

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA SNP (Single nucleotide polymorphisms) CỦA GEN CHH (crustacean hyperglycemic hormone) VÀ TÍNH TRẠNG TĂNG TRƯỞNG CỦA TÔM CÀNG XANH, *Macrobrachium rosenbergii*

CORRELATION OF SNP (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS) IN THE CRUSTACEAN HYPERGLYCEMIC HORMONE GENES WITH INDIVIDUAL GROWTH PERFORMANCE IN GIANT FRESHWATER PRAWN *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

Nguyễn Minh Thành^{a, *}, Andrew C. Barnes^b, Peter B. Mather^c, Yutao Li^d, Russell E. Lyons^d

^a Trường ĐH Quốc tế, ĐH Quốc gia TP.HCM, Việt Nam

^b Centre for Marine Studies, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

^c School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, GPO Box 2434, Brisbane, QLD 4001, Australia

^d CSIRO Livestock Industries, Queensland Biosciences Precinct, QLD 4067, Australia

* Liên hệ tác giả: nmthanh@hcmiu.edu.vn hoặc nmthanh71@yahoo.com

ABSTRACT

We assessed correlations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) genes with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. A preliminary study that evaluated all SNPs suggested an association between SNPs in intron 3 of the CHH gene and individual growth performance. A larger number of offspring ($n=243$) then were genotyped and tested for the associations between SNPs in intron 3 and individual growth performance. Four intronic SNPs were associated significantly with three growth traits (body weight, carapace length, and standard length). Of these, CH3-2402 and CH3-2561 were highly correlated with all three traits, while CH3-2407 and CH3-2409 were correlated significantly only with body weight. A further haplotype-trait association analysis confirmed that these four SNP markers were in linkage disequilibrium, and the specific haplotype TGAA had significant associations with high growth ($P < 0.01$). The implications of these findings with relevance to developing improved culture lines of giant freshwater prawn for the industry in Vietnam are discussed.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) là một trong những đối tượng thủy sản nước ngọt có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam và nhiều nơi trên thế giới. Tuy nhiên sản lượng tôm càng xanh nuôi còn thấp, chưa đáp ứng được nhu cầu trong nước và thị trường thế giới. Nghề nuôi tôm càng xanh hiện nay vẫn còn phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn tôm giống tự nhiên hoặc là nguồn tôm giống chưa được chọn giống nâng cao chất lượng di truyền. Vì vậy nuôi tôm càng xanh đạt sản lượng thấp và dễ mắc cảm với dịch bệnh, ảnh hưởng đến sự phát triển bền vững của nghề nuôi. Ngoài ra, nghiên cứu di truyền phân tử trên tôm càng xanh còn rất hạn chế. Hiện trạng này cho thấy sự cần thiết của chương trình nâng cao chất lượng di truyền cho tôm càng xanh nhằm cải thiện một số tính trạng có giá trị kinh tế. Ứng dụng di truyền phân tử trong các chương trình chọn giống là hướng tiếp cận mới, góp phần làm tăng hiệu quả của quá trình chọn giống.

Single nucleotide polymorphism (SNP) là marker chỉ sai khác một nucleotide của trình tự DNA, xuất hiện ở tần suất cao khi sàng lọc SNP của đa số các hệ gen, cứ khoảng 225 bp là tìm thấy 1 SNP trên bộ gen gà và khoảng 1.250 bp là sàng lọc được 1 SNP cho bộ gen người (Liu, 2007). Điều quan trọng là SNP có thể xuất hiện ở vùng gen mã hoá, tác động trực

tiếp đến tính trạng quan tâm, rất hiệu quả trong việc xác định mối tương quan giữa SNP và tính trạng nào đó (Beuzen và ctv, 2000). Mặc dù ứng dụng SNP trong các chương trình chọn giống còn mới mẻ, gần đây SNP đã được sử dụng để sàng lọc các gen tiềm năng liên quan đến tính trạng tăng trưởng của một số đối tượng thủy sản, bao gồm cá hồi *Salvelinus alpinus* (Tao và Boulding, 2003), cá chêm (Xu và ctv, 2006), tôm thẻ chân trắng *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* và tôm sú *P. monodon* (Glenn và ctv, 2005).

Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) ở giáp xác có vai trò chủ yếu trong quá trình chuyển hoá chất bột đường và chất béo, cũng như ảnh hưởng đến sự lột xác, quá trình sinh sản và điều hoà áp suất thẩm thấu (Santos và ctv, 1997; Fanjul-Moles, 2006). Vì vậy gen CHH có thể tác động đến tăng trưởng của các loài giáp xác. Hiện nay 40 gen CHH đã được xác định ở các loài tôm cua (Zhu và ctv, 2005; Fanjul-Moles, 2006), trong đó có nhiều công trình công bố đặc điểm của gen CHH trên tôm càng xanh (Zhu và ctv, 2005; Lin và ctv, 1998; Sithigorngul và ctv, 1999; Chen và ctv, 2004; Ohira và ctv, 2006; Reddy và Sainath, 2009). Từ cơ sở đó, đề tài sàng lọc SNP trên gen CHH để tìm kiếm mối tương quan của marker SNP và tăng trưởng của tôm càng xanh. Nếu đề tài phát hiện được SNP liên quan đến tính trạng tăng trưởng, các SNP này sẽ được sử dụng cho chương trình chọn giống của tôm càng xanh trong tương lai, thúc đẩy quá trình chọn lọc diễn ra nhanh hơn và hiệu quả hơn.

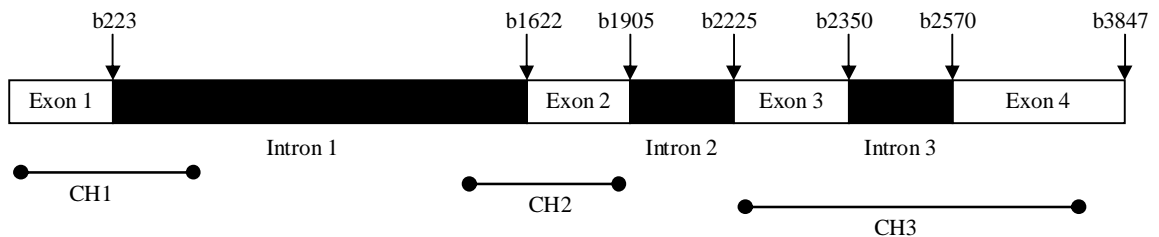
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu thập mẫu vật

Mẫu chân bơi được thu thập từ thí nghiệm lai hỗn hợp 3 x 3 (diallel cross) bao gồm dòng tôm càng xanh Đồng Nai, Mêkông và Hawaii. Mẫu chân bơi của tôm bố mẹ thế hệ thứ 1 được sử dụng để sàng lọc sự hiện diện của SNP ở quần đàn ban đầu. Mẫu chân bơi của tôm cái từ thế hệ 1 và 2 được sử dụng để sàng lọc SNP liên quan đến tính trạng tăng trưởng. Đề tài không sử dụng mẫu vật của tôm đực, vì tăng trưởng của tôm đực chịu ảnh hưởng lớn của yếu tố quần đàn.

Thiết kế primer, ly trích DNA, phản ứng PCR và giải trình tự

Primer được thiết kế từ trình tự CHH của *M. rosenbergii* (Chen và ctv, 2004, GenBank accession no. AF372657) đã được công bố, sử dụng chương trình Primer 3 (v.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Primer được thiết kế có thể khuếch đại các đoạn mã hóa (exon) và không mã hóa (intron) của gen CHH. Thông tin chi tiết của primer được trình bày ở Bảng 1. Chi tiết các đoạn gen của CHH được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc của gen CHH và các đoạn gen được khuếch đại

Đề tài ly trích DNA tổng số từ mẫu chân bơi của tôm càng xanh, bằng phương pháp muối của Miller và ctv (1988). Nồng độ DNA tổng số ly trích được đo bằng máy quang phổ NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), và pha loãng để đạt nồng độ 100 ng/μl cho phản ứng PCR.

Bảng 1. Chi tiết các primer khuếch đại gen CHH của *M. rosenbergii*

Đoạn gen			Primer	
Ký hiệu	Độ dài (bp)	Tên	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ bắt cặp (°C)
CH1	401	CH1F	CCCCACAACCTTTGTCAGTT	60
		CH1R	TGACACTTCAACGACGGTACA	
CH2	360	CH2F	CAGGTTCTTTTTCCCCCTTT	58
		CH2R	ATCAACGCGAAAGCCTCAT	
CH3	608	CH3F	GGTCATTGCGTGGAAGATTT	60
		CH3R	GGCAGATGAGAGGGACTGAG	

Phản ứng PCR (25 µl) bao gồm 50-100 ng DNA, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Roche), 0.5 µM primer, 0.1 mM dNTP, và buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3). Chu trình nhiệt PCR như sau: biến tính DNA (denaturation) ở 94°C trong 5 phút; 30 chu trình: 94°C trong 30 giây, gắn primer (annealing) ở nhiệt độ nhất định cho mỗi primer (Bảng 1) trong 30 giây, và giai đoạn tổng hợp DNA (elongation) tại 72°C trong 1 phút; giai đoạn khuếch đại cuối cùng (extension) tại 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên 1% agarose gel và chụp ảnh bằng UVP BioDoc-It.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Exonuclease I (Exo, Fermentas) và Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Fermentas) trước khi giải trình tự. Tỷ lệ giữa Exo và SAP là 1:2. Phản ứng ExoSAP bao gồm: 2 µl sản phẩm PCR (pha loãng 1/5-1/10), 0.2 µl ExoSAP, và 1.8 µl nước cất. Chu trình nhiệt: 37°C trong 40 phút, 85°C trong 15 phút để bất hoạt các enzyme. DNA được giải trình tự sử dụng BIG DYE 3.1 bằng thiết bị giải trình tự ABI 377 (PE Applied Biosystems). Trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm SequencherTM 4.1 (GeneCodes).

