

NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN QUẦN THỂ CỦA TRAI TAI TƯỢNG (*Tridacna* spp.) (*Tridacninae*) Ở VÙNG BIỂN NAM TRUNG BỘ VÀ NAM BỘ VIỆT NAM

Nguyễn Thị Anh Thư*, Đặng Thúy Bình, Châu Thị Mỹ Linh

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang, *anhthu12th@gmail.com

TÓM TẮT: Trai tai tượng giữ vai trò quan trọng trong hệ sinh thái rạn san hô và có giá trị kinh tế cao, tuy nhiên, những năm gần đây, nguồn lợi trai tai tượng đang bị giảm sút do khai thác quá mức. Nghiên cứu này nhằm khảo sát di truyền quần thể của các loài trai tai tượng (*Tridacna* spp.) ở vùng biển Nam Trung bộ và Nam bộ Việt Nam. Phân tích đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể của 2 loài trai tai tượng (*Tridacna crocea* thu ở vịnh Nha Trang và Côn Đảo, *T. squamosa* thu ở vịnh Nha Trang và đảo Phú Quốc) được thực hiện dựa trên chỉ thị phân tử COI của DNA ti thể. Kết quả cho thấy, quần thể *T. crocea* thể hiện mức đa dạng trung bình với khác biệt trình tự giữa các cá thể từ 0-3,5%, 10 haplotype/30 cá thể (đa dạng haplotype = 0,846) ở vịnh Nha Trang và khác biệt trình tự gen từ 0-9,7%, 16 haplotype/28 cá thể (đa dạng haplotype = 0,934) ở Côn Đảo. Quần thể *T. squamosa* thể hiện mức đa dạng thấp với sự khác biệt trình tự gen của loài từ 0-2,1%, 7 haplotype/19 cá thể (đa dạng haplotype = 0,468) ở vịnh Nha Trang và sự khác biệt trình tự gen từ 0-1,72%, 5 haplotype/18 cá thể ở Phú Quốc (đa dạng haplotype=0,314). Cây đa dạng loài không thể hiện cấu trúc quần thể đặc trưng của 2 loài trai ở các khu vực địa lý đại diện cho vùng biển Nam Trung bộ và Nam bộ, Việt Nam. Đồng thời, quần thể 2 loài trai tai tượng ở Việt Nam có mối quan hệ gần gũi về mặt di truyền với quần thể ở một số khu vực thuộc vùng biển Đông Nam Á.

Từ khóa: *Tridacna*, trai tai tượng, haplotype, đa dạng di truyền.

MỞ ĐẦU

Trai tai tượng họ Tridacnidae gồm những loài có giá trị kinh tế cao và góp phần đa dạng cho hệ sinh thái rạn san hô. Những năm gần đây, trai tai tượng bị khai thác nhằm xuất khẩu do thịt trai thịt chứa hàm lượng protein cao; vỏ trai để làm trang sức, mỹ nghệ và trang trí cho các bể cá cảnh. Việc khai thác quá mức khiến cho quần thể các loài trai tai tượng suy giảm [5]. Hiện nay, cả 7 loài trai tai tượng đang được bảo vệ theo Phụ lục II của Công ước về Thương mại quốc tế các loài động vật hoang dã nguy cấp (CITES, UNEP-WCMC 2007) và đã xuất hiện trong Sách Đỏ Việt Nam về các loài bị đe dọa.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng trình tự gen COI của DNA ty thể (COI mtDNA) để nghiên cứu di truyền quần thể trai tai tượng ở khu vực miền Nam Trung bộ (vịnh Nha Trang), Đông Nam bộ (Côn Đảo) và Tây Nam bộ (Phú Quốc) làm cơ sở cho công tác bảo tồn các loài trai tai tượng có nguy cơ suy giảm nguồn lợi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các loài trai tai tượng được thu thập tại các vùng biển thuộc khu vực Côn Đảo (Bà Rịa-

Vũng Tàu), Phú Quốc (Kiên Giang) và vịnh Nha Trang (Khánh Hòa) năm 2011-2013. Các mẫu trai tai tượng sau đó được phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái theo mô tả của Rosewater (1965) [7]. Hai loài trai được khảo sát gồm: *Tridacna squamosa* và *Tridacna crocea*. Các cá thể trai được giữ trong nơ lỏng (nếu vận chuyển xa) hoặc bảo quản lạnh (nếu vận chuyển gần) và sau đó bảo quản ở -70°C.

