

**ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

KIỀU THỊ HUYỀN

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ THỦY SẢN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM PHÂN BỐ, HÌNH THÁI VÀ
ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁ CHÌNH HOA
(*Anguilla marmorata* QUOY & GAIMARD, 1824) Ở THỪA THIÊN HUẾ**

HUẾ - 2021

Công trình được hoàn thành tại: Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Nguyễn Quang Linh**

Phản biện 1

.....
.....
.....

Phản biện 2

.....
.....
.....

Phản biện 3

.....
.....
.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế họp tại:

.....

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2021

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện quốc gia Việt Nam
2. Thư viện Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế.

**ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ THỦY SẢN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM PHÂN BỐ, HÌNH THÁI VÀ
ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÁ CHÌNH HOA
(*Anguilla marmorata* QUOY & GAIMARD, 1824) Ở THỪA THIÊN HUẾ**

NGÀNH: NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

MÃ SỐ: 9620301

HUẾ - 2021

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Trong số 16 loài và 3 phụ loài cá Chình thuộc giống *Anguilla* đã được xác định, cá Chình hoa có kích thước lớn thứ hai và phân bố rộng trên thế giới. Ở Việt Nam, cá Chình hoa phân bố nhiều nhất là các tỉnh từ Thừa Thiên Huế đến Khánh Hòa. Trong quá trình di cư giữa môi trường nước ngọt, nước lợ và nước mặn nhiều đặc điểm sinh học khác biệt của cá Chình hoa đã được hình thành. Những thay đổi môi trường đã định hình các đặc tính sinh lý và cấu trúc di truyền của loài. Sự đa dạng, phân bố và thích nghi với môi trường sống của cá Chình có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố môi trường, như độ mặn, nhiệt độ, độ cao, lưu vực sông và khả năng cạnh tranh sinh thái. Với phạm vi phân bố rộng và vai trò sinh thái cao, cá Chình hoa được đề xuất là một loài chỉ thị, đại diện cho việc bảo tồn đa dạng sinh học trong các hệ sinh thái nước ngọt. Do đó, việc xem xét sự thay đổi và nhận diện các đặc trưng hình thái, môi trường phân bố và di truyền cho loài cá Chình hoa là cần thiết để xây dựng các chiến lược phục hồi và phát triển nguồn lợi.

Các điều kiện về tự nhiên, môi trường, thời tiết khí hậu và chế độ trao đổi nước giữa các hệ thống thủy vực vào mùa mưa và mùa khô ở Thừa Thiên Huế đã tạo ra các điều kiện thuận lợi cho cá Chình hoa sinh sống và phát triển. Trong hai loài cá Chình đã được xác định tại Thừa Thiên Huế, cá Chình hoa xuất hiện phổ biến hơn với giá trị thương mại và sinh thái cao. Những áp lực của việc thay đổi môi trường trong quá trình di cư, khai thác quá mức và các nhân tố ảnh hưởng môi trường sống tự nhiên, như ô nhiễm môi trường, xây dựng các hồ, đập, thủy điện đã dẫn đến sự gia tăng nguy cơ suy giảm nguồn lợi trong tự nhiên. Năm 2007, cá Chình hoa đã được liệt kê trong Sách Đỏ Việt Nam ở cấp độ là VU. Tuy nhiên, những hiểu biết về cá Chình hoa ở Việt Nam nói chung và Thừa Thiên Huế nói riêng vẫn còn rất hạn chế. Các nghiên cứu trước đây chỉ mới dừng lại ở việc xác định thành phần loài và sự có mặt của cá Chình hoa tại các thủy vực. Do vậy, các nghiên cứu sâu về đặc điểm sinh học và đa dạng di truyền quần thể của cá Chình hoa là cần thiết.

Để xác định đa dạng di truyền của sinh vật có thể dựa trên các thông tin hình thái, sinh hóa và phân tử. Việc sử dụng chỉ thị phân tử cho độ chính xác cao hơn so với chỉ thị hình thái và chỉ thị hoá học vì nó không phụ thuộc vào các yếu tố khách quan nào. Trong các kỹ thuật di truyền phân tử đang được ứng dụng trong lĩnh vực thủy sản, DNA barcode đang trở thành bộ công cụ hữu ích trong nghiên cứu định danh và đa dạng di truyền của sinh vật liên quan đến những hiểu biết về ranh giới loài, sinh thái quần thể, tiến hóa, tương tác chuỗi thức ăn và bảo tồn đa dạng sinh học. Đối với động vật, một vùng DNA ngắn của gen ty thể thường được sử dụng làm chỉ thị DNA, trong đó vùng mã hóa *COI* và *16S rRNA* là những chỉ thị phổ biến và hiệu quả nhất. Vì vậy, việc ứng dụng các chỉ thị phân tử trong đánh giá đa dạng di truyền quần thể của cá Chình hoa cần được thực hiện để làm rõ mối quan hệ giữa sự biến thái, thích nghi sinh thái và di truyền trong quá trình tiến hóa của loài.

Từ những lý do trên, chúng tôi đã lựa chọn đề tài: **“Nghiên cứu đặc điểm phân bố, hình thái và đa dạng di truyền của cá Chình hoa (*Anguilla marmorata* Quoy & Gaimard, 1824) ở Thừa Thiên Huế”**, để thực hiện trong phạm vi nghiên cứu thuộc Luận án Tiến sĩ này.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Nhằm bổ sung thông tin về đặc điểm sinh học, cấu trúc quần thể và đa dạng nguồn gen liên quan đến sự thay đổi môi trường sống của cá Chình hoa (*A. marmorata* Quoy & Gaimard, 1824) tại Thừa Thiên Huế, làm cơ sở cung cấp dẫn liệu khoa học và thực tiễn phục vụ công tác bảo tồn và phát triển bền vững tài nguyên cá Chình hoa.

3. Ý nghĩa của luận án

1) Ý nghĩa khoa học

Luận án đã cung cấp những dẫn liệu khoa học mới về mối quan hệ giữa đặc điểm hình thái, phân bố và di truyền của loài cá Chình hoa phân bố tại Thừa Thiên Huế. Bên cạnh những thông tin liên quan đến đặc điểm sinh học của loài, kết quả nghiên cứu chỉ ra được vai trò sinh thái, ý nghĩa của việc bảo tồn và phát triển nguồn lợi cá Chình hoa trong tự nhiên. Đây chính là những cơ sở quan trọng trong việc đề xuất các chiến lược bảo tồn, phát triển bền vững tài nguyên cá Chình hoa tại địa bàn nghiên cứu cũng như ở Việt Nam và trên Thế giới.

2) Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu của luận án lần đầu tiên đã phân tích được cấu trúc quần thể cá Chình hoa dựa trên các đặc điểm hình thái và sinh thái phân bố; lần đầu tiên cung cấp dữ liệu về gen *COI* và *16S rRNA* thuộc hệ gen ty thể của cá Chình hoa; và ứng dụng kỹ thuật DNA barcode trong đánh giá cấu trúc quần thể của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án đã mô tả được các đặc điểm cấu tạo đặc trưng về hình thái, đặc điểm môi trường sinh thái và hiện trạng phân bố quần thể của cá Chình hoa tại Thừa Thiên Huế có kích cỡ từ 120 – 1.137 mm (3,0 – 4.500 g). Lần đầu tiên luận án sử dụng bộ công cụ phân tích thành phần chính (PCA) và phân tích cụm (CA) để phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến sự đa dạng trong cấu trúc quần thể cá Chình hoa tại Thừa Thiên Huế liên quan đến quá trình thích nghi với điều kiện sinh thái môi trường và biến thái của các giai đoạn trong vòng đời.

Luận án đã giải trình tự và xây dựng được bộ mã vạch cho loài cá Chình hoa dựa trên trình tự hai đoạn gen *COI* và *16S rRNA* để sử dụng trong định danh thành phần loài và bảo tồn nguồn gen. Những phân tích về đa dạng di truyền quần thể đã cho thấy sự đa dạng di truyền và tiến hóa theo hướng mở rộng quy mô quần thể ngẫu nhiên với sự bất gặp của các allele hiếm cao trong quần thể khi được mở rộng phạm vi địa lý. Kết quả nghiên cứu đã phân nào khẳng định được sự ảnh hưởng mạnh mẽ của các yếu tố môi trường sinh thái lên sự đa dạng về đặc điểm hình thái và cấu trúc di truyền quần thể của cá Chình hoa phân bố tại Thừa Thiên Huế.

Thông qua đánh giá mô hình cấu trúc quần thể của cá Chình hoa tại Thừa Thiên Huế bằng các chỉ số hình thái, môi trường phân bố và phân tử đã làm sáng tỏ hơn nhiều thông tin về quá trình sinh trưởng, thích nghi, vòng đời và sự tiến hóa của loài sau khi di nhập và sinh sống tại các thủy vực ở Thừa Thiên Huế. Chính vì vậy, kết quả nghiên cứu làm cơ sở để các nhà khoa học, các nhà quản lý thủy sản xây dựng các phương án bảo tồn và phát triển loài cá Chình hoa một cách hiệu quả và bền vững ở khu vực cũng như Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Sơ lược đặc điểm tự nhiên vùng nghiên cứu

- 1.1.1. Vị trí địa lý
- 1.1.2. Địa hình, địa mạo
- 1.1.3. Khí hậu
- 1.1.4. Thủy văn
- 1.1.5. Tài nguyên sinh vật

1.2. Sơ lược về cá Chình hoa

- 1.2.1. Thành phần loài và phân bố
- 1.2.2. Vòng đời và đặc điểm sinh học

1.3. Chỉ thị phân tử và ứng dụng trong thủy sản

- 1.3.1. Những chỉ thị phân tử dựa trên DNA
- 1.3.2. Kỹ thuật DNA barcode

1.4. Tình hình nghiên cứu về cá Chình *Anguilla*

- 1.4.1. Nghiên cứu hình thái
- 1.4.2. Phân bố, vòng đời và thích nghi sinh thái
- 1.4.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử
- 1.4.4. Nghiên cứu cá Chình ở Việt Nam

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

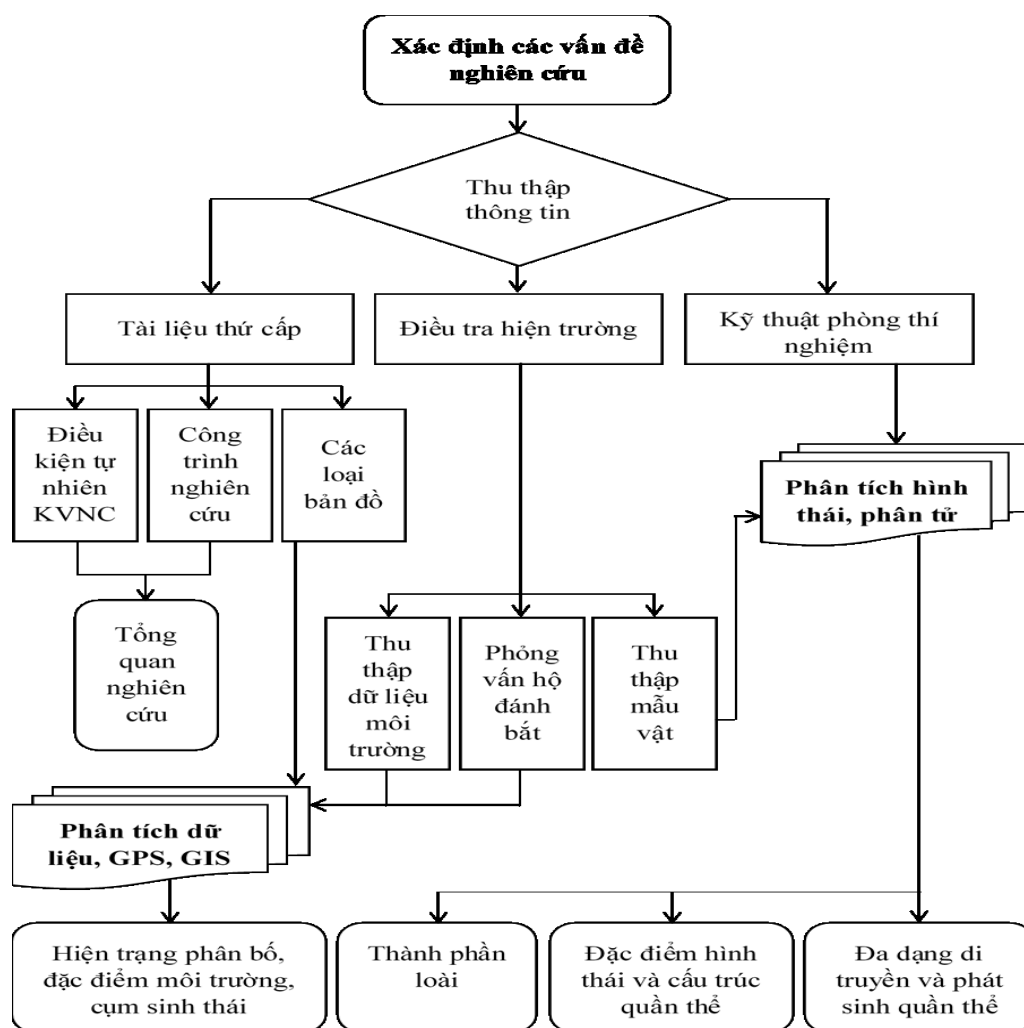
Nghiên cứu được thực hiện trên đối tượng là cá Chình hoa (*A. marmorata* Quoy & Gaimard, 1824) phân bố tại Thừa Thiên Huế trong vòng 4 năm từ 2017 – 2021.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Xác định thành phần loài cá Chình phân bố tại Thừa Thiên Huế bằng chỉ thị hình thái và phân tử.
- Nghiên cứu hiện trạng, đặc điểm môi trường và phân cụm sinh thái phân bố của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế.
- Nghiên cứu đặc điểm và cấu trúc quần thể của cá Chình hoa ở tỉnh Thừa Thiên Huế dựa trên các chỉ thị hình thái.
- Đánh giá đa dạng di truyền quần thể cá Chình hoa ở tỉnh Thừa Thiên Huế bằng chỉ thị phân tử.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu được trình bày trong sơ đồ sau:



Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát thực địa và thu mẫu cá Chình hoa

Các mẫu cá Chình hoa được thu trực tiếp tại 7 vùng nghiên cứu (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Tuyến nghiên cứu và số lượng mẫu vật nghiên cứu

STT	Tuyến nghiên cứu	Ký hiệu	Số mẫu quan sát	Số mẫu giải phẫu	Số mẫu phân tích phân tử
1	Sông Ô Lâu	SOL	34	26	14 (HuePD)
2	Hệ thống sông Hương	SHU	105	64	10 (HueDTL)
3	Sông Truồi	STR	49	38	14 (HueDTR, HueND)
4	Sông Bù Lu	SBL	57	30	8 (HueBL)
5	Đầm Lăng Cô	LC	45	15	2 (HueLC)
6	Cửa biển Thuận An	TA	30	9	0
7	Cửa biển Tư Hiền	TH	30	7	0
Tổng			350	189	48

2.3.2. Phân tích đặc điểm hình thái, môi trường và bản đồ phân bố

Tổng cộng 21 chỉ số hình thái ngoài của cá Chình hoa đo đếm và chuẩn hóa trên toàn bộ 350 cá thể có khối lượng từ 3,0 – 4.500,0 g (120,0 – 1136,9 mm). Trong đó, 10 chỉ số được đo bằng cách sử dụng mặt trái của cơ thể hoặc mặt lưng của đầu, bao gồm: chiều dài tổng (TL), chiều dài đầu (LH), khởi điểm vây lưng (PD), khởi điểm vây hậu

môn (PA), khoảng cách vây lưng và vây hậu môn (AD), khoảng cách từ vây ngực đến vây lưng (PDH), chiều dài vây đuôi (T), Chiều dài thân (TR), đường kính mắt (E), khoảng cách giữa 2 mắt (IO). 10 ký tự được chuẩn hóa theo tỷ lệ LT hoặc LH: HL/TL, PD/TL, PA/TL, TR/TL, AD/TL, PDH/TL, T/TL, E/HL, IO/HL. Các chỉ số hình thái trong được mô tả và phân tích qua giải phẫu 189 mẫu vật.

Các thông tin về môi trường phân bố như: nhiệt độ, độ mặn, pH, DO được xác định bằng máy đo chuyên dụng; độ sâu được đo bằng đĩa Sachi; các thông tin về nền đáy, chế độ thủy triều, chu kỳ trăng, thời tiết, thời gian được xác định thông qua quan sát trực tiếp và dữ liệu khí tượng, thủy văn. Dùng máy ảnh để chụp khi quan sát, ghi nhật ký nghiên cứu, lập phiếu theo dõi để ghi lại kết quả tại thực địa.

Các tập dữ liệu bao gồm 20 chỉ số hình thái ngoài và 11 chỉ số môi trường phân bố của cá Chình hoa đã được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên mền Excell 2016. Phương pháp phân tích thành phần chính (PCA) và phân tích cụm thứ bậc (CA) đã được thực hiện trên phần mềm SPSS 22.0 để phân tích cấu trúc quần thể của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế dựa trên chỉ số hình thái và môi trường. Sử dụng máy định vị GPS để đánh dấu các vị trí thu mẫu và phần mềm ArcGIS ver 10.3 được sử dụng để vẽ bản đồ hiện trạng của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế.

2.3.4. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử

DNA tổng số của 48 mẫu cá Chình được tách chiết theo mô tả của Kumar và cs (2007) có sửa đổi. Các đoạn gen barcode từ các mẫu cá thu được bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu (Bảng 2.2).

Bảng 2.4. Trình tự đoạn mồi sử dụng để khuếch đại đoạn gen *COI* và *16S rRNA*

Đoạn gen	Chỉ thị đoạn mồi	Trình tự đoạn mồi (5' - 3')	Nguồn
<i>COI</i>	A.angFw-1 A.angRv-1	GCACTAAGCCTTCTAATCC GATGATTATTGTGGCAGAAG	Nguyên cứu hiện tại
<i>16S rRNA</i>	L2510 H3080	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT	Palumbi và cs (1991)

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Kit Isolate II PCR and Gel (Bioline) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó được giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp dideoxy terminator trên máy ABI PRISM[®] 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Công ty Maccrogen, Hàn Quốc. Các trình tự nucleotide được sắp xếp và hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit 7.2.5. Các trình tự cuối cùng được so sánh và đăng ký mã số truy cập trên ngân hàng dữ liệu Genbank là MN067923 - MN067970 cho 48 đoạn *COI* và MN633308 - MN633355 48 đoạn *16S rRNA* để xác định thành phần loài và phân tích đa dạng di truyền. Thành phần nucleotide, amino acid, các cây phát sinh chủng loại được phân tích bằng phần mềm Mega X. Các đoạn gen tham chiếu từ genbank (AP007242.1, HQ141374.1 cho *COI* và AB278871.1 cho *16S rRNA*) được sử dụng làm nhóm ngoài khi xây dựng cây phát sinh. Các chỉ số đa dạng di truyền quần thể, các kiểm định trung tính và giá trị Fst được thực hiện bằng phần mềm DNAsp 6.0. Phần mềm Network 10.0 được sử dụng để vẽ các mạng lưới haplotype. Giá trị Nm được tính theo công thức $Nm = (1 - Fst) / 4 Fst$.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thành phần loài cá Chình phân bố tại Thừa Thiên Huế

Hai loài cá Chình phân bố ở Thừa Thiên Huế đã được xác định bằng chỉ thị hình thái và phân tử (Bảng 3.1 và Bảng 3.2). Dựa trên các chỉ số hình thái hoàn toàn có thể phân biệt được sự sai khác giữa hai loài. Các chỉ thị phân tử được sử dụng đã hỗ trợ tính chính xác về thành phần loài của các mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu này là cá Chình hoa (*A. marmorata*). Ngoài ra, các chỉ thị phân tử đã hỗ trợ phân loại các đơn vị dưới loài và khẳng định được cá Chình mun ở Thừa Thiên Huế là *A. biocolor pacifica*.

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái của *Anguilla* spp. được thu thập tại Thừa Thiên Huế

Mẫu	<i>Anguilla</i> sp.01	<i>Anguilla</i> sp.02	<i>Anguilla</i> sp.03	<i>Anguilla</i> sp.04	<i>Anguilla</i> sp.05	<i>Anguilla</i> sp.06
W (g)	34,0	89,0	3.200,0	133,1	388,2	491,0
TL (mm)	255,0	362,0	1.080,0	405,0	540,0	613,0
HL (mm)	33,0	49,0	160,0	55,0	75,0	80,0
PD (mm)	6,5	8,4	31,0	11,0	15,0	27,0
PA (mm)	97,0	152,0	500,0	190,0	260,0	270,0
AD (mm)	42,0	59,0	190,0	80,0	110,0	0,0
TR (mm)	64,0	103,0	340,0	135,0	155,0	190,0
PDH (mm)	32,0	35,0	150,0	55,0	75,0	190,0
PA/TL(%)	39,0	42,0	46,0	47,0	48,0	44,0
HL/TL(%)	12,9	13,5	14,8	13,6	13,9	13,0
TR/TL(%)	25,1	28,5	31,5	33,3	28,7	30,1
AD/TL(%)	16,5	16,3	17,6	19,7	20,4	0,0
PDH/TL(%)	12,5	9,7	13,8	13,6	13,9	30,9
Màu sắc	Có	Có	Có	Có	Có	Không
Xương hàm	Hẹp	Hẹp	Hẹp	Hẹp	Hẹp	Rộng
Loài	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>bicolor</i>

Bảng 3.2. Kết quả xác định thành phần loài cá Chình *Anguilla* ở Thừa Thiên Huế từ dữ liệu Genbank

Mẫu vật	Chỉ thị hình thái	Chỉ thị phân tử	COI		16S rRNA	
			Mã số Genbank	Tỉ lệ tương đồng (%)	Mã số Genbank	Tỉ lệ tương đồng (%)
<i>Anguilla</i> sp.01	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99,44 99,53	AB278871.1	99,69
<i>Anguilla</i> sp.02	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99,53 99,29	AB278871.1	99,84
<i>Anguilla</i> sp.03	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99,56 99,64	AB278871.1	99,84
<i>Anguilla</i> sp.04	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99,76 99,53	AB278871.1	99,84
<i>Anguilla</i> sp.05	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99,56 99,64	AB278871.1	99,69
<i>Anguilla</i> sp.06	<i>A. bicolor</i>	<i>A. bicolor</i> <i>pacifica</i>	AP007237.3	99,53	AP007237.3 AB278743.1	99,84 99,69

3.2. Hiện trạng phân bố, đặc điểm môi trường và phân cụm sinh thái phân bố của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế

3.2.1. Hiện trạng phân bố của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế

3.3.2.1. Phân bố theo thời gian

Cá Chình hoa xuất hiện quanh năm tại Thừa Thiên Huế có kích cỡ từ 100 – 1100 mm (3,0 – 4,500 g), nhiều nhất từ 200 – 599 mm (> 15 g). Sự phân bố của cá Chình hoa được chia thành hai thời kì, mùa khô từ tháng 1 - tháng 4 (điển hình bởi sự xuất hiện của cá con TL > 200 mm) và mùa mưa từ tháng 8 - tháng 12 hàng năm (điển hình bởi sự xuất hiện của cá trưởng thành) (Bảng 3.3).

