Vietnam J. Agri. Sci. 2018, Vol. 16, No. 3: 232-240 Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2018, 16(3): 232-240
www.vnua.edu.vn

THIẾT LẬP PHẢN ỨNG MULTIPLEX PCR PHỤC VỤ NGHIÊN CỨU CÁ CHIM VÂY VÀNG (*Trachinotus* spp.)

Lưu Thị Hà Giang[1], Đặng Thị Nguyên[2], Trần Thị Thúy Hà[1*], Phan Thị Vân[1]

[1]Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1
[2]Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email[*]: thuyha@ria1.org

Ngày gửi bài: 04.04.2018 Ngày chấp nhận: 08.05.2018

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 15 chỉ thị microsatellite cho cá chim vây vàng (Trachinotus spp.) từ các nghiên cứu trước được chọn lọc để tối ưu quy trình nhằm phục vụ phân tích đa dạng di truyền. Bảy chỉ thị đơn đã được tối ưu thành công trên cá chim vây vàng vây ngắn và 4 chỉ thị được tối ưu trên cá chim vây vàng vây dài. Từ đó, ba phản ứng multiplex PCR được phát triển từ chín mồi đơn. Trong đó, lựa chọn được 02 tổ hợp cho cá chim vây vàng ngắn và 01 tổ hợp cho cá chim vây vàng dài. Quy trình phân tích đoạn với ba bộ chỉ thị microsatellite tương ứng với chín locus được xây dựng. Kết quả phân tích đoạn cho thấy 8 locus (EC-7; EC-9; EC-10; EC-17; EC-20; EC-28; TB018; TBG030) thể hiện tính đa hình với số alen dao động từ 3 - 6, riêng locus TO67 không thể hiện tính đa hình. Kết quả này có ý nghĩa khoa học trong việc nghiên cứu đa dạng di truyền cá chim vây vàng (Trachinotus spp.)

Từ khóa: Cá chim vây vàng, microsatellite, PCR đa mồi, phân tích đoạn.

Optimizaton and Evaluation Multiplex PCR for Analysis of Pompano (*Trachinotus* spp.)

ABSTRACT

In this study, fifteen microsatellite markers were used to optimize a protocol for analyzing genetic diversity of pompano (*Trachinotus* spp.). Seven single markers were successfully optimized for short fin Pompano and four markers were optimized for long fin Pompano. Three multiplex PCR reactions including two multiplex pools for short fin Pompano and one pool for long fin Pompano were developed which composed of nine fluorescent-labeled markers. Fragment analysis process was successfully established with three pools of microsatellite markers corresponding to nine loci. Genotyping results revealed polymorphism in eight loci (EC-7; EC-9; EC-10; EC-17; EC-20; EC-28; TB018; TBG030) with the number of alleles ranging from 3 to 6, whereas locus TO67 showed monomorphisms. These findings importantly contribute to the understanding of genetic diversity in pompano.

Keywords: Genotyping, microsatellite, multiplex PCR, *Trachinotus* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá chim vây vàng (*Trachinotus* spp.) đang là đối tượng nuôi tiềm năng và được khuyến khích trở thành đối tượng nuôi biển đầy hứa hẹn tại Việt Nam trong thời gian tới. Tuy nhiên, số lượng cũng như chất lượng con giống cá chim vây vàng phục vụ sản xuất là một trong những khó khăn trong phát triển nuôi trồng thủy sản bền vững. Ngay từ những giai đoạn đầu phát triển nghề nuôi cá chim vây vàng nói riêng, các đối tượng thủy sản khác nói chung, việc nâng cao chất lượng giống là vấn đề rất quan trọng. Một trong những giải pháp lâu dài là thực hiện các chương trình lai tạo, trong đó, việc đánh giá đa dạng di truyền các quần đàn cá chim vây vàng cần được quan tâm.

Chỉ thị microsatellite có tính đa hình cao và được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu bản đồ gen và di truyền quần thể (Litt & Luty, 1989;

