

ỨNG DỤNG CHỈ THỊ MICROSATELITE PHÂN BIỆT QUẦN ĐÀN TÔM HÙM XANH (*Parulinus homarus*) Ở VIỆT NAM VÀ SRI LANKA

Nguyễn Nguyễn Thành Nhơn¹, Đặng Thúy Bình²,
Trần Quang Sáng², Nguyễn Minh Châu¹, Phạm Thị Hạnh³

TÓM TẮT

Tôm hùm xanh (*Parulinus homarus*) phân bố rộng rãi ở Việt Nam, là hải sản có giá trị kinh tế cao và đối tượng nuôi ở các tỉnh miền Trung. Năm (05) chỉ thị Microsatellite được sử dụng để khảo sát đa dạng, khác biệt di truyền và cấu trúc quần thể tôm hùm xanh ở Việt Nam và Sri Lanka. Tổng số 50 alen được phát hiện trên cả 2 quần thể Việt Nam và Sri Lanka (42 ở Việt Nam, 38 ở Sri Lanka), 9/10 vị trí microsatellite không tuân theo định luật cân bằng HW. Quần thể tôm hùm xanh Việt Nam thể hiện đa dạng di truyền cao hơn quần thể Sri Lanka. Ở quần thể tôm hùm Việt Nam có số alen trung bình - và hệ số dị hợp tử quan sát lần lượt là $8,4 \pm 1,778$ và $0,540 \pm 0,108$, trong khi quần thể tôm hùm xanh của Sri Lanka có số alen trung bình là $7,6 \pm 1,166$ và hệ số dị hợp tử quan sát là $0,367 \pm 0,077$. Giá trị khác biệt di truyền F_{st} là 0,021 ($P < 0,05$) phân tích DAPC cho thấy sự phân tách biệt giữa hai quần thể, trong khi kiểm tra AMOVA lại không có sự sai khác có ý nghĩa ($P = 0,99$). Nghiên cứu hiện tại cung cấp dẫn liệu về đặc trưng di truyền quần thể tôm hùm xanh ở Việt Nam trên cơ sở so sánh với quần thể Sri Lanka. Thu thập mẫu tôm hùm xanh theo phạm vi phân bố và khảo sát các chỉ thị microsatellite với số lượng lớn là rất cần thiết để xây dựng định hướng bảo tồn và quản lý nguồn lợi tôm hùm xanh ở Việt Nam bền vững.

Từ khóa: Di truyền, microsatellites, quần thể, tôm hùm xanh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm hùm là một trong những hải sản có giá trị thương mại cao và được tiêu thụ trên toàn thế giới. Tôm hùm phân bố chủ yếu dọc theo khu vực Ấn Độ Dương và Thái Bình Dương (Phillips, 2013). Trên thế giới, sản lượng của tôm hùm khoảng 270.000 tấn/năm trong đó có đến 98% là dạng tự khai thác tự nhiên còn lại là do nuôi trồng. Giống tôm hùm gai (*Panulirus* spp.) chiếm 28% (FAO, 2015). Việt Nam là một trong những nhà cung cấp tôm hùm lớn với sản lượng khai thác hàng năm khoảng 1.500 - 2.000 tấn/năm, tương đương 3 - 4 nghìn tỉ đồng (Tổng cục Thủy sản, 2015), chiếm 2% tổng sản lượng tôm hùm gai trên thế giới. Tôm hùm xanh và tôm hùm bóng là 2 loài được nuôi phổ biến ở vùng Nam Trung bộ, Việt Nam.

Kỹ thuật Microsatellites hay chuỗi lặp lại đơn giản (Simple Sequence Repeats-SSR) là công cụ hữu

ích, được ứng dụng rộng rãi trong đánh giá đa dạng di truyền, định loại tôm hùm, liên kết vòng đời và nghiên cứu cấu trúc di truyền quần thể (Dao *et al.*, 2015; Delghandi *et al.*, 2017; Ellis *et al.*, 2017). Cho đến nay, một số chỉ thị microsatellites đặc trưng cho tôm hùm gai được xác định và có thể ứng dụng trên nhiều loài và các khu vực địa lý (Ben-Horin *et al.*, 2009; Dao *et al.*, 2013; Delghandi *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018).