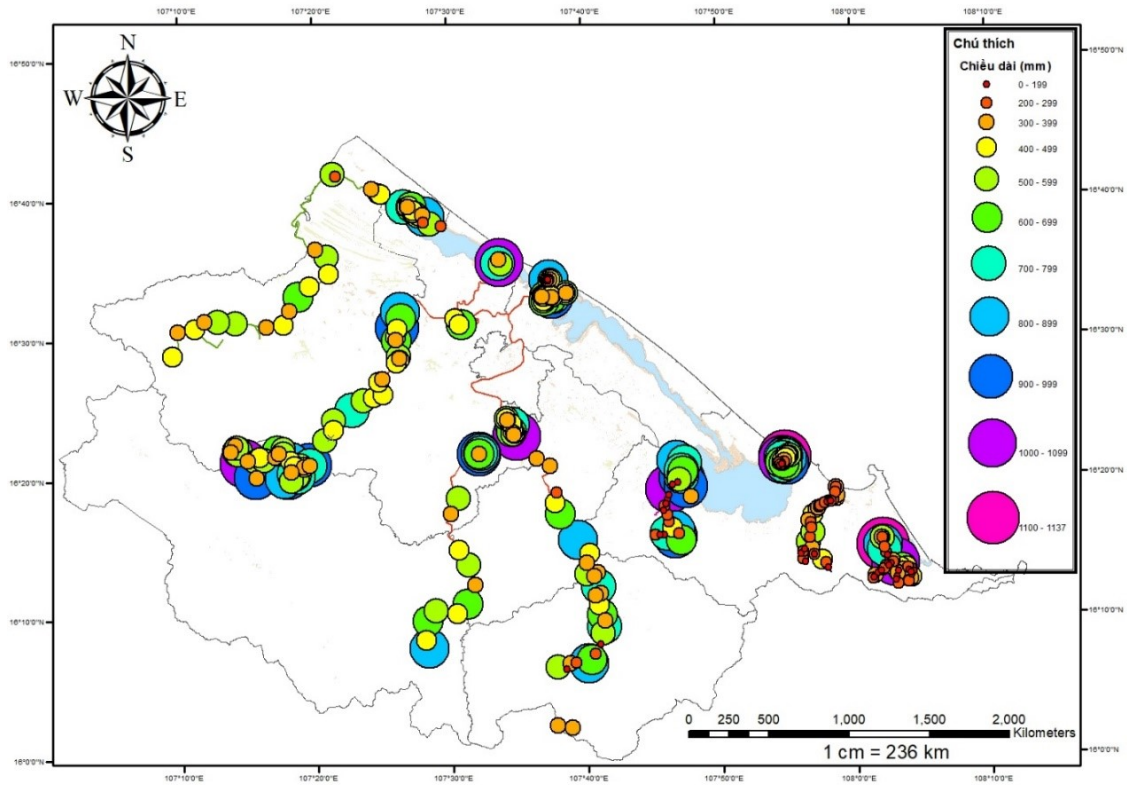
Bảng 3.3. Số lượng và tỉ lệ các nhóm kích cỡ theo thời gian

Tháng	Kích cỡ (mm)											Tổng	Tỉ lệ (%)
	100 - 199	200 - 299	300 - 399	400 - 499	500 - 599	600 - 699	700 - 799	800 - 899	900 - 999	1000 - 1099	1100 - 1199		
1	0	5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	8	2,3
2	7	5	6	3	1	1	0	0	0	0	0	23	6,6
3	22	18	22	22	16	4	3	1	2	0	0	110	31,4
4	3	4	9	3	6	0	1	0	0	0	0	26	7,4
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	3	0,9
7	0	0	1	3	0	0	1	1	0	1	0	7	2,0
8	1	1	7	10	9	5	3	3	1	1	1	42	12,0
9	0	0	0	6	1	6	3	3	1	0	0	20	5,7
10	5	14	5	2	1	4	4	5	1	2	1	44	12,6
11	0	1	3	7	4	2	5	1	1	1	0	25	7,1
12	6	10	8	5	4	3		1	3	2	0	42	12,0
Tổng	44	58	63	63	42	25	20	15	10	8	2	350	100,0
Tỉ lệ (%)	12,6	16,6	18,0	18,0	12,0	7,1	5,7	4,3	2,9	2,3	0,6		

3.2.1.2. Phân bố theo không gian

Bảng 3.4. Số lượng các nhóm kích cỡ khai thác tại các vùng nghiên cứu

TL (mm)	SOL	SHU	STR	SBL	LC	TA	TH
100 - 199	0	0	2	19	15	5	3
200 - 299	3	0	6	25	14	6	5
300 - 399	8	21	12	9	8	4	1
400 - 499	12	29	4	2	3	6	7
500 - 599	7	23	4	2	1	4	1
600 - 699	2	11	6	0	1	1	4
700 - 799	1	7	6	0	1	2	3
800 - 899	1	5	4	0	1	1	3
900 - 999	0	5	3	0	0	1	1
1000 - 1099	0	4	2	0	1	0	1
1100 - 1199	0	0	1	0	1	0	1
Tổng	34	105	50	57	46	30	30
Tỉ lệ (%)	9,7	30,0	14,3	16,3	13,1	8,6	8,6



Hình 3.5. Hiện trạng phân bố theo kích cỡ

Tại các thủy vực ở Thừa Thiên Huế, cá Chình hoa phân bố chủ yếu có kích cỡ từ 300 – 699 mm, sống ở vùng hạ lưu hoặc các khe suối lớn nhỏ ở vùng thượng nguồn. Cá Chình hoa có kích cỡ > 700 mm xuất hiện tập trung ở vùng hạ lưu và rải rác ở trung và thượng lưu. Cá Chình hoa kích cỡ nhỏ (< 200 mm) chỉ xuất hiện ở vùng hạ lưu. Càng lên cao, sự xuất hiện của cá Chình hoa có kích thước 100 – 299 mm càng giảm (Hình 3.5 và Bảng 3.4).

3.2.2. Đặc điểm môi trường phân bố và phân cụm sinh thái

3.2.2.1. Đặc điểm môi trường phân bố

Bảng 3.5. Đặc điểm môi trường phân bố của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế

Thông số môi trường	Trung bình (Min – Max)
Nhiệt độ (°C)	26,3 ± 1,65 (21,0 – 32,0)
Độ mặn (‰)	1,5 ± 3,38 (0,0 – 15,0)
DO (mg/L)	8,0 ± 0,47 (6,5 – 9,5)
pH	7,2 ± 0,51 (6,5 – 8,6)
Độ sâu (m)	3,4 ± 3,07 (0,3 – 11,0)
Chỉ số sinh thái	Tần số (%)
Tháng	1 (2,3 %); 2 (6,6 %); 3 (31,4 %); 4 (7,4 %); 6 (0,9 %); 7 (2,0 %); 8 (12,0 %); 9 (5,7 %); 10 (12,6 %); 11 (7,1 %); 12 (12,0 %)
Thời tiết	Mưa (72,9 %), không mưa (27,1 %)
Màu nước	Đục, bạc (48,9 %); trong (51,1 %)
Nền đáy	Rêu trơn, bằng phẳng (0,9 %); Cát bùn (0,9 %); Đá, cát bùn (26,3 %); Đá, hang hốc (72,0 %)
Chu kỳ trăng	Tối trời (89,7 %), sáng trăng (20,3 %)
Chế độ thủy triều	Có ảnh hưởng (9,8 %), không bị ảnh hưởng (90,2 %)

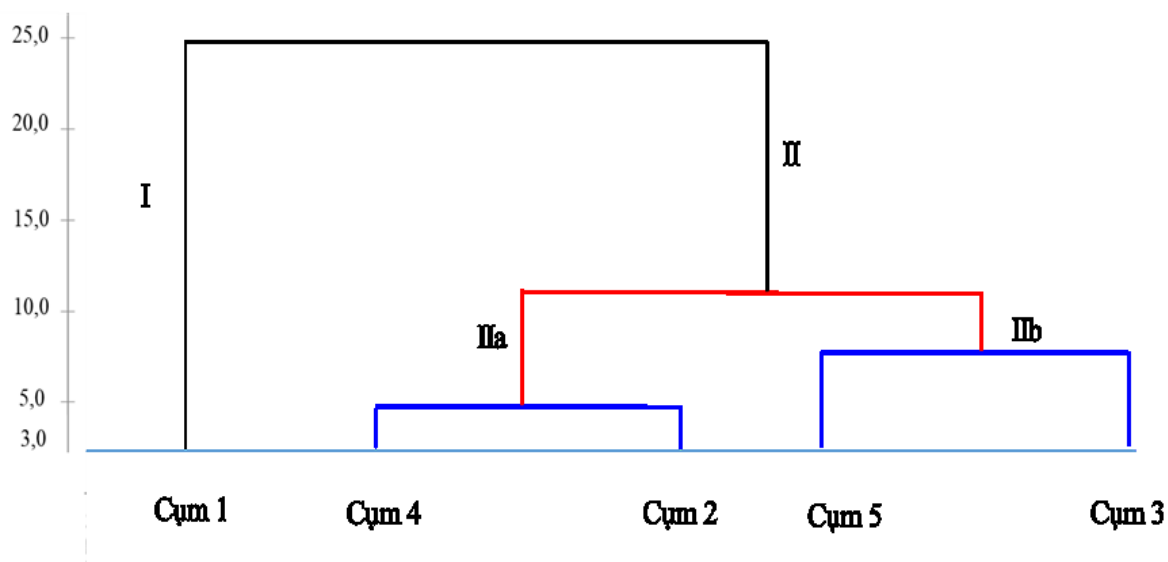
Bảng 3.6. Đặc điểm môi trường tại các vùng nghiên cứu

Tên thủy vực	Ký hiệu	Vị trí	Số mẫu	Độ sâu	Thủy triều	Nhiệt độ	Độ mặn	pH	DO	Nền đáy	Dòng chảy
Sông Ô Lâu (SOL)	PD, OL	Hạ nguồn sông Ô Lâu	8	2,5 – 4,5	Có	25,5 - 27,5	0 - 13	6,7 – 8,8	7,7 – 8,8	Đá, cát bùn	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông
	PD	Thượng nguồn sông Ô Lâu tại Phong Mỹ, Phong Điền	26	0,4 - 6,5	Không	24 - 28,5	0	6,6 – 7,5	7,6 – 9,1	Đá, hang hốc	Dòng chảy nhẹ, liên tục từ tây sang đông
Hệ thống sông Hương (SHU)	SH/DTL	Trung và hạ lưu sông Hương	32		Không	24,5 - 28	0	6,7 – 7,6	7,8 - 9,1	Đá, cát thô	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông
	SBO	Sông Bồ tại Quảng An, Quảng Thọ, Hương Vân	21	0,5 – 7,0	Không	26 - 32	0 - 10	6,8 – 8,6	8,0 – 9,1	Đá lớn, cát thô	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông
	AL	Thượng nguồn sông Hương, sông Bồ tại Hồng Kim, Hồng Hạ, A Roàng	52	0,3 – 5,2	Không	24 – 30,5	0	6,5 – 7,7	6,5 - 8,8	Đá, hang hốc	Dòng chảy nhẹ, liên tục, từ tây sang đông
Sông Truồi (STR)	ND	Thượng nguồn sông Hương, sông Truồi tại Thượng Quảng, Trung Lưu huyện Nam Đông	29	0,4 – 6,5	Không	24,0 – 30,0	0	6,7 – 7,6	8,0 – 9,1	Đá lớn, hang hốc	Dòng chảy nhẹ, liên tục, từ tây sang đông
	DTR	Hạ nguồn sông Truồi tại đập Truồi	20	0,4 - 11	Không	25 – 29,5	0 - 5	6,5 – 7,4	7,6 – 8,3	Đá, hang hốc và cát bùn	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông
Sông Bù Lu (SBL)	SBL	Phú Lộc	33	0,4 – 6,5	Không	24 - 26	0 - 11	6,7 – 7,5	7,5 – 8,8	Đá lớn, hang hốc	Dòng chảy nhẹ, liên tục, từ tây sang đông
	PL	Thượng nguồn sông Bù Lu, Phú Lộc	24	0,4 – 2,5	Không	24 – 28,5	0	6,7 – 7,6	7,4 – 8,5	Đá lớn, hang hốc	Dòng chảy nhẹ, liên tục, từ tây sang đông
Suối đổ về đầm Lập An, cửa Lăng Cô	LC	Thị trấn Lăng cô, Phú Lộc	45	0,4 – 7,0	Có/ Không	23,5 – 29,0	0 - 10	6,7 - 8,6	6,5 – 8,5	Đá, cát bùn	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông
Cửa biển Thuận An	TA	Thuận An, Hải Dương	30	4,1 – 7	Có	22 – 29,5	3 – 12	6,8 - 8,6	7,5 – 9,1	Đá, cát bùn	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông
Cửa biển Tư Hiền	TH	Tư Hiền	30	4 - 7	Có	21 – 29,0	3 - 15	6,9 – 8,6	7,5 – 8,9	Đá, cát bùn	Dòng chảy mạnh, từ tây sang đông

3.2.1.2. Phân tích thành phần chính và phân cụm sinh thái

Bảng 3.7. Phân tích thành phần chính các yếu tố môi trường phân bố của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế

Chỉ số	Thành phần chính		
	1	2	3
Tháng	0,514	-0,468	0,394
Thời tiết (mưa)	-0,701	0,416	0,218
Nhiệt độ	-0,565	0,197	0,241
Độ mặn	0,462	0,788	-0,014
DO	0,368	-0,075	0,650
pH	0,432	0,684	0,206
Màu nước	0,594	-0,492	-0,066
Độ sâu	0,608	0,045	0,277
Nền đáy	-0,541	-0,219	0,061
Chu kì trăng	-0,609	0,174	0,439
Chế độ thủy triều	0,345	0,766	-0,188
Eigenvalue (giá trị riêng)	3,115	2,435	1,039
Variability (Phương sai) (%)	28,321	22,133	9,447
Cumulative (Tích lũy) %	28,321	50,454	59,901



Hình 3.13. Sơ đồ phân cụm các yếu tố môi trường phân bố

Bảng 3.8. Đặc điểm môi trường của các cụm sinh thái phân bố của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế

Chỉ số	Cụm				
	1	2	3	4	5
Số cá thể	171 DTL(22), DTR (13), LC (7), ND (8), OL (8), PL (14), SBL (23), AL (23), SBO (16), TA (19), TH (18)	50 DTL (4), DTR (5), LC (16), ND (10), AL (14), TA (1)	68 DTL (6), DTR (2), LC(3), ND(9), PD (25), SBL(10), AL(11), SBO(2)	36 LC(20), ND (2), PL (10), AL (1) SBO (3)	25 LC(1), TA(10), TH (14)
Nhiệt độ (°C)	21,0 - 28,5	24,8 - 30,5	24,0 - 28,5	23,5 - 32,0	22,0 - 29,0
Độ mặn (‰)	0,0 - 13,0	0,0 - 10,0	0,0 - 10,0	0,0	5,0 - 15,0
DO (mg/l)	6,5 - 9,5	6,5 - 8,5	6,7 - 8,5	6,7 - 8,5	7,5 - 9,5
pH	6,5 - 8,4	6,7 - 8,4	6,6 - 8,6	6,7 - 7,8	6,9 - 8,6
Độ sâu (m)	0,3 - 31,0	0,4 - 6,0	0,4 - 7,0	0,4 - 3,7	4,1 - 7,0
Thời tiết (mưa)	Mưa (100%)	Mưa (2,0%); Không mưa (98,0%)	Mưa (100%)	Không mưa (100%)	Mưa (56,5%); Không (43,5%)
Màu nước	Đục, bạc (100%)	Trong (88,0%); Đục, bạc (12,0%)	Trong (100,0%)	Trong (100,0%)	Trong (100,0%)
Nền đáy	Rêu trơn, bằng phẳng (0,6%); Cát bùn (1,8%); Đá, cát bùn (28,0%); Đá, hang hốc (59,6%)	Rêu trơn, bằng phẳng (4,0%); Đá, cát bùn (6,0%); Đá, hang hốc (90,0%)	Đá, hang hốc (100,0%)	Đá, hang hốc (100,0%)	Đá, cát bùn (95,7%); Đá, hang hốc (4,3%)
Chu kì trăng	Tối trời (100%)	Tối trời (100%)	Tối trời (100%)	Tối trời (100%)	Tối trời (100%)
Thủy triều	Không (93,6%); có (6,4%)	Không (100%)	Không (100%)	Không (100%)	Có (100%)
Tháng	Tháng 1 (1,2%); 2 (4,1%); tháng 3 (12,9%); 4 (6,4%); tháng 6 (0,6%); 8 (18,1%); tháng 9 (10,5%); 10 (24,0%); tháng 11 (12,3%); 12 (9,9%)	Tháng 1 (4,0%); 2 (18,0%); tháng 3 (46,0%); 4 (4,0%); tháng 7 (6,0%); 8 (4,0%); tháng 10 (6,0%); 11 (4,0%); tháng 12 (8,0%)	Tháng 1 (2,9%); 3 (47,1%); tháng 4 (2,9%); 8 (10,3%); tháng 9 (2,9%); 11 (2,9%); tháng 12 (30,9%)	Tháng 3 (58,3%); tháng 4 (25,0%); tháng 8 (11,1%); tháng 9 (5,6%)	Tháng 1 (8,7%); 2 (30,4%); tháng 3 (43,5%); tháng 4 (8,7%); tháng 7 (8,7%)
Kích cỡ (mm)	100 – 200 (5,3%), 200 – 299 (15,2%), 300 – 399 (17,5%), 400 – 499 (19,3%), 500 – 599 (13,5%), 600 – 699 (9,4%), 700 – 799 (7,6%), 800 – 899 (4,1%), 900 – 999 (3,5%), 1000 – 1099 (3,5%), 1100 – 1199 (1,2%)	100 – 200 (20%), 200 – 299 (16%), 300 – 399 (16%), 400 – 499 (16%), 500 – 599 (12%), 600 – 699 (6%), 700 – 799 (4%), 800 – 899 (6%), 900 – 999 (2%), 1000 – 1099 (2%)	100 – 200 (8,8%), 200 – 299 (8,8%), 300 – 399 (26,5%), 400 – 499 (26,5%), 500 – 599 (14,7%), 600 – 699 (5,9%), 700 – 799 (2,9%), 800 – 899 (2,9%), 900 – 999 (1,5%), 1000 – 1099 (1,5%)	100 – 200 (36,1%), 200 – 299 (27,8%), 300 – 399 (16,7%), 400 – 499 (5,6%), 500 – 599 (5,6%), 700 – 799 (2,8%), 800 – 899 (2,8%), 900 – 999 (2,8%)	100 – 200 (24%), 200 – 299 (28%), 400 – 499 (16%), 500 – 599 (4%), 600 – 699 (8%), 700 – 799 (8%), 800 – 899 (8%), 900 – 999 (4%)

3.3. Đặc điểm hình thái của cá Chình hoa

3.3.1. Hình thái ngoài

Màu sắc của vây ngực, sự xuất hiện của các đốm hoa và màu sắc cơ thể thay đổi tương ứng với 4 giai đoạn phát triển: cá con, cá giống, cá tiền trưởng thành và cá trưởng thành (Bảng 3.9). Giá trị các chỉ số hình thái thể hiện trong Bảng 3.10.

Bảng 3.9. Màu sắc cơ thể của cá Chình hoa trong quần thể ở Thừa Thiên Huế

STT	Chỉ tiêu	W (g)	TL (mm)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Cơ thể có màu vàng, lưng có dải nâu, đốm chưa rõ; Vây vàng nhạt gần như trong suốt.	3,0 – 20,7 $10,9 \pm 4,91$	120,0 – 228,5 $180,1 \pm 30,58$	61	17,4
2	Cơ thể có màu vàng, có đốm hoa màu xám rõ; Vây màu vàng.	13,4 – 148,8 $71,5 \pm 39,47$	187,0 – 410,0 $313,9 \pm 60,81$	104	29,7
3	Lưng nâu, đốm hoa rõ, màu xám, bụng xám trắng; Vây màu vàng nâu.	143,5 – 4.500,0 $657,4 \pm 805,41$	387,0 – 1136,9 $574,7 \pm 170,61$	135	38,6
4	Lưng vàng nâu, đốm đen, bụng và đuôi vàng; Vây màu đen hoặc đen đỏ	165,4 – 4.500,0 $1.310,0 \pm 1.101,29$	410,0 – 1136,9 $726,4 \pm 196,19$	50	14,3
Tổng				350	100

Bảng 3.10. Giá trị các chỉ số hình thái ngoài của cá Chình hoa

Chỉ số	TB $\pm$ SD Min - Max	Chỉ số	TB $\pm$ SD Min - Max
W(g)	470,5 $\pm$ 788,19 (3,0 - 4500,0)	TL (mm)	452,9 $\pm$ 231,85 (120,0 - 1136,9)
HL (mm)	62,3 $\pm$ 27,25 (16,0 - 160,0)	HL/TL (%)	13,9 $\pm$ 0,64 (11,2 - 16,6)
PD (mm)	117,8 $\pm$ 51,71 (29,1 - 315,0)	PD/TL (%)	26,2 $\pm$ 1,35 (21,2 - 29,2)
PA (mm)	190,6 $\pm$ 83,14 (51,7 - 500,0)	PA/TL (%)	42,4 $\pm$ 1,97 (37,5 - 48,1)
TR (mm)	128,3 $\pm$ 56,42 (32,7 - 340,0)	TR/TL (%)	28,5 $\pm$ 2,04 (22,7 - 34,3)
AD (mm)	72,8 $\pm$ 32,21 (18,5 - 190,0)	AD/TL (%)	16,2 $\pm$ 1,57 (11,9 - 21,3)
PDH (mm)	55,5 $\pm$ 25,21 (11,7 - 160,0)	PDH/TL (%)	12,3 $\pm$ 1,43 (7,3 - 15,5)
T (mm)	257,7 $\pm$ 110,85 (66,3 - 614,6)	T/TL (%)	57,6 $\pm$ 1,97 (51,9 - 62,5)
E (mm)	6,0 $\pm$ 2,90 (1,4 - 18,0)	E/HL (%)	9,4 $\pm$ 1,27 (5,9 - 11,9)
IO (mm)	13,5 $\pm$ 6,13 (3,2 - 35,0)	IO/HL (%)	21,0 $\pm$ 1,86 (16,0 - 25,0)

3.3.2. Hình thái cấu tạo trong

Bảng 3.11. Cỡ miệng của cá Chình hoa phân bố ở Thừa Thiên Huế

Chỉ số	TB $\pm$ SD	Min - max
Cỡ miệng (mm)	31,3 $\pm$ 16,06	6,7 - 79,5
Cỡ miệng/chiều dài thân (%)	7,0 $\pm$ 0,48	5,6 - 7,9