Sàng lọc SNP của tôm thể hệ 1 và 2

Để tài sử dụng phương pháp xác định kiểu gen chọn lọc (selective genotyping approach) (Poompuang và Hallerman, 1997) để giảm thiểu số lượng mẫu cần thiết phải giải trình tự gen. Đầu tiên đề tài giải trình tự 24 mẫu tôm tăng trưởng nhanh nhất và 24 mẫu tôm tăng trưởng chậm nhất. Đề tài phân tích sơ bộ tìm mối tương quan giữa SNP và tăng trưởng của tôm cho thấy có sự tương quan giữa SNP và đoạn gen CH1 và CH3. Do đó đề tài tăng số lượng mẫu tôm tăng trưởng nhanh nhất và chậm nhất khuếch đại bởi primer CH1 và CH3 để xác định có sự tương quan giữa SNP và tăng trưởng. Tổng số lượng mẫu DNA khuếch đại bởi primer CH1 và CH3 là 96, trong đó 48 mẫu DNA từ tôm tăng trưởng nhanh nhất và 48 mẫu DNA từ tôm tăng trưởng chậm nhất. Ngoài ra đề tài cũng khuếch đại DNA đoạn CH3 của 147 mẫu tôm chọn lọc một cách ngẫu nhiên để khẳng định chắc chắn có sự tương quan giữa SNP và tăng trưởng.

Phân tích thống kê

Số liệu kiểu gen

Kiểu SNP của từng cá thể tôm được xác định dựa vào trình tự gen. Tần suất allele tại mỗi vị trí SNP được kiểm tra có phân bố theo phương trình Hardy-Weinberg bằng phương pháp *Chi-square*. Fisher's exact test được sử dụng để so sánh tần suất xuất hiện SNP giữa các nhóm tôm.

Số liệu kiểu hình

Giá trị tăng trưởng trung bình hiệu chỉnh (least squares means) của 2.700 mẫu tôm cái từ 9 phép lai được tính toán bằng Mô hình 1, sử dụng phép tính PROC MIXED của phần mềm SAS phiên bản 8.0 (SAS Institute, 2000). Công thức của Mô hình 1 như sau:

$$y_{ijklmn} = \mu + G_i + C_j + (GC)_{ij} + A_l + h_m(gc)_{ij} + e_{ijklmn} \quad (\text{Mô hình 1})$$

Trong đó y_{ijklmn} là giá trị tăng trưởng của cá thể quan sát thứ n ; μ là trọng lượng trung bình của quần đàn thí nghiệm; G_i là tác động của yếu tố thể hệ thứ i ($i = 1, 2$); C_j là tác động của yếu tố phép lai thứ j ($j = 1, 2, \dots, 9$); $(GC)_{ij}$ là tương tác của yếu tố thể hệ thứ i và yếu tố phép lai thứ j ; A_l là biến số (covariance) của tuổi tôm lúc thu hoạch; $h_m(gc)_{ij}$ là tương tác ngẫu nhiên giữa giai nuôi với thể hệ thứ i và phép lai thứ j ; e_{ijklmn} là sai số dư của cá thể quan sát thứ n .

Sau đó giá trị tăng trưởng của tôm được xếp thứ tự từ thấp nhất đến cao nhất để chọn mẫu tôm tăng trưởng chậm nhất (48 mẫu), tăng trưởng nhanh nhất (48 mẫu) và mẫu tôm ngẫu nhiên (147 mẫu).

Phân tích mối tương quan giữa tăng trưởng và SNP

Để tài sử dụng ANOVA test để phân tích mối tương quan giữa SNP và tính trạng tăng trưởng của tôm càng xanh bằng Mô hình 2 là mô hình tính trội (dominant effect) và Mô hình 3 là mô hình di truyền cộng gộp (additive effect).

$$y_{ijklmn} = \mu + G_i + C_j + (GC)_{ij} + SNP_k + A_l + h_m(gc)_{ij} + e_{ijklmn} \quad (\text{Mô hình 2})$$

Trong đó y_{ijklmn} là giá trị tăng trưởng của cá thể quan sát thứ n ; μ , G_i , C_j , $(GC)_{ij}$, A_l , $h_m(gc)_{ij}$ được định nghĩa như Mô hình 1; SNP_k là tác động cố định của kiểu SNP genotype thứ k ($k=1, 2$ hoặc 3 tương ứng với GG, GA, hoặc AA); và e_{ijklmn} là sai số dư của cá thể quan sát thứ n .