Shao *et al.*, 2009). Trên thế giới, một số nghiên cứu sử dụng chỉ thị microsatellite để phân tích đa dạng di truyền trên cá chim vây vàng đã được báo cáo (Gong *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014). Tại Việt Nam, chỉ thị microsatellite đã và đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu đa dạng di truyền một số loài nuôi thủy sản quan trọng như cá rô phi đỏ (Bùi Thị Liên Hà và cs., 2011), tôm thẻ chân trắng (Trần Thị Thúy Hà và cs., 2013), cá rô đầu vuông (Dương Thùy Yên và Phạm Trang Nhung, 2015). Đối với cá chim vây vàng, các nghiên cứu trong nước hầu hết tập trung vào phương pháp nuôi, mật độ nuôi, kích cỡ thả hay dinh dưỡng (Chu Chí Thiết *và cs.*, 2016, 2017; Nguyen Quang Huy *et al.*, 2017). Cho đến hiện nay, theo chủ quan của nhóm nghiên cứu, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu liên quan đến phân tích di truyền các quần đàn cá chim vây vàng nói chung hay ứng dụng chỉ thị microsatellite trong phân tích đa dạng di truyền cá chim vây vàng nói riêng. Thêm vào đó, việc phát triển các chỉ thị phân tử trong nghiên cứu thường mất thời gian tối ưu và tốn kém kinh phí để chọn lựa ra được bộ chỉ thị hiệu quả đối với đối tượng mẫu nghiên cứu. Trong nghiên cứu này phản ứng PCR đơn và đa mồi để nhân các vị trí gen bởi chỉ thị microsatellite được tối ưu, từ đó lựa chọn ra các cặp mồi hiệu quả và xây dựng quy trình phân tích để phục vụ đánh giá đa dạng di truyền trên cá chim vây vàng tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu cá chim vây vàng vây ngắn và dài được thu tại Trung tâm quốc gia giống hải sản miền Bắc - Cát Bà - Hải Phòng. Tổng số 40 mẫu vây (mỗi mẫu thu 1 cm vây bụng) được thu từ 20 cá thể cá chim vây ngắn và 20 cá thể cá chim vây vàng có khối lượng trung bình 1 kg. Mẫu vây sau thu được bảo quản trong cồn 98% và chuyển về phòng thí nghiệm Trung tâm Công nghệ sinh học thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I - Đình Bảng - Từ Sơn - Bắc Ninh.

2.2. Tách chiết ADN

ADN được tách chiết theo phương pháp kết tủa muối (Sambrook & Russell, 2001). Theo đó, 100 mg mẫu vây được cắt nhỏ và tiến hành ủ trong 1000 µl dung dịch Cell Lysis Solution (Tris - HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%, pH 8) và 5 µl Proteinase K 20 mg/ml ở 60°C trong 3 - 4 h hoặc ủ qua đêm. Sau khi mẫu tan hoàn toàn, protein được loại bằng cách thêm vào 250 µl amonium acetate 7,5 M và ly tâm lạnh 4°C trong 20 phút ở tốc độ 12.000 vòng/phút. Sau đó, ADN được tủa bằng ethanol 100% và rửa tủa bằng ethanol 70%. Làm khô tủa rồi hòa tan trong 100 ml nước khử ion và bảo quản ở -20°C. ADN tách chiết được kiểm tra định tính trên gel agarose 0,8% và kiểm tra định lượng bằng máy Nanodrop 2000C (Thermo Scientific).

2.3. Tối ưu phản ứng PCR

Trên cá chim vây vàng vây ngắn, chín cặp mồi microsatellite tham khảo từ nghiên cứu của Xie *et al.* (2014) được lựa chọn dựa vào mức độ đa hình và khuyến cáo của tác giả (Bảng 1). Thành phần phản ứng PCR được thiết lập ban đầu dựa theo hướng dẫn của bộ KIT Master mix (Thermo Scientific) với thể tích 15 µl gồm: 7,5 µl Mastermix 2X; 0,6 µl mồi xuôi và 0,6 µl mồi ngược nồng độ 10 µM, 1 µl DNA khuôn và H_2O đề ion. Chu trình nhiệt bước đầu như sau: 94°C trong 5 phút; sau đó là 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây, 72 °C trong 1 phút), cuối cùng ở 72°C trong 3 phút. Trong quá trình tối ưu phản ứng PCR cho từng mồi (PCR đơn), các điều kiện phản ứng như nhiệt độ gắn mồi và nồng độ mồi và các chất khác sẽ được thay đổi phù hợp.

Với cá chim vây vàng vây dài, sáu chỉ thị microsatellite cũng được chọn lựa từ những nghiên cứu của Gong *et al.* (2008); Sun *et al.* (2013) (Bảng 2) và thành phần phản ứng PCR bước đầu được thiết lập với tổng thể tích 12 µl bao gồm 6 µl Mastermix 2 X; 0.48 µl mồi xuôi và 0,48 µl mồi ngược (10 µM), 1 µl DNA khuôn và H_2O đề ion với tổng thể tích. Chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 54 - 57°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút), cuối cùng ở 72°C trong 3 phút.

