

PHÂN BIỆT ONG KHOÁI *Apis dorsata* VÀ ONG ĐÁ *Apis laboriosa*, NGHIÊN CỨU TẬP TÍNH DI CƯ CỦA CHÚNG DỰA VÀO ĐA HÌNH TRÌNH TỰ GEN COII TRÊN DNA TY THỂ

LÊ QUANG TRUNG

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Ong

Ong khoái (*Apis dorsata*) và Ong đá (*A. laboriosa*) là 2 loài có kích thước cơ thể lớn nhất so với các loài ong mật khác như *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. florea* và *A. andreniformis*. Ong đá và Ong khoái không chỉ có giá trị kinh tế cao mà còn là tác nhân quan trọng để thụ phấn cây trồng và cây rừng. Hàng năm, từ một đàn Ong khoái có thể khai thác được 20-30kg mật/vụ và Ong đá từ 20-60kg mật/vụ. Giữa 2 loài có tập tính làm tổ giống nhau nhưng lại có vùng phân bố và tập tính di cư khác nhau. Ong khoái và Ong đá chỉ xây 1 bánh tổ lộ thiên nên không thuần hóa và nuôi được. Tổ Ong khoái có thể tìm thấy dưới cành cây cao hay vách đá có độ cao từ 100-500m so với mặt biển, nhưng Ong đá chỉ làm tổ dưới các vách đá có độ cao > 1000m. Ong khoái phân bố rộng khắp ở các nước nhiệt đới; Ong đá mới chỉ thấy làm tổ dọc dãy Himalaya thuộc một số nước như Ấn Độ, Nepal, Trung Quốc và Việt Nam. Vào mùa khó khăn về thời tiết và khan hiếm về thức ăn, Ong khoái thường di cư hàng trăm kilomet đến nơi ở mới để làm tổ và thu hoạch sản phẩm, trong khi Ong đá chỉ di cư trong bán kính 10-50km, có khi chỉ từ sườn núi này sang sườn núi khác [9]. Về mặt phân loại, dù đã có nhiều nghiên cứu dựa vào khác biệt về hình thái, tập tính làm tổ để xác định loài [9, 3], việc công nhận Ong đá và Ong khoái là 2 loài khác nhau vẫn còn đang tranh cãi. Vì vậy, loài Ong đá chỉ được coi là phân loài của Ong khoái (*A. dorsata laboriosa*). Gần đây toàn bộ hệ gen của ong mật *A. mellifera* đã được giải trình tự và phân tích làm cơ sở ứng dụng chỉ thị phân tử để có thể phân biệt 2 loài Ong đá và Ong khoái. Đến nay đã có nhiều nghiên cứu dựa vào đa hình trình tự một số gen như COI, COII... trên DNA ty thể để xác định nguồn gốc chủng loại, phân biệt ở mức loài, mức phân loài trong giống ong mật (*Apis*) cũng như tập tính di cư của chúng [1, 7].

