

ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN NHÓM MANG (Muntiacinae: Muntiacus) Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

NGUYỄN VĂN THÀNH, LÊ ĐỨC MINH, ĐINH ĐOÀN LONG

Trường Đại học Khoa học tự nhiên,

Đại học Quốc gia Hà Nội

NGUYỄN MẠNH HÀ

Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường,

Đại học Quốc gia Hà Nội

ĐỖ TUỐC

Viện Điều tra và Quy hoạch Rừng

Mang thuộc giống *Muntiacus* bao gồm 13 loài có vùng phân bố rộng từ Ấn Độ đến Indonesia (Timmins và Duckworth, 2008). Các loài mang có nhiều đặc điểm sinh học đáng chú ý như sự khác biệt về kích thước giữa các loài. Loài có kích thước lớn nhất là loài mang lớn, *M. vuquangensis*, có trọng lượng khoảng 30-50kg trong khi một trong những loài có kích thước nhỏ nhất là Mang putao, *M. putaoensis*, chỉ nặng khoảng 12kg (Đỗ và cs., 1994; Rabinowitz và cs., 1999). Giữa các loài mang còn có sự khác biệt rất lớn về số lượng các nhiễm sắc thể, chẳng hạn như Mang reeves (*M. reevesi*) có 46 nhiễm sắc thể trong khi đó Mang thường (*M. vaginalis*) chỉ có 6 nhiễm sắc thể (Wurster và Benirschke, 1967, 1970; Wurster và Atken, 1972).

Trong nhóm này, ngoại trừ loài mang thường (*M. vaginalis*) có vùng phân bố rộng kéo dài từ phía Nam đến Đông Nam Châu Á thì hầu hết các nhóm mang còn lại chỉ tập trung ở một số vùng như Trung Quốc, Thái Lan, Myanmar, Campuchia, Việt Nam, Lào (Amato và cs., 1999a; Rabinowitz và cs., 1999). Ở Việt Nam, cho đến nay đã được xác định là nơi sinh sống của 4 loài mang (Đỗ và cs., 1994; Amato và cs., 1999b; Timmins và Duckworth, 2008). Tuy vậy, hiện nay vẫn chưa có bất kỳ nghiên cứu trong nước nào được tiến hành để đánh giá cụ thể đa dạng ở mức độ phân tử của nhóm này ở nước ta. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp thu mẫu không trực tiếp, kết hợp xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị phân tử DNA để nghiên cứu cấu trúc quần thể của nhóm Mang ở Việt Nam. Phương pháp này, cho phép đánh giá chi tiết về mức độ đa dạng của các loài mang ở nước ta trong điều kiện thu mẫu trực tiếp ngoài thực địa rất khó khăn vì nhiều loài trong nhóm này đã trở nên rất hiếm do tác động của việc săn bắt và thu hẹp sinh cảnh sống.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu sử dụng trong nghiên cứu là xương và da khô của các loài mang, được thu bởi các chuyên gia của Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường, Viện Điều tra và Quy hoạch Rừng ở các vùng phân bố của chúng, từ Đồng Nai tới Hà Giang. Ngoài ra, một mẫu Mang putao (*M. putaoensis*) được thu tại Myanmar. Danh sách và địa điểm thu mẫu được liệt kê ở bảng 1. Đồng thời chúng tôi cũng sử dụng thông tin về trình tự gen của các loài mang trong các nghiên cứu trước đây lấy từ ngân hàng gen và sử dụng các trình tự này như các trình tự chuẩn và đồng thời là cơ sở so sánh, đối chiếu với các mẫu thu được ở Việt Nam, nhằm đánh giá sự khác biệt cũng như mối quan hệ về mặt di truyền của các mẫu này.

Chúng tôi sử dụng gen ty thể cytochrome b với chiều dài tổng số 1140bp là gen chỉ thị phân tử được sử dụng thành công trong các nghiên cứu về phân tích di truyền ở nhóm thú, cũng như nhóm Màng ở các nghiên cứu trước đây (James và cs., 2008; Giao và cs., 1998). Các cặp mồi được sử dụng theo nghiên cứu của Iwin và cs. (1991) và được nêu ở bảng 2. Từ cơ sở dữ liệu di truyền thu được, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm đánh giá mối quan hệ di truyền và mức độ đa dạng của nhóm mang ở Việt Nam.