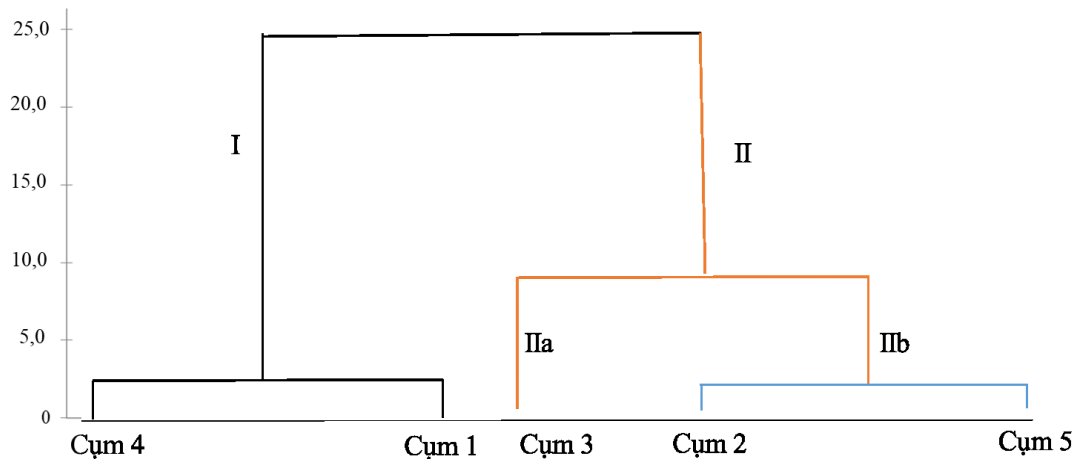
Bảng 3.12. Chiều dài dạ dày và ruột của cá Chình hoa

Chỉ số	TB $\pm$ SD	Min - Max
Dài dạ dày (mm)	138,1 $\pm$ 72,38	31,8 - 398,5
Dài dạ dày/chiều dài thân (%)	30,9 $\pm$ 2,42	26,5 - 35,3
Chiều dài ruột (mm)	167,3 $\pm$ 91,63	38,5 - 470,7
RLG	0,37 $\pm$ 0,041	0,30 - 0,43

3.3.3. Cấu trúc quần thể cá Chình hoa dựa trên các chỉ số hình thái ngoài

Bảng 3.13. Phân tích thành phần chính các tính trạng hình thái của cá Chình hoa

Đặc điểm	F1	F2	F3	F4	F5
TL (mm)	0,954	0,040	0,000	0,000	0,003
HL (mm)	0,947	0,046	0,001	0,000	0,000
PD (mm)	0,973	0,017	0,001	0,003	0,000
PA (mm)	0,982	0,013	0,000	0,000	0,001
TR (mm)	0,986	0,004	0,000	0,000	0,004
AD (mm)	0,965	0,007	0,003	0,012	0,004
PDH (mm)	0,963	0,001	0,001	0,016	0,004
T (mm)	0,920	0,069	0,000	0,000	0,004
HL/TL	0,027	0,046	0,149	0,101	0,676
PD/TL	0,105	0,382	0,195	0,253	0,064
PA/TL	0,167	0,767	0,005	0,050	0,010
TR/TL	0,118	0,839	0,003	0,013	0,026
AD/TL	0,054	0,320	0,091	0,526	0,009
PDH/TL	0,056	0,474	0,062	0,391	0,016
T/TL	0,167	0,767	0,005	0,050	0,010
IO (mm)	0,949	0,031	0,006	0,001	0,003
E (mm)	0,926	0,022	0,020	0,002	0,006
E/HL	0,023	0,037	0,610	0,070	0,064
IO/HL	0,005	0,029	0,555	0,104	0,099
Đặc điểm hình thái	0,772	0,001	0,005	0,001	0,001
Giá trị riêng	11,839	3,930	1,718	1,597	1,005
Phương sai (%)	56,378	18,716	8,181	7,603	4,786
Tích lũy (%)	56,378	75,094	83,275	90,878	95,664

**Hình 3.26.** Cây phát sinh di truyền thể hiện mối quan hệ của 350 cá thể cá Chình hoa dựa trên khoảng cách Eculidean sử dụng phương pháp Ward

Bảng 3.14. Đặc điểm hình thái cá Chình hoa ở 5 cụm sử dụng phương pháp Ward dựa trên khoảng cách Ecudid

Chỉ số	Cụm				
	1	2	3	4	5
Số cá thể	76 DTL(13), DTR(2), LC(12), ND(11), PD(9), OL(4), PL(7), SBL(14), TA(2), TH(2)	70 DTL(7), DTR(7), LC(2), ND(6), PD(6), OL(2), PL(2), TA(6), AL(18), SBO(6)	83 DTL(6), DTR (1), LC(2), ND (6), PD (9), TA(11), TH (8), AL(28), SBO(12)	85 DTR (3), LC(26), ND(4), OL(3), PL(15), SBL(19), TA(9), TH(6)	36 DTL(6), DTR(7), LC(3), ND(2), PD(1), TA(2), TH(6), AL(6), SBO(3)
W (g)	160,8 ± 93,30 (29,0 – 469,5)	731,6 ± 297,01 (374,9 - 1540,3)	195,4 ± 81,84 (52,3 - 369,0)	14,8 ± 8,05 (3,0 – 34,0)	2406,1 ± 1025,5 (143,5 - 4500)
TL (mm)	401,3 ± 74,21 (260,0 – 552,0)	647,3 ± 74,80 (540,0 - 814,0)	435,5 ± 56,73 (324,6 - 532,9)	193,4 ± 35,04 (120,0 - 255,0)	915,5 ± 160,81 (407,0 - 1136,9)
HL (mm)	65,0 ± 16,31 (35,0 – 91,2)	82,7 ± 10,83 (58,0 - 122,4)	78,9 ± 4,18 (64,0 - 91,2)	26,7 ± 5,36 (16,0 - 39,0)	94,4 ± 29,99 (45,0 - 160,0)
PD (mm)	124,1 ± 30,89 (63,4 - 175,0)	154,7 ± 19,70 (112,0 - 210,6)	150,6 ± 7,37 (135,7 - 175,0)	49,7 ± 9,46 (29,1 - 68,0)	179,1 ± 57,83 (90,0 - 315,0)
PA (mm)	199,5 ± 48,74 (112,0 - 265,6)	254,3 ± 30,50 (188,0 - 341,3)	241,0 ± 10,99 (221,5 - 265,6)	80,1 ± 15,05 (51,7 - 106,0)	288,3 ± 88,91 (150,0 - 500,0)
TR (mm)	134,5 ± 33,28 (71,9 - 182,6)	171,6 ± 22,46 (130,0 - 232,4)	162,1 ± 10,92 (140,1 - 182,6)	53,5 ± 10,05 (32,7 - 72,0)	193,8 ± 59,62 (105,0 - 340,0)
AD (mm)	75,4 ± 18,95 (38,9 - 112,4)	99,6 ± 14,30 (70,5 - 140,0)	90,4 ± 8,05 (70,1 - 112,4)	30,4 ± 6,24 (18,5 - 43,1)	109,1 ± 32,37 (60,0 - 190,0)
PDH (mm)	59,1 ± 15,88 (22,0 - 90,0)	72,0 ± 11,47 (45,4 - 103,2)	71,7 ± 8,13 (58,9 - 90,0)	23,0 ± 4,66 (11,7 - 33,0)	84,7 ± 29,08 (45,0 - 160,0)
T (mm)	268,2 ± 67,44 (147,0 - 391,4)	338,4 ± 40,37 (240,0 - 488,3)	327,0 ± 16,61 (275,0 - 391,4)	113,3 ± 20,48 (66,3 - 158,0)	395,6 ± 118,56 (192,0 - 614,6)
HL/TL (%)	13,9 ± 0,68 (11,2 - 16,6)	13,9 ± 0,65 (13,0 - 15,9)	13,9 ± 0,69 (11,2 - 15,1)	13,8 ± 0,61 (11,2 - 15,9)	13,8 ± 0,43 (13,0 - 14,8)
PD/TL (%)	26,5 ± 1,26 (23,1 - 29,2)	26,1 ± 1,41 (21,2 - 28,7)	26,5 ± 1,24 (23,3 - 29,2)	25,7 ± 1,26 (21,2 - 28,6)	26,1 ± 1,50 (21,2 - 29,2)
PA/TL (%)	42,7 ± 1,85 (37,5 - 47,6)	42,9 ± 2,37 (37,8 - 48,1)	42,4 ± 1,84 (38,9 - 45,8)	41,4 ± 1,49 (38,0 - 44,7)	42,2 ± 1,87 (38,0 - 46,3)
TR/TL (%)	28,8 ± 1,92 (22,7 - 33,9)	29,0 ± 2,50 (23,1 - 34,3)	28,5 ± 1,89 (24,6 - 32,0)	27,7 ± 1,59 (23,7 - 31,1)	28,4 ± 1,93 (23,7 - 31,5)
AD/TL (%)	16,2 ± 1,47 (11,9 - 20,4)	16,8 ± 1,87 (12,4 - 21,3)	15,9 ± 1,40 (12,3 - 19,3)	15,7 ± 1,47 (12,3 - 20,4)	16,0 ± 1,26 (13,7 - 18,4)
PDH/TL (%)	12,6 ± 1,42 (7,3 - 15,5)	12,2 ± 1,42 (8,0 - 14,5)	12,6 ± 1,42 (9,4 - 15,5)	11,9 ± 1,32 (8,0 - 15,5)	12,4 ± 1,47 (8,0 - 14,8)
T/TL (%)	57,3 ± 1,85 (52,4 - 62,5)	57,1 ± 2,37 (51,9 - 62,2)	57,6 ± 1,84 (54,2 - 61,1)	58,6 ± 1,49 (55,3 - 62,0)	57,8 ± 1,87 (53,7 - 62,0)
IO (mm)	14,1 ± 4,15 (7,0 - 20,2)	17,9 ± 2,46 (13,0 - 27,6)	17,6 ± 1,52 (13,8 - 20,2)	5,7 ± 1,36 (3,2 - 8,8)	20,7 - 6,26 (9,0 - 35,0)
E (mm)	6,2 ± 2,00 (2,6 - 9,9)	8,2 ± 1,55 (5,0 - 13,1)	7,9 ± 1,06 (4,9 - 9,9)	2,5 ± 0,60 (1,4 - 4,0)	9,3 ± 3,16 (4,0 - 18,0)
E/HL (%)	9,2 ± 1,34 (5,9 - 11,9)	9,5 ± 1,27 (6,1 - 11,7)	9,5 ± 1,23 (5,9 - 11,9)	9,4 ± 1,17 (7,3 - 11,5)	9,5 ± 1,16 (7,7 - 11,6)
IO/HL (%)	20,9 ± 1,67 (16,7 - 24,2)	20,9 ± 1,67 (17,6 - 24,1)	21,2 ± 1,61 (16,7 - 24,2)	21,2 ± 2,20 (16,0 - 25,0)	21,2 ± 2,10 (17,6 - 24,2)
Hình thái ngoài	màu vàng, đốm hoa rõ, vây ngực màu vàng (69,7%); lưng màu nâu, đốm hoa rõ, bụng màu xám trắng, vây vàng nâu (23,7%) và lưng màu vàng nâu, đốm màu đen, bụng vàng, vây đen hoặc đỏ đen (6,6%)	lưng nâu, hoa rõ, bụng xám trắng: 65,7%; lưng vàng nâu, đốm đen, bụng và đuôi vàng, vây đen hoặc đỏ đen: 34,3%	màu vàng, đốm hoa rõ, vây ngực màu vàng: 32,5%; lưng nâu, hoa rõ, bụng xám trắng: 62,7%; lưng vàng nâu, đốm đen, bụng và đuôi vàng, vây đen hoặc đỏ đen: 4,8%	màu vàng, đốm hoa chưa rõ, vây ngực có màu vàng nhạt, gần như trong suốt (71,8%) và cá có màu vàng, đốm hoa rõ, vây ngực màu vàng (28,2%)	lưng nâu, hoa rõ, bụng xám trắng: (52,8%), lưng vàng nâu, đốm đen, bụng và đuôi vàng, vây đen hoặc đỏ đen: (47,2%)

3.3. Đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử

3.3.1. Phân lập đoạn gen *COI* và *16S rRNA*

Các đoạn DNA barcode đã được phân lập thành công với mã số trên Genbank là MN067923 - MN067970 (*COI*) và MN633308 - MN633355 (*16S rRNA*) chiều dài chuỗi lần lượt là: 845 bp và 641 bp.

3.3.2. Đa dạng di truyền quần thể

3.3.2.1. Mức độ đa dạng và xu hướng tiến hóa

Mức độ đa dạng di truyền của quần thể được trình bày trong Bảng 3.15, Bảng 3.16 và Bảng 3.17.

Bảng 3.15. Phân tích tính trung lập dựa trên trình tự đoạn gen *COI*

Quần thể	DTL	DTR	ND	PD	PL	TTH
Số lượng mẫu	10	5	9	14	10	48
H	5	4	6	9	5	17(35,42%)
S	7	4	6	9	6	20
Hd	0,76 ± 0,017	0,9 ± 0,026	0,89 ± 0,008	0,88 ± 0,0062	0,76 ± 0,017	0,801 ± 0,003
Π	0,00185	0,00190	0,00178	0,00242	0,00161	0,00196
Tajima's D	-1,573*	-1,0938	-1,3984	-1,06599	-1,4929	-2,03402*
Fu's Fs	-1,181*	-1,405*	-2,978*	-4,742*	-1,507	-12,2282*
Fu and Li's Fs	-1,818	-1,0938	-1,5509	-1,07521	-1,6893	-2,93225*
Fu and Li's D	-1,634	-1,0938	-1,3904	-0,8946	-1,51	-2,70391*

Bảng 3.16. Phân tích tính trung lập dựa trên trình tự đoạn gen *16S rRNA*

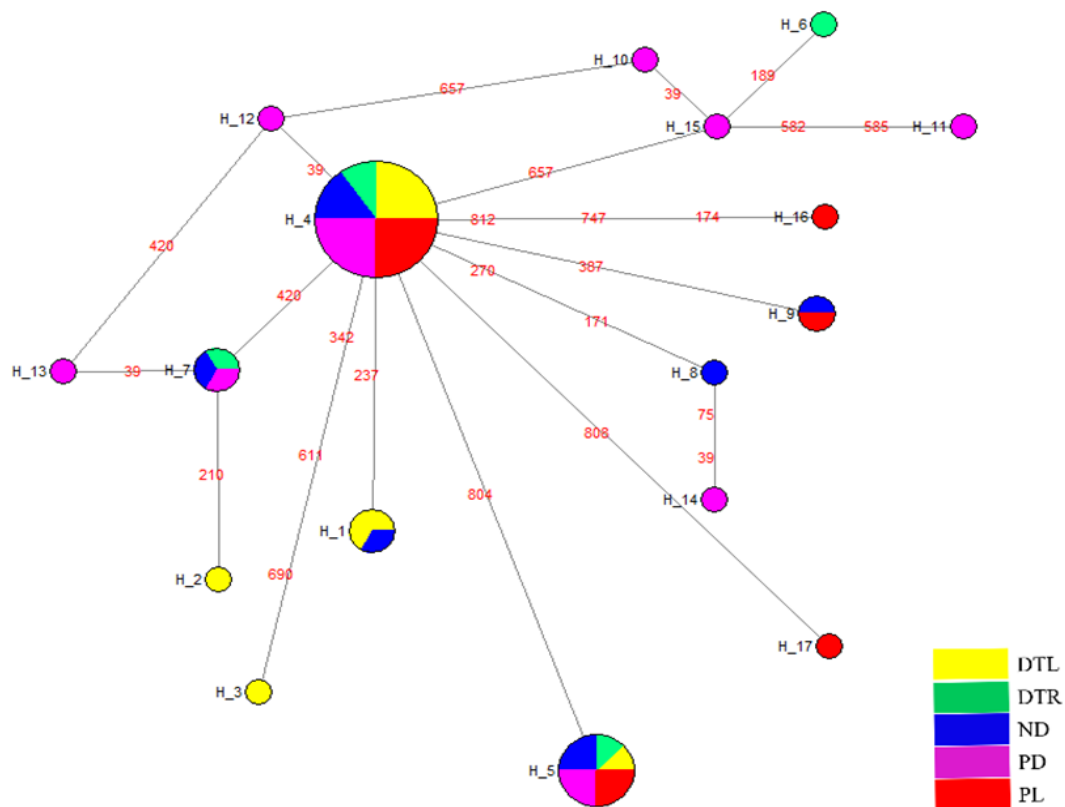
Quần thể	DTL	DTR	ND	PD	PL	TTH
Số mẫu	10	5	9	14	10	48
H	4	3	3	4	3	8(16,67%)
S	3	2	2	3	2	7
Hd	0,53 ± 0,032	0,70 ± 0,048	0,64 ± 0,016	0,58 ± 0,019	0,38 ± 0,033	0,53 ± 0,079
Π	0,00094	0,00125	0,00113	0,00105	0,00062	0,00096
Tajima's D	-1,56222	-0,97256	-0,06382	-0,886	-1,40085	-1,62974*
Fu's Fs	-1,964	-0,829	-0,239	-1,290	-1,164	-5,307*
Fu and Li's Fs	-1,93380	-0,97256	-0,18701	-0,22536	-1,57441	-1,96622*
Fu and Li's D	-1,78443	-0,97256	-0,22104	0,01678	-1,58662	-1,84556*

Bảng 3.17. Giá trị F_{st} và Nm giữa các quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế

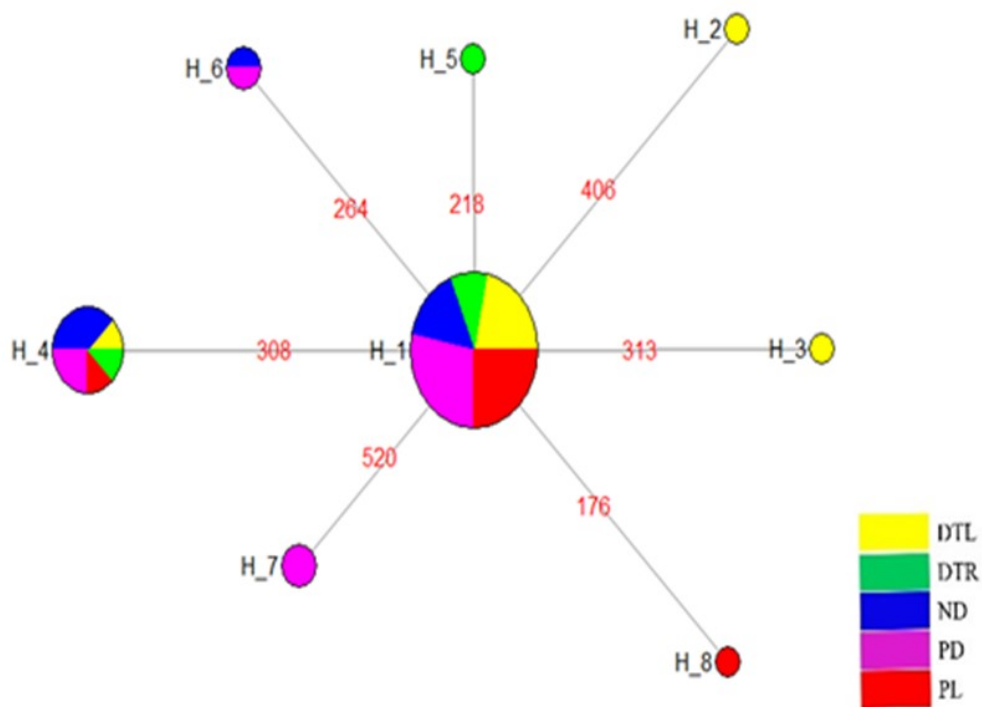
Gen	Quần thể	DTL	DTR	ND	PD	PL
<i>COI</i>	DTL	--	0,012	-0,012	-0,011	0,001
	DTR	-0,038*	--	0,003	-0,012	0,011
	ND	-0,042*	-0,073*	--	-0,020	-0,011
	PD	0,046*	-0,045*	0,012*	--	-0,010
	PL	0,003*	-0,041*	-0,045*	0,048*	--
<i>16S rRNA</i>	DTL	--	-20,2981	8,415511	-3,74993	-6,24952
	DTR	-0,0606*	--	-30,0119	-5,22611	-24,0822
	ND	0,02459*	-0,0703*	--	-3,80568	9,916734
	PD	-0,0105*	-0,0502*	-0,0084*	--	-4,37473
	PL	-0,0417*	-0,0714*	0,02885*	-0,0125*	--

Chú thích: Dữ liệu ở phía trên là F_{st} ; Nm là dữ liệu ở phía dưới. * mức ý nghĩa của giá trị F_{st} với $p < 0.001$.