Ở Việt Nam, cả 2 loài Ong khoái và Ong đá thuộc đối tượng bảo tồn nguồn gen. Ong khoái phân bố ở khắp các tỉnh vùng núi, trung du và nhiều vùng ven biển. Trong khi Ong đá chỉ phát hiện thấy làm tổ ở một số vùng núi đá của Sơn La và Lai Châu, nơi có độ cao > 1000m so với mặt biển [8]. Ở các vùng núi đá Tây Bắc, hàng năm Ong khoái thường về làm tổ và thu sản phẩm từ tháng 4-10. Sau đó, chúng di cư xuống thung lũng để tránh rét hoặc di cư vào các tỉnh miền Trung để tiếp tục một mùa thu hoạch mới [6]. Ở một số hang đá dọc dãy Hoàng Liên (Tân Uyên, Lai Châu), hàng năm Ong đá về làm tổ và thu sản phẩm từ tháng 4-9. Theo quan sát, một số đàn Ong đá được phát hiện trú đông ở nhiều hang đá ở Tam Đường (Lai Châu) trong khoảng thời gian từ tháng 10 đến tháng 3 năm sau. Các đàn ong này có kích thước bánh tổ nhỏ, không có sản phẩm dự trữ. Phải chăng đây là những đàn ong di cư từ Tân Uyên sang? So với Ong khoái, Ong đá đang có nguy cơ bị tuyệt chủng do vùng phân bố hẹp cộng thêm khai thác hủy diệt của con người. Nghiên cứu này nhằm phân biệt Ong đá với Ong khoái và nghiên cứu tập tính di cư của chúng dựa vào phân tích đa hình trình tự đoạn gen COII trên DNA ty thể ong thợ của 2 loài. Kết quả nghiên cứu lần đầu tiên được công bố nhằm cung cấp thêm cơ sở khoa học để bảo tồn hiệu quả hơn 2 loài Ong khoái và Ong đá ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ong thợ của Ong khoái *A. dorsata* và Ong đá *A. laboriosa* được thu trực tiếp trên 24 đàn ong ở 5 tỉnh. Tất cả mẫu ong được thu từ 2010-2012 vào các tháng khác nhau tùy theo sự có mặt của các loài ong tại vùng thu mẫu. Mẫu được ngâm trong cồn 90°, giữ ở -20°C cho đến khi tách DNA tổng số. Thông tin mẫu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Mẫu ong thợ Ong khoái và Ong đá tiến hành nghiên cứu

TT	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ thu mẫu	Tháng thu mẫu	N1	N2
1	Tân Uyên, Lai Châu	22,07°B-104,00°Đ	7-8	3	4
2	Tam Đường, Lai Châu	22,36°B-103,26°Đ	11-12		4
3	Tủa Chùa, Điện Biên	21,85°B-103,33°Đ	6-8	3	
4	Mộc Châu, Sơn La	20,52°B-104,42°Đ	6-8	4	
5	Nghĩa Đàn, Nghệ An	19,33°B-105,15°Đ	3-4; 7-8	3	
6	Mường Khương, Lào Cai	22,77°B-104,10°Đ	7-8	3	

Ghi chú: N1. Số lượng đàn Ong khoái; N2. Số lượng đàn Ong đá.

Tách DNA tổng số: DNA tổng số được tách từ phần đầu, chân và cánh của ong thợ sử dụng Chelex 5% [10] và kit tách DNA của hãng Fermentas (Đức).

Nhận bản bằng PCR: Đoạn DNA đích trên gen COII có chiều dài khoảng 600bp được nhận bản bằng kit PCR của hãng Fermentas (Đức) với cặp mồi ADLF: 5'-CATTTCATAATATAGTAATAAC-3'; ADLR: 5'-CCAATTATAATTGAATCAACTTC-3' được thiết kế từ 2 đầu gen COII. Chu trình PCR gồm 1 chu kỳ biến tính ban đầu 96°C trong 5 phút, tiếp tục 30 chu kỳ: 95°C-0,5 phút, 55°C-1 phút, 72°C-1,5 phút; kết thúc chu kỳ cuối ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được chạy trên gel Agarose 1%, nhuộm bằng Ethidium bromide (0,5µg/ml), quan sát dưới đèn UV và so sánh kích thước với thang DNA chuẩn (Invitrogen™, GeneRuler).

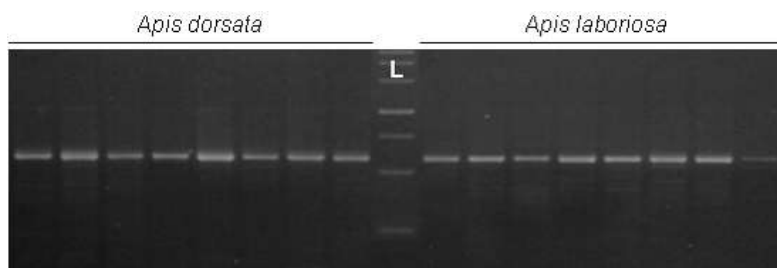
Giải trình tự DNA: Sản phẩm PCR được gắn vào vector pTZ57R/T (Fermentas, Đức), nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5α. Plasmid DNA được tách bằng kit Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit và giải trình tự nucleotide 2 chiều sử dụng cặp mồi M13 tại Macrogen (Korea).