Mô hình 3 tương tự như Mô hình 2, trong đó kiểu SNP là biến số của 3 kiểu SNP tương ứng với số lượng allele A (ví dụ: GG=0, GA=1, AA=2), trong đó A là nucleotide quan tâm.

Phân tích mối tương quan giữa tăng trưởng và SNP haplotype

Để tài sàng lọc SNP của cùng một gen cho nhiều cá thể tôm có nguồn gốc gia đình từ các phép lai khác nhau. Vì vậy đề tài phân tích mối tương quan giữa tăng trưởng và SNP haplotype (nhiều SNP kết hợp với nhau thành haplotype đặc trưng) bằng chương trình Haplo.Stats (Schaid và ctv, 2002).

KẾT QUẢ

Kết quả sàng lọc SNP ở thể hệ 1 và 2

Số lượng SNP sàng lọc được cho đoạn gen CH1 được trình bày ở Bảng 2. Tần suất SNP xuất hiện ở nhóm tôm tăng trưởng nhanh và nhóm tôm tăng trưởng chậm không sai khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0.05$). Trong khi đó SNP không thấy xuất hiện ở đoạn gen CH2.

Bảng 2. Tần suất allele của các SNP xuất hiện ở đoạn gen CH1 của mẫu tôm thể hệ 1 và 2

SNP ^a	Allele	Đoạn gen	Tần suất		Fisher's test (P)
			Tăng trưởng chậm	Tăng trưởng nhanh	
g.302	A	Intron	0,60	0,53	0,508
	G		0,40	0,47	
g.372	C	Intron	0,33	0,47	0,083
	T		0,67	0,53	

^a SNP của 48 mẫu tôm tăng trưởng nhanh nhất và 48 mẫu tôm tăng trưởng chậm nhất. Intron: đoạn gen không mã hóa

Đoạn gen CH3 cho thấy tần suất SNP xuất hiện cao, bao gồm 1 SNP ở vùng 5' không phiên mã và 9 SNP ở vùng không mã hóa (Bảng 3). Sự phân bố allele của mỗi vị trí SNP đều tuân thủ theo phương trình Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$).

Bảng 3. Tần suất allele của các SNP xuất hiện ở đoạn gen CH3 của mẫu tôm thể hệ 1 và 2

SNP ^b	Allele	Đoạn gen	Tần suất	χ^2	P
g.2334	G	5'UTR	0,89	0,01	0,994
	A		0,11		
g.2384	G	Intron	0,60	1,61	0,448
	A		0,40		
g.2395	G	Intron	0,35	0,81	0,667
	A		0,65		
g.2402	G	Intron	0,94	1,08	0,582
	T		0,06		
g.2407	G	Intron	0,98	0,07	0,966
	A		0,02		
g.2409	G	Intron	0,02	0,07	0,966
	A		0,98		
g.2457	G	Intron	0,01	0,05	0,999
	A		0,99		
g.2471	G	Intron	0,04	0,45	0,982
	A		0,96		
g.2524	C	Intron	0,83	0,33	0,846
	T		0,17		
g.2561	G	Intron	0,05	0,60	0,973
	A		0,95		

^b SNPs của 243 mẫu tôm (48 mẫu tôm tăng trưởng nhanh nhất, 48 mẫu tôm tăng trưởng chậm nhất, và 147 mẫu tôm chọn lọc ngẫu nhiên).

Mối tương quan giữa SNP và tính trạng tăng trưởng

Trong số các SNP xuất hiện ở đoạn gen CH3, đề tài xác định được 4 SNP có ảnh hưởng đến tăng trưởng ở tôm càng xanh có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0.05$, Bảng 4). Kết quả phân tích sử dụng mô hình tính trội cho thấy cá thể có kiểu gen GG tại vị trí CH3 g.2402 tăng trưởng chậm hơn so với cá thể có kiểu gen GT ($P < 0.01$). Ngược lại, cá thể AA tại vị trí CH3 g.2561 tăng trưởng nhanh hơn cá thể GA ($P < 0.05$). Tương tự, cá thể có kiểu gen đồng hợp tử tại CH3 g.2407 và CH3 g.2409 tăng trưởng nhanh hơn cá thể dị hợp tử. Tuy nhiên hai kiểu gen này chỉ tác động có ý nghĩa thống kê cho chỉ tiêu trọng lượng cá thể ($P < 0.05$).

