**TÓM TẮT THÔNG TIN VỀ LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: ***Xây dựng và ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền một số bộ cá tại Đồng bằng sông Cửu Long***

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số ngành: 62420201

Họ tên nghiên cứu sinh: Vũ Đặng Hạ Quyên

Khóa đào tạo: 23/2013

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS Trần Linh Thước và TS. Đặng Thuý Bình

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN

Sông Mekong là một trong những điểm nóng toàn cầu về đa dạng sinh học. Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) sỡ hữu đa dạng sinh học cao với khoảng 540 loài cá. Hiện nay, hệ thống sông Mekong đang phải đối mặt với những thách thức lớn về môi trường do các hoạt động của con người và những ảnh hưởng của biến đổi khí hậu. Các đập thủy điện là rào cản vật lý ngăn cản sự di cư của cá và thay đổi môi trường sống tự nhiên, gây ảnh hưởng đến quá trình sinh sản, tập tính sống (sự di cư, các bãi đẻ và khu vực kiếm mồi) dẫn đến thay đổi sự phân bố của các loài và ngành sản xuất thủy sản.

Luận án được thực hiện nhằm mục tiêu xây dựng và ứng dụng chỉ thị phân tử để nghiên cứu đa dạng di truyền các loài cá tại ĐBSCL với 2 nội dung chính: (i) Xây dựng dữ liệu trình tự hai gen thuộc DNA ti thể (gen mã hóa 16S rRNA và cytochrome oxidase subunit 1- CO1) của các loài cá thuộc ba bộ cá nước ngọt phổ biến tại ĐBSCL (Bộ cá da trơn Siluriformes, Bộ cá vược Perciformes và Bộ cá chép Cypriniformes) và ứng dụng để phân tích mối quan hệ phát sinh loài của các loài thuộc ba Bộ cá này; (ii) Nghiên cứu đặc điểm di truyền quần thể, mô hình di cư của loài cá phèn vàng *Polynemus melanochir* (có tập tính di cư giữa các thủy vực nước mặn, nước lợ và nước ngọt) và loài cá sửu *Boesemania microlepis* (có tập tính di cư địa phương) dựa trên việc tuyển chọn và ứng dụng chỉ thị phân tử SNPs (single nucleotide polymorphisms).

Mẫu cá được thu thập tại ĐBSCL trong 3 năm (2013-2016). Bằng phương pháp hình thái và sinh học phân tử, 85 loài cá được định loại gồm: 23 loài (27,1%), 14 giống, 9 họ thuộc bộ Siluriformes; 31 loài (36,5%), 24 giống, 2 họ thuộc bộ Cypriniformes; 31 loài (36,5%), 23 giống, 13 họ thuộc bộ Perciformes. 85 trình tự gen mã hóa 16S rRNA và 85 trình tự gen mã hóa CO1 mtDNA tương ứng của các loài này đã được xác định và được đăng ký trên Genbank, góp phần hình thành dữ liệu di truyền của các loài cá tại ĐBSCL. Kết quả phân tích mối quan hệ phát sinh loài của các loài cá nghiên cứu cho thấy: (i) Sự đơn ngành của các họ trong bộ Siluriformes và các phân bộ Loricarioidei, Siluroidei; Plostosidae phân nhóm riêng rẽ với nhánh của Siluroidei; (ii) Bộ Cypriniformes phân thành 2 nhóm đơn ngành (họ Cyprinidae và họ Cobitidae) có mối quan hệ gần gũi; (iii) Bộ Perciformes phân thành 2 nhánh chính với Nhánh I gồm họ Eleotridae và Gobiidae, Nhánh II gồm 11 họ còn lại; tất cả các giống đều thể hiện sự đồng dạng. Chỉ thị phân tử (16S rRNA và CO1 mtDNA) được sử dụng để kiểm chứng và định loại phân tử một số loài có đặc điểm hình thái dễ gây nhầm lẫn như cá dứa (*P. elongatus*) - cá bông lau (*P. krempfi*), cá tra (*P. hypophthalmus*) - cá xác sọc (*P. macronema*) và 2 loài chưa thể định danh chính xác đến loài là *Pangasius cf. mekongensis* và cá khoai sông *Acantopsis cf. rungthipae.*

