidin* gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(7-8), 747-754.
- Shete, S., Tiwari, H., Elston, R.C. (2000). On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theor Popul Biol*, 57(3) 265-271.
- Sun, L., Li, J., Liang, X., Yi, T., Fang, L., Sun, J., He, Y., Luo, X., Dou, Y., Yang, M. (2015). Microsatellite DNA markers and their correlation with growth traits in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Genetics and Molecular Research*, 14, 19128-19135.
- Wang, K., Yang, M., Chen, J., Cai, J., Qu, H. (2006). Characterization and expression of gene variants of *hepcidin*-like antimicrobial peptides from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B). *The FASEB Journal*, 20, A973.