Tách chiết DNA và nhân gen bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số được tách chiết từ phần mô cơ chân hoặc màng áo của từng cá thể trai tai tượng bằng bộ kit Wizard SV genomic DNA purification system (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn gen COI mtDNA được khuếch đại sử dụng cặp mồi COI-Tricro-Frwd 5'-GGG TGA TAA TTC GAA CAG AA-3' và COI-Tricro-Rev 5'-TAG TTA AAG CCC CAG CTA AA-3' [3].

Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 50 µl (bao gồm 20 ng khuôn DNA, Dream Taq buffer 1X (Fermentat), 0,25 nM mỗi loại dNTP, 0,2 pM mỗi mồi, 2 mM MgCl₂ và 1 đơn vị Dream Taq polymerase (Fermentat),) trên máy luân nhiệt Icycler (Bio-rad) theo chương

trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu tại 94°C trong 3 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ của 94°C trong 40 giây, 52°C trong 40 giây, 72°C trong 90 giây và giai đoạn cuối ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2% nhuộm ethidium bromide. Kết quả được ghi nhận sử dụng hệ thống ghi ảnh gel tự động Geldoc và phần mềm Quantity One® (Bio-rad).

Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PCR clean up system (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng làm khuôn trực tiếp cho phản ứng tiền giải trình tự theo nguyên tắc dye-labelled dideoxy terminator (Big Dye® Terminator v.3.1, Applied Biosystems) với các đoạn mồi COI-Tricr-Frwd và COI-Tricr-Rev theo chương trình nhiệt như sau: 96°C trong 20 giây, 50°C trong 20 giây và 60°C trong 4 phút. Sản phẩm phản ứng được phân tích trên máy phân tích trình tự tự động ABI Prism® 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems). Các trình tự được kết nối bằng phần mềm Vector NTI v.9.

Phân tích mối quan hệ phát sinh loài của trai tai tượng

Kết nối trình tự

Các trình tự COI mtDNA trai tai tượng thu được sẽ được kết nối bằng kỹ thuật Contig Express trong phần mềm Geneious pro 5.5. Sau đó, các trình tự đó sẽ được kiểm chứng bằng chương trình Blast Nucleotide trên website của ngân hàng Gen. Các trình tự được đóng hàng bằng phần mềm Mega5 [2], kiểm tra lại và chỉnh sửa bằng mắt thường.

Phân tích đa dạng loài trai tai tượng *Tridacna* spp.

Đa dạng di truyền của các quần thể trai tai tượng được tính bằng tổng số haplotype (k), số lượng vị trí đa hình-polymorphic sites (s), đa dạng haplotype (hd) và đa dạng nucleotide (H), số đột biến (η). Các số liệu được xử lý bằng phần mềm DNAsp5 [4].

Phân tích đa dạng loài trai tai tượng *T. crocea* được thực hiện dựa trên tập hợp trình tự gen COI mtDNA gồm 30 trình tự thu tại vịnh Nha Trang và 28 trình tự ở Côn Đảo và 89 trình tự từ Genbank của loài *T. crocea* ở 5 địa điểm

thu mẫu: Singapore 27 trình tự, Philippines 29 trình tự, Ấn Độ-Tây Thái Bình Dương-30 trình tự, Đài Loan 1 trình tự và Nhật Bản 1 trình tự. Trình tự của hai loài trai tai tượng *T. maxima* (EU346368) và *T. squamosa* (EU346361) từ Genbank được sử dụng làm nhóm ngoại.

Phân tích đa dạng di truyền loài trai tai tượng *T. squamosa* được thực hiện dựa trên tập hợp trình tự gen COI gồm 19 trình tự ở vịnh Nha Trang và 18 trình tự ở Phú Quốc. 36 trình tự từ GenBank của loài *T. squamosa* ở 2 địa điểm thu mẫu: Ấn Độ-Tây Thái Bình Dương 18 trình tự Singapore 18 trình tự. Trình tự loài *T. crocea* (AB076920) từ Genbank được sử dụng làm nhóm ngoại.

Phương pháp phân tích cây tiến hóa

Phân tích đa dạng di truyền của loài *T. squamosa* và *T. crocea* được tiến hành dựa trên 3 thuật toán Maximum parsimony (MP), Neighbor joining (NJ) và Maximum likelihood (ML), các phương pháp được phân tích bằng các phần mềm MEGA 5.10 [2]. Giá trị bootstrap (BT) được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán MP, ML và NJ với độ lặp lại 1.000.