Bảng 1

Địa điểm thu mẫu của các mẫu mang sử dụng trong nghiên cứu

TT	Địa điểm thu	Tên loài	Ký hiệu
1	Mường Nhé-Điện Biên	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.5
2	Na Hang-Tuyên Quang	<i>M. vaginalis</i>	Mu 5.11
3	Na Hang-Tuyên Quang	<i>M. vaginalis</i>	Mu 5.7
4	Xuân Liên- Thanh Hoá	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.1
5	Xuân Liên- Thanh Hoá	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.3
6	Xuân Liên- Thanh Hoá	<i>M. rooseveltorum</i>	Mu 2.18
7	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.9
8	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 6.5
9	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.2
10	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.12
11	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.13
12	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.19
13	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.21
14	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.16
15	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. rooseveltorum</i>	Mu 6.3
16	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. rooseveltorum</i>	Mu 6.4
17	Pù Hoạt-Quế Phong	<i>M. rooseveltorum</i>	Mu 2.20
18	Sốp Cộp-Sơn La	<i>M. vaginalis</i>	Mu 3.5
19	Sốp Cộp-Sơn La	<i>M. vaginalis</i>	Mu 3.8
20	Sốp Cộp-Sơn La	<i>M. vaginalis</i>	Mu 3.6
21	Sốp Cộp-Sơn La	<i>M. vaginalis</i>	Mu 3.7
22	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vaginalis</i>	Mu 1.6
23	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vaginalis</i>	Mu 1.7
24	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.11
25	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vaginalis</i>	Mu 1.3
26	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.8
27	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.14
28	Sao La-Quảng Nam	<i>M. truongsonensis</i>	Mu 1.2
29	Sao La-Quảng Nam	<i>M. truongsonensis</i>	Mu 2.4
30	Sao La-Quảng Nam	<i>M. truongsonensis</i>	Mu 2.7
31	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vuquangensis</i>	Mu 1.1
32	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vuquangensis</i>	Mu 6.21

TT	Địa điểm thu	Tên loài	Ký hiệu
33	Sao La-Quảng Nam	<i>M. vuquangensis</i>	Mu 1.5
34	Kon Ka Kinh-Gia Lai	<i>M. vuquangensis</i>	Mu 6.9
35	Kon Ka Kinh-Gia Lai	<i>M. vaginalis</i>	Mu 6.11
36	Kon Ka Kinh-Gia Lai	<i>M. vuquangensis</i>	Mu 6.13
37	Ngọc Linh-Kontum	<i>M. vaginalis</i>	Mu 6.19
38	Ngọc Linh-Kontum	<i>M. vaginalis</i>	Mu 6.17
39	Ngọc Linh-Kontum	<i>M. vaginalis</i>	Mu 2.10
40	Myanmar	<i>M. putaoensis</i>	Mu 4.1

Bảng 2

Danh sách môi sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Vị trí	Trình tự	Tác giả
L14724	14724	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	Irwin <i>et al.</i> , 1991
L15162	15162	5'-GCAAGCTTCTACCATGAGGACAAATATC-3'	Irwin <i>et al.</i> , 1991
L14979	14979	5'-GACGTCAACTACGGCTGAAT-3'	Irwin <i>et al.</i> , 1991
H15915R	15915	5'-GGAATTCATCTCTCCGGTTTACAAGAC-3'	Irwin <i>et al.</i> , 1991

Các mẫu mang được tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ kit Dneasy blood and tissue, với các quy trình đã mô tả trong nghiên cứu của Lê và cs. (2013). Nhân bản trình tự gen đích bằng kỹ thuật PCR với hỗn hợp Hotstar Taq mastermix (Qiagen, Đức). Chu kỳ nhiệt PCR: 95°C trong 15 phút để hoạt hóa Taq; 40 chu kỳ gồm: 95°C trong 30 giây, 45°C trong 45 giây, 72°C trong 60 giây và bước kéo dài cuối cùng trong 6 phút. Chúng tôi sử dụng HotStar Taq là loại Taq hiệu quả trong việc nhân gen với nồng độ DNA khuôn thấp và có tính đặc hiệu cao. Đối với các mẫu có nồng độ DNA quá thấp, chúng tôi tiến hành thêm phản ứng PCR lần thứ hai sử dụng DNA khuôn là sản phẩm PCR lần thứ nhất. Lần PCR thứ hai, chúng tôi sử dụng Taq polymerase (Fermentas). Với loại Taq polymerase chúng tôi thực hiện phản ứng với các điều kiện tương tự như với HotStar Taq, ngoại trừ thời gian hoạt hóa cho Taq Polymerase là 95°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Các sản phẩm PCR thành công được tiến hành tinh sạch sử dụng bộ kit PCR purification (Bioneer) và được gửi giải trình tự hai chiều tại MacroGen, Hàn Quốc.