Nghiên cứu này ứng dụng các chỉ thị Microsatellites nhằm khảo sát đa dạng di truyền và đặc trưng quần thể của tôm hùm xanh (*Panulirus homarus*) dọc theo bờ biển miền Trung, Việt Nam và phân định với quần thể ở Sri Lanka, làm cơ sở cho công tác bảo tồn, quản lý nguồn lợi, cũng như di truyền chọn giống định hướng phát triển nghề nuôi bền vững.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm nghiên cứu và phương pháp thu mẫu

Tôm hùm xanh (*P. homarus*) tự nhiên được thu ở Việt Nam và Sri Lanka, mỗi khu vực thu 30 cá thể. Tại Việt Nam, mẫu được thu ở phường Đức Long,

¹ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

² Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang

³ Viện Nuôi trồng Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

Email: thanhnhon@ria3.vn

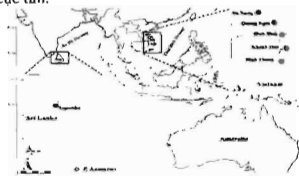
thành phố Phan Thiết, tỉnh Bình Thuận; xã Vạn Hưng, huyện Vạn Ninh, tỉnh Khánh Hòa; xã Cát Khánh, huyện Phù Cát, tỉnh Bình Định; xã Tinh Kỳ, huyện Sơn Tịnh, tỉnh Quảng Ngãi; phường Phước Mỹ, bán đảo Sơn Trà, thành phố Đà Nẵng đại diện cho khu vực phân bố ở miền Trung, mỗi tỉnh chọn 6 cá thể. Do đặc thù khoảng cách địa lý, mẫu tôm hùm chỉ được thu tại một địa điểm (Negombo) ở Sri Lanka. Địa điểm thu mẫu được trình bày ở hình 1. Mẫu tôm được thu trực tiếp từ các ngư dân đánh bắt tôm hùm. Sau khi định danh chính xác dựa trên đặc điểm hình thái (George và Holthius, 1965), mẫu cơ và chân bơi được bảo quản trong cồn tuyệt đối, sau đó chuyển về phòng thí nghiệm và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Tách chiết ADN, khuếch đại dựa trên chỉ thị microsatellite

ADN được tách chiết từ 25 mg mẫu mô cơ chủ yếu với mẫu tôm hùm từ Sri Lanka của từng cá thể tôm hùm bằng bộ kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nghiên cứu hiện tại sử dụng 5 chỉ thị phân tử microsatellite được lựa chọn từ nghiên cứu của (Delghandi *et al.*, 2016). Đối với mỗi cặp mồi, mồi xuôi được gắn chỉ thị huỳnh quang FAM hoặc HEX ở đầu 5'. Đồng thời, nghiên cứu tối ưu tổ hợp mồi cho

phản ứng PCR đa mồi gồm PCR I (Pho-G45 và Pho-G62), PCR II (Pho-G74 và Pho-G91) và PCR III (Pho-G100). Thông tin chi tiết về trình tự đoạn mồi, mẫu huỳnh quang, kiểu lặp của mỗi được trình bày ở bảng 1. Phản ứng khuếch đại PCR được thực hiện với thể tích 25 µl gồm 12,5 µl GoTaq Master Mix 2X (Promega), 1 µl mỗi loại mồi (10 mM). 5 µl mẫu DNA và nước cho đủ thể tích. Phản ứng được chạy trên máy luân nhiệt Icycler (Bio-Rad) theo chu trình nhiệt độ: biến tính ban đầu tại 94°C trong 3 phút; sau đó là 35 chu kỳ của 94°C trong 30 giây, nhiệt độ lai (Bảng 1) trong 45 giây, 72°C trong 30 giây; cuối cùng là bước kéo dài 72°C trong 5 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel garose 1,5%, nhuộm Ethidium bromide và quan sát kết quả dưới tia cực tím.



Hình 1. Sơ đồ địa điểm thu mẫu (chấm tròn màu xanh) của tôm hùm xanh (*Panulirus homarus*) tại Việt Nam và Sri Lanka

Bảng 1. Thông tin về các chỉ thị microsatellite được sử dụng trong nghiên cứu

Tổ hợp PCR đa mồi	Locus	Kiểu lặp	Nhiệt độ lai (°C)	Trình tự mồi (5' - 3')	Độ dài (bp)
PCR I	Pho-G45	AGAT	56	FAM_F-GGATGGCAGAGGAGGCAAC	364-394
				R- GTTTCCTCGAACCCGGAGACAAATGC	
	Pho-G62	ATCT		HEX_F-CGTAGCTAGGACGCCATTTG	174-198
				R- GTTTCCTTTGAGCCAACGTCCCAGTC	
PCR II	Pho-G74	AC	58	FAM_F-ACGTCCACTTACGAGAGCC	176-204
				R-GTTTCCTCCCAGGAATATGCTTTGTGCC	
	Pho-G91	CCT		HEX_F-AGAGCAACTCTCGTAGCC	245-263
				R- GTTTCCTGTCTTGTGACGTGCTTTGG	
PCR III	Pho-G100	TCC	58	FAM_F-CCTCTCGCGGTACACC	228-249
		R- GTTTCCTTATCGCTCATAATCAGGCGG			