Xây dựng mạng lưới haplotype

Xây dựng mạng lưới haplotype bằng phần mềm Network 4.6.1 [1]. Phần mềm này sử dụng kết nối mạng dữ liệu đầu vào được tạo ra phần mềm DnaSPv5 và sử dụng thuật toán Median joining (chức năng calculate network) để tính, chức năng draw network cho phép tự động vẽ ra mạng lưới giữa các haplotype được xem xét.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa dạng di truyền quần thể *Tridacna crocea*

Trong số 58 trình tự gen thu được ở của Nha Trang và Côn Đảo quan sát có số lượng vị trí đa hình (polymorphic sites) $s = 46$, số đột biến $\eta = 48$. Đa dạng di truyền trong từng khu vực thu mẫu cho thấy quần thể trai tai tượng thu ở Nha Trang có độ đa dạng thấp hơn ở Côn Đảo. Trong tổng số 30 trình tự gen COI mtDNA của *T. crocea* ở Nha Trang có sự khác biệt trình tự là 0-3,5%, ngược lại, 28 trình tự gen ở Côn Đảo có sự khác biệt trình tự là 0-9,7% (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân tích di truyền *Tridacna crocea*

Vùng thu mẫu	n	Đa dạng di truyền		
		N _{hp}	h	Π
Nha Trang	30	10	0,846±0,041	0,00966±0,00141
Côn Đảo	28	16	0,934±0,027	0,01701±0,00171
Nha Trang và Côn Đảo	58	19	0,897±0,019	0,01330±0,00171

n. số lượng các trình tự trong phân tích; Nhp. số lượng haplotype; h. đa dạng haplotype; π. đa dạng nucleotide. Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình±độ lệch chuẩn.

Đa dạng di truyền quần thể *Tridacna squamosa* (bảng 2)

Phân tích 37 trình tự mã hóa cho gen CO1 mtDNA của *T. squamosa* thu từ 2 khu vực địa

lý (vịnh Nha Trang 19 trình tự, Phú Quốc 18 trình tự), cho thấy có số lượng vị trí đa hình (polymorphic sites) $s=13$, tổng số đột biến là 13.

Bảng 2. Kết quả phân tích đa dạng di truyền của *Tridacna squamosa* ở Nha Trang và Phú Quốc

Vùng thu mẫu	N	Đa dạng di truyền		
		N _{hp}	hd	π
Nha Trang	19	6	0,468±0,140	0,00467±0,00207
Phú Quốc	18	4	0,314±0,138	0,00378±0,00196
Nha Trang và Phú Quốc	37	8	0,389±0,102	0,00414±0,00143

n. Số lượng các trình tự trong phân tích; Nhp. số lượng haplotype; hd. đa dạng haplotype; π. đa dạng nucleotide. Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình±độ lệch chuẩn.

Đa dạng di truyền trong từng khu vực thu mẫu cho thấy, quần thể trai tại tượng thu ở Nha Trang có độ đa dạng cao hơn ở Phú Quốc. Trong 19 trình tự gen CO1 mtDNA của *T. squamosa* ở Nha Trang có sự khác biệt trình tự 0-2,56%, còn ở Phú Quốc với 18 trình tự gen CO1 mtDNA, sự khác biệt trình tự là 0-2,05%.

Di truyền quần thể của *Tridacna squamosa* và *Tridacna crocea* tại vùng biển miền Nam Trung bộ và Nam bộ dựa trên chỉ thị CO1 mtDNA

Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên 37 trình tự mã hóa cho gen CO1 mtDNA của *T. squamosa* và so sánh giá trị BT ở cây phân loại dựa trên 391bp đã đóng hàng, với giá trị BT được thể hiện trên các nhánh của cây phân loại (hình 1A).

Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên 58 trình tự mã hóa cho gen CO1 mtDNA của *T. crocea* và so sánh giá trị BT ở cây phân loại dựa trên 412bp đã đóng hàng, với giá trị BT được thể hiện trên các nhánh của cây phân loại (hình 1B).