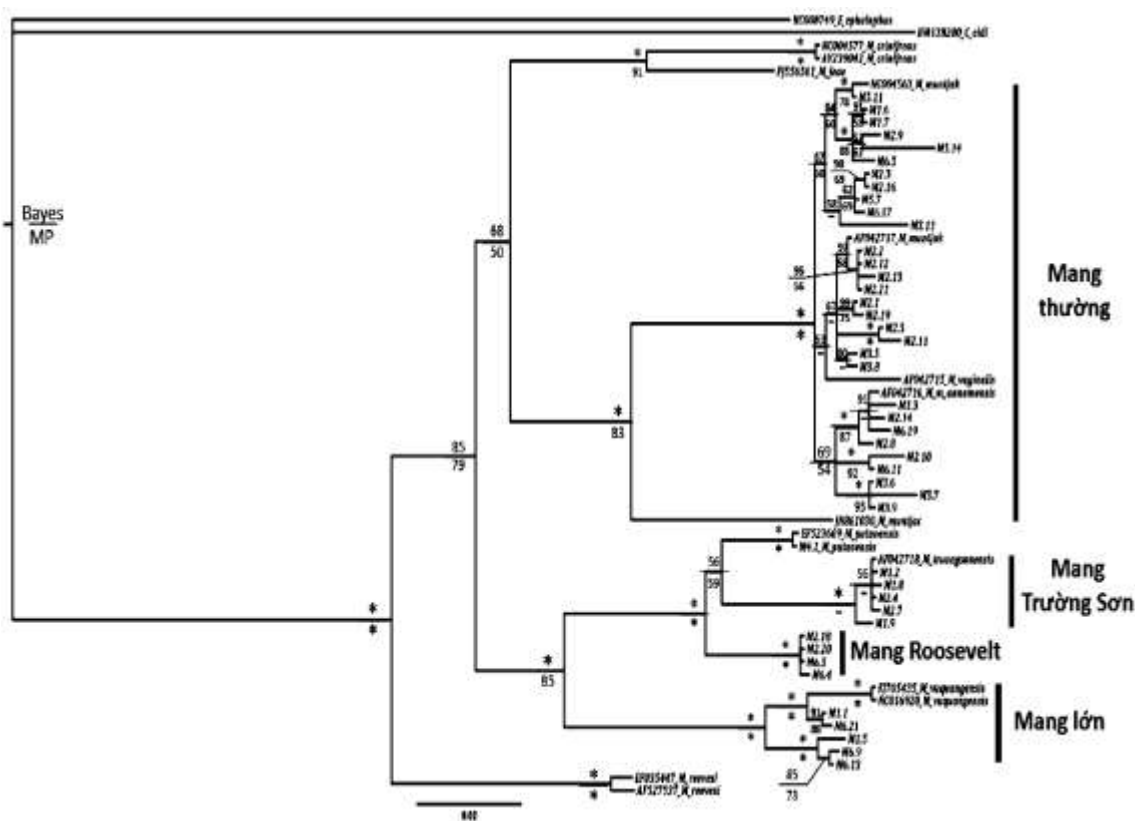
Sắp xếp trình tự cùng với các đoạn gen chuẩn lấy từ ngân hàng gen bằng phần mềm BioEdit v5.0. Trình tự gen của hai loài *Cervus eldi* và *Elaphodus cephalophus* được chúng tôi sử dụng làm nhóm ngoài cho phân tích. Các trình tự thừa được cắt bỏ khi sử dụng để xây dựng cơ sở dữ liệu và cây phát sinh chủng loại dựa trên phương pháp tiết kiệm tối đa (Maximum Parsimony-MP) có trong phần mềm PAUP 4.0b10 (Swofford, 2001) và phương pháp phân tích Bayesian có trong phần mềm MrBayes v3.1.

