

ĐA DẠNG DI TRUYỀN NGUỒN GEN GIỐNG LỢN NGOẠI NUÔI TẠI VIỆT NAM

TA THỊ LOAN, NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY

Viện Công nghệ Sinh học

NGUYỄN GIANG SƠN

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

ĐỖ VÕ ANH KHOA

Trường Đại học Cần Thơ

Lợn là vật nuôi chiếm tỷ trọng cao trong ngành chăn nuôi ở Việt Nam với số lượng đàn khoảng 12 triệu con. Các giống lợn nội rất đa dạng, chiếm tới 60 - 90% về số lượng do chúng thích nghi với điều kiện khí hậu nhiệt đới và điều kiện chăn nuôi của vùng nông thôn nghèo. Hiện nay các giống lợn nhập nội, chủ yếu là lợn Yorkshire và lợn Landrace, đang được nuôi phổ biến ở nước ta với những ưu điểm như tốc độ sinh trưởng nhanh, tỷ lệ nạc cao (45-55%). Các chương trình cải tạo nguồn gen bằng chọn lọc hình thái truyền thống kết hợp với sự hỗ trợ của các chỉ thị di truyền liên quan đến các tính trạng có giá trị kinh tế như: chất lượng thịt, tốc độ tăng trưởng, số lượng con sinh ra/lứa đã mang lại những lợi ích đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn. Khá nhiều công trình nghiên cứu đánh giá mức độ đa hình nguồn gen liên quan tính trạng có giá trị kinh tế ở giống lợn nội Việt Nam đã được tiến hành (Nguyễn Ngọc Tuấn và cs., 1999; Nguyễn Văn Cường và cs., 2003; Nguyễn Văn Anh và cs., 2005; Nguyễn Thu Thúy và cs., 2005a, b). Với mục đích xác định sự tương quan giữa đa hình gen với một số tính trạng có giá trị kinh tế, tạo cơ sở khoa học để chọn lọc đàn giống lợn nhập ngoại, nghiên cứu này tiến hành phân tích đa hình di truyền các gen liên quan tính trạng kinh tế H-FABP (Heart Fatty Acid Binding Protein gene), LIF (Leukocyte Inhibitory Factor gene), MYOG (Myogenin gene), RYR1 (Ryanodine Receptor 1 gene) bằng phương pháp PCR-RFLP trên đối tượng là dòng lợn lai 2 máu Yorkshire x Landrace được nuôi tại Trại Chăn nuôi thực nghiệm Hòa An thuộc Đại học Cần Thơ.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

33 mẫu mô tai của lợn đực thuộc nhóm lai 2 máu Yorkshire x Landrace (YL) từ nguồn gốc 14 mẹ khác nhau, có khối lượng $33 \pm 4,02$ kg, được thu từ Trại Chăn nuôi thực nghiệm Hòa An, Đại học Cần Thơ. Lợn. ADN hệ gen được tách chiết từ các mẫu theo phương pháp của Ausubel (1995).

Cặp mỗi nhân đặc hiệu các đoạn gen H-FABP, LIF, MYOG, RYR1 được thiết kế dựa trên cơ sở các trình tự gen đã được công bố trên Genbank, có trình tự thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1

Trình tự mỗi đặc hiệu các gen

Gen	Mỗi xuôi (F)/ Mỗi ngược (R) [5'-3']	Kích thước sản phẩm PCR [bp]
H-FABP	F: ATT GCC TTC GGT GTG TTT GAG R: TCA GGA ATG GGA GTT ATT GG	816
LIF	F: ATG TGG ATG TGG CCT ACG G R: GGG AAC AAG GTG GTG ATG G	407
MYOG	F: TCA GGA AGA ACT GAA GGC TG R: GTT TCC TGG GGT GTT GC	353
RYR1	F: GTT TGC CAC AGG TCC TAC CA R: ATT CAC CGG AGT GGA GTC TC	656

Thành phần và chu trình nhiệt PCR nhân bản các đoạn gen đích trình bày ở Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2