Sơ đồ cây phát sinh loài của *T. squamosa* và

T. crocea dựa trên chỉ thị CO1 mtDNA cho thấy, hai cây phát sinh loài trên đều được chia thành 2 nhóm. Cả 2 nhóm đều xuất hiện các cá thể của khu vực miền Nam Trung bộ và Nam bộ. Điều này cho thấy không có sự khác biệt rõ rệt về cấu trúc quần thể giữa 2 vùng địa lý.

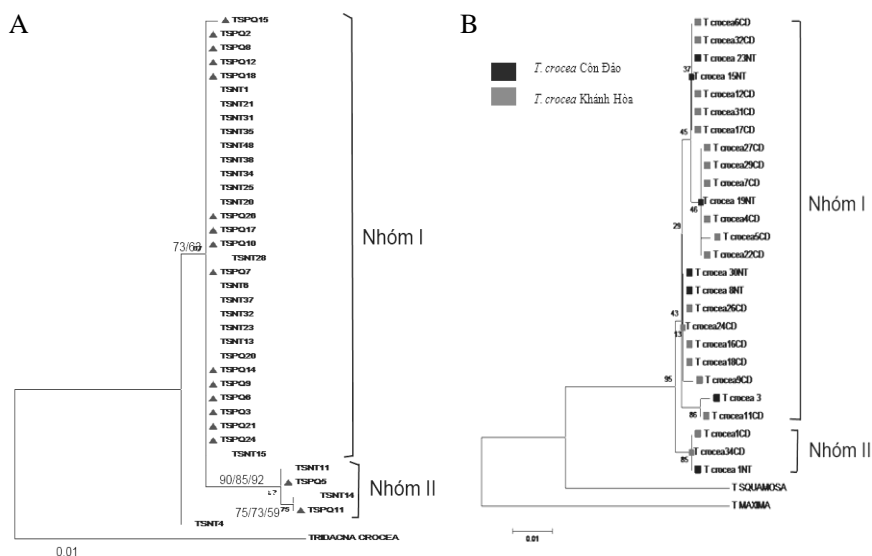
Di truyền quần thể của *Tridacna squamosa* và *Tridacna crocea* tại vùng biển Nam Trung bộ và Nam bộ, Việt Nam và một số khu vực trên thế giới dựa trên chỉ thị CO1 mtDNA

Kết quả phân tích mối quan hệ giữa cấu trúc di truyền quần thể của *T. crocea* thu ở Nam Trung bộ (Khánh Hòa) và miền Nam (Côn Đảo) và một số vùng trong khu vực châu Á (bao gồm Singapore, Philippines, Đài Loan, Nhật Bản và quần đảo Malaysia) dựa trên 412 bp gen CO1 mtDNA và được thực hiện bằng mạng lưới haplotype tạo thành 29 haplotype/100 trình tự gen CO1 mtDNA của trai tại tượng *T. crocea* (hình 2).

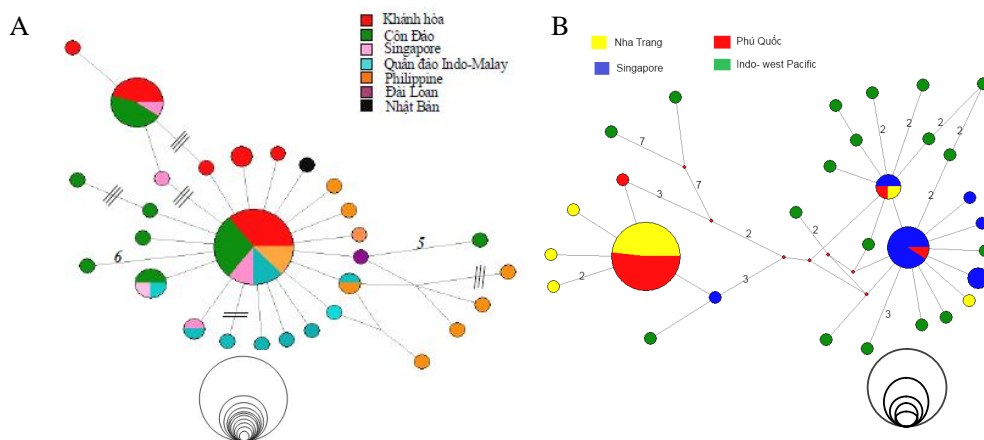
Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy, các cá thể trai tại tượng có trong phân tích di truyền quần thể được chia làm hai nhóm haplotype chính. Nhóm haplotype I thể hiện mối quan hệ

gắn gũi giữa quần thể Khánh Hòa, Côn Đảo và Singapore. Nhóm haplotype II bao gồm các cá thể thuộc quần thể Khánh Hòa, Côn Đảo được sắp xếp như là nhóm gần gũi với các quần thể còn lại. Ngoài ra còn xuất hiện một số

haplotype riêng lẻ, bao gồm: haplotype chứa quần thể Côn Đảo+Singapore; quần thể Philippines, quần thể Indo-Malay+Philippines+Singapore; quần thể Côn Đảo+Philippines; quần thể Côn Đảo+Khánh Hòa.