Sau khi tối ưu được phản ứng PCR đơn mồi, hỗn hợp các cặp mồi (multiplex) sẽ được thiết kế bằng phần mềm Multiplex Manager

(Holleley & Geerts, 2009) và kiểm tra việc bắt cặp chéo giữa các cặp mồi bằng Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific). Quy trình phản ứng multiplex PCR cũng được tối ưu dựa vào hướng dẫn KIT Master Mix (Thermo Scientific) nhằm thu được tất cả các sản phẩm PCR của các mồi trong cùng một phản ứng. Sự thành công của phản ứng multiplex PCR được kiểm chứng bằng việc phân tích đoạn trên hệ thống máy CEQ 80000 áp dụng quy trình hướng dẫn của hãng Beckman Coulter. Đa hình alen các locus nghiên cứu sẽ được ước tính dựa vào phần mềm GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Bảng 1. Các chỉ thị microsatellite trên cá chim vây vàng vây ngắn *(Trachinotus ovatus)*

Locus	Số hiệu genbank	Trình tự mồi	Số alen*	Kích thước dự kiến (bp)
EC-7	KF623046	F:ATATCAGCGTCCACCCAAAC R:GACGACACACATCCTGCACT	10	182 - 202
EC-9	KF623047	F:GCTTGTGGAGACCATGACG R:CTCCTGGAGGAACTGTGGAG	7	127 - 158
EC-10	KF623048	F:CGTCTGATCCCATCTCTGTG R:CTGGTCACTGGAGCTGTGTG	17	135 - 196
EC-12	KF623049	F:TGCTGTAAATCCACTCGCTCT R:TGTGATGGTAAGGGGCTAGG	7	153 - 190
EC-14	KF623051	F:AGGGTAAGGGGCTAGGGAAT R:GTTCTGGTCCACGCCTCTTA	8	143 - 187
EC-17	KF623053	F:GGTCTGTAGAGAACCAGAACAGT R:GCTCCTGTGGAGGACAGAGA	14	154 - 203
EC-20	KF623055	F:CCACCATCAATCAGCTGTCA R:AGGTGCTCCACAGATGTTCC	8	171 - 201
EC-25	KF623057	F:CCTTACTAAGTAGCAAGTACA R:TGACTTGTTGAGGGTGAAAGTG	18	143 - 213
EC-28	KF623058	F:GACGTGTTCCACAGCAAGAA R:AGGAATGGTCCCAAAGAATG	8	179 - 205

Nguồn: Xie et al. (2014)*

Bảng 2. Các chỉ thị microsatellite trên cá chim vây vàng vây dài *(Trachinotus blochii)*

Locus	Số hiệu genbank	Trình tự mồi	Số alen*	Kích thước dự kiến (bp)	Tác giả
TB018	EU707447	F:GGCCTCCTGCACCTCACCAT R:ACGCTTTGCCGCCTAACCTTC	8	144 - 146	Gong *et al.* (2008)
TBG008	EU707449	F:AGCATTTTCACCTCCTCCATTG R:TCGCGACAAACTTTAACTCATC	14	186 - 242	
TBG015	EU707450	F:CACAGGGGGAACAAGCAAACT R:TGGACATTGGCACTAAGCCTGA	14	150 - 188	
TBG030	EU707452	F:TAGCGGGATCACTTTACCAAC R:GCCTGCGCATGAATACACAGA	9	240 - 242	
TBG034	EU707453	F:AGCCAATGCCAGGGTTGAGG R:GTGGCTGCAGCAGGTTCACTG	9	235 - 243	
TO67		F:GCAGCCAGATGTTATTTC R:CCCTGTTTACCTCCACCC	10	249 - 275	Sun *et al.* (2013)

Nguồn: Gong et al. (2008); Sun et al. (2013)*

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. ADN tổng số

ADN tổng số sau khi tách chiết cho kết quả định tính với các vạch băng sáng, rõ nét (Hình 1) và định lượng với nồng độ DNA dao động trong khoảng 100 - 150 ng/µl. Như vậy ADN tổng số đảm bảo điều kiện để thực hiện phản ứng PCR khuếch đại các vị trí microsatellite ở các bước tiếp theo.

3.2. Tối ưu PCR

PCR đơn mồi

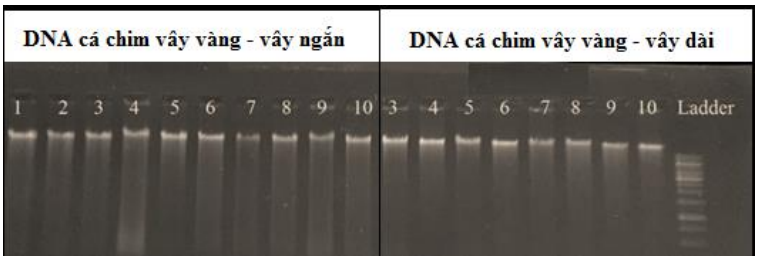
Kết quả tối ưu PCR đơn mồi ban đầu cho thấy sáu mồi (EC-7, EC-9, EC-10, EC-14, EC-20, EC-28) trên tổng số chín mồi thử nghiệm cho các mẫu cá chim vây vàng vây ngắn cho băng vạch sáng, rõ nét, đúng với kích thước dự kiến và không có sản phẩm phụ (Hình 2).