Bảng 4 cũng cho thấy ảnh hưởng di truyền cộng gộp của các SNP tại 4 vị trí của đoạn gen CH3 ($P < 0.05$). SNP tại CH3 g.2402 tác động làm tăng trọng lượng cá thể 6.77 g, trong

khi đó SNP tại 3 vị trí còn lại có tác dụng làm giảm trọng lượng cá thể từ 4.39 đến 7.47 g. Tương tự, SNP tại vị trí CH3 g.2402 làm tăng chiều dài giáp đầu ngực và chiều dài chuẩn lần lượt là 0.27 và 0.77 cm, trong khi đó SNP tại CH3 g.2561 làm giảm chiều dài giáp đầu ngực và chiều dài chuẩn lần lượt là 0.21 và 0.54 cm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của SNP lên tốc độ tăng trưởng của tôm càng xanh phân tích bằng mô hình tính trội và mô hình di truyền cộng gộp

SNP	Kiểu gen	Số lượng mẫu	BW (g)	CL (cm)	SL (cm)
LSM ± SE (Mô hình tính trội) ⁽ⁱⁱ⁾					
CH3 g.2402	GG	207	22,21 ± 0,59 ^a	3,09 ± 0,03 ^a	9,37 ± 0,07 ^a
	GT	30	28,98 ± 1,61 ^b	3,36 ± 0,08 ^b	10,14 ± 0,20 ^b
CH3 g.2407	GG	230	23,32 ± 0,58 ^a	3,14 ± 0,03 ^a	9,49 ± 0,07 ^a
	GA	8	15,85 ± 3,28 ^b	2,82 ± 0,16 ^a	8,86 ± 0,41 ^a
CH3 g.2409	AA	230	23,32 ± 0,58 ^a	3,14 ± 0,03 ^a	9,49 ± 0,07 ^a
	GA	8	15,85 ± 3,28 ^b	2,82 ± 0,16 ^a	8,86 ± 0,41 ^a
CH3 g.2561	AA	220	23,31 ± 0,60 ^a	3,14 ± 0,03 ^a	9,50 ± 0,07 ^a
	GA	23	18,92 ± 1,91 ^b	2,92 ± 0,09 ^b	8,96 ± 0,24 ^b
SNP thay thế ± SE (Mô hình di truyền cộng gộp) ⁽ⁱⁱ⁾					
CH3 g.2402			6,77 ± 1,71 [*]	0,27 ± 0,08 [*]	0,77 ± 0,21 [*]
CH3 g.2407			-7,47 ± 3,34 [*]	0,32 ± 0,16	0,63 ± 0,41
CH3 g.2409			-7,47 ± 3,34 [*]	0,32 ± 0,16	0,63 ± 0,41
CH3 g.2561			-4,39 ± 2,01 [*]	-0,21 ± 0,10 [*]	-0,54 ± 0,25 [*]

(i) BW = body weight – Trọng lượng cá thể, CL = carapace length – Chiều dài giáp đầu ngực, SL = standard length – Chiều dài chuẩn, SE = standard error – Sai số chuẩn, LSM = Least-squares means – Giá trị trung bình hiệu chỉnh

(ii) Kiểu SNP có cùng chữ cái là không có sai khác ý nghĩa thống kê ($P > 0.05$), * $P < 0.05$.

Mối tương quan giữa SNP haplotype và tính trạng tăng trưởng

Bởi vì 4 SNP hiện diện ở đoạn gen CH3 có ảnh hưởng có ý nghĩa đến tốc độ tăng trưởng của tôm, đề tài phân tích sâu hơn mối liên kết giữa các SNP ở dạng marker phân tử (hay haplotype) đối với tính trạng tăng trưởng. Kết quả cho thấy 4 SNP liên kết với nhau thành 6 haplotype. Trong đó 4 haplotype bao gồm GAGA, GGAG, TGAA và GGAA có tần suất xuất hiện lớn hơn 0.01 (Bảng 5), và 2 haplotype là AGAA và GAGG xuất hiện ở tần suất thấp (0.002 và 0.006) nên không trình bày ở Bảng 5. Haplotype GGAA xuất hiện phổ biến nhất với tần suất 0.864.

Bảng 5 cho thấy TGAA có ảnh hưởng di truyền cộng gộp đối với cả 3 chỉ tiêu tăng trưởng ($P < 0.01$). Marker này xuất hiện ở những cá thể có tăng trưởng vượt trội 5.95 g trọng

lượng cá thể, 0.25 cm chiều dài giáp đầu ngực, và 0.70 cm chiều dài chuẩn. Marker phổ biến nhất là GGAA không có ảnh hưởng có ý nghĩa đến các chỉ tiêu tăng trưởng.