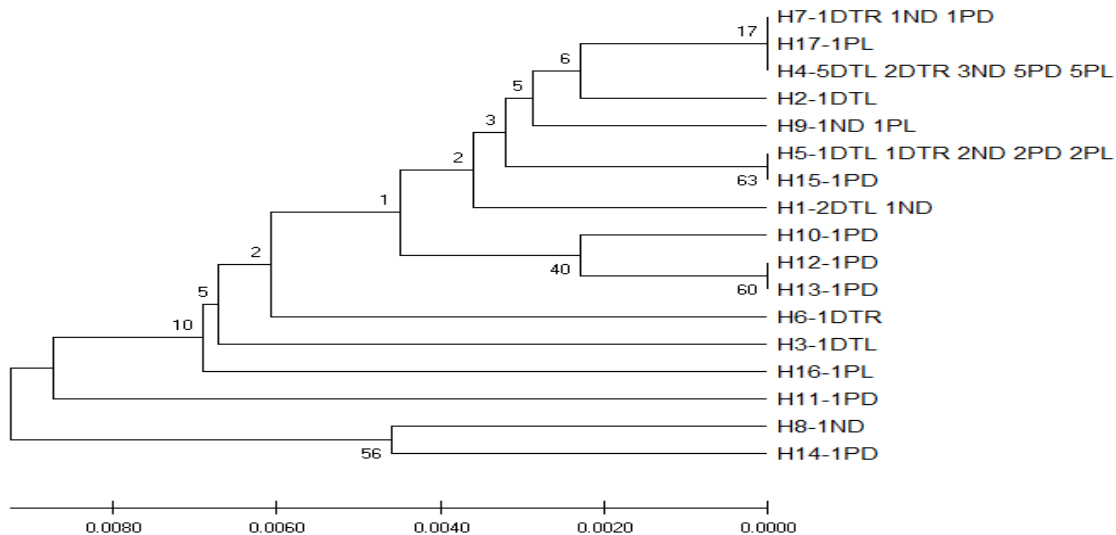
3.3.2.2. Các biến thể di truyền



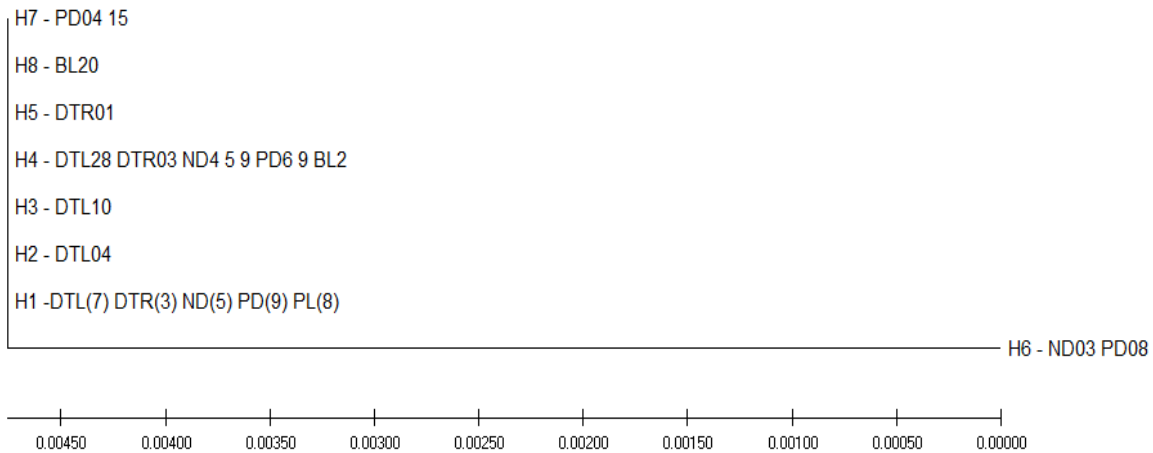
Hình 3.27. Mạng lưới haplotype dựa trên trình tự đoạn gen COI



Hình 3.28. Mạng lưới haplotype dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA



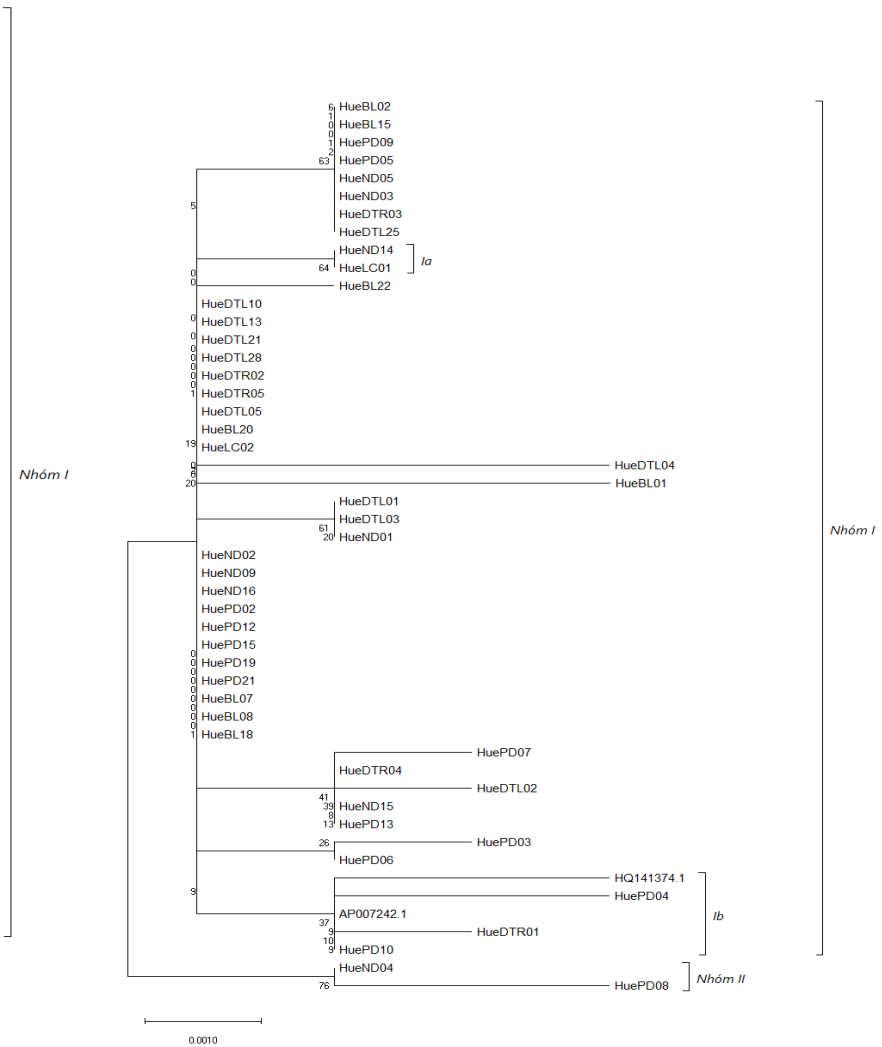
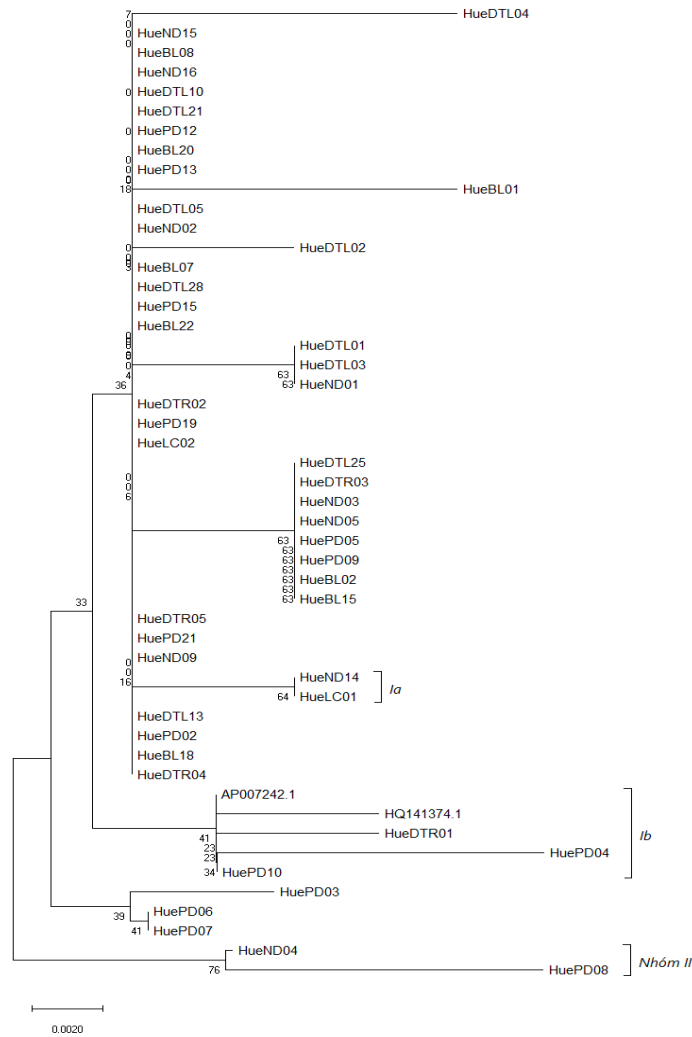
Hình 3.29. Cây phát sinh di truyền giữa các haplotype sử dụng trình tự *COI*



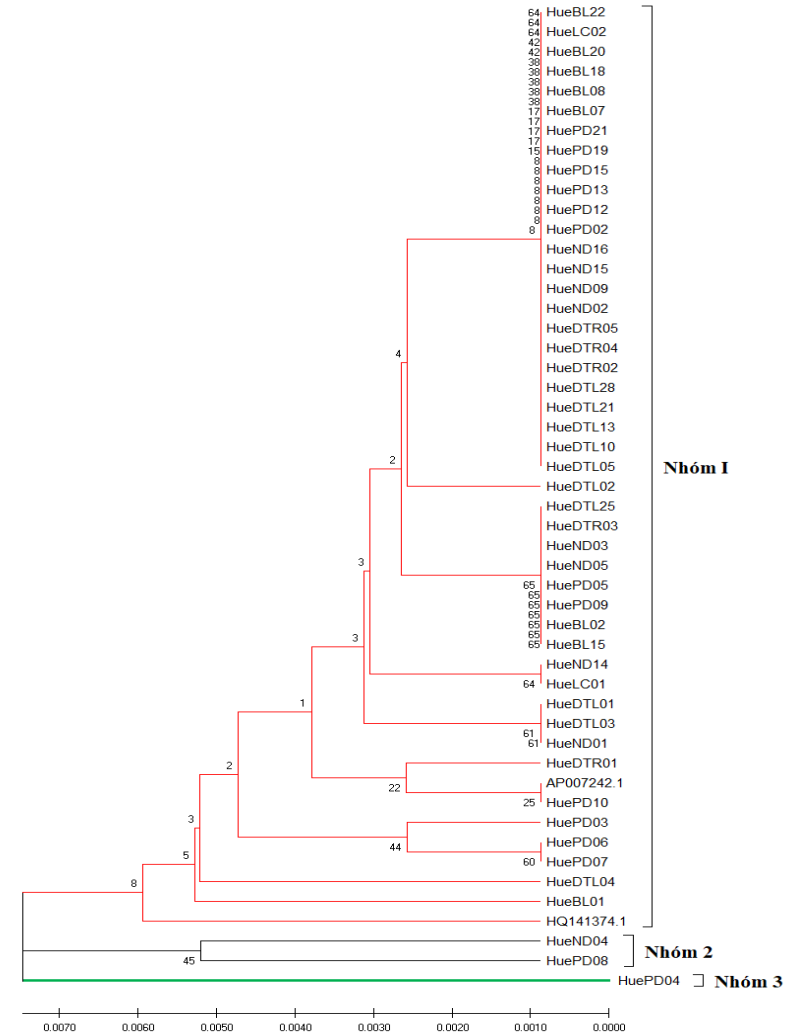
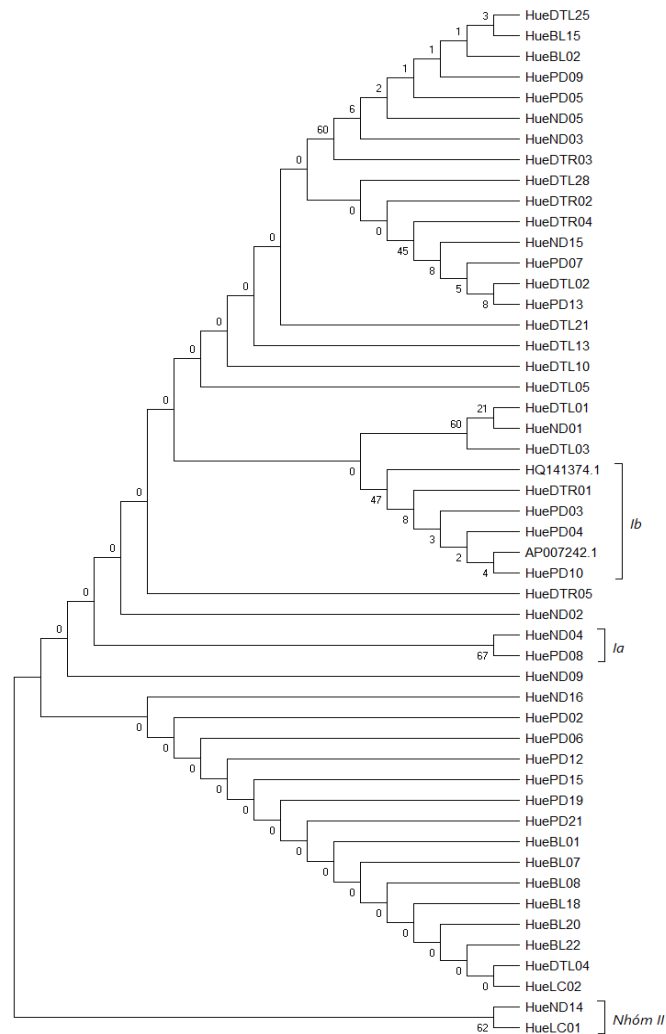
Hình 3.30. Cây phát sinh di truyền giữa các haplotype sử dụng trình tự *16S rRNA*

3.3.3. Mô hình dự đoán đặc điểm quần thể và cây phát sinh loài

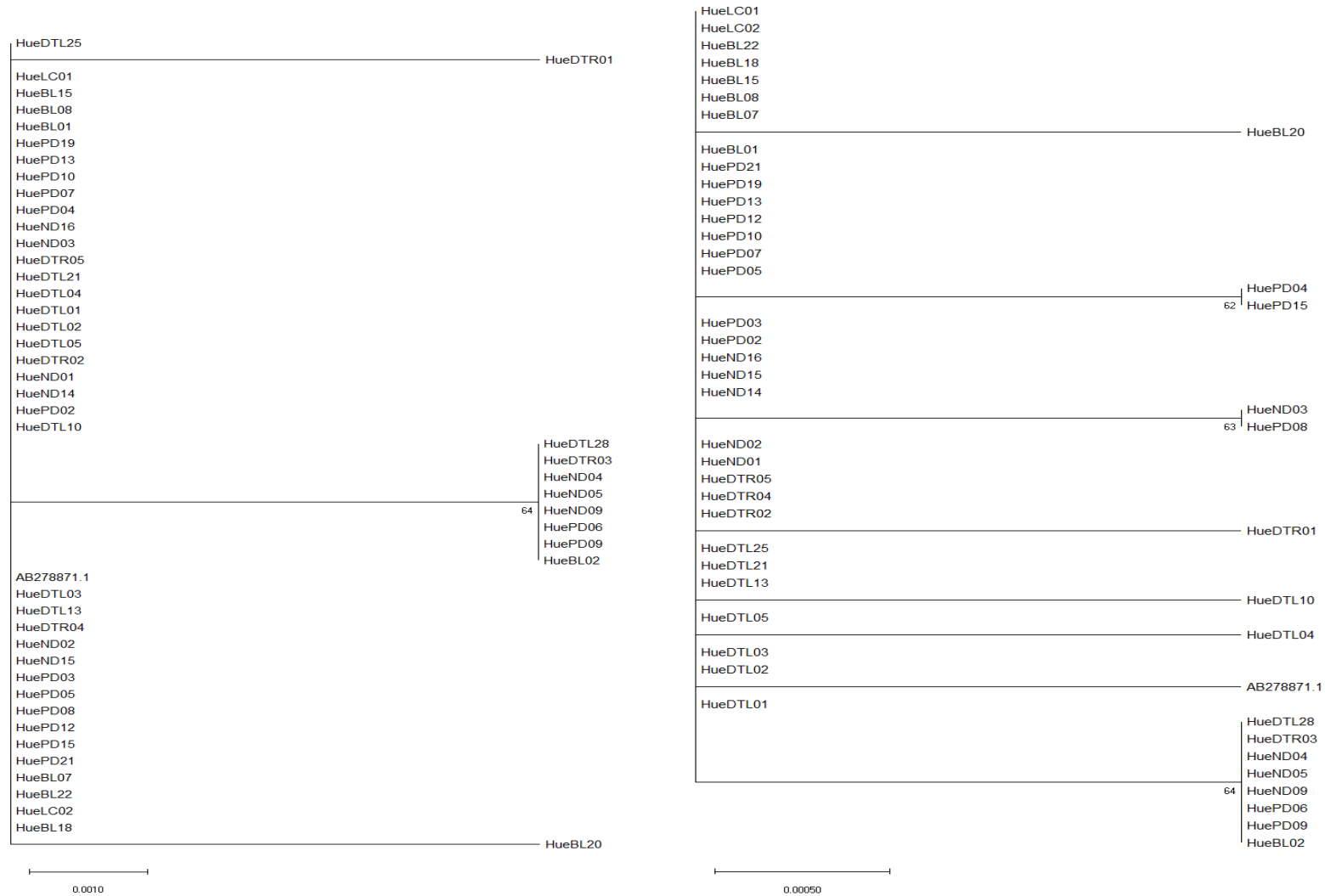
Các cây phát sinh di truyền được xây dựng, trong đó, các cây Neighbor-Joining đã xây dựng có tổng chiều dài nhánh lần lượt là 0,08396 cho đoạn *COI* (Hình 3.31) và 0,01346 cho đoạn *16S rRNA* (Hình 3.35); các cây Maximum Likelihood, có tính hợp lý cao nhất là -1336,57 cho gen *COI* và - 934,58 cho gen *16S rRNA* (Hình 3.32 và Hình 3.36); các cây Maximum Parsimony có chỉ số thống nhất là (0,727273), chỉ số duy trì là (0,875) và chỉ số tổng hợp là 0,77 (0,636364) cho đoạn *COI* (Hình 3.33). Tổng chiều dài nhánh = 8 với chỉ số thống nhất là 1,00, chỉ số duy trì là 1,00 và chỉ số tổng hợp là 1,00 cho đoạn *16S rRNA* (Hình 3.37). Cây tiến hóa bằng phương pháp UPGMA của đoạn gen *COI* có tổng chiều dài nhánh = 0,05699 (Hình 3.34) và 0,0102 cho 49 đoạn gen *16S rRNA* (Hình 3.38).



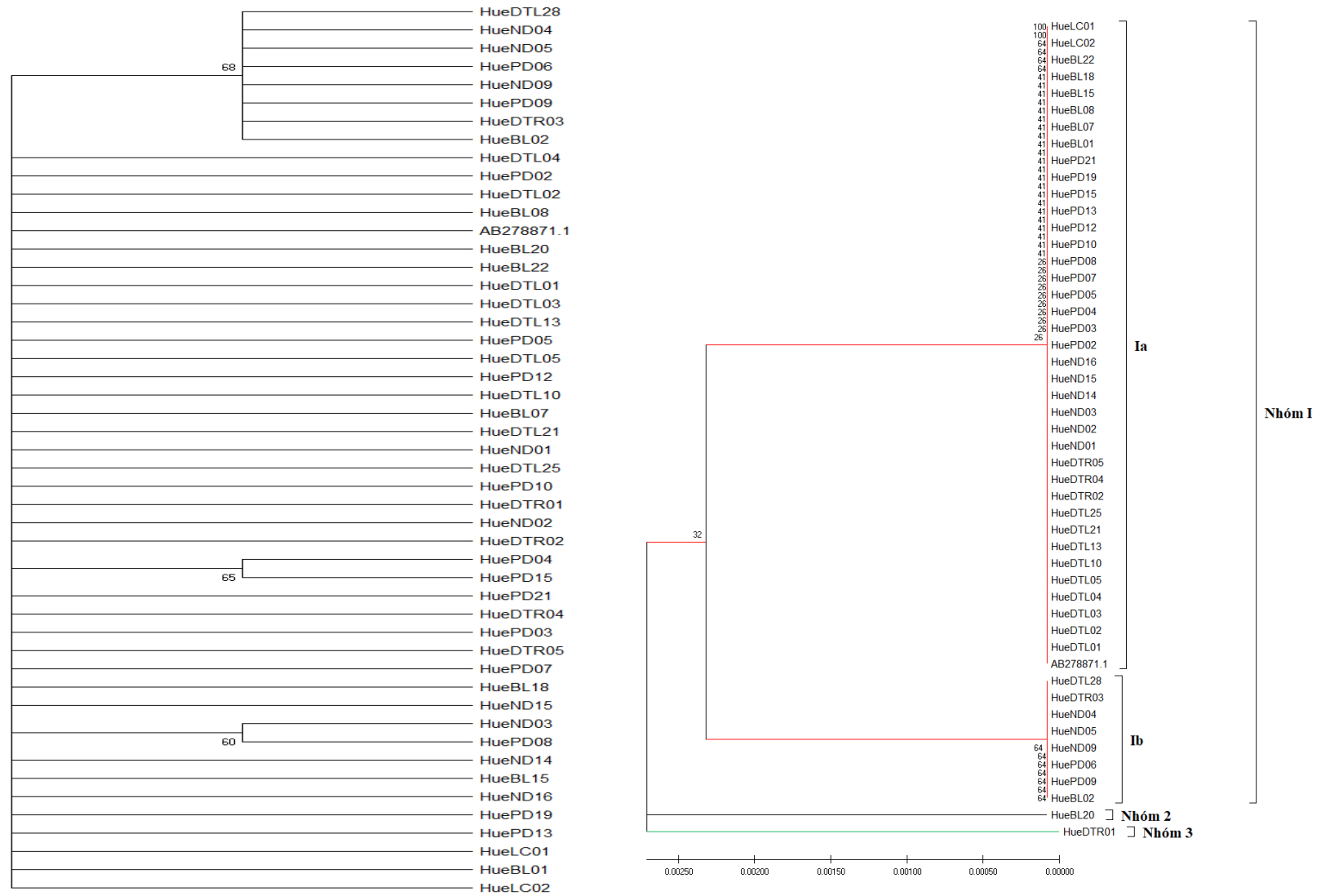
Hình 3.31 và Hình 3.32. Cây phát sinh loài của quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế dựa trên trình tự đoạn gen COI bằng phương pháp Neighbor-Joining và Maximum Likelihood



Hình 3.33 và Hình 3.34. Cây phát sinh loài của quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế dựa trên trình tự đoạn gen COI bằng phương pháp Maximum Parsimony và UPGMA



Hình 3.35 và Hình 3.36. Cây phát sinh loài của quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA bằng phương pháp Neighbor-Joining và Maximum Likelihood



Hình 3.37 và Hình 3.38. Cây phát sinh loài của quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA bằng phương pháp Maximum Parsimony và UPGMA

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm hình thái

Các mô tả hình thái của cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế (TL = 120 - 1137 mm) phù hợp với các đặc điểm hình thái đặc trưng của loài đã được nghiên cứu trước đây. Những đặc điểm đặc trưng của các giai đoạn phát triển đã được thể hiện. Đặc điểm về hình thái ngoài và cấu tạo trong thể hiện khả năng thích nghi với môi trường sông, phù hợp với các tập tính sinh học và tính ăn thiên về động vật của cá Chình hoa. Phân tích cấu trúc quần thể dựa trên các chỉ số hình thái đã cho thấy sự đa hình cao về kiểu hình liên quan đến màu sắc cơ thể của cá Chình hoa ở các giai đoạn phát triển khi sinh sống trong các hệ sinh thái khác nhau.

4.2. Đặc điểm phân bố

Các đặc điểm môi trường ở các thủy vực trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế hoàn toàn phù hợp với đặc điểm sinh học của cá Chình hoa trong giai đoạn từ 120 – 1137 mm (3,0 – 4500 g). Chúng phân bố rộng rãi trên hầu hết các thủy vực nghiên cứu. Giai đoạn cá Chình con TL < 200 mm và cá Chình trưởng thành xuất hiện theo mùa vụ (mùa khô và mùa mưa). Đặc điểm phân bố theo thời gian và không gian của cá Chình hoa hoàn toàn phù hợp với sự vận hành của các cơ chế sinh thái và tập tính sinh học của loài. Các phân tích PCA và CA cho thấy có sự đa dạng trong quá trình thích nghi của cá Chình hoa ở các kích cỡ khác nhau với các điều kiện sinh thái khác biệt tại các vùng nghiên cứu. Kết quả này cho thấy sự ảnh hưởng mạnh mẽ của các yếu tố môi trường lên khả năng thích nghi của loài trong các giai đoạn phát triển khác nhau. Dựa trên các dữ liệu về đặc điểm phân bố, vòng đời của cá Chình hoa ở khu vực nội địa Thừa Thiên Huế đã phân nào được hé lộ. Đây là cơ sở quan trọng để xây dựng các chiến lược bảo tồn loài liên quan đến bảo vệ môi trường sông của chúng ở các giai đoạn và thủy vực khác nhau. Bên cạnh đó, số lượng và tỉ lệ thấp của cá Chình hoa có kích thước lớn phân bố ngoài tự nhiên ở các khu vực trung và thượng lưu cũng làm dấy lên những lo ngại về nguy cơ suy giảm nguồn lợi do những tác động của các hoạt động kinh tế xã hội lên quá trình di cư ngược dòng và môi trường sông của chúng ngoài tự nhiên.