Thành phần hỗn hợp PCR

Thành phần	Thể tích [μl]			
	H-FABP	LIF	MYOG	RYR1
Taq DNA polymerase 5U	1,0	1,0	1,0	1,0
Buffer 10x	2,5	2,0	2,5	2,5
MgCl ₂ 25 mM	2,0	0,5	2,0	1,5
dNTPs 2,5 mM	2,0	2,0	2,0	2,0
Primer F 5 mM	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer R 5 mM	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O	14,5	11,5	14,5	14,0
DNA template	1,0	1,0	1,0	2,0

Bảng 3

Chu trình nhiệt PCR

Bước	Nhiệt độ [°C] - Thời gian [phút]				Số chu kì
	H-FABP	LIF	MYOG	RYR1	
Biến tính ban đầu	94 - 4	96 - 3	94 - 4	95 - 4	1
Biến tính	94 - 0,75	96 - 0,5	94 - 1	94 - 0,75	35
Gắn mồi	57 - 1	60 - 0,5	60 - 1	64 - 1	
Tổng hợp	72 - 1	72 - 0,5	72 - 1	72 - 1	
Kết thúc	72 - 10	72 - 5	72 - 5	72 - 10	1
Giữ mẫu	14 - ∞	14 - ∞	14 - ∞	14 - ∞	

Sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme giới hạn tương ứng gồm *Dra*III (LIF), *Hae*III (H-FABP), *Hin*6I (RYR1), *Msp*I (H-FABP và MYOG), điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm ethidium bromide và soi dưới ánh sáng tử ngoại. Thành phần phản ứng cắt gồm 15,0 μl sản phẩm PCR, 2,0 μl buffer 10x, 1,0 μl enzyme cắt giới hạn và 2,0 μl nước, ủ ở điều kiện 37°C trong 14 giờ.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đa hình đoạn gen H-FABP

Đoạn gen H-FABP của các mẫu nghiên cứu đã được nhân thành công bằng kỹ thuật PCR biểu thị là một băng điện di đặc hiệu có kích thước như thiết kế (816 bp) (Hình 1). Trên đoạn gen này có 3 ~~điểm~~ đa hình tại vị trí nucleotide số 1489, 1556 được nhận biết do bị cắt bởi enzyme *Msp*I và vị trí 1811 do bị cắt bởi enzyme *Hae*III, tương ứng các kiểu allele được trình bày trong Bảng 4. Sản phẩm cắt của các kiểu gen là tổ hợp các băng cắt của các allele tương ứng được trình bày đại diện cho một số mẫu nghiên cứu trong Hình 1.

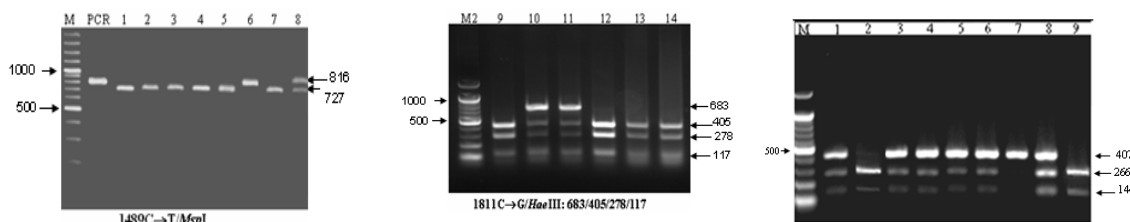
Bảng 4

Các điểm đa hình trên đoạn gen H-FABP (6q21→q26, Y16180: 1401-2216)

Enzyme	Trình tự nhận biết	Vị trí cắt	Độ dài sản phẩm sau cắt (bp)	Vị trí đột biến	Allele
<i>MspI</i>	C↓CGG	Không	816	1489, 1556: T	a
<i>MspI</i>	C↓CGG	1489	89/727	1489: T→C	A
<i>MspI</i>	C↓CGG	1489, 1556	67/89/660	1489: T→C, 1556: T→C	B
<i>HaeIII</i>	GG↓CC	1517, 1533, 1811	16/117/278/405	1811: (G)	d
<i>HaeIII</i>	GG↓CC	1517, 1533	16/117/683	1811: G→C	D