Bảng 5. Tần suất SNP haplotype ở đoạn gen CH3 của gen CHH và ảnh hưởng di truyền cộng gộp của SNP marker đối với tính trạng tăng trưởng^(i, ii)

SNP haplotype					BW (g)				
g.2402	g.2407	g.2409	g.2561	hap.freq	coef	SE	t	P	
G	A	G	A	0,011	-5,30	3,65	-1,45	0,15	
G	G	A	G	0,033	-0,45	2,12	-0,21	0,83	
T	G	A	A	0,062	5,95	1,61	3,69	<0,01	
*	*	*	* ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0,030	-1,28	1,63	-0,79	0,43	
G	G	A	A	0,864	0,05	0,60	0,08	0,94	

Bảng 5. (tiếp tục)

SNP haplotype				CL (cm)				SL (cm)			
g.2402	g.2407	g.2409	g.2561	coef	SE	t	P	coef	SE	t	P
G	A	G	A	-0,14	0,19	-0,75	0,45	-0,33	0,46	-0,73	0,47
G	G	A	G	0,00	0,11	-0,02	0,99	-0,06	0,26	-0,21	0,83
T	G	A	A	0,25	0,08	3,13	<0,01	0,70	0,20	3,47	<0,01
*	*	*	* ⁽ⁱⁱⁱ⁾	-0,06	0,08	-0,75	0,45	-0,22	0,20	-1,07	0,28
G	G	A	A	-0,04	0,03	-1,38	0,17	-0,07	0,08	-0,96	0,34

(i) BW = body weight – Trọng lượng cá thể, CL = carapace length – Chiều dài giáp đầu ngực, SL = standard length – Chiều dài chuẩn, SE = standard error – Sai số chuẩn,

(ii) hap.freq = haplotype frequency – Tần suất haplotype, coef = regression coefficient – Hệ số tuyến tính, t = giá trị t, P = giá trị P

(iii) Haplotype “*****” có tần suất < 0.01.

THẢO LUẬN

Đề tài sàng lọc được SNP xuất hiện ở các đoạn gen không mã hóa (intron) của gen CHH, không thấy xuất hiện SNP ở đoạn gen mã hóa (exon). Theo tác giả Liu (2007), SNP thường xuất hiện ở đoạn gen không mã hóa và chọn lọc tự nhiên nói chung bảo tồn đoạn gen mã hóa vì tính chất quan trọng của gen mã hóa. Tác giả De-Santis và Jerry (2007) cũng báo cáo các marker đa hình xuất hiện ở đoạn gen mã hóa của hormone tăng trưởng ở cá thường rất hiếm so với mức độ phổ biến của marker xuất hiện ở đoạn gen không mã hóa. Tất cả các SNP của đề tài sàng lọc được đều xuất hiện ở đoạn gen không mã hóa, tuy nhiên nó có thể ảnh hưởng đến quá trình cắt nối các đoạn mã hoá và không mã hoá (splicing) trong quá trình phiên mã, từ đó dịch mã thành các chuỗi amino acid khác nhau. Nhiều nghiên cứu trước đây công bố SNP ở đoạn gen không mã hóa có thể tác động đến quá trình splicing, dẫn đến những bệnh tật bất thường ở người (Langdahl và ctv, 1997; Pagani và Barralle, 2004; Boer và ctv, 2005; Hastings và ctv, 2005; Hull và ctv, 2007).

M. rosenbergii có 2 bản sao (transcripts) là CHH mã hoá hormone CHH và CHH-L (CHH-like) mã hoá hormone tương tự CHH. Cả 2 bản sao này là kết quả của quá trình cắt và nối các đoạn mã hoá và không mã hoá khác nhau (alternative splicing) có nguồn gốc từ 1 gen (Chen và ctv, 2004). Bản sao CHH phiên mã từ các đoạn exon 1, 2, và 4, trong khi đó bản sao CHH-L phiên mã từ cả 4 đoạn exon (Hình 1). Nhóm Ohira và ctv (2006) công bố chỉ có CHH có tác dụng chuyển hoá chất bột đường, CHH-L không có tác dụng này. Nhiều đoạn gen đặc trưng (motif) ở vùng tiếp giáp giữa exon-intron (exon – intron boundary) luôn được bảo tồn vì đó là vị trí quan trọng để quá trình splicing xảy ra. Ngoài ra các đoạn gen đặc trưng làm tăng tốc (enhancers) hoặc ức chế (silencers) hiện diện ở exon hoặc intron có tác dụng điều khiển quá trình splicing. Các enhancer hoặc silencer thường nằm ở khoảng cách từ 50-100 bp có khi lên đến hàng trăm hoặc hàng ngàn bp so với vị trí splicing (Pagani và Baralle, 2004). Đề tài phát hiện các SNP liên quan chặt chẽ đến tính trạng tăng trưởng là CH3-2402, CH3-2407 và CH3-2409 (Hình 2) nằm ở khoảng cách từ 53 đến 60 bp so với vùng tiếp giáp exon 3 – intron 3. Một phát hiện quan trọng nữa của đề tài là CH3-2561 nằm ngay vùng giáp ranh