4.3. Đa dạng di truyền

Các phân tích đã cho thấy sự đa dạng cao trong cấu trúc di truyền của quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế với tỷ lệ xuất hiện các biến thể, các alen hiếm cao trong quá trình biến thái và thích nghi sinh thái. Xu hướng tiến hóa theo hướng mở rộng phạm vi địa lý cũng đã được tìm thấy trong quần thể cá Chình hoa tại địa phương. Kết quả này phù hợp với các giả thuyết và kết quả nghiên cứu của các tác giả khác được thực hiện trên các quần thể cá Chình hoa và các loài Chình *Anguilla* khác trong khu vực và trên thế giới. Hơn thế nữa, thông qua phân tích mô hình phát sinh quần thể cho thấy sự đa dạng cao về khoảng cách di truyền giữa các cá thể với nhau trong cùng quần thể nghiên cứu, cùng vùng thu mẫu và các cá thể có nguồn gốc khác ở khu vực Indo – Thái Bình Dương. Sự gần gũi về khoảng cách di truyền cho thấy đa số các cá thể thuộc quần thể cá Chình hoa phân bố tại Thừa Thiên Huế có cùng nguồn gốc di truyền với nhau và có mối quan hệ gần gũi với quần thể cá Chình hoa tại khu vực Indo – Thái Bình Dương. Những biến thể có khoảng cách di truyền xa so với các cá thể còn lại có thể được phát sinh từ quá trình di cư ngẫu nhiên từ một số quần thể tách biệt trong khu vực hoặc được hình thành bởi đặc điểm môi trường đặc trưng tại Thừa Thiên Huế.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

1) Cá Chình hoa (*A. marmorata*) có hình thái đặc trưng, có bốn giai đoạn phát triển: cá con, cá giống, tiền trưởng thành và trưởng thành. Sự tăng trưởng về khối lượng có tương quan với tổng chiều dài thân theo công thức $W = 5 \times 10^{-7} L^{3,26}$. Có tính đa dạng cao về hình thái trong quần thể ở Thừa Thiên Huế (95,664 %). Các đặc điểm cấu tạo bên trong của cá Chình hoa thể hiện tập tính ăn thiên về động vật.

2) Sự xuất hiện của cá Chình hoa có liên quan mật thiết đến sự thay đổi của các yếu tố sinh thái môi trường: nhiệt độ: 21 – 32 °C, pH: 6,5 – 8,6, DO: 6,5 – 9,5 mg/L, độ mặn 0 đến 15 ‰, độ sâu từ 0,3 – 31 m, nền đáy có nhiều hang hốc (72,0 %) và sự xáo trộn dòng chảy, thay đổi màu nước, chế độ thủy triều, lượng mưa lũ (72,9 %), chu kỳ trăng. Các yếu tố môi trường có tính quyết định 59,9% sự đa dạng sinh thái trong cấu trúc của quần thể phân bố tại Thừa Thiên Huế.

3) Tại Thừa Thiên Huế, cá Chình hoa xuất hiện trên hầu hết các thủy vực lớn nhỏ có dòng chảy hướng về phía Đông vào hai mùa rõ rệt: mùa khô từ tháng 1 đến tháng 3, tương ứng với thời gian di nhập của cá Chình con (từ 100 đến 200 mm) ở biển vào vùng nội địa, và mùa mưa từ tháng 8 đến tháng 12, tương ứng với thời điểm di cư sinh sản của cá bố mẹ (> 700 mm) từ vùng thượng nguồn ra biển để sinh sản và cá có kích cỡ 200 – 1137 mm xuất hiện quanh năm.

4) Hai phân đoạn gen *COI* và *16S rRNA* đã được phân lập với chiều dài chuỗi là 845 và 641 nucleotide có mã số trên ngân hàng dữ liệu Genbank tương ứng là MN067923 - MN067970 và MN633308 - MN633355. Có tỷ lệ tương đồng cao về trình tự của các chuỗi được phân lập với các chuỗi đối chứng trên ngân hàng Genbank. Quần thể có tính đa dạng di truyền cao với tỷ lệ đa hình và các biến dị di truyền cao (20 vị trí đa hình và 17 haplotype từ phân đoạn gen *COI*; 7 vị trí đa hình và 8 haplotype từ phân đoạn gen *16S rRNA*). Quần thể tiến hóa theo xu hướng chọn lọc ngẫu nhiên và mở rộng quy mô. Quần thể cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế có mối quan hệ gần gũi với các quần thể thuộc khu vực Indo - Thái Bình Dương.

Kiến nghị

1. Tiếp tục các nghiên cứu về sự di cư ở các giai đoạn sinh trưởng của cá, nguồn dinh dưỡng ở giai đoạn cá Chính lá liễu, khả năng sinh sản, phân tích đặc điểm cấu trúc mô tế bào học để xây dựng bộ chỉ thị sinh học cho cá Chình hoa ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau.

2. Sử dụng phân tích di truyền dựa trên việc thu thập dữ liệu DNA từ môi trường (eDNA) để hạn chế sự suy giảm nguồn lợi ngoài tự nhiên do việc thu thập mẫu vật nghiên cứu. Thực hiện các nghiên cứu về sự ảnh hưởng của biến đổi khí hậu, ô nhiễm môi trường, các hoạt động ngăn dòng, tạo lập các hệ thống hồ, đập, dịch vụ du lịch sinh thái, khai thác thủy sản ... trên các lưu vực tác động đến nguồn lợi cá Chình hoa.

3. Xây dựng các giải pháp kỹ thuật gắn liền với các giải pháp quản lý nhằm phát triển và bảo tồn nguồn gen cá Chình hoa ở Thừa Thiên Huế, Việt Nam và các nước trong khu vực. Ngoài ra, trên cơ sở phát triển các nghiên cứu cao hơn về khả năng dẫn truyền các xung điện trên cơ thể của cá Chình hoa để giúp công tác nhận biết, dự báo, cảnh báo sớm những biến đổi của môi trường.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NCKH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

TT	Tên công trình	Tên tạp chí, số	Xếp hạng
1	Characterization of giant mottled eel (<i>Anguilla marmorata</i>) gastrointestinal tract that origin from Thua Thien Hue, Vietnam.	J Fish Res. 3(2):4-9.(2019) DOI: 10.35841/fisheries-research.3.2.4-9	Scopus
2	Phylogenetic analysis of <i>Anguilla marmorata</i> population in Thua Thien Hue, Vietnam based on the <i>cytochrome C oxidase I (COI)</i> gene fragments.	AMB Expr 10, 122 (2020). https://doi.org/10.1186/s13568-020-01059-7	ISI, Q2
3	Nutrition composition and lipid distribution in the flesh of species <i>Anguilla marmorata</i> natural mining in Thua Thien Hue, Vietnam.	Hue university journal of science: Agriculture and rural development 129, 3C (2020). http://jos.hueuni.edu.vn/index.php/HUJOS-ARD/article/view/5848	HDCDNN
4	Using DNA barcodes based on mitochondrial COI and <i>16S rRNA</i> genes to identify <i>Anguilla</i> eels in Thua Thien Hue province, Vietnam.	<i>Genet. Mol. Res.</i> (2020) 19 (4): gmr18722. DOI http://dx.doi.org/10.4238/gmr18722	ISI, Q3

INTRODUCTION

1. Urgency of research topics

Out of 16 species and 3 subspecies of *Anguilla* identified, Marbled eel (*A. marmorata* Quoy & Gaimard, 1824) has the second largest size and widely distributed in the world. In Vietnam, Marbled eel is mainly distributed in coastal areas, estuaries, lagoons, lakes, rivers, freshwater streams from Ha Tinh to Vung Tau, Central Highlands, and Phu Quoc Island with the most are from Thua Thien Hue to Khanh Hoa. During the migration between freshwater, brackish and saltwater environments, many different biological characteristics of the eel have been formed and have attracted great attention from biologists for many centuries. Environmental changes have also shaped the physiological and genetic diversity of *Anguilla*. The diversity, distribution and adaptation of *Anguilla* can be greatly influenced by environmental factors, such as salinity, temperature, altitude, river size and tolerance in ecological competition. Given its wide range of distribution and ecological role as the highest predator in the food chain, Marbled eel is proposed as an indicator species, represents the conservation of biodiversity in freshwater ecosystems. Therefore, consideration of the change and identification of morphological, distributional, and genetic characteristics for Marbled eel species at various stages of development as well as changes by habitat in each region in relation to geographic and climatic factors are needed to develop resource recovery and development strategies.

Thua Thien Hue province has a unique hydrological network with dense river systems. All rivers and streams in the province have small basins with big slopes. Tam Giang - Cau Hai lagoon system has a basin area of about 22,000 ha, is the intersection between river and sea ecosystems. The regime of water exchange between rivers and the sea on the river system in the rainy and dry seasons has created favorable conditions for the migratory behavior of Eels. Of the two species of *Anguilla* genus identified, Marbled eel is more popular with high commercial and ecological value. In the wild, Marbled Eel is being exploited under great pressure to serve the commercial needs and to provide seed in farms. The pressures of environmental change in the process of migration, exploitation and threats from natural habitat problems caused by pollution and artificial activities have led to the increased risk of decline in natural resources. In 2007, Marbled eel was listed in the Vietnam Red Book Data at the VU (vulnerable) level. However, the understanding of Marbled eel in Vietnam in general and Thua Thien Hue in particular is still extremely limited. Previous studies just stop at determining the species composition and the presence of Eels in the water bodies. Therefore, in-depth studies on the biological characteristics and genetic diversity of the Eel are necessary to serve the conservation, protection, and development of resources.

To determine the genetic diversity of the organism can be based on morphological, biochemical, and molecular markers. The use of the molecular markers is more accurate than the morphological and chemical markers because it does not depend on objective factors. In molecular genetic techniques being applied in the fisheries, DNA barcode is becoming a useful toolkit in identification research and genetic diversity of organisms related to understanding of species boundaries, community ecology, functional trait evolution, trophic interaction, and the conservation of biodiversity. In animals, a short DNA region of the mitochondrial gene is often used as a DNA marker, in which, the *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) and *16S ribosomal ribonucleic acid* (*16S rRNA*) encoding regions are the most common and effective indicators. Therefore, the application of molecular indicators in Marbled Eel's population genetic diversity assessment needs to be done to clarify the relationship between metamorphosis, ecological adaptation, and genetics in the evolution of the species.

Base on these reasons, we have chosen the topic: **"Study on characteristics of distribution, morphology and genetic diversity of Marbled eel (*Anguilla marmorata* Quoy & Gaimard, 1824) in Thua Thien Hue"**, to conduct in the Doctoral program.

2. Research objectives

Objective to complement information on biological characteristics related to distribution, morphology and genetic diversity to adapt to the environmental changing and life stages of Marble eel. Since, providing scientific and practical data for the conservation, restoration and sustainable development of Marbled eel resources in Thua Thien Hue, Vietnam and around the world.

3. Significances of thesis

1) Scientific significance

The thesis has provided new scientific data on the relationship between morphological, distribution and genetic characteristics of Marbled eel distributed in Thua Thien Hue. Besides the research results have also shown the ecological role and significance of the conservation and development of eel resources in the wild. This is an important basis in proposing strategies for conservation, development and sustainable protection of Marbled eel resources in Thua Thien Hue, Central of Vietnam, in the region and over the world.

2) Practical significance

The study analyzed the structure of the Marbled eel population for the first time based on morphological, environmental and molecular markers. DNA barcode data of two gene segments, *COI* and *16S rRNA*, of the eel's *mitochondrial genome* have

been published and used in the identification and evaluation of genetic diversity in populations.

Chapter 1. OVERVIEW

1.1. Natural features of Thua Thien Hue

- 1.1.1. Geographical location
- 1.1.2. Topography, geomorphology
- 1.1.3. Climate
- 1.1.4. Hydrological
- 1.1.5. Biological resources

1.2. Biological characteristics of Marbled eel

- 1.2.1. Species composition and distribution
- 1.2.2. Life cycle and biological characteristics

1.3. Molecular indicator and application in fisheries

- 1.3.1. DNA-based molecular markers
- 1.3.2. Technical DNA barcode

1.4. Research situation on the *Anguilla*

- 1.4.1. Morphological studies
- 1.4.2. Distribution, life cycle and ecological adaptation
- 1.4.3. Molecular indicator application
- 1.4.4. Study of *Anguilla* in Vietnam

Chapter 2. MATERIAL AND METHODOLOGY

2.1. Research scope and object

The study was researched on Marbled eel (*Anguilla marmorata* Quoy & Gaimard, 1824) distributed in Thua Thien Hue province, Vietnam for 4 years from 2017 to 2021.

2.2. Research contents

- Determining the composition of Eel species distributed in Thua Thien Hue by morphological and molecular markers.
- Research on the current status, environmental characteristics and ecological clustering distribution of flower eels in Thua Thien Hue.
- Study on characteristics and population structure of flower eel in Thua Thien Hue province based on morphological indicators.

- Evaluation of the genetic diversity of the Eel population in Thua Thien Hue province by molecular markers.

2.3. Research methods

The research methods are presented in the following diagram:

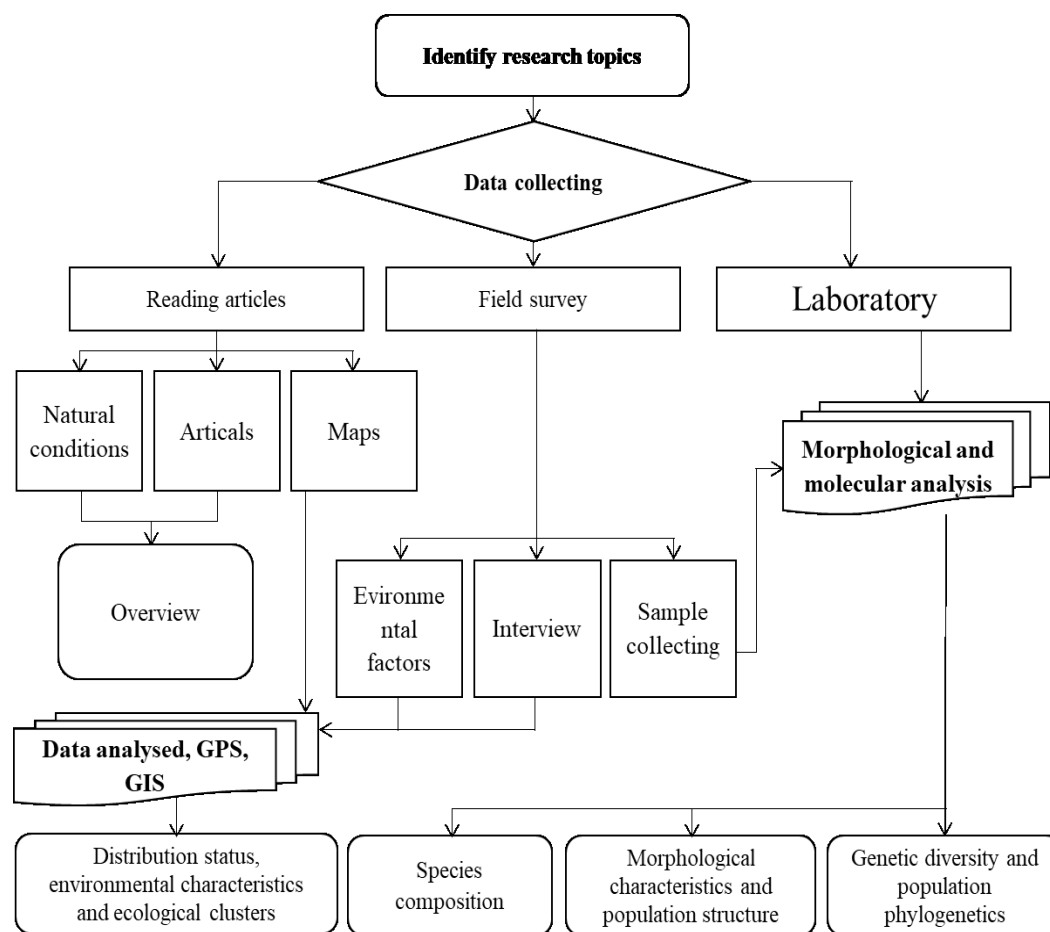


Figure 2.2. Research diagram

2.3.1. Field survey and sampling

The samples collected in 7 study areas are representative and with high concentration of distribution of Marbled eel in Thua Thien Hue (Table 2.1).

Table 2.1. The number of research samples

No.	Research routes	Symbol	Number of samples observed	Anatomical sample number	Number of molecular analysis samples
1	O Lau river system	SOL	34	26	14 (HuePD)
2	Huong river system	SHU	105	64	10 (HueDTL)
3	Truoi river system	STr	49	38	14 (HueDTR, HueND)
4	Bu Lu river system	SBL	57	30	8 (HueBL)

5	Lang Co lagoon	LC	45	15	2 (HueLC)
6	Thuan An gate	TA	30	9	0
7	Tu Hien gate	TH	30	7	0
Total			350	189	48

2.3.2. Analysis of morphological and environmental characteristics, and build distribution maps

A total of 21 morphology indicators measured and standardized on 350 Marbled eels with size TL= 120.0 - 1136.9 mm. Among them, 10 indicators are measured using the left side of the body or the dorsal side of the head, including: total length (TL), head length (LH), the predorsal length (PD), preanal length (PA), the distance between the verticals through the anus and origin of the dorsal fin (AD), PD without HL (PDH), Tail (T), PA lengths without HL (TR), eye diameter (E), distance between clear margins of eyes (IO). Ten characters normalized according to the ratio LT or LH: HL / TL, PD / TL, PA / TL, TR / TL, AD / TL, PDH / TL, T / TL, E / HL, IO / HL. Morphological indicators in the description and statistics through anatomical 189 samples.

Information about the distributed environment such as temperature, salinity, pH, DO is determined by a dedicated machine; depth is measured with Sachi disk; information on the base, tidal regime, moon phase, weather, time is determined by direct observation and meteorological and hydrological data. Use a camera to take pictures while observing, record research diaries, make a monitoring sheet to record field results.

The datasets include 20 morphological indicators and 11 distributional environmental indicators were processed according to the biological statistics method on Excel 2016 software. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (CA) were done on SPSS 22.0 software to analyze the population structure of Marbled Eel in Thua Thien Hue based on morphology and environment index. Use a GPS to mark sampling locations and ArcGIS version 10.3 was used to map the current state of the Marbled Eel in Thua Thien Hue.

2.3.4. Analysis of genetic diversity using molecular markers

Total DNA of 48 samples was extracted as described by Kumar et al (2007) with modification. Barcode gene segments from Marbled Eels were obtained by PCR with specific primers (Table 2.4).

Table 2.4. Primer sequences were used to amplification of COI and 16S rRNA genes

Genetic segment	Primer segment indicator	Primer sequence (5' - 3')	Source
<i>COI</i>	A.angFw-1 A.angRv-1	GCACTAAGCCTTCTAATCC GATGATTATTGTGGCAGAAG	Current research
<i>16S rRNA</i>	L2510 H3080	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT	Palumbi và cs (1991)

The PCR products were purified by the Isolate II PCR kit (Bioline) according to the manufacturer's instructions. The PCR products were purified by the Isolate II PCR kit (Bioline). These PCR products were then sequenced directly by the dideoxy terminator method on ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at Maccrogen company, Korea. The nucleotide sequences were manually edited and assembled on the BioEdit software Ver. 7.2.5. The final sequences were compared and registered access codes on the Genbank data were from MN067923 to MN067970 for 48 segments of *COI* and from MN633308 to MN633355 for 48 segments of *16S rRNA*, respectively, to determine species composition and genetic diversity analysis. Components of nucleotides, amino acids, phylogenetic trees were analyzed using Mega X software. The reference gene segments from genbank (AP007242.1, HQ141374.1 for *COI* and AB278871.1 for *16S rRNA*) were used as the external group when building phylogenetic trees. Population genetic diversity indexes, neutral tests and Fst values were performed using DNAsp 6.0 software. Network 5.0 software was used to draw haplotype networks. The Nm value is calculated using the formula : $Nm = (1 - Fst) / 4 Fst$.

Chapter 3. RESULTS

3.1. The composition of Eel species distributed in Thua Thien Hue

Two species of *Anguilla* Eel distributed in Thua Thien Hue were identified by morphological and molecular markers (Table 3.1 and Table 3.2). Based on the morphological indicators, it is possible to distinguish the difference between the two species. The molecular markers used supported the accuracy of the species composition of the specimens used in this study, the Marbled eel (*A. marmorata*). In addition, molecular markers have supported the classification of subspecies and confirmed that the Shortfin eel in Thua Thien Hue is *A. bicolor pacifica*.

Table 3.1. Morphological characteristics of *Anguilla* spp. collected in Thua Thien Hue

Sample	<i>Anguilla</i> sp.01	<i>Anguilla</i> sp.02	<i>Anguilla</i> sp.03	<i>Anguilla</i> sp.04	<i>Anguilla</i> sp.05	<i>Anguilla</i> sp.06
W (g)	34.0	89.0	3,200.0	133.1	388.2	491.0
TL (mm)	255.0	362.0	1,080.0	405.0	540.0	613.0
HL (mm)	33.0	49.0	160.0	55.0	75.0	80.0
PD (mm)	6.5	8.4	31.0	11.0	15.0	27.0
PA (mm)	97.0	152.0	500.0	190.0	260.0	270.0
AD (mm)	42.0	59.0	190.0	80.0	110.0	0.0
TR (mm)	64.0	103.0	340.0	135.0	155.0	190.0
PDH (mm)	32.0	35.0	150.0	55.0	75.0	190.0
PA/TL(%)	39.0	42.0	46.0	47.0	48.0	44.0
HL/TL(%)	12.9	13.5	14.8	13.6	13.9	13.0
TR/TL(%)	25.1	28.5	31.5	33.3	28.7	30.1
AD/TL(%)	16.5	16.3	17.6	19.7	20.4	0.0
PDH/TL(%)	12.5	9.7	13.8	13.6	13.9	30.9
Color marking	Variegated	Variegated	Variegated	Variegated	Variegated	Non-Variegated
Dentition	Narrow	Narrow	Narrow	Narrow	Narrow	Wide
Species	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	<i>A.</i> <i>bicolor</i>

Table 3.2. The results of *Anguilla* spp. identification by COI and 16S rRNA sequences from NCBI

Sample	Morphological marker	Molecular marker	COI		16S rRNA	
			Genbank sequences	% Max identify	Genbank sequences	% Max identify
<i>Anguilla</i> sp.01	<i>A. marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99.44 99.53	AB278871.1	99.69
<i>Anguilla</i> sp.02	<i>A. marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99.53 99.29	AB278871.1	99.84
<i>Anguilla</i> sp.03	<i>A. marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99.56 99.64	AB278871.1	99.84

<i>Anguilla</i> sp.04	<i>A. marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99.76 99.53	AB278871.1	99.84
<i>Anguilla</i> sp.05	<i>A. marmorata</i>	<i>A.</i> <i>marmorata</i>	AP007242.1 HQ141374.1	99.56 99.64	AB278871.1	99.69
<i>Anguilla</i> sp.06	<i>A. bicolor</i>	<i>A. bicolor</i> <i>pacifica</i>	AP007237.3	99.53	AP007237.3 AB278743.1	99.84 99.69

3.2. Distribution characteristics

3.2.1. Distribution status

3.2.1.1. Timeable distribution

Marbled eel appears all year-round in Thua Thien Hue with sizes from 100 - 1100 mm, the most from 200 to 599 mm (> 15 g). The distribution of the Marbled eel is divided into two periods, the dry season from January to April (typical by the appearance of fish with TL < 200 mm) and the rainy season from August to December every year (typical figure by appearance of adult fish) (Table 3.3).