Phân tích trình tự DNA: Phân biệt 2 loài ong được phân tích dựa vào đa hình về trình tự đoạn đích trên gen COII theo phương pháp Neighbor Joining trên phần mềm MEGA 3.1 với 1000 lần lấy lại mẫu và các đột biến điểm đặc trưng trên các haplotype của đoạn đích [5]. Các đàn ong di cư của từng loài giữa các vùng được nhận diện bằng mức tương đồng (100%) khi so sánh trình tự DNA trên gen COII của chúng trên phần mềm MEGA3.1 [5] và DNAMAN 4.15.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

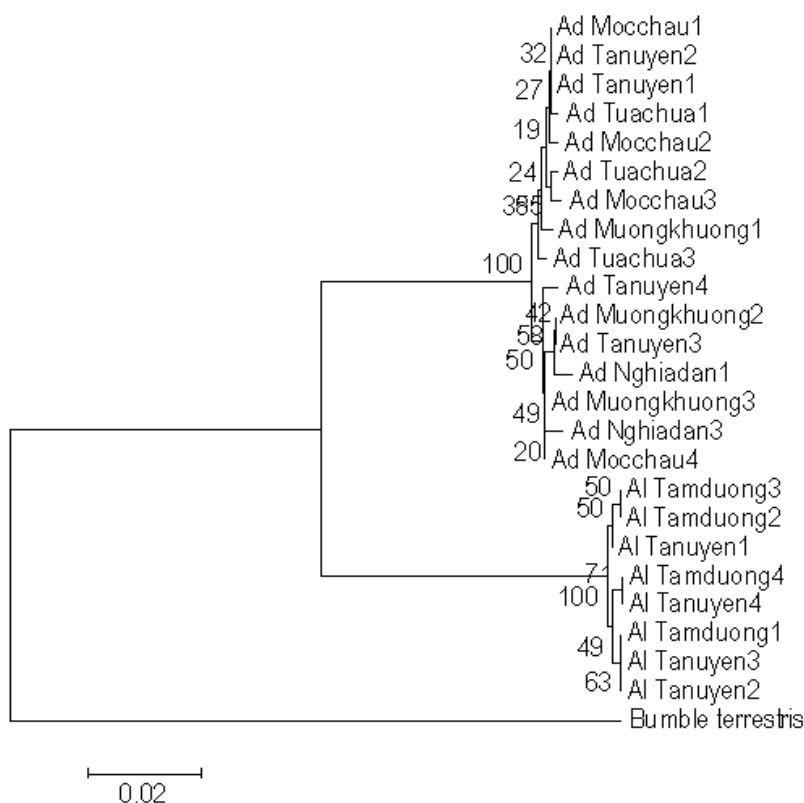
1. Phân biệt Ong khoái *Apis dorsata* và Ong đá *A. laboriosa*

Kết quả nhận bản đoạn đích trên gen COII bằng PCR giữa 16 mẫu đàn Ong khoái và 8 mẫu đàn Ong đá được trình bày ở hình 1. Chiều dài đoạn gen đích của các mẫu được giải trình tự DNA là 574bp.