2.3. Giải mã và xử lý dữ liệu trình tự

Trước khi tiến hành giải trình tự, tất cả sản phẩm PCR được tinh sạch bởi kit Expin™ PCRSV (GeneAII) để đảm bảo chất lượng cho việc giải trình tự. Phân tích đoạn được thực hiện trên hệ thống máy

ABI 3730XL (Thermo Fisher Scientific) tại Công ty 1st Base (Singapore). Phần mềm Peak Scanner v2.0 (Applied Biosystems, 2006) được sử dụng để ghi nhận kích thước chính xác của các alen từ file dữ liệu fasta (.fsa).

2.4. Nghiên cứu di truyền quần thể tôm hùm xanh

2.4.1. Khảo sát đa dạng và sự khác biệt di truyền

Đa dạng di truyền của quần thể tôm hùm xanh tại hai khu vực địa lý (Việt Nam và Sri Lanka) được khảo sát thông qua các giá trị: Số lượng alen và số alen trung bình trên từng locus (Na), số alen hiệu quả (Ne), dị hợp tử quan sát (Ho), dị hợp tử mong đợi (He) và tỉ lệ locus đa hình (%P) sử dụng phần mềm GenAIEx v6.5.1 (Peakall và Smouse, 2006).

Tính toán các chỉ số khác biệt di truyền (F_{ST}) giữa các quần thể, và chỉ số AMOVA với tần số hoàn vị (No. of permutations) là 999 và giá trị tin cậy (p-value) thông qua phần mềm Arlequin v3.5 (Excoffier và Lischer, 2010) với dữ liệu đầu vào được tạo ra từ phần mềm GenAIEx.

2.4.2. Xây dựng cấu trúc quần thể tôm hùm xanh

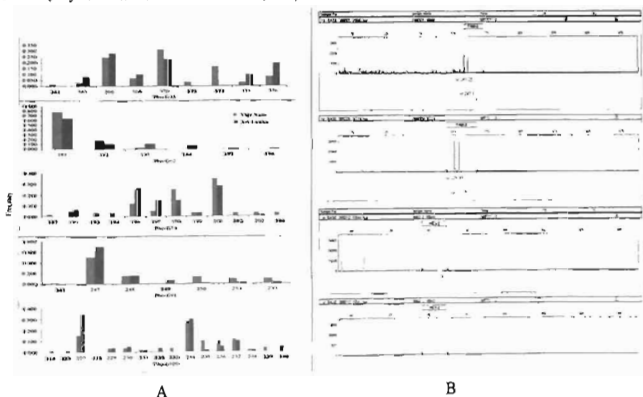
Để xác định cấu trúc di truyền đặc trưng đối với quần thể tôm hùm xanh, phân tích đa biệt thức các thành phần chính (Discriminant Analysis of Principal Components-DAPC) (Jombart *et al.*, 2010) sử dụng gói dữ liệu adegenet v1.3.1 (Jombart and Ahmed, 2011) được thực hiện bằng phần mềm R v3.5.1 (R Core Team, 2017). Tính năng findcluster dựa theo thông số BIC (Bayesian Information Criterion) được

tiến hành với giả lập số cấu trúc nhóm là K=1-4. Thông số BIC được biểu diễn trên đồ thị như một hàm của giá trị K, và giá trị BIC tại vị trí giảm thấp nhất tương ứng với số nhóm (K) tối ưu. Cấu trúc di truyền quần thể được biểu hiện bằng tính năng compplot (biểu đồ thanh thể hiện xác suất gán nhóm của các cá thể cho các nhóm) tích hợp trong gói dữ liệu adegenet.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đa dạng di truyền quần thể tôm hùm xanh

Sự đa dạng di truyền quần thể tôm hùm xanh *P. homarus* theo từng locus và giữa các khu vực nghiên cứu được thể hiện ở bảng 2. Năm microsatellite chọn lọc trong nghiên cứu đều thể hiện tính đa hình cao với tổng cộng 50 alen trên hai quần đàn được xác định với kích thước dao động từ 181 bp đến 375 bp (Hình 2). Các alen xuất hiện với tần số cao ở 2 quần thể nằm rải rác ở các vị trí như alen 366, 370 (locus Pho-G45), alen 181 (locus Pho-G45), alen 200 (locus Pho-G74), alen 247 (locus Pho-G91), alen 234 (locus Pho-G100). Các alen đặc thù xuất hiện nhiều ở quần đàn Việt Nam (12 alen, chủ yếu ở các locus Pho-G45, Pho-G74, và Pho-G100, trong khi đó Sri Lanka có 8 alen đặc thù, chủ yếu ở locus Pho-G62, và Pho-G100 (Hình 2).