Các mồi EC-20, EC-25 qua nhiều lần tối ưu vẫn cho kết quả không như mong đợi, băng vạch không đặc hiệu xuất hiện, riêng mồi EC-17 khi thực hiện PCR ở các điều kiện nhiệt độ gắn mồi khác nhau từ 54 - 56°C, giữ nguyên thời gian và nhiệt độ của các giai đoạn khác, giảm nồng độ mồi xuống 0,4 µl thì đã cho kết quả băng vạch rõ nét ở nhiệt độ gắn mồi 55°C *(giếng 4)*.

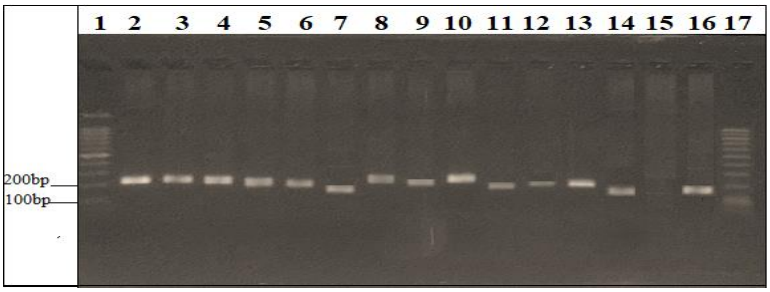
Như vậy, sau quá trình tối ưu điều kiện phản ứng PCR mồi đơn cho cá chim vây vàng vây ngắn chúng tôi đã tối ưu được 7 trên tổng số 9 mồi microsatellite ban đầu. Các mồi bao gồm: EC-7, EC-9, EC-10, EC-14, EC-17, EC-20, EC-28.

Đối với cá chim vây vàng vây dài kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR đơn mồi (Hình 4) cho thấy: Mồi TBG030 và mồi TO67 cho băng vạch rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước khoảng 240 - 270 bp. Mồi TBG034 khi tối ưu nhiệt độ gắn mồi ở 56°C cho sáng, rõ nét, kích thước đúng với kích thước mồi 235 - 243 bp. Các mồi còn lại TBG015, TB018 và TBG008 cần phải tối ưu lại.

Sau khi thay đổi một số thành phần và điều kiện phản ứng như tăng nhiệt độ gắn mồi lên 60 °C, giảm thời gian kéo dài xuống 30 s, giảm số chu kì xuống 30 chu kì và tăng thời gian hồi

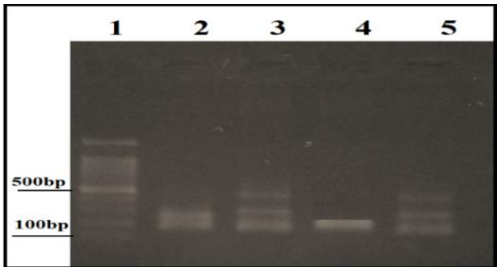


Hình 1. Kết quả điện di tổng số DNA của mẫu cá chim vây vàng ngắn và dài trên gel agarose 0,8%



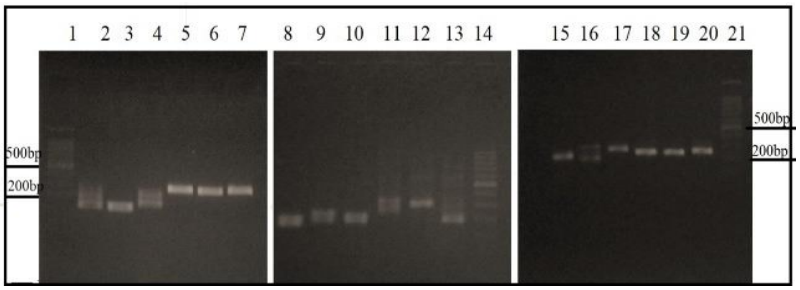
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%

Ghi chú: Giếng 1: thang chuẩn 100 pb; Giếng 2,3,4: sản phẩm PCR mồi EC-7; Giếng 5,6,7: sản phẩm PCR mồi EC-9; Giếng 8,9,10: sản phẩm PCR mồi EC-20; Giếng 11,12,13: sản phẩm PCR mồi EC-28; Giếng 14,15,16: sản phẩm PCR mồi 14.