2. Đa hình đoạn gen LIF

Đoạn gen LIF của các mẫu nghiên cứu được nhân thành công bằng kỹ thuật PCR có kích thước như thiết kế (407 bp). Đoạn gen này mang một vị trí đa hình được nhận biết do bị cắt bởi enzyme *DraIII* tương ứng với 2 allele A và B. Allele A (mang đồng hoán Thymine→Cytosine ở vị trí 6988) không bị cắt bởi enzyme, allele B bị cắt bởi enzyme thành 2 băng có kích thước 144 bp và 266 bp (Bảng 5). 3 kiểu gen AA, AB, BB cho các sản phẩm cắt tương ứng được thể hiện đại diện cho một số mẫu nghiên cứu ở Hình 2.



Hình 1: Điện di đồ sản phẩm PCR-RFLP gen H-FABP cắt bằng *MspI* và *HaeIII*

M: Thang cỡ đoạn DNA 100 bp;
PCR: Sản phẩm PCR; 1-5, 7: Kiểu gen AA; 6: Kiểu gen aa; 8: Kiểu gen Aa

M2: Thang cỡ đoạn DNA 100 bp; 9, 12-14: Kiểu gen dd; 10, 11: Kiểu gen Dd.

Hình 2: Điện di đồ sản phẩm cắt đoạn gen LIF bằng *DraIII*

M: Thang cỡ đoạn DNA 100 bp; 1,3-6,8: Kiểu gen AB; 2, 9: Kiểu gen BB; 7: Kiểu gen AA

Bảng 5

Các điểm đa hình trên đoạn gen LIF (exon 3, AJ296176: 6843-7249)

Enzyme	Trình tự nhận biết	Vị trí cắt	Độ dài sản phẩm sau cắt (bp)	Vị trí: Biến dị	Allele
<i>DraIII</i>	CACNNN↓GTG	6987	144/266	6988: T→C	B
<i>DraIII</i>	CACNNN↓GTG	Không	407	6988: (T)	A

3. Đa hình đoạn gen MYOG

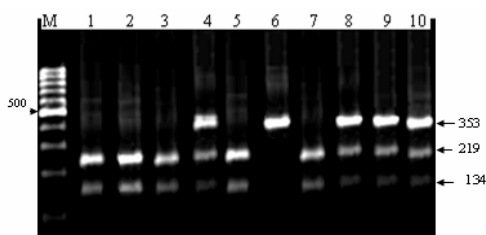
Đoạn gen MyoG có một vị trí đa hình được nhận biết bởi enzyme *MspI* tương ứng với 2 allele A và B. Allele A không mang trình tự nhận biết của enzyme cắt nên giữ nguyên kích thước bằng sản phẩm PCR (353 bp). Allele B mang một trình tự nhận biết của enzyme cắt, sản phẩm cắt là 2 băng có kích thước 134 bp và 219 bp (Bảng 6). Sản phẩm cắt của 3 kiểu gen AA, AB, BB thể hiện cho một số mẫu đại diện trên Hình 3.

Bảng 6

Các điểm đa hình trên đoạn gen MYOG (NST9, X89209: 39-391)

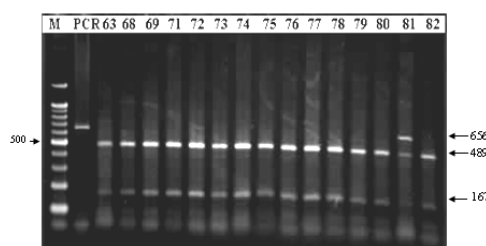
Enzyme	Trình tự nhận biết	Vị trí cắt	Độ dài sản phẩm sau cắt (bp)	Vị trí: Biến dị	Allele
<i>MspI</i>	C↓CGG	173	134/219	173: (C)	B
<i>MspI</i>	C↓CGG	Không	353	173: C→D	A

4. Đa hình đoạn gen RYR1



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm cắt đoạn gen Myogenin

M: Thang cỡ đoạn DNA 100 bp; 1, 2, 3, 5, 7: Kiểu gen BB; 4, 8, 9, 10: Kiểu gen AB; 6: Kiểu gen AA