Hình 2. A: Tần số alen tại 5 vị trí microsatellite trên quần đàn tôm hùm xanh tại Việt Nam và Sri Lanka. Các alen đặc thù cho quần thể tại các vị trí được in đậm. B: Hình ảnh đại diện alen trên máy ABI đã phân tích với 2 dải màu FAM và HEX

Đa dạng di truyền của quần thể tôm hùm xanh ở Việt Nam cao hơn Sri Lanka. Tổng số alen trên các vị trí khảo sát lần lượt là 42 (trung bình 8,4±1,778/locus) và 38 (trung bình 7,6±1,166/locus); số alen hiệu quả trung bình (4,26±0,896 và 3,63±0,667); số di hợp quan sát/di hợp từ mong đợi (0,540±0,108/0,696±0,09 và 0,453±0,069/0,687±0,053). Số lượng alen trên mỗi locus ghi nhận được có sự tương đồng nhất định ở cả hai quần thể, trong đó quần thể Việt Nam từ 3 – 13 và quần thể Sri Lanka là 6 – 12. Số lượng alen cao nhất được ghi nhận ở locus Pho-G100 (12-13 alen) và thấp nhất ở locus Pho-G62 của quần thể Việt Nam (3 alen). Trong tổng số 5

locus microsatellite, 3 locus (Pho-G45, Pho-G74 và Pho-G100) cho thấy đa dạng di truyền cao hơn ở quần thể tôm hùm xanh của Việt Nam so với Sri Lanka. Số alen lần lượt là 9, 11 và 13 ở Việt Nam, so với 6, 8 và 12 ở Sri Lanka; số alen hiệu quả - số di hợp từ quan sát/mong đợi lần lượt là 4,885 - 0,3/0,794 và 4,950 0,233/0,798 (locus Pho-G45); 4,775 0,787/0,791 và 4,918 - 0,267/0,797 (locus Pho-G74); 6,897 - 0,800/0,855 và 4,327 - 0,600/0,769 (locus Pho-G100). Ở locus Pho-G91, số alen bằng nhau, nhưng đa dạng di truyền của quần thể Việt Nam cao hơn (Bảng 2).

Bảng 2. Đa dạng di truyền ở các quần thể tôm hùm xanh theo từng locus và giữa các khu vực

Quần thể	Locus	Na	Ne	Ho	He	%P	HWE test
Việt Nam (N=30)	Pho-G45	9	4,865	0,300	0,794	100	***
	Pho-G62	3	1,542	0,533	0,352		ns
	Pho-G74	11	4,775	0,767	0,791		***
	Pho-G91	6	3,220	0,300	0,689		***
	Pho-G100	13	6,897	0,800	0,855		**
	Tổng (TB±SE)	42 (8,4±1,778)	4,260±0,896	0,540±0,108	0,696±0,09		
Sri Lanka (N=30)	Pho-G45	6	4,959	0,233	0,798	100	***
	Pho-G62	6	2,187	0,500	0,543		***
	Pho-G74	8	4,918	0,267	0,797		***
	Pho-G91	6	1,925	0,233	0,481		***
	Pho-G100	12	4,327	0,600	0,769		***
	Tổng (TB±SE)	38 (7,6±1,166)	3,66±0,667	0,367±0,077	0,677±0,069		
Cả hai quần đàn (N=60)	Tổng (TB±SE)	50 (8,0±1,011)	3,96±0,536	0,453±0,069	0,687±0,053		

Ghi chú: TB±SE: giá trị trung bình ± sai số chuẩn; ns: Sai khác không có ý nghĩa so với định luật Hardy-Weinberg; (*): Sai khác có ý nghĩa so với định luật Hardy-Weinberg (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001);

N: số cá thể; Na: Số lượng alen/locus; Ne: số alen hiệu quả; Ho: di hợp từ quan sát; He: di hợp từ mong đợi; P: vị trí đa hình; HWE test: kiểm tra qui luật Hardy Weinberg.

Các kiểm định di truyền quần thể tôm hùm xanh với từng vị trí microsatellite chỉ ra độ lệch đáng kể (9/10 vị trí microsatellite trên hai quần đàn nghiên cứu là sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $P \leq 0,01$) so với cân bằng Hardy Weinberg, ngoại trừ locus Pho-G62 ở quần thể Việt Nam là tuân theo định luật cân bằng HW (Bảng 2).