Figure 3.3. Number and proportion of size groups by time

Month	TL (mm)											Total	Rate (%)
	100 - 199	200 - 299	300 - 399	400 - 499	500 - 599	600 - 699	700 - 799	800 - 899	900 - 999	1000 - 1099	1100 - 1199		
1	0	5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	8	2.3
2	7	5	6	3	1	1	0	0	0	0	0	23	6.6
3	22	18	22	22	16	4	3	1	2	0	0	110	31.4
4	3	4	9	3	6	0	1	0	0	0	0	26	7.4
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	3	0.9
7	0	0	1	3	0	0	1	1	0	1	0	7	2.0
8	1	1	7	10	9	5	3	3	1	1	1	42	12.0
9	0	0	0	6	1	6	3	3	1	0	0	20	5.7
10	5	14	5	2	1	4	4	5	1	2	1	44	12.6
11	0	1	3	7	4	2	5	1	1	1	0	25	7.1
12	6	10	8	5	4	3		1	3	2	0	42	12.0
Total	44	58	63	63	42	25	20	15	10	8	2	350	100.0
Rate (%)	12.6	16.6	18.0	18.0	12.0	7.1	5.7	4.3	2.9	2.3	0.6		

3.2.1.2. Special distribution

Figure 3.4. Number of Eels by fishing size in the study areas

TL (mm)	SOL	SHU	STR	SBL	LC	TA	TH
100 - 199	0	0	2	19	15	5	3
200 - 299	3	0	6	25	14	6	5
300 - 399	8	21	12	9	8	4	1
400 - 499	12	29	4	2	3	6	7
500 - 599	7	23	4	2	1	4	1
600 - 699	2	11	6	0	1	1	4
700 - 799	1	7	6	0	1	2	3

800 - 899	1	5	4	0	1	1	3
900 - 999	0	5	3	0	0	1	1
1000 - 1099	0	4	2	0	1	0	1
1100 - 1199	0	0	1	0	1	0	1
Total of number	34	105	50	57	46	30	30
Rate (%)	9.7	30.0	14.3	16.3	13.1	8.6	8.6

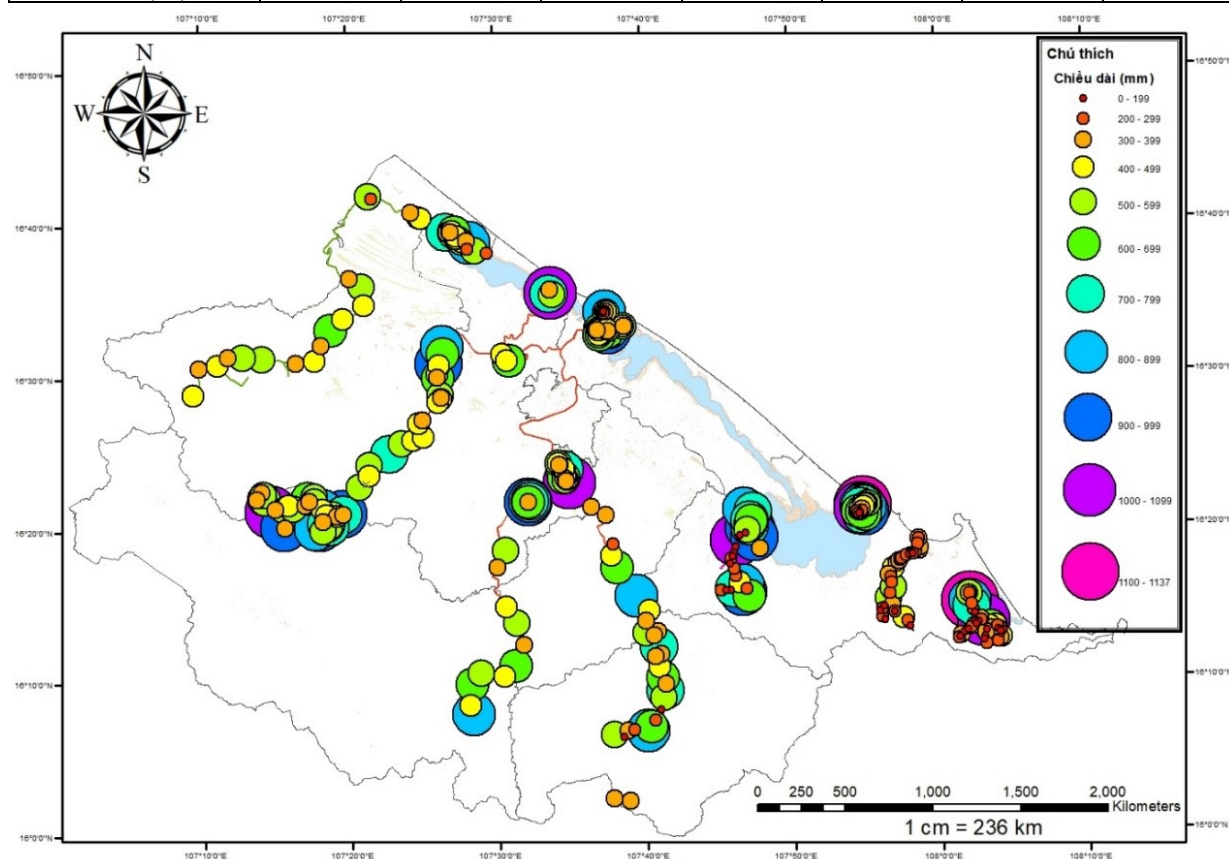


Figure 3.5. Distribution status by size of Marbled eel in Thua Thien Hue

In Thua Thien Hue, the Marbled eel has the size TL = 300 - 699 mm, mainly distributed in the downstream area or large and small streams in the upstream area. Flower eels with size TL > 700 mm appear concentrated in the downstream and scattered in the middle and upstream. Juvenile eel (TL < 200 mm) occurs only in the downstream area. When elevation increases, the appearance of eel with size TL = 100 - 299 mm decreases (Figure 3.5 and Table 3.4).

3.2.2. Environmental characteristics and ecological clusters

3.2.2.1. Environmental characteristics

Table 3.5. Environmental characteristics

Environmnetal factors	Average (Min – Max)
Temperature (°C)	26.3 ± 1.65 (21.0 – 32.0)
Salinity (‰)	1.5 ± 3.38 (0.0 – 15.0)
DO (mg/L)	8.0 ± 0.47 (6.5 – 9.5)

pH	7.2 ± 0.51 (6.5 – 8.6)
Deep (m)	3.4 ± 3.07 (0.3 – 11.0)
Ecology indicators	Frequency (%)
Month	1 (2,3 %); 2 (6,6 %); 3 (31,4 %); 4 (7,4 %); 6 (0,9 %); 7 (2,0 %); 8 (12,0 %); 9 (5,7 %); 10 (12,6 %); 11 (7,1 %); 12 (12,0 %)
Weather	Rainy (72,9 %), Dry (27,1 %)
Water color	Cloudy (48,9 %); Clear (51,1 %)
Bottom	Stone, sand and mud (26,3 %); Stone with caves (72,0 %)
Moon phase	Dark (89,7 %), moonlight (20,3 %)
Tide cycle	Yes (9,8 %), No (90,2 %)

Table 3.6. Environmental characteristics in the study areas

Name of water bodies	Sign	Location	Number of sample	Deep	Tide	Temperature	Salinity	pH	DO	Bottom	Flow
O Lau river system (SOL)	PD, OL	Downstream	8	2.5 – 4.5	Yes	25.5 - 27.5	0 - 13	6.7 – 8.8	7.7 – 8.8	Stone, sand and mud	Strong currents, from west to east
	PD	Upstream in Phong My, Phong Dien	26	0.4 - 6.5	No	24 - 28.5	0	6.6 – 7.5	7.6 – 9.1	Stone with caves	Slightly curenets from west to east
Huong river system (SHU)	SH/DTL	Downstream	32		No	24.5 - 28	0	6.7 – 7.6	7.8 - 9.1	Stone, sand and mud	Strong currents, from west to east
	SBO	Bo river in Quang An, Quang Tho, Huong Van	21	0.5 – 7.0	No	26 - 32	0 - 10	6.8 – 8.6	8.0 – 9.1	Stone with caves	Strong currents, from west to east
	AL	Upstream in A Luoi	52	0.3 – 5.2	No	24 – 30.5	0	6.5 – 7.7	6.5 -8.8	Stone with caves	Slightly curenets from west to east
Truoi river system (STr)	ND	Upstreams in Thuong Quang, Trung Luu, Nam Dong	29	0.4 – 6.5	No	24.0 – 30.0	0	6.7 – 7.6	8.0 – 9.1	Stone with caves	Slightly curenets from west to east
	DTR	Downstream	20	0.4 - 11	No	25 – 29.5	0 - 5	6.5 – 7.4	7.6 – 8.3	Stone, sand and mud	Strong currents, from west to east
Bu Lu river system (SBL)	SBL	Phu Loc	33	0,4 – 6.5	No	24 - 26	0 - 11	6.7 – 7.5	7.5 – 8.8	Stone with caves	Slightly curenets from west to east
	PL	Upstream of Bu Lu River, Phu Loc	24	0.4 – 2.5	No	24 – 28.5	0	6.7 – 7.6	7.4 – 8.5	Stone with caves	Slightly curenets from west to east
Lap An (Lang Co) lagoon	LC	Lang Co, Phu Loc	45	0.4 – 7.0	Both	23.5 – 29.0	0 - 10	6.7 - 8.6	6.5 – 8.5	Stone, sand and mud	Strong currents, from west to east
Thuan An gate	TA	Thuan An, Hai Duong	30	4,1 – 7	Yes	22 – 29.5	3 – 12	6.8 – 8.6	7.5 – 9.1	Stone, sand and mud	Strong currents, from west to east
Tu Hien gate	TH	Tu Hien	30	4 - 7	Yes	21 – 29.0	3 - 15	6.9 – 8.6	7.5 – 8.9	Stone, sand and mud	Strong currents, from west to east

3.2.2.2. Principal component analysis and cluster analysis of distribution environment characteristics

Table 3.7. PCA results of the distribution environment characteristics

Indicators	Factors		
	1	2	3
Month	0.514	-0.468	0.394
Weather (rain)	-0.701	0.416	0.218
Temperature	-0.565	0.197	0.241
Salinity	0.462	0.788	-0.014
DO	0.368	-0.075	0.650
pH	0.432	0.684	0.206
Water color	0.594	-0.492	-0.066
Deep	0.608	0.045	0.277
Bottom	-0.541	-0.219	0.061
Moon phase	-0.609	0.174	0.439
Tide	0.345	0.766	-0.188
Eigenvalue	3.115	2.435	1.039
Variability (%)	28.321	22.133	9.447
Cumulative (%)	28.321	50.454	59.901

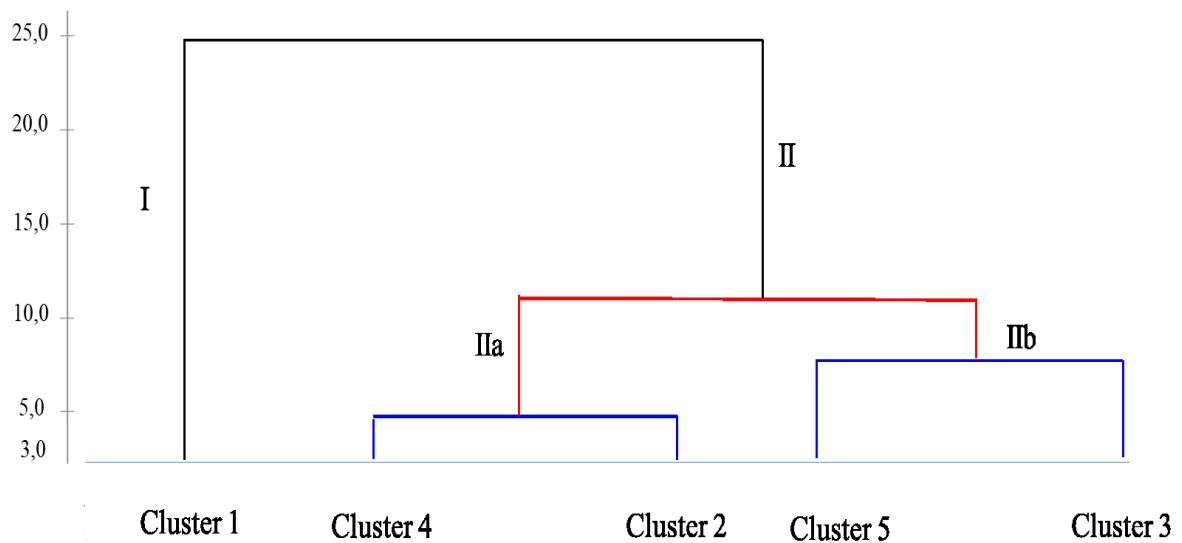


Figure 3.13. The clustering of distributed environmental factors

Table 3.8. Environmental characteristics of ecological clusters

Indicators	Clusters				
	1	2	3	4	5
No. of sample	171 DTL(22), DTR (13), LC (7), ND (8), OL (8), PL (14), SBL (23), AL (23), SBO (16), TA (19), TH (18)	50 DTL (4), DTR (5), LC (16), ND (10), AL (14), TA (1)	68 DTL (6), DTR (2), LC(3), ND(9), PD (25), SBL(10), AL(11), SBO(2)	36 LC(20), ND (2), PL (10), AL (1) SBO (3)	25 LC(1), TA(10), TH (14)
Temperature (°C)	21.0 – 28.5	24.8 - 30.5	24.0 - 28.5	23.5 - 32.0	22.0 - 29.0
Salinity (‰)	0.0 - 13.0	0.0 - 10.0	0.0 - 10.0	0.0	5.0 - 15.0
DO (mg/l)	6.5 - 9.5	6.5 - 8.5	6.7 - 8.5	6.7 - 8.5	7.5 - 9.5
pH	6.5 - 8.4	6.7 – 8.4	6.6 – 8.6	6.7 – 7.8	6.9 – 8.6
Deep (m)	0.3 - 31.0	0.4 – 6.0	0.4 – 7.0	0.4 – 3.7	4.1 - 7.0
Weather (rain)	Rainy (100%)	Rainy (2.0%); Dry (98.0%)	Rainy (100%)	Dry (100%)	Rainy (56.5%); Dry (43.5%)
Water color	Cloudy (100%)	Clear (88.0%); Cloudy (12.0%)	Clear (100%)	Clear (100%)	Clear (100%)
Bottom	Stone, sand and mud (28.0%); Stone with caves (59.6%)	Stone with caves (90.0%)	Stone with caves (100%)	Stone with caves (100%)	Stone, sand and mud (95.7%); Stone with caves (4.3%)
Moon phase	Dark (100%)	Dark (100%)	Dark (100%)	Dark (100%)	Dark (100%)
Tide	No (93.6%); Yes (6.4%)	No (100%)	No (100%)	No (100%)	Yes (100%)
Month	1 (1.2%); 2 (4.1%); 3 (12.9%); 4 (6.4%); 6 (0.6%); 8 (18.1%); 9 (10.5%); 10 (24.0%); 11 (12.3%); 12 (9.9%)	1 (4.0%); 2 (18.0%); 3 (46.0%); 4 (4.0%); 7 (6.0%); 8 (4.0%); 10 (6.0%); 11 (4.0%); 12 (8.0%)	1 (2.9%); 3 (47.1%); 4 (2.9%); 8 (10.3%); 9 (2.9%); 11 (2.9%); 12 (30.9%)	3 (58.3%); 4 (25.0%); 8 (11.1%); 9 (5.6%)	1 (8.7%); 2 (30.4%); 3 (43.5%); 4 (8.7%); 7 (8.7%)
Zise (mm)	100 – 200 (5.3%), 200 – 299 (15.2%), 300 – 399 (17.5%), 400 – 499 (19.3%), 500 – 599 (13.5%), 600 – 699 (9.4%), 700 – 799 (7.6%), 800 – 899 (4.1%), 900 – 999 (3.5%), 1000 – 1099 (3.5%), 1100 – 1199 (1.2%)	100 – 200 (20%), 200 – 299 (16%), 300 – 399 (16%), 400 – 499 (16%), 500 – 599 (12%), 600 – 699 (6%), 700 – 799 (4%), 800 – 899 (6%), 900 – 999 (2%), 1000 – 1099 (2%)	100 – 200 (8.8%), 200 – 299 (8.8%), 300 – 399 (26.5%), 400 – 499 (26.5%), 500 – 599 (14.7%), 600 – 699 (5.9%), 700 – 799 (2.9%), 800 – 899 (2.9%), 900 – 999 (1.5%), 1000 – 1099 (1.5%)	100 – 200 (36.1%). 200 – 299 (27.8%), 300 – 399 (16.7%), 400 – 499 (5.6%), 500 – 599 (5.6%), 700 – 799 (2.8%), 800 – 899 (2.8%), 900 – 999 (2.8%)	100 – 200 (24%), 200 – 299 (28%), 400 – 499 (16%), 500 – 599 (4%), 600 – 699 (8%), 700 – 799 (8%), 800 – 899 (8%), 900 – 999 (4%)

3.3. Morphology characteristics

3.3.1. Description of morphological characteristics

The changes color of the pectoral fins, spots and body color corresponding to 4 stages of development: juveniles, fingerlings, pre-adults, and adults (Table 3.9). The values of morphological indicators are shown in Table 3.10.

Table 3.9. *The body color of the Marbled eel in the population in Thua Thien Hue*

No	Indicators	W (g)	TL (mm)	Amount	Ratio (%)
1	The body is yellow, the back is brown, the spots are not clear; The fins are pale yellow almost transparent.	3.0 – 20.7 10.9 ± 4.91	120.0 – 228.5 180.1 ± 30.58	61	17.4
2	The body is yellow, with clear gray spots; The fins are yellow.	13.4 – 148.8 71.5 ± 39.47	187.0 – 410.0 313.9 ± 60.81	104	29.7
3	The back is brown, the spots are clear, the color is gray, the belly is gray-white; the fins are yellow-brown.	143.5 – 4500.0 657,4 ± 805,41	387.0 – 1136.9 574.7 ± 170.61	135	38.6
4	The back is golden brown, with black spots, yellow belly and tail; The fins are black or red	165.4 – 4500.0 1310.0 ± 1101.29	410.0 – 1136.9 726.4 ± 196.19	50	14.3
Total				350	100

Table 3.10. *The values of morphology indicators of Marbled eel in Thua Thien Hue*

Indicators	Average ± SD Min - Max	Indicators	Average ± SD Min - Max
W(g)	470.5 ± 788.19 (3.0 - 4500.0)	TL (mm)	452.9 ± 231.85 (120.0 - 1136.9)
HL (mm)	62.3 ± 27.25 (16.0 - 160.0)	HL/TL (%)	13.9 ± 0.64 (11.2 - 16.6)
PD (mm)	117.8 ± 51.71 (29.1 - 315.0)	PD/TL (%)	26.2 ± 1.35 (21.2 - 29.2)
PA (mm)	190.6 ± 83.14 (51.7 - 500.0)	PA/TL (%)	42.4 ± 1.97 (37.5 - 48.1)
TR (mm)	128.3 ± 56.42 (32.7 - 340.0)	TR/TL (%)	28.5 ± 2.04 (22.7 - 34.3)
AD (mm)	72.8 ± 32.21 (18.5 - 190.0)	AD/TL (%)	16.2 ± 1.57 (11.9 - 21.3)
PDH (mm)	55.5 ± 25.21 (11.7 - 160.0)	PDH/TL (%)	12.3 ± 1.43 (7.3 - 15.5)
T (mm)	257.7 ± 110.85 (66.3 - 614.6)	T/TL (%)	57.6 ± 1.97 (51.9 - 62.5)
E (mm)	6.0 ± 2.90 (1.4 - 18.0)	E/HL (%)	9.4 ± 1.27 (5.9 - 11.9)
IO (mm)	13.5 ± 6.13 (3.2 - 35.0)	IO/HL (%)	21.0 ± 1.86 (16.0 - 25.0)

3.3.2. Internal structure

Table 3.11. *Marbled Eel's mouth size*

Indices	TB ± SD	Min - max
Mouth size (mm)	31.3 ± 16.06	6.7 - 79.5
Mouth size / body length (%)	7.0 ± 0.48	5.6 - 7.9

Table 3.12. *Marbled eel's stomach and intestinal indexes*

Index	TB ± SD	Min - Max
Stomach length (mm)	138.1 ± 72.38	31.8 - 398.5
Stomach length / body length (%)	30.9 ± 2.42	26.5 - 35.3
Bowel length (mm)	167.3 ± 91.63	38.5 - 470.7
RLG	0.37 ± 0.041	0.30 - 0.43

3.3.3. Population structure is based on morphological indicators

Table 3.13. The principal components analysis of the morphological characteristics

Index	F1	F2	F3	F4	F5
TL (mm)	0.954	0.040	0,000	0,000	0.003
HL (mm)	0.947	0.046	0.001	0,000	0,000
PD (mm)	0.973	0.017	0.001	0.003	0,000
PA (mm)	0.982	0.013	0.000	0.000	0.001
TR (mm)	0.986	0.004	0.000	0.000	0.004
AD (mm)	0.965	0.007	0.003	0.012	0.004
PDH (mm)	0.963	0.001	0.001	0.016	0.004
T (mm)	0.920	0.069	0.000	0.000	0.004
HL/TL	0.027	0.046	0.149	0.101	0.676
PD/TL	0.105	0.382	0.195	0.253	0.064
PA/TL	0.167	0.767	0.005	0.050	0.010
TR/TL	0.118	0.839	0.003	0.013	0.026
AD/TL	0.054	0.320	0.091	0.526	0.009
PDH/TL	0.056	0.474	0.062	0.391	0.016
T/TL	0.167	0.767	0.005	0.050	0.010
IO (mm)	0.949	0.031	0.006	0.001	0.003
E (mm)	0.926	0.022	0.020	0.002	0.006
E/HL	0.023	0.037	0.610	0.070	0.064
IO/HL	0.005	0.029	0.555	0.14	0.099
Morphological characteristics	0.772	0.001	0.005	0.001	0.001
Eigenvalue	11.839	3.930	1.718	1.597	1.005
Variability (%)	56.378	18.716	8.181	7.603	4.786
Cumulative (%)	56.378	75.094	83.275	90.878	95.664