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm cắt đoạn gen RYR1

M: Thang cỡ đoạn DNA 100 bp; PCR: sản phẩm PCR; 63-80, 82: Kiểu gen NN; 81: Kiểu gen Nn

Đoạn gen RYR1 có kích thước sản phẩm PCR theo thiết kế là 656 bp (Hình 4). Trên đoạn gen này có một điểm đa hình được phân biệt bởi enzyme *Hin6I* tạo ra 2 allele N và n. Allele N mang 1 trình tự nhận biết bởi enzyme, cho sản phẩm cắt gồm 2 băng có kích thước 167 bp và 489 bp. Allele n mang đồng hoá Cytosine → Thymine làm mất vị trí nhận biết của enzyme nên không bị cắt, giữ nguyên kích thước 656 bp (Bảng 7). Các kiểu gen có sản phẩm bị cắt tương ứng thể hiện cho một số mẫu đại diện trên Hình 4.

Bảng 7

Các điểm đa hình trên đoạn gen RYR1 (6p11→q21, Z49778: 18129-18784)

Enzyme	Trình tự nhận biết	Vị trí cắt	Độ dài sản phẩm sau cắt (bp)	Vị trí biến dị	Allele
<i>Hin6I</i>	G↓CGC	18617	167/489	18618: (C)	N
<i>Hin6I</i>	G↓CGC	Không	656	18618: C→T	n

5. Tần suất xuất hiện các kiểu gen của giống lợn lai Yorkshire x Landrace

Kết quả phân tích đa hình PCR-RFLP các đoạn gen H-FABP, LIF, MYOG, RYR1 của 33 mẫu lợn lai Yorkshire x Landrace (YL) được thống kê trong Bảng 8.

Phân tích đa hình gen H-FABP/*MspI*, quan sát được 2 kiểu allele và 3 kiểu gen có tần số xuất hiện tương ứng là: kiểu allele A: 84,8%; kiểu allele a: 15,2%; kiểu gen AA: 72,7%, kiểu gen Aa: 24,2% và kiểu gen aa: 3,0%. Theo nghiên cứu của Thúy và cs. (2005), không ghi nhận được allele B trong hai giống lợn ngoại Yorkshire và Landrace. Như vậy, không có allele B trong giống lợn lai Yorkshire và Landrace (YL) trong nghiên cứu này cũng phù hợp. Trong giống lợn lai YL kiểu gen dị hợp tử Aa có tần số khá lớn (24,2%) khi so sánh với 2 giống lợn thuần chủng Yorkshire (5,56%) và Landrace (7,14%). Kiểu gen đồng hợp aa đã được ghi nhận trong giống lợn lai YL, có lẽ quá trình lai đã tạo ra kiểu gen đồng hợp aa.

Bảng 8

Kết quả phân tích đa hình PCR-RFLP các đoạn gen H-FABP, LIF, MyoG, RYR1

Gen	Kiểu gen	Tổng số (n)	Tần số kiểu gen	Kiểu allele	Tổng số (2n)	Tần số allele
H-FABP	AA	24	0,727	A	56	0,848
	Aa	8	0,242	a	10	0,152
	aa	1	0,030			
	Dd	11	0,333	D	11	0,167
	dd	22	0,667	d	55	0,833
LIF	AA	5	0,156	A	33	0,516
	AB	23	0,719	B	31	0,484
	BB	4	0,125			
MYOG	AA	3	0,091	A	20	0,303
	AB	14	0,424	B	46	0,697
	BB	16	0,485			
RYR1	NN	31	0,939	N	64	0,970
	Nn	2	0,061	n	2	0,030

Tần số allele *d* ở các giống lợn châu Âu cao hơn rất nhiều so với các giống lợn của Việt Nam và Trung Quốc. Allele *D* chiếm ưu thế gần như tuyệt đối trong các giống lợn địa phương của Châu Á. Ở tất cả các giống lợn, allele *A* chiếm tỷ lệ cao hơn nhiều so với allele *a*, trừ giống lợn Duroc của Hà Lan có allele *a* ưu thế hơn allele *A*. Nhìn chung, các giống lợn ngoại có sự đa hình kiểu gen *H-FABP* cao hơn nhiều so với các giống lợn Việt Nam và Trung Quốc. Sự xuất hiện của allele *B* càng chứng tỏ khả năng xảy ra đột biến gen *H-FABP* của các giống lợn nội cao hơn nhiều so với các giống lợn ngoại.

