

ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÙNG D-LOOP GEN TY THỂ CỦA MỘT SỐ GIỐNG LỢN NUÔI Ở VIỆT NAM

NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY

Viện Công nghệ Sinh học

NGUYỄN GIANG SƠN

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

ĐỖ VĨ ANH KHOA

Đại học Cần Thơ

Lợn là giống vật nuôi phổ biến trên thế giới, đặc biệt là ở các nước châu Á nơi có nền nông nghiệp lâu đời. Theo số liệu của tổ chức FAO, 55% số lượng và 37% các giống lợn trên thế giới thuộc về vùng châu Á Thái Bình Dương (Sherf, 2000). Nhiều nghiên cứu về đa dạng di truyền đã được tiến hành trên các giống lợn Châu Âu (Larval *et al.*, 2000, Lemus-Flores *et al.*, 2001), các giống lợn Trung Quốc (Li *et al.*, 2000, Fan *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2003). Đa dạng nguồn gen các giống lợn Việt Nam đã được phân tích bằng chỉ thị microsatellite (Thuy và *cs.*, 2006; Larson và *cs.* 2007). Ở Việt Nam, lợn là đối tượng vật nuôi quan trọng, tổng đàn khoảng 12 triệu con, trong đó hơn 60% là các giống lợn nội. Các giống lợn nội rất đa dạng, đã thích nghi với điều kiện khí hậu nhiệt đới và chế độ dinh dưỡng còn hạn chế (Lê Viết Ly, 1999). Trình tự DNA vùng D-loop ở các loài động vật có vú biến đổi khá nhanh, có thể giúp bộc lộ những đặc trưng di truyền giữa những quần thể, giống vật nuôi cùng loài. Nghiên cứu này nhằm đánh giá mức độ đa dạng nguồn gen giữa các giống lợn nội để góp phần bảo tồn tài nguyên di truyền các giống lợn bản địa của Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thông tin của 20 mẫu nghiên cứu (mẫu máu và mô cơ) thu từ 8 giống lợn nội Việt Nam như sau: Lợn cỏ (CO01, CO13) và Mèo (ME03, ME20 và ME30) thu từ huyện Con Cuông và Quỳnh Châu, Nghệ An; Mường Khương (MK01, MK25, MK38 và MK73) thu tại huyện Mường Khương, Lào Cai; Táp Ná (TN04, TN21, TN23) thu tại huyện Thông Nông, Cao Bằng; Vân Pa (VP11, VP13) thu tại huyện Vĩnh Linh, Quảng Trị; Lợn sóc (SO03, SO06) thu tại tỉnh Đắk Lắk; Ba Xuyên (BX01, BX06) thu tại tỉnh Tiền Giang. Riêng Ỉ đen (IB01, IB02) được đưa từ Thanh Hóa về nuôi giữ tại Trung tâm Bảo tồn quỹ gen, Viện Chăn nuôi. Tách chiết DNA tổng số theo Ausubel *et al.* (1995).

Cặp mồi đặc hiệu để nhân bản đoạn ADN đích bằng PCR có trình tự: Mồi xuôi (F): 5'-CTCCGCCATCAGCACCCAAAG-3'; Mồi ngược (R): 5'-GCACCTTGTTTGGATTG TCG-3. Chu trình nhiệt của PCR gồm các bước: Biến tính ban đầu 94°C trong 3 phút; lặp lại 35 chu kỳ các bước biến tính 94°C trong 45 giây, bám mồi ở 52°C trong 45 giây; tổng hợp chuỗi ở 72°C trong 45 giây; chu kỳ cuối ở 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 15°C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức) và giải trình tự trực tiếp sử dụng bộ hóa chất BigDye v3.1 và máy đọc trình tự ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Mỹ). Phân tích di truyền bằng phần mềm GenDoc v2.6.002 (Nicholas, 1997) và MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood, sử dụng với mô hình Hasegawa-Kishino-Yano với bootstrap 1000 lần lấy lại mẫu.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trình tự nucleotide thuộc vùng D-loop của 20 mẫu nghiên cứu xác định được có chiều dài 652 bp, có thành phần các loại nucleotide trung bình: Adenine (A) = 33,2%; Cytosine (C) = 24,6%; Guanine (G) = 14,6%; Thymine (T) = 27,6% và chỉ số đa dạng nucleotide (π) = 0,008.