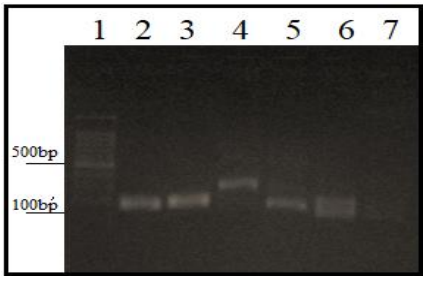
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5 %

Ghi chú: Giếng 1: thang chuẩn 100 pb; Giếng 2: sản phẩm PCR mồi EC-7, Tm=54°C; Giếng 3: sản phẩm PCR mồi EC-7, Tm=54,5 °C; Giếng 4: sản phẩm PCR mồi EC-7, Tm=55 °C; Giếng 5: sản phẩm PCR mồi EC-7, Tm=56 °C.



Hình 4. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5 %

Ghi chú: Giếng 1, 14, 21: thang chuẩn 100 pb; Giếng 2,3,4: sản phẩm PCR mồi TBG015 - Tm=56°C; Giếng 5,6,7: sản phẩm PCR mồi TBG030 - Tm=56°C; Giếng 8,9,10: sản phẩm PCR mồi TB018 - Tm= 54°C; Giếng 11,12,13: sản phẩm PCR mồi TBG008 - Tm=54°C; Giếng 15,16,17: sản phẩm PCR mồi TBG034 - Tm= 54°C, 55°C, 56°C; Giếng 18,19,20: sản phẩm PCR mồi TO67 - Tm= 55°C, 56 °C, 57°C.



Hình 5. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%

Giếng 1: thang chuẩn 100bp; Giếng 2,3- Tm=60°C: sản phẩm PCR mồi TB018- Tm=60°C; Giếng 4,5: sản phẩm PCR mồi TBG008- Tm=60°C; Giếng 6,7: sản phẩm PCR mồi TBG015- Tm=60°C.

tính lên 10 phút so với phản ứng PCR đơn mồi ban đầu. Kết quả điện di hình 5 cho thấy mồi TB018 *(giếng 2,3)* cho băng vạch rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước sản phẩm gần 200 bp, như vậy locus TB018 đã được tối ưu. Trong khi đó, hai mồi TBG008 và TBG015 qua một số lần thay đổi chương trình phản ứng PCR thì sản phẩm xuất hiện nhiều băng phụ, không đặc hiệu, không đúng kích thước mong đợi.

Như vậy, sau quá trình tối ưu điều kiện phản ứng PCR mồi đơn cho cá chim vây vàng vây dài đã tối ưu được 4 trên tổng số 6 mồi microsatellite ban đầu. Các mồi bao gồm: TBG030, TBG034, TB018 và TO67 sau đó sẽ tiếp tục đưa vào nghiên cứu thiết lập quy trình cho phản ứng PCR đa mồi (multiplex PCR).

PCR đa mồi (multiplex PCR)

Multiplex PCR là một kỹ thuật sinh học phân tử phổ biến để khuếch đại nhiều ADN đích trong một phản ứng PCR, qua đó nhiều hơn một chuỗi mục tiêu có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng nhiều cặp mồi trong một hỗn hợp phản ứng. Do đó, kỹ thuật này có khả năng tiết kiệm đáng kể thời gian, nỗ lực trong phòng thí nghiệm đồng thời tăng hiệu suất công việc trên số lượng mẫu lớn mà không ảnh hưởng đến kết quả của thí nghiệm.

Kết quả sử dụng phần mềm thiết kế tổ hợp mồi đa từ 11 mồi đơn đã lựa chọn được 3 tổ hợp multiplex PCR, mỗi tổ hợp có 3 mồi trong đó có 2 tổ hợp của cá chim vây vàng vây ngắn *(nhóm 1, nhóm 2)* và 1 tổ hợp của cá chim vây vàng vây dài *(nhóm 3)*.

Kết quả tối ưu quy trình phản ứng multiplex PCR dựa vào kết quả tối ưu các mồi đơn đều cho thấy khuếch đại được sản phẩm PCR nằm trong khoảng kích thước dự kiến (150 - 250 bp) cho cả 3 tổ hợp mồi với tỷ lệ pha mồi trong mỗi tổ hợp là (1:1:1). Các kết quả này được thể hiện rõ nét và chi tiết hơn qua quá trình phân tích đoạn.