3.2. Sự khác biệt di truyền giữa các quần thể tôm hùm xanh

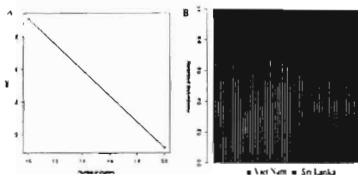
Kết quả phân tích cho thấy sự sai khác di truyền (F_{st}) có ý nghĩa thống kê giữa hai quần thể tôm hùm xanh Việt Nam và Sri Lanka ($F_{st}=0,021$; $P=0,0018 < 0,05$). Kết quả phân tích AMOVA (Bảng 3) cho thấy đa dạng di truyền ở mức độ phân tử chủ yếu là giữa các cá thể trong quần thể (53,87%) và giữa các cá thể (45,73%) và có ý nghĩa thống kê ($F_{is}=0,54$, $P<0,001$; $F_{it}=0,54$, $P<0,001$). Trong khi mức độ đa dạng của 2 quần thể tôm hùm xanh khi so sánh với nhau là rất thấp (0,4%) và không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai phân tử (AMOVA) của các quần thể tôm hùm xanh

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Thành phần biến động	Phần trăm biến động	Fixation index	Giá trị P
Giữa các quần thể	1	4,392	0,009	0,4	$F_{ST}=0,004$	0,99
Giữa các cá thể trong quần thể	58	220,6	1,335	53,87	$F_{IS}=0,54$	<0,001
Giữa các cá thể	60	68	1,133	45,73	$F_{IT}=0,54$	<0,001

3.3. Cấu trúc quần thể tôm hùm xanh

Phân tích DAPC về cấu trúc di truyền quần thể tôm hùm xanh được trình bày ở hình 3. Thông số BIC cho thấy số nhóm quần thể tối ưu là 2 (Hình 3A). Biểu đồ thanh thể hiện xác suất gán nhóm cũng thể hiện 2 nhóm quần thể riêng biệt, điều này cho thấy có sự phân tách rõ rệt giữa quần đàn tôm hùm xanh của Việt Nam và Sri Lanka (Hình 3B).



Hình 3. Phân tích DAPC cấu trúc di truyền quần thể tôm hùm xanh tại Việt Nam và Sri Lanka.

A. Giá trị BIC (Bayesian Information Criteria) thể hiện số nhóm tối ưu; B. Sơ đồ thanh thể hiện xác suất gán nhóm của các cá thể.

Tôm hùm xanh *Panulirus homarus* phân bố rộng ở Ấn Độ Dương - Tây Thái Bình Dương, từ Đông Nam châu Phi đến biển Ả Rập và phía Đông đến Nhật Bản, Indonesia và Bắc Australia (Phillips, 2013). Nghiên cứu về lịch sử tiến hóa và địa sinh hóa ghi nhận một số phân loài của *Panulirus homarus* (Al-Breiki *et al.*, 2018; Farhadi *et al.*, 2017; Reddy, 2013). Các phân tích sử dụng chỉ thị phân tử của ti thể, gen nhân và chỉ thị microsatellite cho thấy tồn tại ít nhất ba hoặc bốn phân loài có phạm vi phân bố địa lý khác nhau, ví dụ như *Panulirus homarus rubellus* phân bố ở Tây Nam Ấn Độ Dương; *Panulirus homarus* "brown" chỉ có ở quần đảo Marquesas, trung tâm Thái Bình Dương; và *P. h. homarus* có vùng phân bố rộng rãi ở các khu vực còn lại; phân loài *P. h. megasculptus* ở Tây Bắc Ấn Độ Dương (chủ yếu là biển Ả Rập) vẫn chưa được kiểm chứng (Al-

Breiki *et al.*, 2018; Farhadi *et al.*, 2017; Lavery *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2018). Việt Nam thuộc khu vực nhiệt đới của Ấn Độ Dương - Tây Thái Bình Dương, chủ yếu tồn tại phân loài *P. h. homarus*.