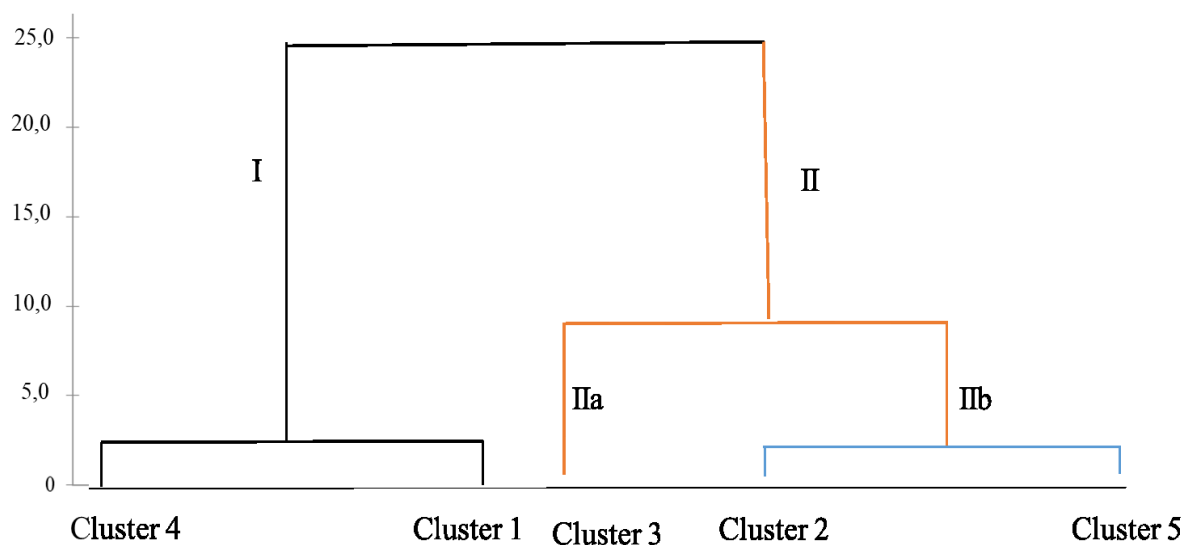


Figure.3.26. Phylogenetic tree of 350 Marbled eels based on Euclidean distance using Ward's method

Table 3.14. Morphological characteristics of *A. marmorata* in 5 clusters using Ward method based on Euclidean distance

Index	Cluster				
	1	2	3	4	5
Number of sample	76 DTL(13), DTR(2), LC(12), ND(11), PD(9), OL(4), PL(7), SBL(14), TA(2), TH(2)	70 DTL(7), DTR(7), LC(2), ND(6), PD(6), OL(2), PL(2), TA(6), AL(18), SBO(6)	83 DTL(6), DTR (1), LC(2), ND (6), PD (9), TA(11), TH (8), AL(28), SBO(12)	85 DTR (3), LC(26), ND(4), OL(3), PL(15), SBL(19), TA(9), TH(6)	36 DTL(6), DTR(7), LC(3), ND(2), PD(1), TA(2), TH(6), AL(6), SBO(3)
W (g)	160.8 ± 93.30 (29.0 – 469.5)	731.6 ± 297.01 (374.9 - 1540.3)	195.4 ± 81.84 (52.3 - 369.0)	14.8 ± 8.05 (3.0 – 34.0)	2406.1 ± 1025.5 (143.5 - 4500)
TL (mm)	401.3 ± 74.21 (260.0 – 552.0)	647.3 ± 74.80 (540.0 - 814.0)	435.5 ± 56.73 (324.6 - 532.9)	193.4 ± 35.04 (120.0 - 255.0)	915.5 ± 160.81 (407.0 - 1136.9)
HL (mm)	65.0 ± 16.31 (35.0 – 91.2)	82.7 ± 10.83 (58.0 – 122.4)	78.9 ± 4.18 (64.0 -91.2)	26.7 ± 5.36 (16.0 - 39.0)	94.4 ± 29.99 (45.0 - 160.0)
PD (mm)	124.1 ± 30.89 (63.4 - 175.0)	154.7 ± 19.70 (112.0 - 210.6)	150.6 ± 7.37 (135.7 - 175.0)	49.7 ± 9.46 (29.1 - 68.0)	179.1 ± 57.83 (90.0 - 315.0)
PA (mm)	199.5 ± 48.74 (112.0 - 265.6)	254.3 ± 30.50 (188.0 - 341.3)	241.0 ± 10.99 (221.5 - 265.6)	80.1 ± 15.05 (51.7 - 106.0)	288.3 ± 88.91 (150.0 - 500.0)
TR (mm)	134.5 ± 33.28 (71.9 - 182.6)	171.6 ± 22.46 (130.0 - 232.4)	162.1 ± 10.92 (140.1 - 182.6)	53.5 ± 10.05 (32.7 - 72.0)	193.8 ± 59.62 (105.0 - 340.0)
AD (mm)	75.4 ± 18.95 (38.9 - 112.4)	99.6 ± 14.30 (70.5 - 140.0)	90.4 ± 8.05 (70.1 - 112.4)	30.4 ± 6.24 (18.5 - 43.1)	109.1 ± 32.37 (60.0 - 190.0)
PDH (mm)	59.1 ± 15.88 (22.0 - 90.0)	72.0 ± 11.47 (45.4 - 103.2)	71.7 ± 8.13 (58.9 - 90.0)	23.0 ± 4.66 (11.7 - 33.0)	84.7 ± 29.08 (45.0 - 160.0)
T (mm)	268.2 ± 67.44 (147.0 - 391.4)	338.4 ± 40.37 (240.0 - 488.3)	327.0 ± 16.61 (275.0 - 391.4)	113.3 ± 20.48 (66.3 - 158.0)	395.6 ± 118.56 (192.0 - 614.6)
HL/TL (%)	13.9 ± 0.68 (11.2 - 16.6)	13.9 ± 0.65 (13.0 - 15.9)	13.9 ± 0.69 (11.2 - 15.1)	13.8 ± 0.61 (11.2 - 15.9)	13.8 ± 0.43 (13.0 - 14.8)
PD/TL (%)	26.5 ± 1.26 (23.1 - 29.2)	26.1 ± 1.41 (21.2 - 28.7)	26.5 ± 1.24 (23.3 - 29.2)	25.7 ± 1.26 (21.2 - 28.6)	26.1 ± 1.50 (21.2 - 29.2)
PA/TL (%)	42.7 ± 1.85 (37.5 - 47.6)	42.9 ± 2.37 (37.8 - 48.1)	42.4 ± 1.84 (38.9 - 45.8)	41.4 ± 1.49 (38.0 - 44.7)	42.2 ± 1.87 (38.0 - 46.3)
TR/TL (%)	28.8 ± 1.92 (22.7 - 33.9)	29.0 ± 2.50 (23.1 - 34.3)	28.5 ± 1.89 (24.6 - 32.0)	27.7 ± 1.59 (23.7 - 31.1)	28.4 ± 1.93 (23.7 - 31.5)
AD/TL (%)	16.2 ± 1.47 (11.9 - 20.4)	16.8 ± 1.87 (12.4 - 21.3)	15.9 ± 1.40 (12.3 – 19.3)	15.7 ± 1.47 (12.3 - 20.4)	16.0 ± 1.26 (13.7 - 18.4)
PDH/TL (%)	12.6 ± 1.42 (7.3 - 15.5)	12.2 ± 1.42 (8.0 - 14.5)	12.6 ± 1.42 (9.4 - 15.5)	11.9 ± 1.32 (8.0 - 15.5)	12.4 ± 1.47 (8.0 - 14.8)
T/TL (%)	57.3 ± 1.85 (52.4 - 62.5)	57.1 ± 2.37 (51.9 - 62.2)	57.6 ± 1.84 (54.2 – 61.1)	58.6 ± 1.49 (55.3 - 62.0)	57.8 ± 1.87 (53.7 - 62.0)
IO (mm)	14.1 ± 4.15 (7.0 - 20.2)	17.9 ± 2.46 (13.0 - 27.6)	17.6 ± 1.52 (13.8 – 20.2)	5.7 ± 1.36 (3.2 - 8.8)	20.7 - 6.26 (9.0 - 35.0)
E (mm)	6.2 ± 2.00 (2.6 - 9.9)	8.2 ± 1.55 (5.0 - 13.1)	7.9 ± 1.06 (4.9 – 9.9)	2.5 ± 0.60 (1.4 - 4.0)	9.3 ± 3.16 (4.0 - 18.0)
E/HL (%)	9.2 ± 1.34 (5.9 - 11.9)	9.5 ± 1.27 (6.1 - 11.7)	9.5 ± 1.23 (5.9 – 11.9)	9.4 ± 1.17 (7.3 - 11.5)	9.5 ± 1.16 (7.7 - 11.6)
IO/HL (%)	20.9 ± 1.67 (16.7 - 24.2)	20.9 ± 1.67 (17.6 - 24.1)	21.2 ± 1.61 (16.7 – 24.2)	21.2 ± 2.20 (16.0 - 25.0)	21.2 ± 2.10 (17.6 - 24.2)
Outward appearance	yellow, clear mottled color, yellow pectoral fins (69.7%); brown back, clear mottled greyish-white abdomen, brownish-yellow fins (23.7%) and yellow-brown back, with black spots, yellow abdomen, black fins or red-black (6.6%)	brown back, clear mottled color, gray and white abdomen: (65.7%); brown yellow back, black spots, yellow abdomen and tail, black or red fins (34.3%)	yellow, clear mottled color, yellow pectoral fins (32.5%); brown back, clear mottled, gray and white abdomen: (62.7%); brown yellow back, black spots, yellow abdomen and tail, black or red fins (4.8%)	yellow, not clear mottled color, pectoral fins are pale yellow, almost transparent (71.8%) and Eel is yellow, clear mottled color, yellow pectoral fins (28.2%)	brown back, clear mottled color, gray and white abdomen (52.8%), brownish-yellow back, black spots, yellow abdomen and tail, black or red fins (47.2%)

3.4. Genetic diversity by molecular markers

3.4.1. Isolation of COI and 16S rRNA gene segments

The DNA barcode fragments have been successfully isolated with the codes on Genbank as MN067923 - MN067970 (*COI*) and MN633308 - MN633355 (*16S rRNA*) with a total length: 845 bp and 641 bp, respectively.

3.4.2. Population genetic structure

3.4.2.1. Variety and evolutionary trends

The genetic diversity of the population is shown in Table 3.15, Table 3.16 and Table 3.17.

Table 3.15. Neutrality tests for COI data

Population	DTL	DTR	ND	PD	PL	TTH
No. of sample	10	5	9	14	10	48
H	5	4	6	9	5	17(35.42%)
S	7	4	6	9	6	20
Hd	0.76 ± 0.017	0.9 ± 0.026	0.89 ± 0.008	0.88 ± 0.0062	0.76 ± 0.017	0.801 ± 0.003
Π	0.00185	0.00190	0.00178	0.00242	0.00161	0.00196
Tajima's D	-1.573*	-1.0938	-1.3984	-1.06599	-1.4929	-2.03402*
Fu's Fs	-1.181*	-1.405*	-2.978*	-4.742*	-1.507	-12.2282*
Fu and Li's Fs	-1.818	-1.0938	-1.5509	-1.07521	-1.6893	-2.93225*
Fu and Li's D	-1.634	-1.0938	-1.3904	-0.8946	-1.51	-2.70391*

Table 3.16. Neutrality tests for 16S rRNA data

Population	DTL	DTR	ND	PD	PL	TTH
No. of Sample	10	5	9	14	10	48
H	4	3	3	4	3	8(16.67%)
S	3	2	2	3	2	7
Hd	0.53 ± 0.032	0.70 ± 0.048	0.64 ± 0.016	0.58 ± 0.019	0.38 ± 0.033	0.53 ± 0.079
Π	0.00094	0.00125	0.00113	0.00105	0.00062	0.00096
Tajima's D	-1.56222	-0.97256	-0.06382	-0.886	-1.40085	-1.62974*
Fu's Fs	-1.964	-0.829	-0.239	-1.290	-1.164	-5.307*
Fu and Li's Fs	-1.93380	-0.97256	-0.18701	-0.22536	-1.57441	-1.96622*
Fu and Li's D	-1.78443	-0.97256	-0.22104	0.01678	-1.58662	-1.84556*

Table 3.17. Fst value and Nm among populations in Thua Thien Hue

Gen	Population	DTL	DTR	ND	PD	PL
COI	DTL	--	0.012	-0.012	-0.011	0.001
	DTR	-0.038*	--	0.003	-0.012	0.011
	ND	-0.042*	-0.073*	--	-0.020	-0.011
	PD	0.046*	-0.045*	0.012*	--	-0.010
	PL	0.003*	-0.041*	-0.045*	0.048*	--
16S rRNA	DTL	--	-20.2981	8.415511	-3.74993	-6.24952
	DTR	-0.0606*	--	-30.0119	-5.22611	-24.0822
	ND	0.02459*	-0.0703*	--	-3.80568	9.916734
	PD	-0.0105*	-0.0502*	-0.0084*	--	-4.37473
	PL	-0.0417*	-0.0714*	0.02885*	-0.0125*	--

Data allow is F_{st} ; Nm values are data above, * indicates the significance level of F_{st} value at $p < 0.001$.

3.4.2.2. Genetic variations

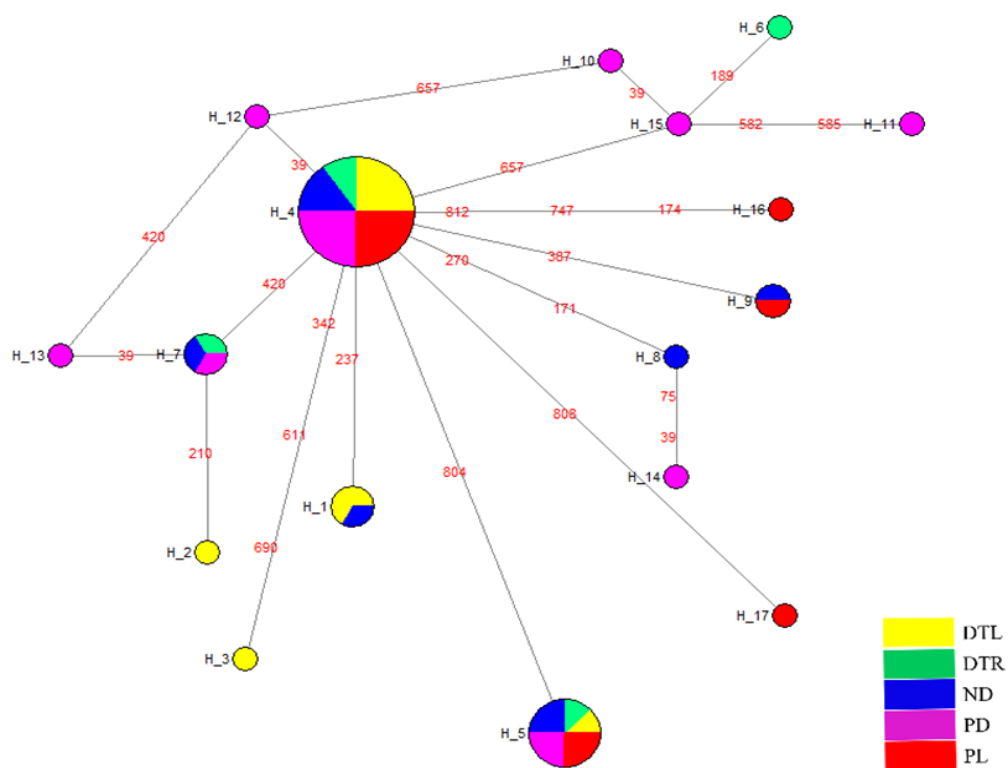


Figure 3.27. Median-joining network for COI haplotypes

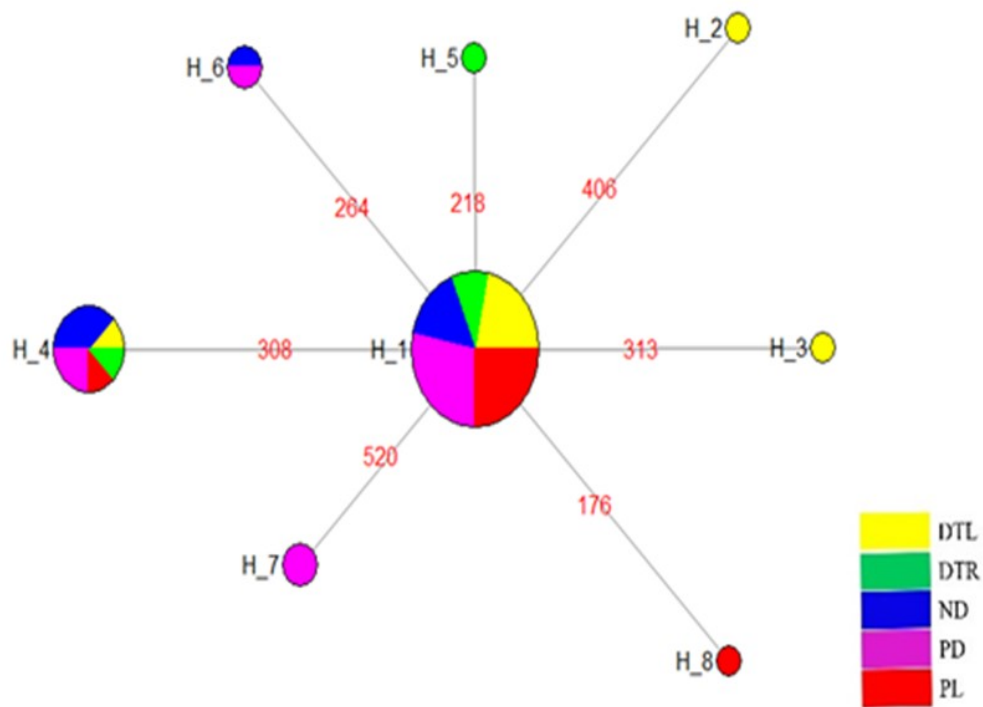


Figure 3.28. Median-joining network for 16S rRNA haplotypes

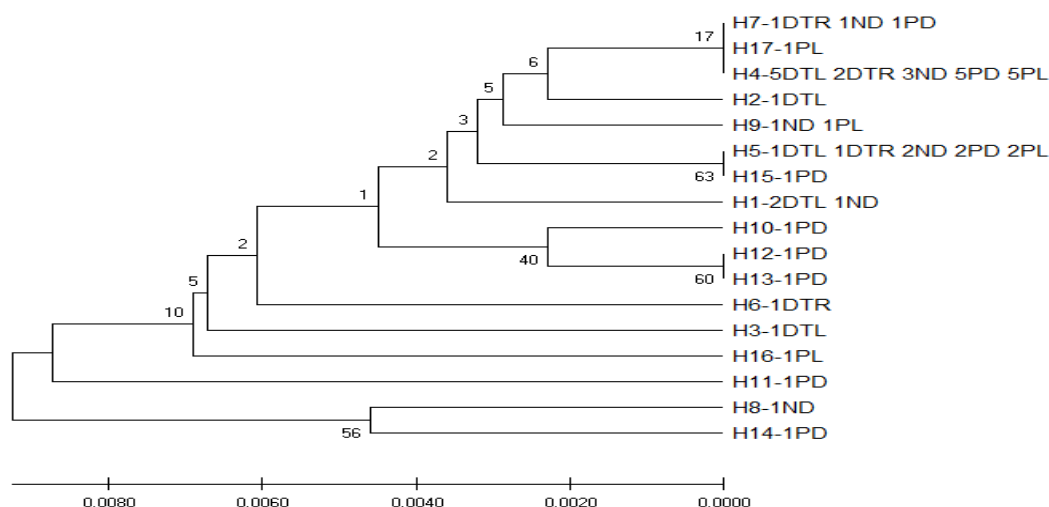


Figure 3.29. The phylogenetic relationship among haplotypes was determined using *COI*

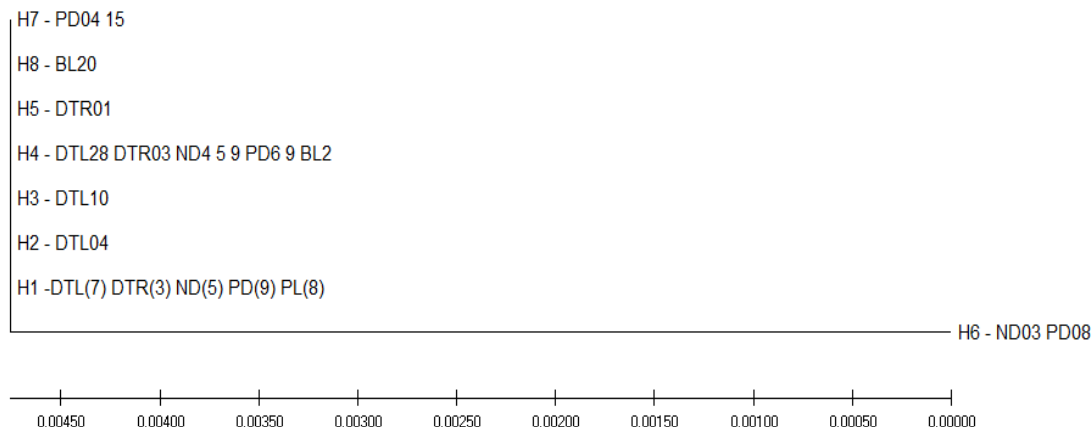


Figure 3.30. The phylogenetic relationship among haplotypes determined using *16S rRNA*

3.4.3. Estimates of the evolutionary divergence and phylogenetic trees

The phylogenetic trees were built. In which, Neighbor-Joining phylogenetic trees have the total of branch length = 0.08396 for *COI* (Fig 3.31) and 0.01346 for *16S rRNA* (Fig.3.35). Maximum Likelihood phylogenetic trees have highest reasonableness = -1336.57 for *COI* and - 934,58 for *16S rRNA* (Fig. 3.32 and Fig. 3.36). Maximum Parsimony phylogenetic tree shows consistency index = 0.727273, the retention index = 0.875, and the composite index = 0.77 for *COI* (Fig. 3.33). The total of branch length = 8, consistency index =1.00, the retention index =1.00 and the composite index = 1.00 of Maximum Parsimony phylogenetic trees for *16S rRNA* (Fig. 3.37). UPGMA phylogenetic trees for *COI* have the total of branch length = 0.05699 (Fig. 3.34) and 0.0102 for *16S rRNA* (Fig. 3.38).