Hình 1. Cây phát sinh loài dựa trên gen CO1 mtDNA của *Tridacna squamosa* (a) thu tại vùng biển ở Nha Trang và Phú Quốc và *Tridacna crocea* (b) thu tại vùng biển ở Nha Trang và Côn Đảo. Các giá trị bootstrap (phân tích NJ/ ML/ MP) được biểu hiện trên các nhánh



Hình 2. Mạng lưới haplotype thu từ 100 trình tự gen CO1 mtDNA của *T. crocea* (a) và 73 trình tự gen CO1mtDNA của *T. squamosa* (b) ở vùng biển Việt Nam và châu Á

Các đường nối giữa các vòng tròn thể hiện một bước đột biến. Đường gạch và số thể hiện việc cộng thêm các bước đột biến. Kích cỡ của vòng tròn thể hiện số lượng trình tự gen. Từng màu sắc tương ứng với từng khu vực thu mẫu.

Tương tự, mạng lưới haplotype cũng được xây dựng từ 30 haplotype/73 trình tự gen CO1

mtDNA của trại tại tượng *T. squamosa* thu ở hai khu vực ven biển Việt Nam (Nha Trang và Phú

Quốc) và một số trình tự gen từ Genbank (bao gồm Singapore và Ấn Độ-Tây Thái Bình Dương) (hình 2B).

Kết quả trình bày ở hình 2B cho thấy, các cá thể trai tai tượng có trong phân tích di truyền quần thể được chia làm ba nhóm haplotype chính. Nhóm haplotype I thể hiện mối quan hệ gần gũi giữa quần thể Nha Trang, Phú Quốc với Singapore và Ấn Độ-Tây Thái Bình Dương. Nhóm haplotype II bao gồm các quần thể Nha Trang và Phú Quốc với mối quan hệ mật thiết về di truyền. Haplotype III thể hiện mối quan hệ gần gũi giữa quần thể Phú Quốc và Singapore.

Như vậy, không có cấu trúc quần thể đặc trưng cho loài *T. crocea* và *T. squamosa* thu từ khu vực miền Nam Trung bộ (vịnh Nha Trang) và Nam bộ (Côn Đảo và Phú Quốc). Đồng thời, chúng có mối quan hệ gần gũi hơn với quần thể Singapore so với các quần thể *Tridacna* spp. ở các vùng địa lý khu vực Đông Nam Á. Ngoài ra, quần thể *T. crocea* và *T. squamosa* ở khu vực miền Nam Trung bộ và Nam bộ đã có sự phân tách nhất định về mặt di truyền so với các quần thể của loài này ở các vùng thu mẫu khác trên thế giới (hình 2a và b), tuy nhiên, cấu trúc quần thể chưa hình thành rõ rệt.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các quần thể *T. crocea* và *T. squamosa* ở khu vực miền Nam Trung bộ và Nam bộ có mức đa dạng di truyền không cao. Điều này có thể liên quan đến tính chất trẻ về lịch sử hình thành của vùng biển Việt Nam. Ngoài ra, vùng biển này nằm trong khu vực biển Đông, tiếp giáp với vùng biển quần đảo Malaysia ở phía nam và nhất là gần với trung tâm phát sinh, phát tán cổ xưa và lớn nhất của sinh vật biển ven bờ vùng phía tây Thái Bình Dương-vùng biển Philippines-Malaysia [8]. Bên cạnh đó, tính đa dạng di truyền với mức độ trung bình và thấp của *T. crocea* và *T. squamosa* còn có thể do các quần thể giảm sút số lượng bởi tình trạng khai thác quá mức.