Hình 1. Kết quả nhân bản bằng PCR với cặp mồi ADLF-R (L: Thang DNA- Invitrogen™)

Khi phân tích theo phương pháp Neighbor Joining, đa hình trình tự DNA của đoạn đích 574bp đã nhóm 24 mẫu ong thu từ 6 vùng thành 2 nhánh tách biệt của 2 loài ong (hình 2). Ong khoái bao gồm 16 mẫu ở Mường Khương, Tân Uyên, Tòa Chùa, Mộc Châu và Nghĩa Đàn. Ong đá chỉ có ở 8 mẫu thu ở Mường Khương và Tân Uyên (bảng 1). Giá trị thống kê gốc nhánh của 2 nhóm là 100%.

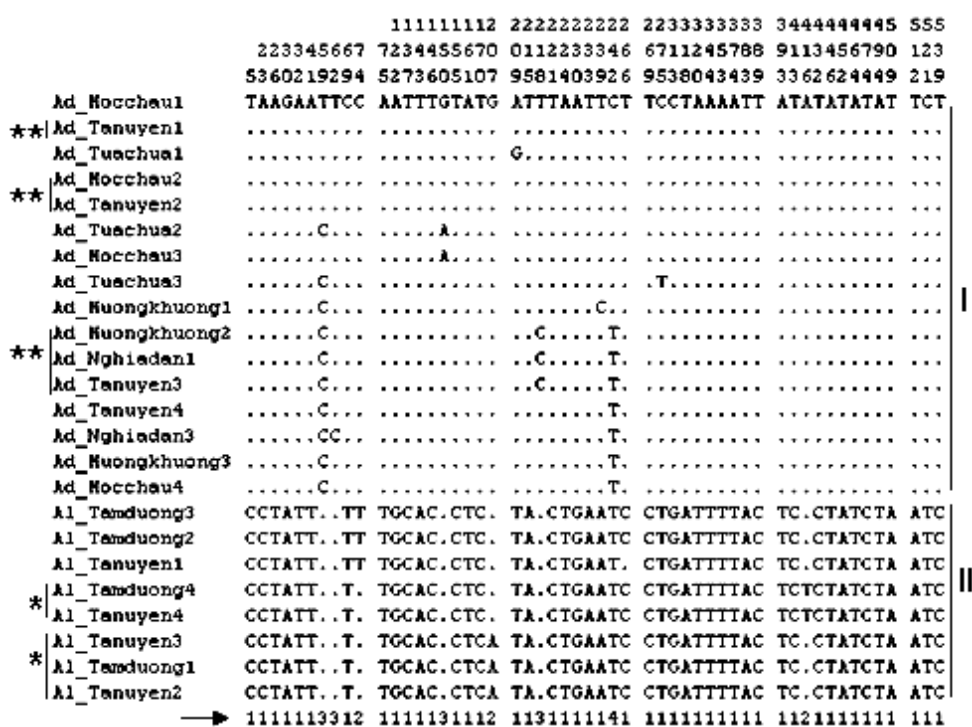


Hình 2. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen COII

Ad: Ong khoái *Apis dorsata*; Al: Ong đá *A. laboriosa*; số ở các gốc nhánh là giá trị bootstrap.

Kết quả phân tích haplotype dựa vào các đột biến điểm đặc trưng đã phản ánh kết quả phân tích bằng Neighbor Joining. Số đàn Ong khoái nghiên cứu (16 đàn) và Ong đá (8 đàn) được cấu trúc thành 2 nhánh riêng biệt là do 45 đột biến điểm trên đoạn đích 574bp của gen COII để tạo thành các haplotype điển hình cho từng loài (hình 3).