Mẫu cá phèn vàng *P. melanochir* và cá sửu *B. microlepis* được thu thập tại 3 tỉnh thuộc lưu vực sông Hậu, 5 tỉnh thuộc lưu vực sông Tiền tại ĐBCSL và tỉnh Siêm Riệp, Campuchia (chỉ riêng đối với mẫu cá sửu) từ 08/2015 - 11/2016. Tại mỗi địa điểm tiến hành thu 32–48 cá thể. Thư viện DNA bộ gen của mỗi cá thể được thu nhận bằng kỹ thuật Enzyme Restriction-site Associated DNA (EzRAD) và trình tự được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới Illumina.

1738 SNPs đặc trưng của các quần thể cá phèn vàng *P. melanochir* tại 8 tỉnh ĐBSCL đã được tuyển chọn. Kết quả phân tích đặc điểm di truyền quần thể cho thấy: (i) Mức độ đa dạng di truyền tương đối cao ở các địa điểm nghiên cứu; sự khác biệt di truyền giữa các quần thể thấp nhưng có ý nghĩa thống kê; (ii) Có sự kết nối cao giữa các quần thể; (iii) Kích thước quần thể hiệu quả Ne < 500, cho thấy quần thể cá phèn vàng khó có khả năng phục hồi trước những biến động môi trường trong thời gian dài. Phân tích mô hình di cư cho kết quả: (i) Mô hình di cư lịch sử cho thấy có sự di cư dọc 2 nhánh sông Hậu và sông Tiền, nhưng không có sự di cư giữa 2 sông; (ii) Mô hình di cư hiện tại cho thấy có sự di cư của cá phèn vàng dọc ở 2 nhánh sông, chủ yếu từ sông Tiền sang sông Hậu.

638 SNPs đặc trưng của các quần thể cá sửu *B. microlepis* tại 6 tỉnh ĐBSCL và tỉnh Siêm Riệp (Campuchia) đã được tuyển chọn. Kết quả phân tích đặc điểm di truyền quần thể cho thấy: (i) Mức độ đa dạng di truyền tương đối cao ở tất cả 7 địa điểm nghiên cứu; sự khác biệt di truyền giữa các quần thể thấp không có ý nghĩa thống kê; (ii) Có sự kết nối cao giữa các quần thể; (iii) Kích thước hiệu quần thể hiệu quả Ne < 500, cho thấy quần thể cá sửu khó có khả năng phục hồi trước những biến động môi trường trong thời gian dài; Ne của cá sửu ở sông Tiền (66,1) tiệm cận giá trị cực 50, chứng tỏ biến động môi trường ảnh hưởng đến sức sống quần thể. Phân tích mô hình di cư cho kết quả: (i) Mô hình di cư lịch sử là mô hình Panmixia, có sự di cư qua lại giữa 2 nhánh sông và di cư đến Biển Hồ (Campuchia); (ii) Mô hình di cư hiện tại cho thấy có sự di cư của cá sửu chủ yếu ở nhánh sông Hậu, từ sông Tiền sang sông Hậu và từ sông Hậu đến Siêm Riệp.

2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Xây dựng dữ liệu di truyền (đoạn gen mã hóa 16S rRNA và CO1 mtDNA) của DNA ti thể của 85 loài cá thuộc Bộ Siluriformes, Bộ Perciformes, Bộ Cypriniformes tại ĐBSCL.

- Ứng dụng dữ liệu di truyền để khảo sát mối quan hệ tiến hóa của các loài cá thuộc 3 bộ này và kiểm chứng, định loại phân tử 06 loài cá có đặc điểm hình thái dễ gây nhầm lẫn.

- Ứng dụng kỹ thuật EzRAD phát hiện và tuyển chọn SNPs đặc trưng quần thể cho 2 loài cá ở ĐBSCL có đặc tính di cư khác nhau, trong đó cá phèn (*Polynemus melanochir*) di cư dọc sông, giữa các thủy vực ngọt, lợ, mặn và cá sửu (*Boesemania microlepis*) di cư ở qui mô địa phương.