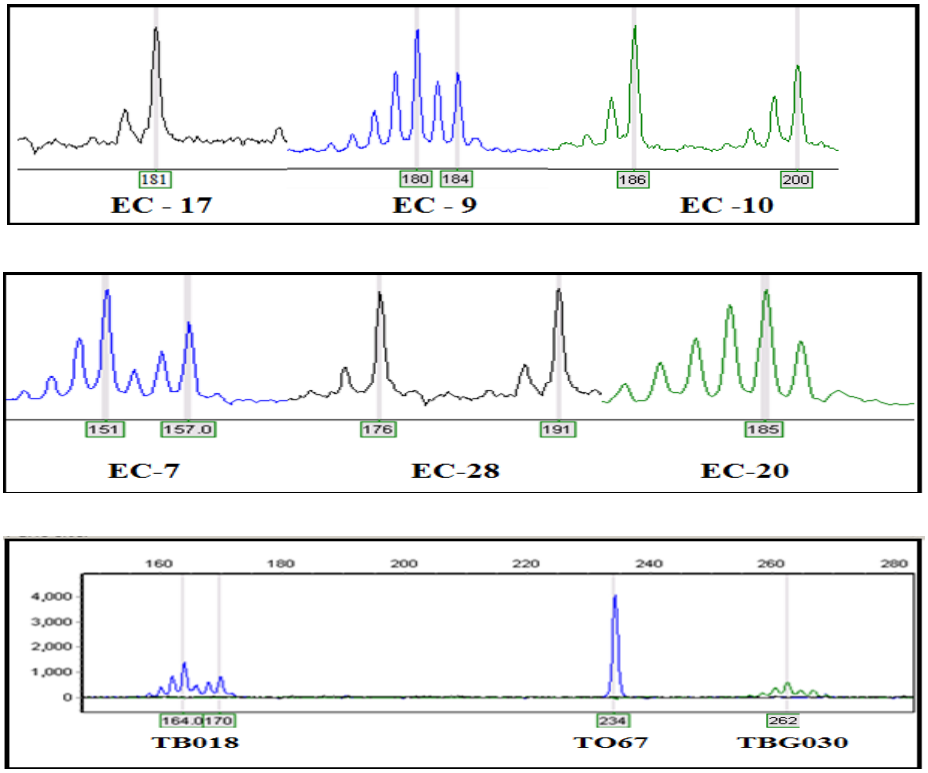
3.3. Phân tích đoạn trên hệ thống CEQ 8000

Kết quả phân tích đoạn thể hiện qua biểu đồ đường tín hiệu cho thấy các đỉnh tương ứng với các đoạn sản phẩm ADN dự kiến được nhân lên ở cả 9 locus. Hình ảnh tín hiệu đồ rõ nét, ít nhiễu. Ở các cá thể dị hợp tử sẽ quan sát được 2 đỉnh tín hiệu riêng rẽ tương ứng với 2 alen cách nhau trong khoảng từ 2 đến 50 bp tùy theo kiểu lặp của locus microsatellite. Trong khi đó ở các cá thể đồng hợp tử, một đỉnh tín hiệu sẽ được ghi nhận tương ứng với 2 alen có cùng kích thước. Tuy nhiên, ở locus TO67 chỉ quan sát được một đỉnh tín hiệu duy nhất cùng kích thước (234 bp) trên tất cả các mẫu cá chim vây dài nghiên cứu. Kết quả khuếch đại những locus mục tiêu được thể hiện qua biểu đồ đường tín hiệu cho thấy mức độ tương thích giữa các cặp mồi là thấp, trong khi độ tương đồng giữa các điều kiện phản ứng là cao, cho thấy những bộ chỉ thị này là hiệu quả trong việc ước tính các kiểu gen (genotyping) trong biến đổi di truyền.

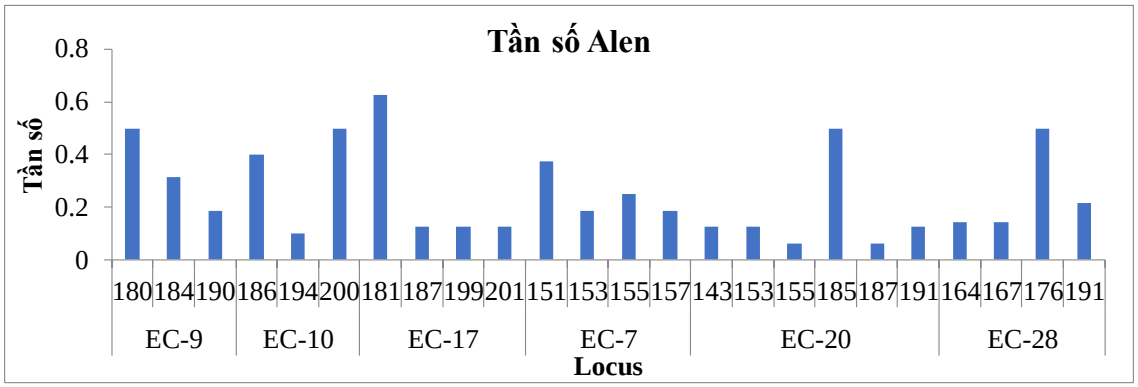
Kết quả ước tính đa hình alen cho các cá thể cá chim vây vàng vây ngắn trên 6 locus microsatellite nghiên cứu được thể hiện ở hình 7, đã phát hiện được tổng số 24 alen với kích thước alen dao động từ 143 đến 201 bp. Trong đó chỉ có 2 alen thuộc locus EC-20 được coi là hiếm với tần số xuất hiện thấp (0,063), số lượng alen mỗi locus dao động từ 3 đến 6 alen. Trên tổ hợp multiplex 1 đã xác định được 10 alen tổng số, trong đó tính đa hình cao hơn được thể hiện ở EC-17 với 4 alen; locus EC-9 và locus EC-10 có số alen là 3 alen. Tương tự nhóm với 2, tổng số có 14 alen được xác định, trong đó locus EC-20 có tính đa hình cao nhất với 6 alen và 2 locus còn lại là EC-7 và EC-28 có số alen bằng nhau là 4 alen. Tần số alen của các locus microsatellite được thể hiện ở hình 7. Trong nghiên cứu này số lượng alen của từng locus cho kết quả thấp hơn so với nghiên cứu của Xie *et al.*