Bảng 1

Các vị trí biến đổi nucleotide giữa các giống lợn

Vị trí nucleotide	2	2	4	5	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5
	3	4	8	1	2	0	1	4	3	0	8	3	0	9	3	4	4	2	1	9	0	3	9
BX01	C	A	C	A	T	C	C	A	C	T	C	G	C	A	C	T	T	A	T	T	G	T	T
BX06	.	.	.	G	T
CO01	T	G	.	.	A	.	T	.	T	T	.	.	G	.	.	A	.	.
CO13	.	G	.	.	A	.	T	.	T	.	.	.	T	.	T	A	.	C
IB01	.	G	.	.	A	T	T	.	T	C	.	.	.	G	T	C	.	.	C	C	A	C	.
IB02	.	G	.	.	A	T	T	.	T	C	.	.	.	G	T	C	.	.	C	C	A	C	.
MEO03	.	G	.	.	A	.	T	.	T	T	C	A	.	.
MEO20	.	G	.	.	A	.	T	G	T	T	.	.	G	.	.	A	.	.
MEO30	.	G	.	.	A	.	T	.	T	.	.	.	T	.	T	A	.	C
MK01	.	G	G	.	A	.	T	.	T	C	T	A	.	.
MK25	.	G	.	.	A	.	T	.	T	C	T	A	.	.
MK38	.	G	.	.	A	.	T	.	T	C	T	.	.	.	T	A	.	.
MK73	.	G	.	.	A	.	T	.	T	.	T	.	.	.	T	.	.	.	C
SOC03	A	C	T
SOC06	A	A	.	.	T
TN04	.	G	.	.	A	.	T	.	T	C	T	.	.	.	T	.	.	.	C	.	A	.	.
TN21	.	G	.	.	A	.	T	.	T	C	T	.	.	.	T	.	.	.	C	.	A	.	.
TN23	.	G	.	.	A	.	T	.	T	T
VP11	.	G	.	.	A	.	T	.	T	T	C	C	.	.	.	A	.	.
VP13	.	G	.	.	A	.	T	.	T	T	C	C	.	.	.	A	.	.

Bảng 1 trình bày kết quả so sánh biến đổi nucleotide giữa các trình tự nghiên cứu đã ghi nhận 17 vị trí biến đổi mang thông tin parsimony và một số vị trí có biến đổi đặc trưng cho các giống lợn. Giống lợn Ỉ đen mang nhiều biến dị, trong đó có 4 biến dị riêng (ở vị trí nucleotide số: 180, 309, 469, 553) khác biệt với tất cả các giống lợn khác. Giống lợn Vân Pa mang một biến dị riêng ở vị trí nucleotide 424. Giống lợn Ba Xuyên và Sóc cũng mang khá nhiều biến dị đặc trưng và giống nhau (vị trí nucleotide số: 24, 181, 213), giống Ba Xuyên còn mang biến dị riêng ở vị trí nucleotide số 142. Ngoài ra, còn quan sát được 6 vị trí có biến đổi cá biệt gồm vị trí nucleotide số 23: C→T (CO01), 48: C→G (MK01), 51: A→G (BX06), 204: A→G (ME20), 293: G→A (SO06), 353: T→C (BX01). Có sự đa hình trình tự nucleotide trong cùng giống lợn Ba Xuyên, Cổ, Mèo, Mường Khương, Sóc và Táp Ná. Tuy nhiên, để đánh giá về mức độ đa hình trình tự nucleotide trong các giống cần phải phân tích số lượng mẫu lớn hơn.

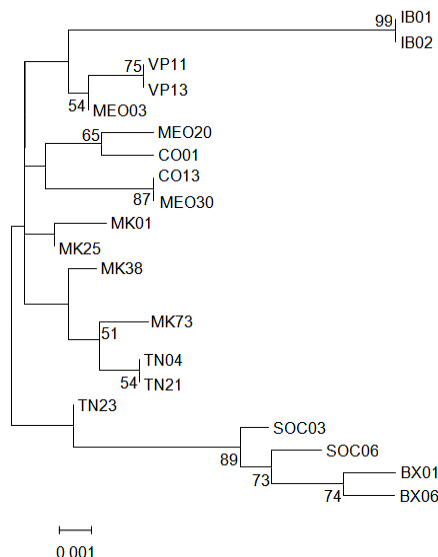
Bảng 2

Khoảng cách di truyền giữa các giống lợn

	BX	CO	IB	ME	MK	SO	TN
CO	0.018						
IB	0.034	0.019					
ME	0.017	0.005	0.016				
MK	0.016	0.007	0.014	0.007			
SO	0.005	0.014	0.025	0.014	0.011		
TN	0.017	0.008	0.013	0.007	0.004	0.012	
VP	0.018	0.007	0.014	0.005	0.007	0.014	0.008

Bảng 2 trình bày ma trận khoảng cách di truyền giữa các giống lợn trên cơ sở đối chiếu trình tự nucleotide, cho thấy sự khác biệt di truyền giữa giống lợn Ba Xuyên và giống lợn Sóc là khá thấp (0,5%), trong khi đó khác biệt di truyền giữa 2 giống này với những giống khác là khá cao (1,1 - 3,4%). Giống lợn ĩ đen thể hiện sự khác biệt di truyền rõ hơn cả so với các giống lợn khác, khoảng cách di truyền giữa giống lợn ĩ đen và các giống khác từ 1,3 - 3,4%. Các giống lợn Cò, Mèo, Mường Khương, Táp Ná, Vân Pa không thể hiện khác biệt di truyền lớn, giá trị khoảng cách di truyền giữa chúng từ 0,3 - 0,8%.