Ngoài ra, các dòng hải lưu ở bề mặt đại dương trong khu vực cũng ảnh hưởng mạnh đến cấu trúc của quần thể *T. crocea* và *T. squamosa*. Sự phát tán của các cá thể trai tai tượng phụ thuộc vào sự phát tán của ấu trùng ở giai đoạn trôi nổi (7-10 ngày) [6]. Hơn nữa, Việt Nam

nằm trong vùng có vĩ độ thấp, vì vậy, mùa sinh sản của các loài thuộc giống *Tridacna* có thể diễn ra quanh năm. Chính các dòng chảy có thể tạo nên sự phát tán ấu trùng với khoảng cách xa từ khu vực miền Nam Trung bộ đến Nam bộ hay ngược lại trước khi chúng chuyển sang giai đoạn sống bám cố định.

KẾT LUẬN

Quần thể các loài trai tai tượng *Tridacna* spp. ở miền Nam và Nam Trung bộ có sự đa dạng di truyền thấp đối với loài *T. squamosa* $h_d=0,389$ và trung bình đối với loài *T. crocea* với $h_d=0,897$ và không có sự phân tách rõ ràng về mặt di truyền. Có sự kết nối di truyền giữa quần thể trai tai tượng ở Việt Nam và các vùng trong khu vực Đông Nam Á.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandelt H. J., Forster P., Rohlf A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1): 37-48.
2. Hall B. G., 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.*, 30(5): 1229-1235.
3. Kochzius M., Nuryanto A., 2008. Strong genetic population structure in the boring giant clam, *Tridacna crocea*, across the Indo-Malay Archipelago: implications related to evolutionary processes and connectivity. *Mol. Ecol.*, 17: 75-87.
4. Librado P., Rozas J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
5. Lucas J. S., 1988. Giant clams: description, distribution and life history. In Copland, J.W. and Lucas, J.S., (eds), *Giant clams in Asia and the Pacific*. ACIAR Monograph, (9): 21-23.
6. Rachel G. R., Richard M. M., Juinio-Menez M. A., 2007. Influence of the North equatorial current on the population genetic structure of *Tridacna crocea* (Mollusca: Tridacnidae) along the eastern Philippine seaboard. *Marine Ecology Progress Series*,

- (336): 161-168.
7. Rosewater J., 1965. The family Tridacnidae in the Indo-Pacific, Indo-Pacific. Mollusca, 1: 347-396.
8. Vũ Trung Tạng, Nguyễn Đình Mão, 2006. Khai thác và sử dụng bền vững đa dạng sinh học thủy sinh vật và nguồn lợi thủy sản Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội: 146.

**A STUDY ON GENETIC STRUCTURE OF GIANT CLAM (*Tridacna* spp.)
(Tridacninae) POPULATION IN SOUTH CENTRAL AND SOUTHERN
VIETNAM'S COAST**

Nguyen Thi Anh Thu, Dang Thuy Binh, Chau Thi My Linh

Institute of Biotechnology and Environment, Nha Trang University

SUMMARY

Giant clams have economic value and play an important role in coral reef ecology. However, in recent years, giant clam resources have been declining due to overexploitation. This study investigated the population genetic structure of giant clams (*Tridacna* spp.) in South Central and Southern Vietnam's coast. Analysis of genetic diversity and population structure of two species of giant clams (*Tridacna crocea* collected in Nha Trang Bay and Con Dao and *T. squamosa* collected in Nha Trang Bay and Phu Quoc Island) was done based on CO1 mitochondrial DNA. The results showed that populations of *T. crocea* represented the average diversity with sequence differences between individuals 0-3.5%, 10 haplotypes/30 individuals (haplotype diversity= 0.846) in Nha Trang Bay and sequence differences 0-9.7%, 16 haplotypes/28 individuals (haplotype diversity=0.934) in Con Dao. Populations of *T. squamosa* expressed the low diversity with the genetic sequence differences 0-2.1%, 7 haplotypes/19 individuals (haplotype diversity=0.468) in Nha Trang Bay and the genetic sequence differences 0-1.72%, 5 haplotypes/18 individuals in Phu Quoc (haplotype diversity=0.314). Phylogenetic tree did not show the specific population structure of two species from South Central and Southern coast of Vietnam. Simultaneously, populations of two species of giant clams in Vietnam had close relationship with the genetics of giant clam populations collected in some areas of Southeast Asian coast.

Keywords: *Tridacna*, giant clams, haplotype, genetic diversity.

Ngày nhận bài: 15-7-2013