- Dựa trên chỉ thị SNPs, cấu trúc di truyền quần thể, mô hình di cư, kích thước quần thể hiệu quả được khảo sát nhằm bước đầu đánh giá ảnh hưởng của biến động về môi trường về chế độ thủy văn, sự xâm nhập mặn lên quần thể cá phèn vàng và cá sửu tại ĐBCSL.

3. CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU

- Luân án góp phần cung cấp dữ liệu di truyền và cơ sở khoa học tin cậy cho các bên liên quan để phục vụ bảo tồn và quản lý nguồn lợi cá tại khu vực ĐBSCL trước những biến động môi trường.

- Luân án góp phần hoàn thiện bộ dữ liệu di truyền cho các bộ cá phân bố ở ĐBSCL trên cơ sở đa dạng hóa các chỉ thị phân tử và kết hợp định loại hình thái và phân tử với các loài cá có đặc điểm hình thái dễ gây nhầm lẫn.

- Cần khảo sát cấu trúc di truyền quần thể cá phèn vàng và cá sửu ở tất cả các thủy vực phân bố tự nhiên ngoài ĐBSCL (cá phèn vàng ở Campuchia, Indonesia; cá sửu ở hạ lưu sông Mekong).

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN** | **NGHIÊN CỨU SINH** |

**GS.TS. Trần Linh Thước TS. Đặng Thuý Bình Vũ Đặng Hạ Quyên**

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**PHÓ HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: ***Building and applying molecule markers for genetic diveristy study of some orders of fish in Mekong Delta***

Specialty: Biotechnology

Code: 62420201

Name of PhD Student: Vu Dang Ha Quyen

Academic year: 23/2013

Supervisor: Prof. Dr Tran Linh Thuoc, Dr. Dang Thuy Binh

At: VNUHCM - University of Science

1. SUMMARY

Mekong River is one of the global hotspots for biodiversity. The Mekong River delta (Mekong Delta) possesses high fish biodiversity of approx. 540 species of fish. Currently, the Mekong River is facing major environmental challenges due to human activities and the effects of climate change. Hydroelectric dams are a physical barrier that prevents fish migration and changes in natural habitats, affecting reproductive processes and behavior (migration, spawning grounds and feeding grounds) leading to changes in the distribution of species and fisheries.

The thesis aims to build and apply molecular markers to study genetic diversity of fish species in the Mekong Delta including: (i) Building genetic data of two genes of mitochondrial DNA (16S rRNA and cytochrome oxidase subunit 1- CO1) of three common fish orders (Siluriformes, Perciformes and Cypriniformes) in the Mekong Delta and examining phylogenetic relationships of these fishes; (ii) Investigating population genetics, migration pattern of the *Polynemus melanochir* fish (migrating along the river between fresh, brackish and salt waters) and the *Boesemania microlepis* fish (with local migration, strictly freshwater fish) basing on single-nucleotide polymorphisms (SNPs) markers.

Fish samples were collected in the Mekong Delta during 3 years (2013-2016). By morphological and molecular methods, 85 fish species were identified, including: 23 species (27.1%), 14 genera, 9 families of the Siluriformes order; 31 species (36.5%), 24 genera, 2 families of the Cypriniformes order; and 31 species (36.5%), 23 genera, 13 families belonging to the Perciformes order. 85 respective sequences of 16S rRNA and CO1 mtDNA of these species were determined and submitted to Genbank, contributing to the establishment of genetic data of fish species in the Mekong Delta. Phylogenetic relationship analyses of the studied fish species showed that: (i) The Siluriformes order was monophyletic, and Loricarioidei, Siluroidei, Plostosidae were clustered separately from the Siluroidei; (ii) The Cypriniformes order was divided into two monophyletic lineages (families Cyprinidae and Cobitidae) with a close relationship; (iii) The Perciformes order was divided into two main lineages: Lineage I composing of Eleotridae and Gobiidae, and Lineage II composing of eleven remaining families; all genus were monophyly. Morphological unclear fishes such as *P. elongatus*, *P. krempfi*, *P. hypophthalmus* and *P. macronema*. *Pangasius cf. mekongensis* and *Acantopsis cf. rungthipae* were genetically verified. Two species, however, could not be identified at the species level.