Cây phát sinh chủng loại xây dựng theo phương pháp Maximum likelihood (ML), sử dụng hình Hasegawa-Kishino-Yano được thể hiện trong Hình 1, có tham số phân phối Gamma (BIC = 2587.807, AICc = 2239.911, lnL = -1073.804, γ -shape = 0.05, R = 13.36), cho thấy quan hệ di truyền giữa các giống lợn có một số phân hóa khá rõ ràng. Giống lợn ĩ đen nằm riêng trong một nhánh dài nhất, do mang nhiều khác biệt di truyền với các giống khác. Giống lợn Ba Xuyên và giống lợn Sóc có quan hệ di truyền khá gần gũi, hình thành một gốc phát sinh chung và mang nhiều khác biệt với các giống lợn còn lại. Thông tin này phản ánh sự phân hóa di truyền khá mạnh của giống lợn ĩ đen, lợn Ba Xuyên và Sóc với những giống lợn khác ở Việt Nam.



Hình 1: Quan hệ phát sinh chủng loại giữa các giống lợn theo phương pháp Maximum Likelihood. Số ở các góc các nhánh là giá trị bootstrap, thang tỷ lệ biểu thị giá trị khoảng cách di truyền

Giữa các giống lợn Cò, Mẹo và Mường Khương, Táp Ná không thể hiện sự phân hóa di truyền rõ rệt, có một số đặc điểm biến dị đan xen nhau. Điều này có thể do phân bố địa lý và sự trao đổi nguồn gen giữa chúng trong quá trình nhân giống. Lợn Cò và Mẹo đều thu mẫu từ tỉnh Nghệ An, lợn Mường Khương và Táp Ná thu ở 2 tỉnh phía Bắc gần kề nhau, so với các giống còn lại thì lợn Sóc và lợn Ba Xuyên thu mẫu ở 2 tỉnh phía Nam gần nhau hơn cả.

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy lịch sử hình thành những giống lợn này chưa có thay đổi lớn để tạo ra những phân hóa mạnh về di truyền.

III. KẾT LUẬN

Các biến đổi trình tự nucleotide trong một phần vùng điều khiển (D-loop) thuộc hệ gen ty thể của 8 giống lợn nội Việt Nam phản ánh sự khác biệt di truyền giữa chúng.

Giống lợn Í, giống lợn Ba Xuyên và giống lợn Sóc mang nhiều biến dị di truyền riêng biệt với các giống lợn khác.

Các giống lợn Vân Pa, Cò, Mẹo, Mường Khương và Táp Ná chưa bộc lộ sự phân hóa di truyền rõ ràng.

Lời cảm ơn: Công trình nhận được hỗ trợ kinh phí từ đề án bảo tồn quỹ gen vật nuôi của Viện Chăn nuôi do TS. Võ Văn Sự chủ trì. Xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các đồng nghiệp Viện Chăn nuôi, Phòng Công nghệ gen động vật, Viện Công nghệ Sinh học trong quá trình thu mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn**, 2004: *Át lát các giống vật nuôi ở Việt Nam*. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội
2. **Fan B, Wang ZG, Li YJ, Zhao XL, Liu B, Zhao SH**, 2002: Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Anim. Genet.* 33: 422-427.
3. **Greger Larson et al.**, 2007: Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *PNAS*, 104 (12), 4834-4839.
4. **Larval G, Lannuccelli N, Legault L, Milan D, Groenen MA, Giuffra E.**, 2000: Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet. Sel. Evol.* 32, 187-203.
5. **Lê Viết Ly**, 1999: *Bảo tồn nguồn gen vật nuôi Việt Nam*. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
6. **Li K, Chen Y, Moran C, Fan B, Zhao S and Peng Z.**, 2000: Analysis of diversity and genetic relationships between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed. *Anim. Genet.* 31: 322-325.
7. **Scherf B.D.**, 2000: *World Watch list of domestic animal diversity*, 3rd edition, FAO, Rome, October 2000, 103, 151.
8. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S.**, 2011: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. *Molecular Biology and Evolution* (published).
9. **Thuy, N.T.D., E. Melchinger, A. W. Kuss, T. Peischl, H. Bartenschlager, Cuong. N.V., H. Geldermann**, 2006: Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *Journal of Animal Science*, 84, 2601-2608.

ANALYSIS OF GENETIC VARIATION OF INDIGENOUS PIG BREEDS IN VIETNAM BY DNA SEQUENCE OF D-LOOP REGION OF MITOCHONDRIA

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

SUMMARY

DNA of the control region of mitochondrial genome (D-loop region) with the length of 652 bp of 20 samples belonging to eight indigenous pig breeds raised in Vietnam were sequenced and analyzed. The samples were collected from the original regions of those breeds, which included Co, Meo, Muong Khuong, Tap Na, I Black, Soc, Van Pa and Ba Xuyen . The result showed that the highest genetic variation was found between i Black pig and other breeds and it created the evolution branch separated from others with four private nucleotide changes. Ba Xuyen and Soc pigs shared three nucleotide changes and are more genetically related. Compared to other breeds, Co, Meo, Muong Khuong, Tap Na, Van Pa pigs had the close relationship to each other and showed the unclear genetic differentiation. The result of genetic variation analysis within eight Vietnamese autochthonous pig breeds coincided with geographical distribution of those breeds.