Nghiên cứu này khảo sát đa dạng di truyền và cấu trúc của tôm hùm xanh ở Việt Nam (thuộc Tây Thái Bình Dương) và so sánh với quần thể tôm hùm ở Sri Lanka (thuộc Ấn Độ Dương) với 5 trong số 15 chỉ thị Microsatellite công bố bởi Delghandi và cs (2016) được lựa chọn. Qua khảo sát 96 cá thể tôm hùm xanh từ Việt Nam, (Delghandi *et al.*, 2016) cho thấy số alen dao động từ 3-10, với dị hợp tử quan sát/mong đợi là 0,021-0,818 và 0,021-0,858 trên 15 chỉ thị. Kết quả này có sự tương đồng với các thông số về đa dạng di truyền tôm hùm xanh Việt Nam (số alen 3-12, dị hợp tử quan sát/mong đợi 0,540±0,108/0,696±0,09, n=30). So sánh với tôm hùm xanh ở Indonesia (n=7), tôm hùm Việt Nam cũng thể hiện sự đa dạng di truyền cao hơn, tương tự như kết quả hiện tại với tôm hùm xanh ở Sri Lanka (n=30) (Bảng 2). Điều này có thể giải thích do số lượng thu mẫu nhỏ (trong trường hợp ở Indonesia), hoặc giới hạn địa điểm thu mẫu (1 địa điểm cả ở Indonesia và Sri Lanka), trong khi đó tôm hùm xanh ở Việt Nam được thu từ các địa điểm khác nhau dọc theo bờ biển miền Trung, Việt Nam. Theo nghiên cứu của Delghandi và cs (2016), 10 trong tổng số 15 locus cho thấy sự sai khác có ý nghĩa với định luật HW và để xuất nguyên nhân có thể do số lượng cá thể nhỏ, sự hiện diện của null alen hoặc trôi dạt di truyền. Kết quả hiện tại cũng ghi nhận 9/10 vị trí microsatellite có sự sai khác, và chỉ có một vị trí (Pho-G62) ở quần thể Việt Nam là tuân theo định luật HW (Delghandi *et al.*, 2016).

Giá trị khác biệt di truyền F_{ST} cho thấy sự phân tách có ý nghĩa thống kê giữa 2 quần thể ở Việt Nam và Sri Lanka. Tuy nhiên, phân tích AMOVA không thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa hai quần thể (0,4%, $P>0,05$). Sự kết nối di truyền ở cả phạm vi phân bố hẹp và ở qui mô lớn được quan sát ở tôm hùm

bóng (Dao *et al.*, 2015), tôm hùm xanh (*Al-Breiki et al.*, 2018; Galindo *et al.*, 2006) và tôm hùm châu Âu (Ellis *et al.*, 2017). Rất nhiều yếu tố như dòng chảy đại dương, giai đoạn ấu trùng trôi nổi, sự lưu giữ ấu trùng tại nơi sinh ra (larval retention) có thể dẫn đến sự liên kết rộng rãi của các quần thể tôm hùm ở các khu vực địa lý cách xa nhau. Trong nghiên cứu hiện tại, tôm hùm xanh ở Việt Nam và Sri Lanka thuộc 2 đại dương với các đặc tính khác biệt, thể hiện sự phân tách rõ rệt dựa vào phân tích DAPC (hình 3). Sự phân tách quần thể sinh vật giữa hai đại dương được ghi nhận trên nhiều sinh vật biển (Postaire *et al.*, 2017; Salas *et al.*, 2019), tuy nhiên, chưa ghi nhận sự phân tách của các loài tôm hùm. Năm 2013, Reddy (2013) phát hiện các quần thể phụ (subpopulation) của phân loài *P. h. rubellus* phân bố ở bờ biển châu Phi, liên quan mật thiết đến dòng chảy bề mặt. Permana và cs (2019) sử dụng chỉ thị COI của DNA ti thể ghi nhận sự phân tách của quần thể tôm hùm xanh ở Indonesia với các quần thể ở Ấn Độ Dương (Sri Lanka, Ấn Độ, Oman, Iran) và biển Đông (Việt Nam, Đài Loan) (Permana *et al.*, 2019). Đối với tôm hùm châu Âu (*Homarus gammarus*), sự phân tách ở qui mô lớn cũng được ghi nhận giữa quần thể ở Thụy Điển và ở Đại Tây Dương (Ellis *et al.*, 2017). Nghiên cứu dọc theo khu vực phân bố của *P. homarus*, Farhadi và cs (2017) nhận thấy sự phân tách của các quần thể ngoại biên (phân loài *P. h. rubellus* ở Nam Phi và Madagascar, *P. h. "brown"* ở đảo Marquesas, trong khi các quần thể ở Ấn Độ Dương-Thái Bình Dương (phân loài *P. h. homarus*) thể hiện sự kết nối rộng rãi (mặc dù có sự phân hóa theo khu vực địa lý) (Farhadi *et al.*, 2017). Nghiên cứu này cho thấy sự phân tách của quần thể tôm hùm xanh ở Việt Nam và Sri Lanka (giá trị Fst, phân tích DAPC), tuy nhiên, kiểm tra AMOVA lại không thể hiện mức sai khác có ý nghĩa giữa 2 quần thể.