Samples of *P. melanochir* and *B. microlepis* fishes were collected in 3 provinces in Hau river, 5 provinces in Tien river in the Mekong Delta and in Siem Reap, Cambodia (only for *B. microlepis*) from 8/2015-11/2016. At each location, 32–48 individuals were collected. DNA libraries were obtained by the Enzyme Restriction-site Associated DNA (EzRAD) technique, and analyzed by new generation sequencing technology (Illumina).

1738 SNPs of *P. melanochir* populations in eight sampling sites were selected. The results of population genetic analysis showed that: (i) The level of genetic diversity was relatively high in the study sites; genetic differences between populations were low but statistically significant; (ii) There was a high connectivity between populations; (iii) Ne < 500 showing *P. melanochir* population was unlikely able to recover from environmental fluctuations in the long time. Analysis of the migration pattern showed: (i) The historic migration model showed that there were movements along the two tributaries of the Hau and Tien rivers, but there was no migration between the two rivers; (ii) The current migration model showed the migration along two river branches, mainly from Tien River to Hau River.

638 SNPs of *B. microlepis* populations in 6 sampling sites of the Mekong Delta and Siem Reap, Cambodia were selected. The results of population genetic analyses showed that: (i) The level of genetic diversity was relatively high in all 7 study sites; genetic differences between low populations were not statistically significant; (ii) There was a high connectivity between populations; (iii) Ne < 500 showing fish population was unlikely able to recover from environmental changes in the long time; Ne of *B. microlepis* population in the Tien River (66.1) was near the extreme value of 50, indicating that environmental fluctuations did affect the vitality of the population. Analysis of the migration pattern showed that: (i) The historic migration model was the Panmixia model, with the movement between two tributaries and the migration to Bien Ho, Cambodia; (ii) The current migration model showed that the migration mainly came from Hau river branch, from Tien river to Hau river, and from Hau river to Siem Reap.

2. NOVELTY OF THESIS

- Building genetic data (16S rRNA and CO1) of mitochondrial DNA of 85 fish species in the three orders Siluriformes, Perciformes and Cypriniformes in the Mekong Delta.

- Application of genetic data to investigate phylogenetic relationships of fishes belong to these three orders, and to genetically verified six fish species with confusing morphological characteristics.

- Applying EzRAD technique to detect and select population-specific SNPs of two fish species in the Mekong Delta with different migration patterns, i.e the Blackhand paradise fish (*Polynemus melanochir*) which migrates along the river, between fresh, brackish and salt water bodies, and the Boeseman croaker fish (*Boesemania microlepis*) which migrates within a local scale, strictly freshwater.

- Based on SNPs markers, population genetic structure, migration patterns and effective population size were investigated in order to initially assess the impact of environmental changes on hydrological regime, saline intrusion on populations of these two fishes in the Mekong Delta.

 3. APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTINE

- The thesis provides genetic data and reliable scientific basis for stakeholders to serve the conservation and management of fish resources in the Mekong Delta under environmental changes.

- The thesis improves genetic data for fish species distributing in the Mekong Delta on the basis of diversifying molecular markers, and the combination of morphological and molecular markers for the identification of confusing fish species.

- There is a need to investigate population genetics of *P. melanochir* and *B. microlepis* in all their natural distribution sites outside the Mekong Delta (in Cambodia, Indonesia for *P. melanochir* and in the Lower Mekong Basin for *B. microlepis*).

|  |  |
| --- | --- |
| **SUPERVISORS** | **PhD STUDENT** |

**Prof. Dr. Tran Linh Thuoc Dr. Dang Thuy Binh Vu Dang Ha Quyen**

**CONFIRMATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**VICE PRESIDENT**