intron 3 – exon 4. Các SNP này có thể làm thay đổi quá trình splicing hoặc biến đổi vị trí nhận biết của quá trình splicing, dẫn đến làm tăng hoặc giảm quá trình tổng hợp hormone CHH hoặc hormone tương tự CHH (CHH-L), vì vậy tác động đến tốc độ tăng trưởng. Điều này được chứng minh ở cá hồi chấm bông Bắc cực (Arctic charr), SNP xuất hiện ở đoạn intron giữa 2 exon tương quan có ý nghĩa đến tăng trưởng của các cá thể. SNP này làm ảnh hưởng đến quá trình splicing hình thành các bản sao tổng hợp enzyme adenylate cyclase (Tao và Boulding, 2003). Một nghiên cứu khác cũng công bố SNP xuất hiện ở vùng giáp ranh exon-intron của gen tổng hợp hormone tăng trưởng liên quan mật thiết với sự chậm lớn ở gà (Huang và ctv, 1993).

Hiện nay chỉ có vài công bố về mối tương quan có ý nghĩa của SNP với các tính trạng có giá trị kinh tế ở đối tượng thủy sản. Đó là SNP xuất hiện ở gen amylase có liên quan đến tốc độ tăng trưởng của hàu *Crassostrea gigas* (Prudence và ctv, 2006) và SNP xuất hiện ở gen parvalbumin ảnh hưởng tăng trưởng của cá chêm *Lates calcarifer* (Xu và ctv, 2006). Ngoài ra nhóm nghiên cứu Zeng và ctv (2008) cũng công bố SNP ở gen Hsp70 có liên quan đến khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*. Đề tài này đã phát hiện ra 4 SNP ở đoạn CH3 của gen CHH có tương quan có ý nghĩa đến tính trạng tăng trưởng của tôm càng xanh, trong đó haplotype TGAA với tần suất 0.062 có tương quan chặt chẽ với cá thể tăng trưởng nhanh ($P < 0.01$). Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên phát hiện ra mối tương quan giữa gen tiềm năng (candidate gene) có ảnh hưởng đến tính trạng có giá trị kinh tế ở tôm càng xanh. Phát hiện này mở ra hướng mới cho chương trình chọn giống tôm càng xanh sử dụng các marker (marker-assisted selection) liên quan đến tính trạng tăng trưởng. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu này chỉ là kết quả bước đầu, cần phải sàng lọc SNP ở quần đàn lớn hơn để khẳng định mối tương quan của SNP với tính trạng tăng trưởng ở tôm càng xanh.

Exon 3

2225 5'- AAAAGACTGTTTTGGTACTAAGACTTTTGGTCATTGCGTGGAAGATTTGTT
 2276 ATTAGATCAAACCTCATTATAAAGAGATAAGAGACCACATCGCCCTGTTTTG

Intron 3

2327 ACCTGGAGGAATATAATTTGAAGGTAAGGGATAAAGTTTTTCGTTGCATTTT
 2378 ATGTTAATATGGTAGCTATTTCCAGCTTAGAAGCGTTCCTGTTCCAAAACCT
 2429 AGATTTGAATCACATTTTCAATAAACTTAGTATATTTTTTCTAAGAAATTT
 2480 GAAGCGTTTAAGCTTTCAGAGAAGCTGGAATGATTCGTCTCGTAGCTCAGAC

Exon 4

2531 AACAGTATTTATTAATCCCCGATCGTTTCCAAAACGGGGAGGGC TGCTAC
 2582 CAGAACTTGGTCTTCCGACAGTGCATCCAGGACCTCCAGTT-3' 2623

Hình 2. Vị trí của các SNP trên đoạn intron 3 có tương quan với tính trạng tăng trưởng của tôm càng xanh. Trình tự được bôi xám là đoạn exon, trình tự không bôi xám là đoạn intron. Chữ cái in nghiêng, đậm, và gạch chéo là SNP.