Mặc dù còn hạn chế về số lượng và khu vực thu mẫu trong phạm vi phân bố rộng của tôm hùm xanh nhưng nghiên cứu này góp phần đánh giá đa dạng di truyền và phân định quần thể tôm hùm xanh Việt Nam, làm cơ sở cho công tác bảo tồn, quản lý nguồn lợi, phát triển nuôi trồng thủy sản và di truyền chọn giống.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Năm chỉ thị Microsatellite hữu hiệu trong khảo sát đa dạng, khác biệt di truyền và cấu trúc quần thể tôm hùm xanh ở Việt Nam và Sri Lanka. Tổng số 50

alen được phát hiện (42 ở Việt Nam, 38 ở Sri Lanka), 9/10 vị trí microsatellite không tuân theo định luật cân bằng HW.

Quần thể tôm hùm xanh Việt Nam thể hiện đa dạng di truyền cao hơn quần thể Sri Lanka (số alen locus - dị hợp tử quan sát/mong đợi lần lượt là $8,4 \pm 1,778$ - $0,540 \pm 0,108$; $0,696 \pm 0,09$ và $7,6 \pm 1,166$ - $0,367 \pm 0,077$; $0,677 \pm 0,069$). Phân tích DAPC thông qua sơ đồ thanh (màu đỏ và màu xanh) cho thấy sự phân tách rõ rệt giữa hai quần thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Breiki, R. D., Kjeldsen, S. R., Afzal, H., Al Hinai, M.S., Zenger, K. R., Jerry, D. R., Al-Abri, M. A., Delghandi, M., 2018. Genome-wide SNP analyses reveal high gene flow and signatures of local adaptation among the scalloped spiny lobster (*Panulirus homarus*) along the Oman coastline. BMC Genomics 19, 1DUMMY. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5044-8>.
2. Ben-Horin, T., Iacchei, M., Selkoe, K. A., Mai, T. T., Toonen, R. J., 2009. Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the California spiny lobster, *Panulirus interruptus* and cross-amplification in other achelate lobsters. Conserv. Genet. Resour. 1, 193–197. <https://doi.org/10.1007/s12686-009-9047-2>.
3. Dao, H. T., Smith-keune, C., Wolanski, E., Jones, C. M., 2015. Oceanographic currents and local ecological knowledge indicate, and genetics does not refute, a Contemporary pattern of larval dispersal for The ornate spiny lobster, *Panulirus ornatus* in the South-East Asian Archipelago. PLoS One 10, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124568>.
4. Dao, H. T., Todd, E. V., Jerry, D. R., 2013. Characterization of polymorphic microsatellite loci for the spiny lobster *Panulirus* spp. and their utility to be applied to other *Panulirus* lobsters. Conserv. Genet. Resour. 5, 43–46. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9728-0>.
5. Delghandi, M., Afzal, H., Al Hinai, M. S. N., Al-Breiki, R. D. G., Jerry, D. R., Dao, H. T., 2016. Novel Polymorphic Microsatellite Markers for *Panulirus ornatus* and their Cross-species Primer Amplification in *Panulirus homarus*. Anim. Biotechnol. 27, 310–314. <https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1190372>.
6. Delghandi, M., Saif Nasser Al Hinai, M., Afzal,

H., Khalfan Al-Wahaibi, M., 2017. Parentage analysis of tropical spiny lobster (*Panulirus homarus*) by microsatellite markers. *Aquac. Res.* 48, 4718–4724. <https://doi.org/10.1111/are.13293>.

7. Ellis, C. D., Hodgson, D. J., Daniels, C. L., Collins, M., Griffiths, A. G. F., 2017. Population genetic structure in European lobsters: Implications for connectivity, diversity and hatchery stocking. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 563, 123–137. <https://doi.org/10.3354/meps11957>.

8. Excoffier, L. and Lischer, H. E. L., 2010. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.

9. FAO, 2015. FishStatJ. Báo cáo của tổ chức nông lương liên hiệp quốc năm 2015.

10. Farhadi, A., Jeffs, A. G., Farahmand, H., Rejiniemon, T. S., Smith, G., Lavery, S. D., 2017. Mechanisms of peripheral phylogeographic divergence in the indo-Pacific: Lessons from the spiny lobster *Panulirus homarus*. *BMC Evol. Biol.* 17, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1050-8>.

11. Galindo, H. M., Olson, D. B., Palumbi, S. R., 2006. Seascape genetics: A coupled oceanographic-Genetic model predicts population structure of Caribbean corals. *Curr. Biol.* 16, 1622–1626. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.052>.

12. Jombart, T., Ahmed, I., 2011. adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27, 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>.

13. Jombart, T., Sébastien, D., François, B., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000455>.

14. Lavery, S. D., Farhadi, A., Farahmand, H., Chan, T. Y., Azhdehakhoshpour, A., Thakur, V., Jeffs, A. G., 2014. Evolutionary divergence of geographic subspecies within the scalloped spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus 1758). *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097247>.