Bảng 9

Tần số kiểu gen H-FABP theo Thúy và cs. (2005)

Giống lợn	Số lượng mẫu phân tích	Tần số kiểu gen H-FABP (%)		
		DD	Dd	dd
Landrace	n = 28	21,43	39,29	39,29
Yorkshire	n = 18	44,44	44,44	11,11

Gen H-FABP được cho là có liên quan đến sự tích lũy mỡ trong mô và được coi như một chỉ thị về hàm lượng mỡ trong mô. Gerben và cs. (1999) nhận thấy kiểu gen đồng hợp tử *aa/dd* (của RFLP-*MspI*, RFLP-*HaeIII*) ở lợn Duroc tương quan với hàm lượng mỡ rất cao trong giống lợn này. Sự tương quan này còn tìm thấy ở con lai giữa lợn Meishan với lợn Large White và Dutch Landrace (Gerben *et al.*, 2000), con lai giữa lợn Iberian và Landrace (Ovilo *et al.*, 2002). Điều này đặt ra vấn đề cần quan tâm khi tạo dòng lai YL cần tránh và loại bỏ những con lai mang kiểu gen đồng hợp *aa/dd* nếu muốn khai thác thịt có tỷ lệ thịt nạc cao.

Phân tích đa hình gen LIF/ *DraIII* quan sát được 2 kiểu allele có tần suất khá đồng đều (allele A: 51,6%, allele B: 48,4%) và 3 kiểu gen (AA: 15,6%, AB: 71,9%, BB: 12,5%). Spotter và cs. (2005) cho thấy tần số xuất hiện của 3 kiểu gen AA, AB, BB khi phân tích đa hình

DraIII - LIF ở lợn lai Duroc x Large White lần lượt là 7%, 40% và 53%. Cũng theo nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ lợn con sinh ra còn sống sót ở các cá thể mẹ có allele A cao hơn so với mang allele B. Lin và cs (2009) lại chỉ ra rằng lợn mẹ có kiểu gen AA và BB có tỷ lệ lợn con sinh ra còn sống sót cao hơn so với kiểu gen AB.

Phân tích đa hình gen MYOG/ *MspI* ghi nhận 2 kiểu allele, allele A: 30,3% và allele B: 69,7%, và 3 kiểu gen: AA: 9,1%, AB: 42,4%, BB: 48,5%. Đối chiếu với nghiên cứu của Soumillion và cs. (1997) và Te Pas và cs. (1999) cho thấy tần số kiểu gen AA bị suy giảm rất mạnh, trong khi tần số kiểu gen BB lại có xu hướng tăng lên nhiều ở dòng lợn lai YL. Theo Te Pas và cs. (1999), đa hình đoạn gen MYOG có liên kết với tốc độ tăng trưởng cũng như tỷ lệ thịt nạc ở lợn, việc chọn lọc những cá thể mang kiểu gen BB sẽ làm tăng trọng lượng sơ sinh, giảm tỷ lệ chết ở lợn khoảng 1%, tăng tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ nạc. Như vậy, dòng lợn lai YL có ưu thế với tần suất kiểu gen BB rất cao.