Đối với phương pháp tiết kiệm tối đa, các tùy chỉnh cho phân tích, với việc thêm 100 taxa ngẫu nhiên lặp lại nhờ thuật toán phân cắt và nối chéo các nhánh của cây phân tích (Tree-bisection and reconnection-TBR), không chọn giới hạn trên cho số cây được ghi nhớ. Sau phân tích, chúng tôi chạy 1000 vòng lặp ngẫu nhiên (Bootstrap-BP) để đánh giá độ tin cậy của các nhánh trong cây phát sinh chủng loại. Giá trị của gốc nhánh được coi là đủ độ tin cậy khi đạt chỉ số > 70%. Đối với phương pháp Bayesian, để xác định mô hình tiến hóa phù hợp cho hệ thống

cơ sở dữ liệu của mình, chúng tôi sử dụng phần mềm Modeltest v3.7 và sử dụng phần mềm MrBayes để chạy phân tích. Phân tích được bắt đầu từ một cây ngẫu nhiên và chạy trong 10×10^6 thế hệ. Bốn mô hình Markov, gồm một nóng và ba lạnh (giá trị mặc định) được lấy mẫu sau mỗi 1000 thế hệ. Với phương pháp này sẽ có hai phân tích được tiến hành song song để đánh giá. Sau phân tích, cần xác định các điểm lấy mẫu, mà tại đó biểu đồ Markov chains bắt đầu ổn định, các cây ở trước thời điểm lấy mẫu này sẽ được loại bỏ. Giá trị xác suất xảy ra (Posterior probability-PP) của tất cả các nhánh sẽ được xác định sau khi kết thúc phân tích.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chúng tôi đã thu được trình tự gen cytochrome b đầy đủ chiều dài 1140bp ở 45 mẫu mang. Kết hợp với trình tự lấy từ ngân hàng gen, cơ sở dữ liệu của chúng tôi gồm 61 mẫu của 10 trên tổng số 13 loài mang. Với phương pháp tiết kiệm tối đa, chúng tôi đã tiến hành xây dựng được cây phát sinh chủng loại phát sinh của các loài mang ở Việt Nam (hình 1).



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại các loài mang (*Muntiacus*)

Ghi chú: Cây phát sinh được xây dựng trên cơ sở dữ liệu gen cytochrome b (1140bp) theo phương pháp tiết kiệm tối đa (MP) và Bayesian. Độ dài của nhánh được tính toán theo phương pháp Bayesian. Chỉ số phía trên các nhánh là xác suất của gốc nhánh của phương pháp Bayesian theo mô hình GTR (General Time Reversible) chạy trong 10×10^6 thế hệ, chọn mẫu cách 1000 thế hệ. Chỉ số phía dưới nhánh cây là độ tin cậy của phương pháp tiết kiệm tối đa với các thông số: Chiều dài cây (TL) = 584, chỉ số chắc chắn (CI) = 0,5925, chỉ số duy trì (RI) = 0.8795. Độ tin cậy có được sau 1000 vòng lặp. Dấu sao (*) tương ứng với giá trị 100%.

Cây phát sinh chủng loại thu được có sự tương đồng khá cao tại các nhánh ở cả hai phương pháp. Cụ thể, cây phân loại chia các loài mang ở Việt Nam làm 2 nhánh lớn, gồm có 4 loài mang là mang thường (*M. vaginalis*), Mang trường sơn (*M. truongsongensis*), Mang vũ quang (*M. vuquangensis*), Mang roosevelt (*M. rooseveltorum*).

Qua cây chủng loại phát sinh cho thấy, Mang thường (*M. vaginalis*) có sự đa dạng rất cao về mặt di truyền, vùng phân bố rộng trên toàn bộ chiều dài địa lý Việt Nam. Bởi vậy, sự đa dạng này có thể liên quan tới sự phân bố theo vị trí địa lý, khi loài này phải sống ở các điều kiện khác nhau. Ở một số nhánh của cây, chưa phân tách được ở các mẫu, hoặc chỉ số tin cậy chưa cao, điều này có thể được giải thích do các quần thể vẫn có sự trao đổi với nhau về mặt di truyền. Kết quả chứng tỏ Mang thường có phân bố rộng và có thể thích nghi với nhiều loại môi trường sống khác nhau không giống như những loài mang khác tại Việt Nam thường chỉ sống ở những môi trường sống nhất định.