Bảng 3. Thông tin các nhóm chỉ thị microsatellite

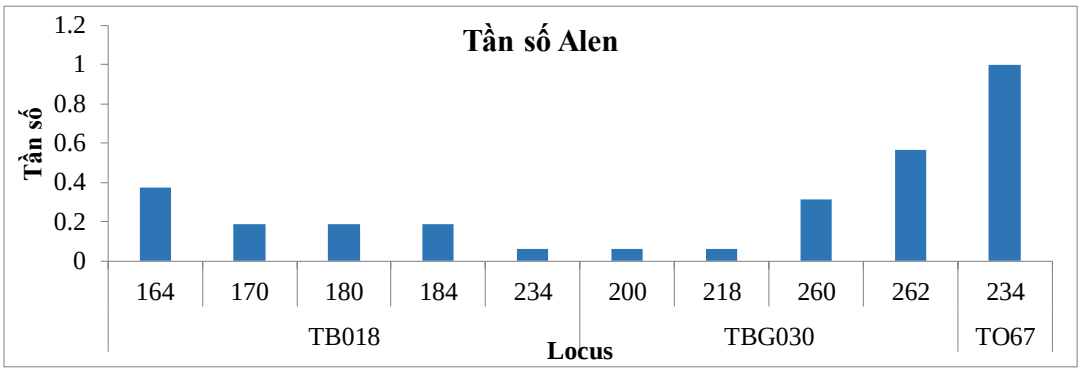
Nhóm	Tên mồi	Màu huỳnh quang	Nhiệt độ tối ưu (^oC)	Loài nghiên cứu
1	EC-9	D4 (Xanh da trời)	54,0	Cá chim vây vàng vây ngắn
	EC-10	D3 (Xanh lá cây)		
	EC-17	D2 (Đen)		
2	EC-7	D4 (Xanh da trời)	54,5	Cá chim vây vàng vây ngắn
	EC-20	D3 (Xanh lá cây)		
	EC-28	D2 (Đen)		
3	TB018	D4 (Xanh da trời)	57,3	Cá chim vây vàng vây dài
	TBG030	D3 (Xanh lá cây)		
	TO67	D4 (Xanh da trời)		



Hình 6. Tín hiệu đồ phân tích đoạn sản phẩm PCR từ phản ứng multiplex PCR



Hình 7. Tần số alen tại 6 vị trí microsatellite trên quần đàn cá chim vây vàng vây ngắn



Hình 8. Tần số alen tại 3 vị trí microsatellite trên quần đàn cá chim vây vàng vây dài

(2014) ở đối tượng *T. ovatus,* số alen dao động từ 8 đến 18 alen/locus. Nguyên nhân của sự sai khác này được lý giải là do nghiên cứu chỉ phân tích trên số lượng cá thể nhỏ (8 cá thể trên mỗi đối tượng) so với số lượng cá trong nghiên cứu của Xie *et al.* (2014) là 30 cá thể. Như vậy, mức đa hình trong các locus nghiên cứu này nằm trong phạm vi mang thông tin cao, phục vụ tốt cho công tác đánh giá đa dạng di truyền.