15. Peakall, R., Smouse, P. E., 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.

8286.2005.01155.x.

16. Permana, G. N., Slamet, B., Permana, B. A., Dewi, A. K., Mahardika, G. N., 2019. Population genetic structure of spiny lobsters, *Panulirus homarus* and *Panulirus ornatus*, in the Indian Ocean, Coral Triangle, and South China Sea. *Indones. Aquac. J.* 14, 7–14.

17. Phillips, B. F., 2013. Lobsters: Biology, management, aquaculture and fisheries. John Wiley & Sons, Ltd Wiley-Blackwell, UK.

18. Postaire, B., Gélín, P., Bruggemann, J. H., Pralong, M., Magalon, H., 2017. Population differentiation or species formation across the Indian and the Pacific Oceans? An example from the brooding marine hydrozoan *Macrorhynchia phoenicea*. *Ecol. Evol.* 7, 8170–8186. <https://doi.org/10.1002/ece3.3236>.

19. Reddy, M. M., 2013. Molecular Phylogeny and population genetic structure of the shallow-water spiny lobster *Panulirus homarus* in the South West Indian Ocean Region: Implications for management. *Sch. Life Sci. Univ. KwaZulu-Natal* 144.

20. Salas, E. M., Bernardi, G., Berumen, M. L., Gaither, M. R., Rocha, L. A., 2019. RADseq analyses reveal concordant Indian Ocean biogeographic and phylogeographic boundaries in the reef fish *Dascyllus trimaculatus*. *R. Soc. Open Sci.* 6. <https://doi.org/10.1098/rsos.172413>.

21. Santos, M. F., Souza, I. G. B., Gomes, S. O., Silva, G. R., Bentzen, P., Diniz, F. M., 2018. Isolation and characterization of microsatellite markers in the spiny lobster, *Panulirus echinatus* Smith, 1869 (Decapoda: Palinuridae) by Illumina MiSeq sequencing. *J. Genet.* 97, 25–30. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-0895-y>.

22. Senevirathna, J., Munasinghe, D., 2014. Genetic Diversity and Population Structure of *Panulirus Homarus* Populations of Southern Sri Lanka and South India Revealed by the Mitochondrial COI Gene Region 10–13. <https://doi.org/10.15242/iucbe.c0114541>.

23. Singh, S. P., Groeneveld, J. C., Hart-Davis, M. G., Backeberg, B. C., Willows-Munro, S., 2018. Seascape genetics of the spiny lobster *Panulirus homarus* in the Western Indian Ocean: Understanding how oceanographic features shape

the genetic structure of species with high larval dispersal potential. *Ecol. Evol.* 8, 12221–12237. <https://doi.org/10.1002/ece3.4684>. 24. Tổng cục Thủy sản. 2015. Báo cáo tổng hợp “Quy hoạch nuôi tôm hùm đến năm 2020 và định hướng đến 2030”.

MICROSATELLITE MARKERS FOR SEPARATION VIETNAM AND SRI LANKA SPINY LOSTER (*Parulinus homarus*) POPULATIONS

Nguyen Nguyen Thanh Nhon, Dang Thuy Binh,
Tran Quang Sang, Nguyen Minh Chau, Pham Thi Hanh

Summary

Spiny lobster (*Parulinus homarus*) widely distributed in Vietnam, is a high-value seafood and major cultured species in the central provinces. 5 Microsatellite markers are used to investigate diversity, genetic differentiation, and population structure of spiny lobster in Vietnam and Sri Lanka. Total of 50 alleles were detected (42 in Vietnam, 38 in Sri Lanka), 9/10 microsatellite loci deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. *P. homarus* population in Vietnam exhibited higher genetic diversity than Sri Lankan population (number of allele/locus; observed/expected heterozygous are 8.4 ± 1.778 ; $0.540 \pm 0.108 / 0.696 \pm 0.09$ and 7.6 ± 1.166 ; $0.367 \pm 0.077 / 0.677 \pm 0.069$). The F_{st} value (0.021; $P < 0.05$), DAPC analysis showed the disconnectivity between the two populations, while AMOVA test showed no significant difference ($P = 0.99$). The present study provides data on the genetic characteristics of *P. homarus* population in Vietnam based on comparison with Sri Lanka's population. Collecting *P. homarus* samples throughout its distribution range, and examine additional microsatellite markers is essential to formulating strategies for conservation and sustainable management of fisheries resources.

Keywords: *Genetics, microsatellites, population, spiny lobster.*

Người phản biện: TS. Thái Thanh Bình

Ngày nhận bài: 6/12/2019

Ngày thông qua phản biện: 6/01/2020

Ngày duyệt đăng: 13/01/2020