Phân tích đa hình gen RYR1/ *Hin6I* ghi nhận 2 kiểu allele (N: 97%, n: 3%) và 2 kiểu gen (NN: 93,9%, Nn: 6,1%). Tần suất lớn của allele N quan sát được ở giống lợn lai YL trong nghiên cứu này cũng phù hợp với tần suất cao của allele N ở lợn Yorkshire và Landrace trong nghiên cứu của Thúy và cs. (2005). Đột biến gen RYR1 mặc dù có làm tăng tỷ lệ thịt nạc nhưng lại gây ra bệnh tăng thân nhiệt ác tính ở lợn, gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới hiệu quả kinh tế trong chăn nuôi, làm giảm chất lượng thịt (thịt có màu tái, mềm, ứa dịch) (Jokubka và Miceikience, 1995). Vì vậy, những cá thể có kiểu gen RYR1 đột biến (kiểu gen nn) cần phải loại bỏ. Kết quả nghiên cứu đa hình RYR1/ *Hin6I* cho thấy kiểu gen đột biến (nn) không xuất hiện ở quần thể mẫu nghiên cứu, có thể tần số của allele lặn (n) là rất thấp, nên dòng lợn lai YL có giá trị trong chọn giống.

IV. KẾT LUẬN

Các đoạn gen H-FABP, LIF, MYOG, RYR1 đã được nhân đặc hiệu và sử dụng cho phân tích đa hình RFLP với các enzyme cắt giới hạn phù hợp. Kết quả phân tích đa hình cho thấy dòng lợn lai hai máu Landrace x Yorkshire có sự đa hình trong cả 4 gen nghiên cứu với tần số khác nhau và theo hướng có lợi cho chăn nuôi. Đặc biệt, kiểu gen BB (MYOG/ *MspI*) có tần số xuất hiện lớn, kiểu gen đồng hợp tử lặn nn (RYR1/ *Hin6I*) không được tìm thấy trong quần thể nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K., 1995: Short protocols in Molecular Biology, 3rd, ed. John Wilert and Sons, Inc.
2. Gerbens F, de Koning DJ, Harders FL, Meuwissen THE, Janss LLG et al., 2000: *J Anim Sci.* 78: 552–559.
3. Nguyễn Văn Anh, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Kim Độ, 2005: *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 3(3): 311-317.
4. Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Thu Thúy, Đậu Hùng Anh, Nguyễn Đăng Vang, 2003: *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1(1): 39-46.
5. Nguyen Ngoc Tuan, Tran Thi Dan, Le Thanh Hien, Ngo Tien Dung, Chau Thanh Truc, 2001: Halothane gene frequency and its association to growth rate, meat quality and reproduction of pig in HoChiMinh City. Summary of Scientific conference of molecular biology and Biochemistry, 25-29/6/2001. Tp. HCM.
6. Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Kim Độ, Nguyễn Văn Cường, 2005: *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 3(3): 303-309.

7. Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Kim Độ, Nguyễn Văn Cường, 2005: *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 3(4): 453-458.
8. Ovilo C, A Clop, L. Noguera, M. A. Oliver, C. Barragan, C. Rodriguez, L. Silio, M. A. Toro, A. Coll, J. M. Folch, A. Sanchez, D. Babot, L. Varona, M. PerezEnciso, 2002: *J. Anim. Sci.* 80: 2801-2808.
9. Soumillion A, Erkens JHF, Lenstra JA, Rettenberger G, Te Pas MFW., 1997: *Mammalian Genome*. 8: 564-568.

GENETIC RESOURCES OF SYNTHETIC PIGS BRED IN VIETNAM

TA THI LOAN, NGUYEN THI DIEU THUY,
NGUYEN GIANG SON, DO VO ANH KHOA

SUMMARY

Genetic resource analysis was carried out with the Yorkshire x Landrace pigs in Hoa An Bio-diversity Research and Experimental Center, Can Tho University. Genetic variation of candidate genes associated with economic traits such as: H-FABP - Heart Fatty Acid Binding Protein gene, LIF - Leukocyte Inhibitory Factor gene, MYOG - Myogenin gene, RYR1 - Ryanodine Receptor 1 gene were analysed using PCR-RFLP method. The results showed that the genetic variation was observed in all our candidate genes with identical genotype frequencies which are potential for breeding. Considering that the BB genotype of MYOG/MspI appeared with high frequency whereas homology genotype of nn was not observed within RYR1/Hin6I. The comparison of the variation in genetic resources of Vietnam indigenous pig revealed that the genetic diversity level of analysed synthetic pigs was lower, reflecting the influence of the applied breeding programme on Yorkshire x Landrace pig population.