Trên đối tượng cá chim vây vàng vây dài, mức độ đa hình cho 3 locus nghiên cứu là 10 alen tổng số, với kích thước alen dao động từ 164 - 234 bp, trong đó có 3 alen có tần số xuất hiện thấp 0,063. Locus TB018 và TBG030 thể hiện tính đa hình với số alen lần lượt là 5 alen và 4 alen. Đặc biệt, locus TO67 chỉ thể hiện 1 alen duy nhất với tần số xuất hiện 100% khi phân tích trên cả 8 cá thể cá chim vây vàng vây dài, do đó locus này không thể hiện tính đa hình, locus này không hiệu quả khi sử dụng trong quá trình phân tích đa dạng di truyền trên quần đàn cá chim Việt Nam (Hình 7). Những alen này có thể dễ dàng mất đi nếu không có sự lai tạo để duy trì. Việc lai tạo giữa các quần đàn có nguồn gốc khác nhau là một giải pháp hữu hiệu giúp duy trì đa dạng alen và có thể phục hồi một phần sự đa dạng di truyền bị mất đi như đề xuất của Freitas *et al.* (2007).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tối ưu thành công 11 chỉ thị phân tử microsatellite cho cá chim vây vàng, trong đó 7 với cá chim vây ngắn (EC-7, EC-9, EC-10, EC-14, EC-17, EC-20, EC-28) và 4 với cá chim vây dài (TBG030, TBG034, TB018 và TO67). Từ đó đã thiết kế được 3 tổ hợp mồi multiplex, gồm *nhóm 1:* (EC- 9; EC-10; EC-17) và *nhóm 2:* (EC-7, EC-20, EC-28) cho cá chim vây ngắn và *nhóm 3:* (TB018, TBG030) cho cá chim vây dài.

Quy trình phân tích đoạn phục vụ đánh giá đa dạng di truyền trên cá chim vây vàng vây ngắn và vây dài cũng được phát triển thành công. Các locus trong các tổ hợp mồi đều thể hiện tính đa hình và có tiềm năng sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền cũng như hỗ trợ các nghiên cứu khác liên quan đến cá chim vây vàng với thời gian rút ngắn và tiết kiệm chi phí.

LỜI CÁM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Tiểu dự án: "Hiện đại hóa công nghệ sản xuất cá biển quy mô công nghiệp ở Việt Nam nhằm nâng cao sản lượng, chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm" (03/FIRST/2a/RIA1) thuộc Dự án: "Đẩy mạnh đổi mới sáng tạo thông qua nghiên cứu khoa học và công nghệ" (FIRST). Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Quốc gia Giống Hải sản miền Bắc đã hỗ trợ thu mẫu cá để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Thị Liên Hà, Lê Chính, Nguyễn Điền và Trịnh Quốc Trọng (2011). Đánh giá đa dạng di truyền các dòng cá Rô Phi Đỏ (*Oreochromis* spp.) bằng microsatellite. http://fof.hcmuaf.edu.vn/data/file/_%20BTL%20Ha_TQ%20Trong-RIA2-Da%20dang%20di%20truyen_ca%20ro%20phi%20do_microsatellite.pdf. Truy cập ngày 23/3/2018.

Chu Chí Thiết, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Thị Lệ Thủy, Phạm Quốc Hùng, I. Lund (2016). Nghiên cứu thay thế protein bột cá bằng protein bột đậu nành trong thức cã cho cá chim vây vàng (*Trachinotus falcatus* Linnaeus, 1758) giai đoạn giống. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Đại học Nha Trang, 4: 125-132.

Dương Thùy Yên và Phạm Trang Nhung (2015). Đa dạng di truyền của dòng cá rô đầu vuông (*Anabas testudineus*) nuôi ở Hậu Giang. Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ, 20: 37-45.

Trần Thị Thúy Hà, Nguyễn Thế Việt, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Hữu Đức (2013). Tìm hiểu đặc điểm di truyền một số quần đàn tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi tại Việt Nam bằng chỉ thị microsattelite. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 6(11): 797-803.

Freitas P.D., Jesus C.M., Galetti Jr., P.M. (2007). *Litopenaeus vannamei* clone 5 microsatellite sequence. GenBank accession no. AY369258.

Gong P., Li J., Yue H.G. (2008). Twelve novel microsatellite loci from an endangered marine fish species golden pompano *Trachinotus blochii*. Conserv Genet., 10: 1365-1367.

Holleley C.E., Geerts P.G. (2009). Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans

and optimizes multiplex PCR. Biotechniques, 46(7): 511-517.

Litt M., Luty J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed *by in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet., 44: 379-401.

Shao C.W., Liao X.L., Tian Y.S., Chen S.L. (2009). Microsatellite maker analysis of genetic structures of three populations of cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Prog. Fish. Sci., 30: 41-46.

Sun L., Zhang D., Jian, S., Guo H., Zhu C. (2013). Isolation and characterization of 21 polymorphic microstatellitesin golden pompano *Trachinotus ovatus.* Conservation Genet Resour., 5: 117-1109.

Peakall R., Smouse P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. Bioinformatics, 28: 2537-2539.

Xie Z.Z., Huang M.W., Xu W., Peng C., He J.N., Meng Z.N., Zhang Y., Li S.S., Lin H.R. (2014). Nineteen polymorphic microsatellite markers developed for *Trachinotus ovatus.* Genetics and Molecular Research, 13: 10518-10522.