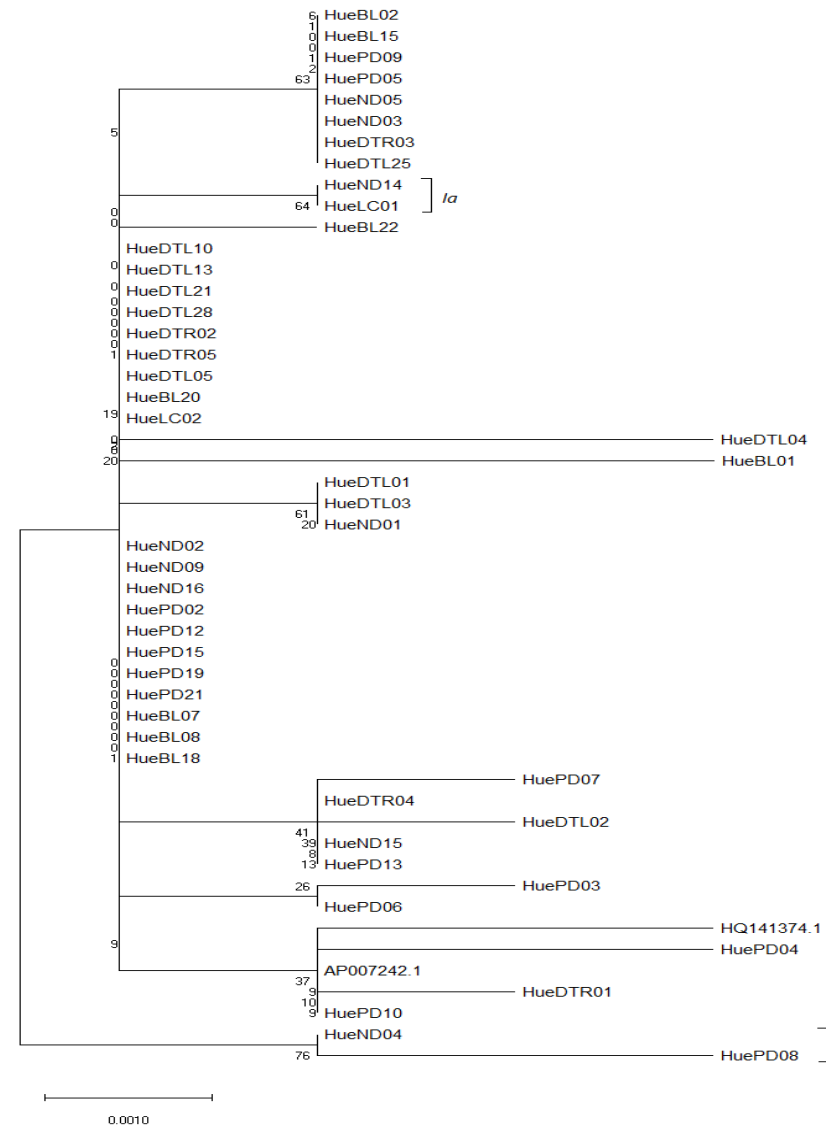
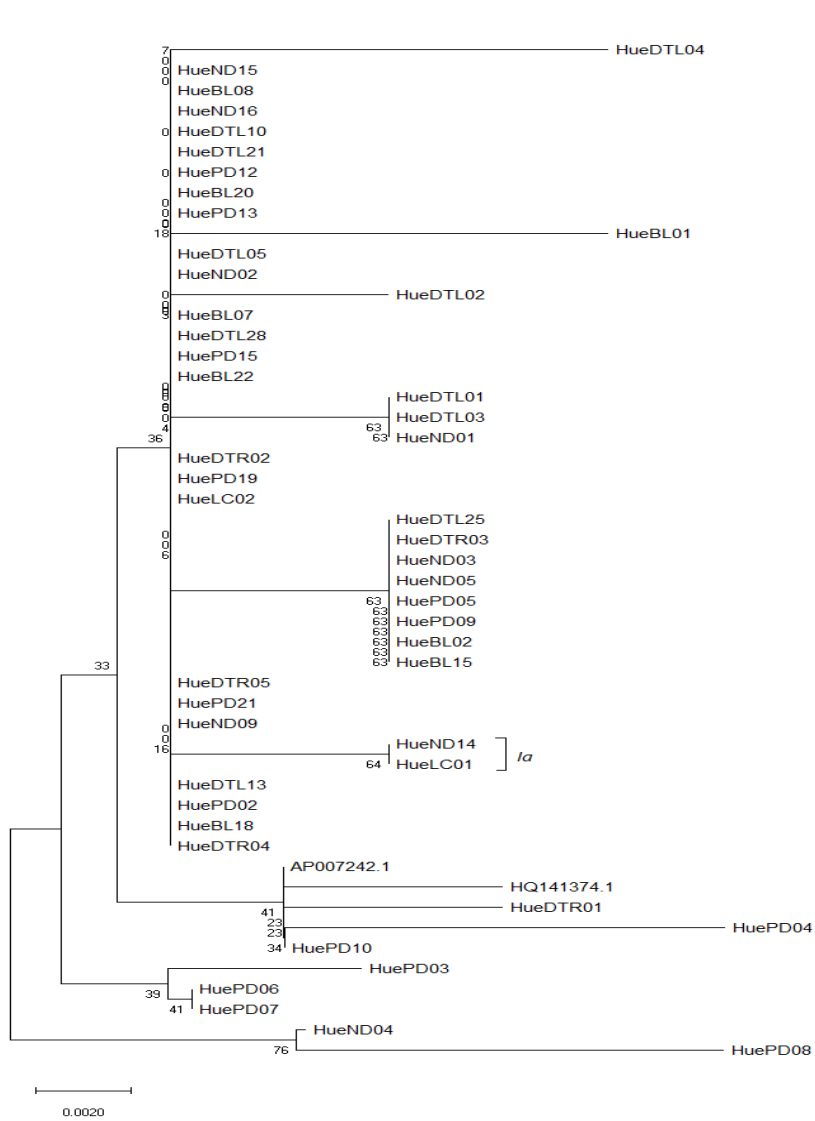


Figure 3.31 and Figure 3.32. Neighbor-Joining and Maximum Likelihood phylogenetic trees based on COI sequences

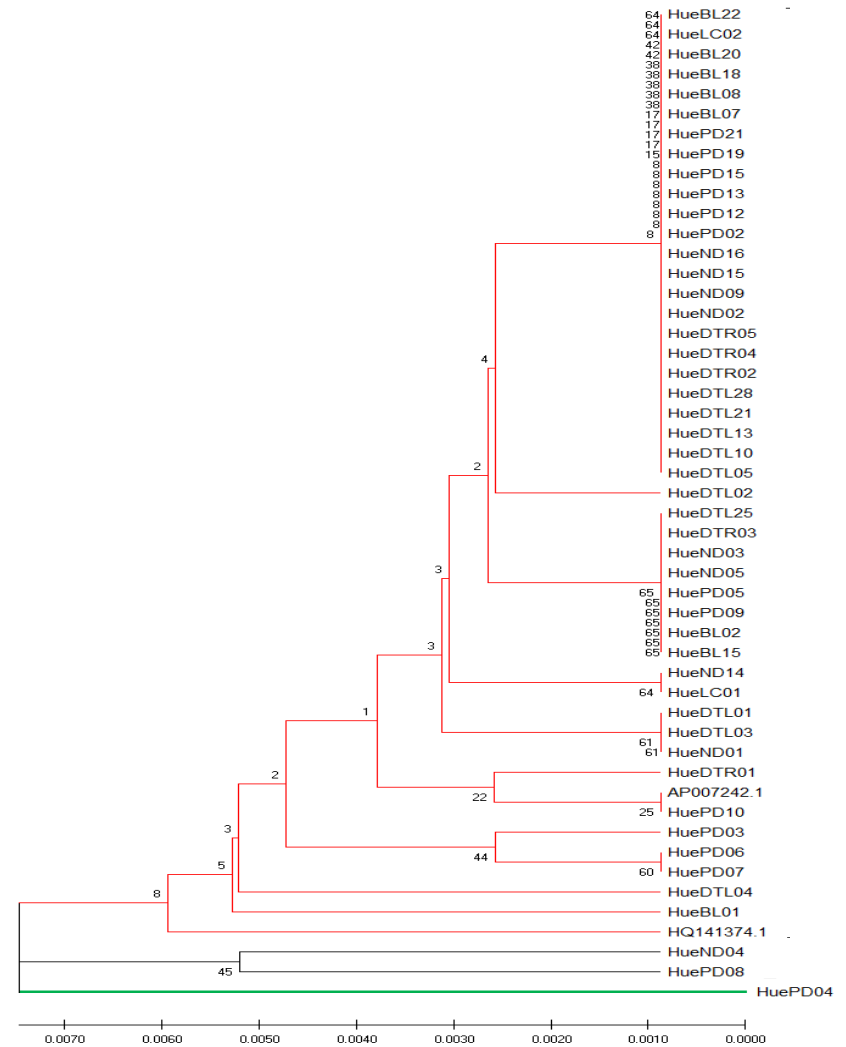
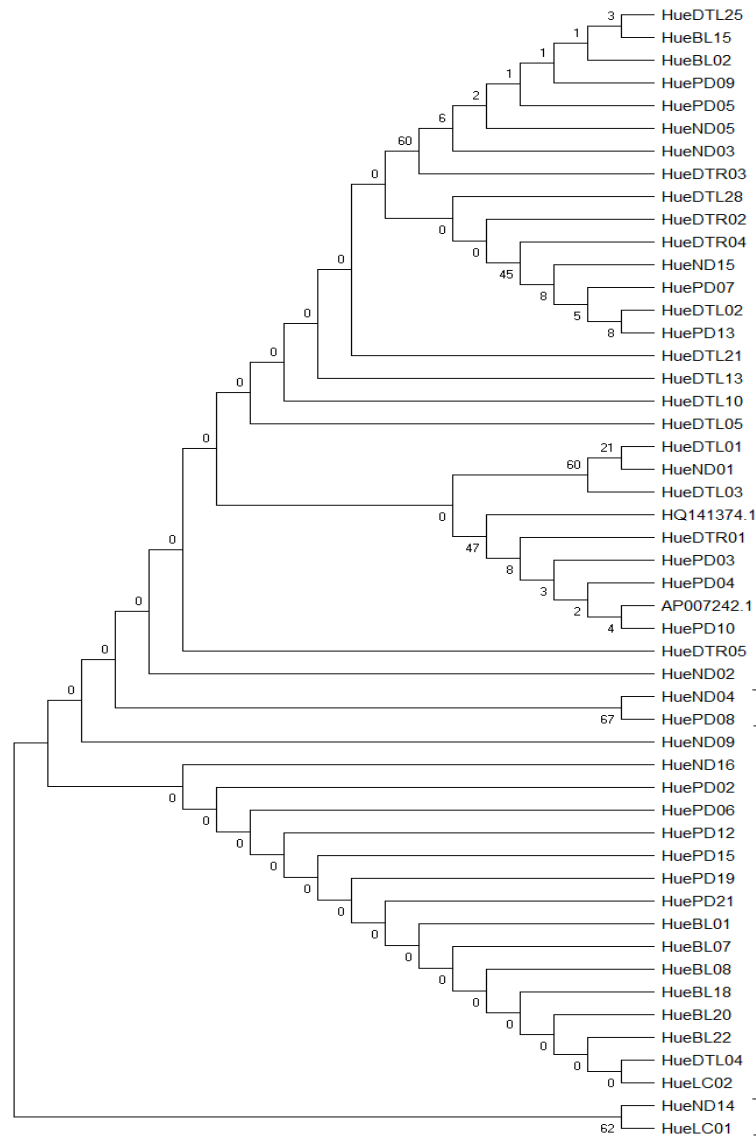


Figure 3.33 and Figure 3.34. Maximum Parsimony and UPGMA phylogenetic trees based on the COI sequences



Figure 3.35 and Figure 3.36. Neighbor-Joining and Maximum Likelihood phylogenetic trees based on 16S rRNA sequences

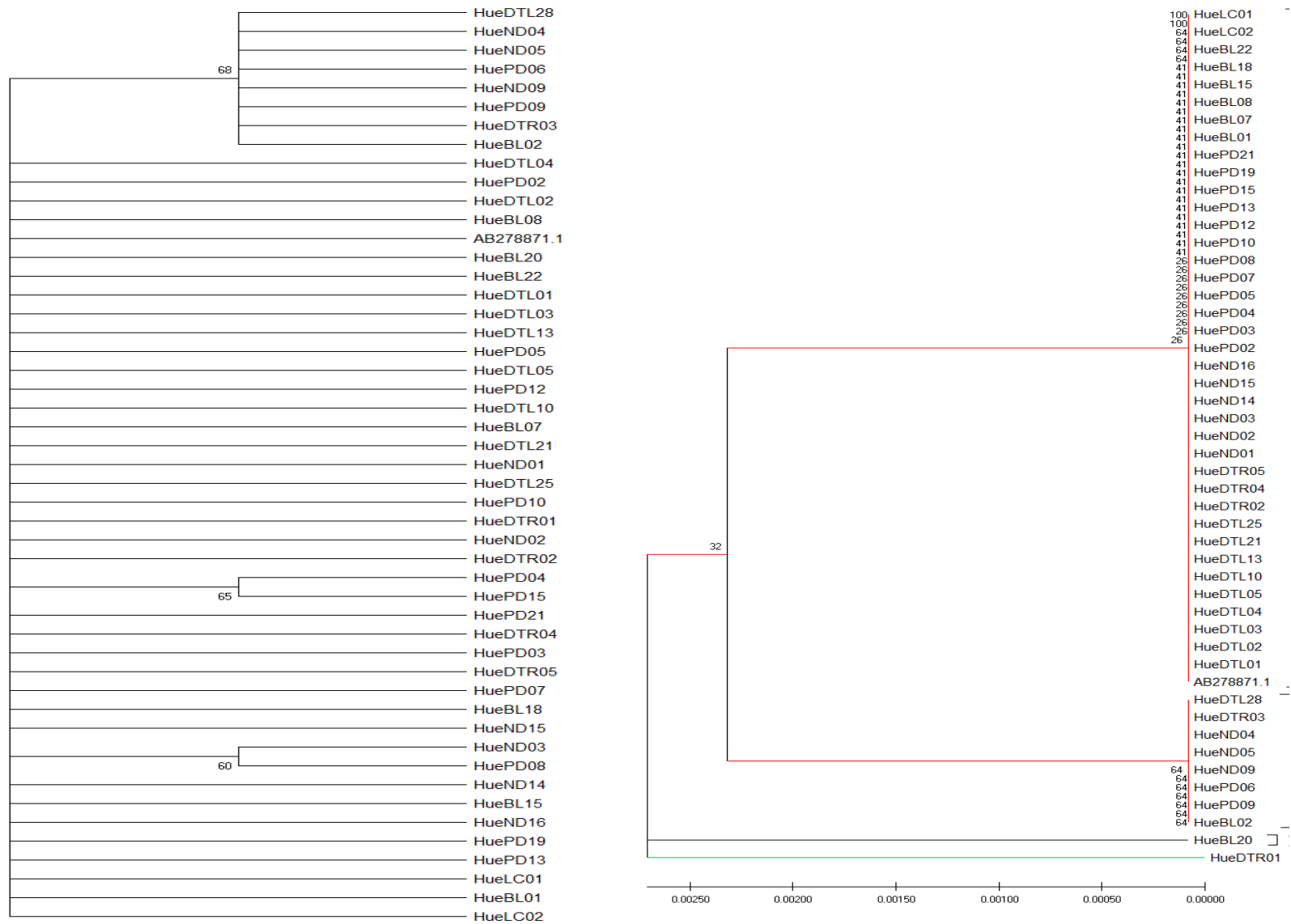


Figure 3.37 and Figure 3.38. Maximum Parsimony and UPGMA phylogenetic trees based on 16S rRNA sequences

Chapter 4. DISCUSSION

4.1. Distribution characteristics

The environmental characteristics of the water bodies in Thua Thien Hue province completely match with the biological characteristics of the Eel in the period from 120 - 1137 mm (3.0 - 4500 g). Marbled eel is widely distributed in most studied water bodies. The juvenile eel (TL < 200 mm) and adult eels appear seasonal (dry and rainy seasons). The distribution characteristics of time and space of Eel are completely consistent with the operation of the ecological mechanisms and biological behavior of the species. PCA and CA analyzes showed diversity in the adaptation of Eel at different sizes to ecological conditions in the study areas. This result shows the strong influence of environmental factors on the adaptability of the eel in different stages of development. Based on data of distribution characteristics, the life cycle of the Marbled eel in Thua Thien Hue has been partly provided. This is an important basis for developing species conservation strategies related to the protection of their habitats at different stages and water bodies. In addition, the low numbers and proportions of large eels distributed in the wild in the middle and upstream regions have raised concerns about the risk of loss of resources due to the impacts of socio-economic activities on upstream migration and their habitats in the wild.

4.2. Morphological characteristics

The morphological descriptions of the Marbled eel in Thua Thien Hue (TL = 120 - 1137 mm) are consistent with the descriptions in studied previously. In this study, distinct characteristics between developmental stages have been shown. The external and internal morphological characteristics show the ability to adapt to the living environment, and to the biological behavior and predatory behavior of the Marbled eel. Population structure analysis based on morphological indicators has shown high phenotypic polymorphism associated with the eel's body color at the developmental stages while inhabiting different ecosystems.

4.3. Genetic diversity

Analysis has shown high genetic diversity of the Marbled eel populations in Thua Thien Hue with a high rate of variations and alleles. An evolutionary trend towards geographic expansion has also been found in Thua Thien Hue population. This result is consistent with the hypotheses and research results of other authors performed on the Marbled eel and other *Anguilla* in the region and over the world. Moreover, the analysis of the population generation pattern shows a high diversity of genetic distance between individuals in the Thua Thien Hue population, the same sampling areas and other individuals in the Indo - Pacific region. The proximity to genetic distance shows that the majority of individuals belonging to the Marbled eel population distributed in Thua Thien Hue have the same genetic origin and have a close relationship with the populations in the Indo-Pacific region. Variants that are genetically long distant from the rest may arise from random migration from isolated populations within the area or by typical environmental characteristics in Thua Thien Hue.

CONCLUSION AND RECOMMENDATION

Conclusions

1) Marbled eel distributed in Thua Thien Hue has characteristic morphology corresponding to four stages: juveniles, fingerlings, pre-adults and adults. The correlation equation between weight and length has the form: $W = 5 \times 10^{-7} L^{3.26}$. The Eel population has a high morphological diversity associated with changes in body color at various stages of development and environmental factors. The internal structural characteristics show that Marbled eel is an animal-eating species.

2) Commonly occurring eels in environmental conditions include: temperature: 21 - 32 ° C, pH: 6.5 - 8.6, DO: 6.5 - 9.5 mg / L, salinity: 0 - 15 ‰, depth: 0.3 - 11 m, the bottom has many holes (72.0%), flow disturbance, water color, tidal regime (72.9%). The high diversity in the population structure of the Eel in Thua Thien Hue is related to the choice of their distribution environment in the water bodies and the stages of the life cycle (59.9%).

3) In Thua Thien Hue, Marbled eel (TL = 120 – 1137) distributes widely year-round in all water bodies for two seasons. The dry season is from January to July, which corresponds to migration time of juveniles (TL = 100 - 200 mm) from the coastal. The rainy season corresponds to spawning migration time of adults (TL > 700 mm) from August to December.

4) The two gene segments, *COI* and *16S rRNA*, were isolated with 845 bp and 641 bp of total length of sequences, respectively. Their access code on NCBI data is from MN067923 to MN067970 and from MN633308 to MN633355 for *COI* and *16S rRNA*, respectively. Most of them have a high similarity rate with the control samples on Genbank. Marbled eel population in Thua Thien Hue recorded the high genetic diversity (20 polymorphic sites and 17 haplotypes for *COI*; 7 polymorphic sites and 8 haplotypes for *16S rRNA*), evolution tendency in random and expand the geographic range of the population (negative values of neutral tests) and having a close genetic relationship with the Indo-Pacific populations.

Recommendations

1) Studies on migration, nutrition, growth, reproduction, and cytology analysis should be performed to build biological indicators for Marbled eel at different growth stages, and increase species awareness.

2) Using DNA data from the environment (eDNA) to study genetic resources and diversity. Carry out researches on the effects of climate change, environmental pollution, diversion activities, tourism services, and fishing in basins on Eel resources.

3) Develop plans, strategies and coordinate to conserve genetic resources and protect living environment in order to maintain and develop Eel resources in Thua Thien Hue, Vietnam and other countries in the region. On the basis of developing higher studies and the ability to conduct electrical impulses on the surface of the fish and recognize the environmental change through automatic chips.

LIST OF PUBLICATION RELATED TO THESIS

No.	Article	Journal name and No.	Authors	Ranting
1	Characterization of giant mottled eel (<i>Anguilla marmorata</i>) gastrointestinal tract that origin from Thua Thien Hue, Vietnam.	J Fish Res. 3(2):4-9.(2019) DOI: 10.35841/fisheries-research.3.2.4-9	Huyen KT, Linh NQ	Scopus
2	Phylogenetic analysis of <i>Anguilla marmorata</i> population in Thua Thien Hue, Vietnam based on the <i>cytochrome C oxidase I (COI)</i> gene fragments.	AMB Expr 10, 122 (2020). https://doi.org/10.1186/s13568-020-01059-7	Huyen KT, Linh NQ	ISI, Q2
3	Nutrition composition and lipid distribution in the flesh of species <i>Anguilla marmorata</i> natural mining in Thua Thien Hue, Vietnam.	Hue university journal of science: Agriculture and rural development 129, 3C (2020). http://jos.hueuni.edu.vn/index.php/HUJOS-ARD/article/view/5848	Kieu Thi Huyen, Nguyen Quang Linh	HDCDNN
4	Using DNA barcodes based on mitochondrial <i>COI</i> and 16S <i>rRNA</i> genes to identify <i>Anguilla</i> eels in Thua Thien Hue province, Vietnam.	<i>Genet. Mol. Res.</i> (2020) 19 (4): gmr18722. DOI http://dx.doi.org/10.4238/gmr18722	K.T. Huyen*, V.D.Nghia, T.N.Ngoc, T.V. Dan, V.V. Phu, T.Q. Dung and N.Q. Linh	ISI, Q3

HUE UNIVERSITY
HUE UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY

KIEU THI HUYEN

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS IN AQUACULTURE

**STUDY ON CHARACTERISTICS OF DISTRIBUTION, MORPHOLOGY
AND GENETIC DIVERSITY OF MARBLED EEL
(*Anguilla marmorata* QUOY & GAIMARD, 1824) IN THUA THIEN HUE**

HUE - 2021

HUE UNIVERSITY
HUE UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS IN AQUACULTURE

**STUDY ON CHARACTERISTICS OF DISTRIBUTION, MORPHOLOGY
AND GENETIC DIVERSITY OF MARBLED EEL
(*Anguilla marmorata* QUOY & GAIMARD, 1824) IN THUA THIEN HUE**

MAJOR: AQUACULTURE

CODE: 9620301

HUE - 2021