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy SNP đa hình và SNP haplotype ở đoạn intron 3 của gen CHH có ảnh hưởng đến tình trạng tăng trưởng của tôm càng xanh. Các SNP này có thể ứng dụng cho chương trình chọn giống bằng marker phân tử, làm tăng hiệu quả của chương trình chọn giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beuzen, N.D., Stear, M.J., Chang, K.C., 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary Journal* 160, 42-52.
- Boer, M., Hartl, D., Wintergerst, U., Belohradsky, B.H., Roos, D., 2005. A donor splice site mutation in intron 1 of *CYBA*, leading to chronic granulomatous disease. *Blood Cells, Molecules, and Disease* 35, 365-369.
- Chen, S.H., Lin, C.Y., Kuo, C.M., 2004. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Marine Biotechnology* 6, 83-94.
- Davis, G.P., DeNise, S.K., 1998. The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science* 76, 2331-2339.
- De-Santis, C., Jerry, D.R., 2007. Candidate growth genes in finfish – Where should we be looking? *Aquaculture* 272, 22-38.
- Fanjul-Moles, M.L., 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 142, 390-400.
- Glenn, K.L., Grapes, L., Suwanasopee, T., Harris, D.L., Li, Y., Wilson, K., Rothschild, M.F., 2005. SNP analysis of *AMY2* and *CTSL* genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. *Animal Genetics* 36, 235-236.
- Hastings, M.L., Resta, N., Traum, D., Stella, A., Guanti, G., Krainer, A.R., 2005. An *LKB1* AT-AC intron mutation causes Peutz-Jeghers syndrome via splicing at noncanonical cryptic splice sites. *Nature Structural and Molecular Biology* 12, 54-59.
- Huang, N., Cogburn, L.A., Agarwal, S.K., Marks, H.L., Burnside, J., 1993. Overexpression of a truncated growth hormone receptor in the sex-linked dwarf chicken: evidence for a splice mutation. *Molecular Endocrinology* 7, 1391-1398.
- Hull, J., Campino, S., Rowlands, K., Chan, M.S., Copley, R.R., Taylor, M.S., Rockett, K., Elvidge, G., Keating, B., Knight, J., Kwiatkowski, D., 2007. Identification of common genetic variation that modulates alternative splicing. *PLoS Genetics* 3, 1009-1018.
- Langdahl, B.L., Knudsen, J.Y., Jensen, H.K., Gregersen, N., Eriksen, E.F., 1997. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 20, 289-294.
- Lin, C.Y., Chen, S.H., Kou, G.H., Kuo, C.M., 1998. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 121, 315-321.
- Liu, Z., 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP). In: Liu, Z. (Ed.), *Aquaculture Genome Technologies*. Blackwell, USA, pp. 59-72.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.

- Ohira, T., Tsutsui, N., Nagasawa, H., Wilder, M.N., 2006. Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormones from the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and their hyperglycemic activities. *Zoological Science* 23, 383-391.
- Pagani, F., Baralle, F.E., 2004. Genomic variants in exons and introns : indentifying the splicing spoilers. *Nature Reviews Genetics* 5, 389-396.
- Poempuang, S., Hallerman, E.M., 1997. Toward detection of quantitative trait loci and marker-assisted selection in fish. *Reviews in Fisheries Science* 5, 253-277.
- Prudence, M., Moal, J., Boudry, P., Daniel, J.Y., Quere, C., Jeffroy, F., Mingant, C., Ropert, M., Bedier, E., Wormhoudt, A.V., Samain, J.F., Huvet, A., 2006. An amylase gene polymorphism is associated with growth differences in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics* 37, 348-351.
- Reddy, P.S., Sainath, S.B., 2009. Hyperglycemic hormone in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: purification from eyestalk nervous tissue and quantification by ELISA in hemolymph following various stresses. *Aquaculture* 286, 290-295.
- Santos, E.A., Nery, L.E., Keller, R., Goncalves, A.A., 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological Zoology* 70, 415-420.
- Schaid, D.J., Rowland, C.M., Tines, D.E. Jacobson, R.M., Poland, G.A., 2002. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *The American Journal of Human Genetics* 70, 425-434.
- Sithigorngul, W., Jaideechoey, S., Saraithongkum, W., Longyant, S., Sithigorngul, P., 1999. Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Experimental Zoology* 284, 217-224.
- Tao, W.J., Boulding, E.G., 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Heredity* 91, 60-69.
- Xu, Y.X., Zhu, Z.Y., Lo, L.C., Wang, C.M., Lin, G., Feng, F., Yue, G.H., 2006. Characterization of two parvalbumin genes and their association with growth traits in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Animal Genetics* 37, 266-268.
- Zeng, D., Chen, X., Li, Y., Peng, M., Ma, N., Jiang, W., Yang, C., Li, M., 2008. Analysis of *Hsp70* in *Litopenaeus vannamei* and detection of SNPs. *Journal of Crustacean Biology* 28, 727-730.
- Zhu, X.J., Dai, Z.M., Liu, J., Yang, W.J., 2005. Actin gene in prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: characteristics and differential tissue expression during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 140, 599-605.