Nhánh Mang vũ quang (*M. vuquangensis*) có sự phân tách thành 2 nhánh với các chỉ số tin cậy cao (cả BP và PP đều là 100%), tương ứng với vị trí địa lý miền Trung và miền Nam Việt Nam. Dựa vào kết quả thu được cùng với địa điểm thu mẫu của hai nhóm mang trong loài Mang vũ quang, chúng ta có thể tạm thời kết luận là nhóm này bị chia cắt bởi dãy Trường Sơn và cụ thể là đèo Hải Vân. Kết quả này cho thấy đây có thể là biên giới tự nhiên của hai quần thể có sự khác biệt di truyền do cách ly về mặt địa lý.

Nhánh Mang trường sơn có mối quan hệ di truyền gần với loài mang putao (*M. putaoensis*) có vùng phân bố ở Myanmar và Đông Bắc Ấn Độ. Điều này khẳng định lại một lần nữa kết quả của các nghiên cứu trước đây (James và cs., 2008 và cũng cho thấy đã có sự hình thành loài mới do cách ly địa lý ở hai loài này.

III. KẾT LUẬN

Chi thị phân tử DNA cho thấy ở Việt Nam là nơi sinh sống của 4 loài mang *M. vaginalis*, *M. truongsongensis*, *M. vuquangensis*, *M. rooseveltorum*. Trong đó, loài mang thường (*M. vaginalis*) có sự đa dạng cao về mặt di truyền, có thể liên quan tới vùng địa lý. Mang trường sơn (*M. truongsongensis*) và Mang roosevelt (*M. rooseveltorum*) có mối quan hệ di truyền rất gần với loài mang putao (*M. putaoensis*) và có khu vực phân bố ở Myanmar và Đông Bắc Ấn Độ. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt về mặt di truyền giữa hai quần thể theo khu vực phân bố ở miền Trung và miền Nam Việt Nam của loài mang vũ quang (*M. vuquangensis*).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amato G., M. G. Egan, A. Rabinowitz, 1999. Animal Conservation, 2: 1-7.
2. Amato G., M. G. Egan, G. B. Schaller, R. H. Barker, H. C. Rosenbaum, W. G. Robichaud, 1999. Journal of Mammalogy, 80: 639-643.
3. Eganm. G., 2000. "The identification of species by diagnostic molecular characters and the phylogenetic relationships of muntjac", PhD. Dissertation, Fordham University, New York.
4. Giao P. M., Tuoc Do et al., 1998. Animal Conservation, 1: 61-68.
5. Irwin D. M., T. D. Kocher, A. C. Wilson, 1991. Journal of Molecular Evolution, 32: 17.
6. James J., Ramakrishnan U., Datta A., 2008. Conservation Genetic, 9: 927-931.
7. Lan W. A., 2000. Molecular Biology and Evolution, 17: 1326-1333.
8. Lem., Ha D. T., Thanh N. V., Ha N. M., Long D. D., Tuoc Do, Hai N. D., 2013. Journal of Biology, vol. 35.
9. Rabinowitz Ar, M. T. Khaing St, Rabinowitz S., 1999. Journal of Mammalogy, 249: 427-435.
10. Schaller G. B. E. A., 1996. Journal of Mammalogy, 77: 675-683.

**EVOLUTION AND CONSERVATION OF MUNTJACS (*Muntiacinae: Muntiacus*)
IN VIETNAM: A STUDY MOLECULAR APPROACHES**

NGUYEN VAN THANH, LE DUC MINH, DINH DOAN LONG
NGUYEN MANH HA, DO TUOC

SUMMARY

Muntjac or barking deers (Genus: *Muntiacus*) are small to medium sized animals, which belong to family Cervidae. They occur in forested habitats throughout tropical Asia. Up to now, thirteen species have been documented (Groves and Grubb, 1990; Amato *et al.*, 1990a; Amato *et al.*, 2000). The Indian muntjacs (*Muntiacus vaginalis*) are widely distributed from south to south-east Asia. All other muntjacs are more or less restricted to China, Thailand, Myanmar, Cambodia, Laos, Vietnam. Among them, four species are found in Vietnam. In this study, we attempt to determine the genetic diversity of this group in Viet Nam using non-invasive sampling and a phylogenetic approach. Our preliminary results show that the Indian Muntjac is much more diverse genetically than previously thought. In addition, geographically isolated populations of the Giant Muntjac (*M. vuquangensis*) is genetically divergent.