Dựa vào phân tích đa hình trình tự DNA trên gen COII để phân biệt thành công loài Ong khoái *Apis dorsata* với loài Ong đá *A. laboriosa* trong nghiên cứu này phù hợp với nhiều công bố trước đây với mục đích trung tự. Với chỉ thị là đa hình trình tự trên gen COII kết hợp với một số gen khác, Cao và cs. [2] đã phân biệt được các cặp loài còn đang tranh cãi ở Trung Quốc như ong ruồi đỏ (*A. florea*) với ong ruồi đen (*A. andreniformis*); Ong khoái (*A. dorsata*) với Ong đá (*A. laboriosa*) và giữa hàng loạt các loài ong mật khác (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nigrocinta*, *A. nuluensis*). Với kỹ thuật tương tự, Raffiudin và Crozier [7] đã xác định *Apis binghami* là một loài riêng biệt, mà trước đây vẫn cho chúng thuộc phân loài của Ong khoái (*Apis dorsata binghami*). Như vậy, đa hình trình tự gen COII với 45 đột biến điểm đặc trưng (hình 3) có thể là những chỉ thị phân tử để phân biệt 2 loài Ong đá và Ong khoái. Ngoài ra, gen COII có thể sử dụng để phân biệt các cặp loài như ong ruồi đỏ (*A. florea*) với ong ruồi đen (*A. andreniformis*) cũng là những nguồn gen ong mật đang được bảo tồn ở Việt Nam.



Hình 3. Haplotype đặc trưng cho Ong khoái và Ong đá

- I. Các haplotype của Ong khoái; II. Các haplotype của Ong đá. Mũi tên và các số 1: Đột biến điểm để phân biệt 2 loài; 2: Đột biến điểm giữa các đàn Ong đá; 3: Đột biến điểm giữa các đàn Ong khoái; 4: Đột biến điểm chung giữa 2 loài. *: Các haplotype giống nhau của các đàn Ong đá ở các vùng khác nhau; **: Các haplotype giống nhau của các đàn Ong khoái ở các vùng khác nhau.

2. Xác định tập tính di cư của Ong đá và Ong khoái

Kết quả phân tích đột biến điểm trên gen COII của 2 loài Ong khoái và đá (hình 3) cho thấy Ong khoái có phân bố trải trên khoảng cách hàng trăm kilomet, trong khi khoảng cách này của Ong đá chỉ ghi nhận khoảng 30-40km. Lào Cai, Lai Châu cách xa Nghĩa Đàn tới 400-500km, mà các haplotype Ad_Muongkhuong2, Ad_Tanuyen3 thu trên đàn Ong khoái ở Mường Khương (Lào Cai) và Tân Uyên (Lai Châu) tương đồng 100% với haplotype Ad_Nghiadan1 của loài ong này thu trên đàn ong ở Nghĩa Đàn (Nghệ An). Như vậy, hết mùa mật nhiều đàn Ong khoái ở Tây Bắc có thể đã di cư vào Miền Trung để xây tổ và khai thác mật. Kết quả của nghiên cứu này

phù hợp với một số công bố trước đây. Theo Koeniger và Koeniger [4], trong tự nhiên, Ong khoái di cư theo mùa hoa, quãng đường bay của chúng đến nơi ở mới có thể tới 100-200km. Dựa vào chỉ thị trên gen COI của 18 đàn Ong khoái, Lê Quang Trung và Nguyễn Tường Vân [6] đã xác định được lộ trình di cư Tây Bắc-Miền Trung của chúng. Tuy nhiên, trong các đàn Ong khoái của nghiên cứu này, một số haplotype giống nhau của Ong khoái cũng thấy ở các khoảng cách Mộc Châu-Mường Khương (như 2 haplotype Mocchau4-Muongkhuong3) hoặc ở các cự ly Mộc Châu-Tân Uyên (như Mocchau1, 2-Tanuyen2). Sự giống nhau về haplotype của các đàn Ong khoái trong mùa phát triển (tháng 7-8, bảng 1) ở các vùng Tây Bắc có lẽ cũng do tập tính di cư của Ong khoái. Nhiều đàn Ong khoái ở mùa mật trước di cư từ Mộc Châu vào Miền Trung, đến mùa mật sau chúng lại bay trở lại Tây Bắc, nhưng không làm tổ ở Mộc Châu mà lại tới Tân Uyên hoặc Mường Khương. Đây cũng là tập tính không bảo thủ nơi làm tổ của Ong khoái [4].

Khác với lộ trình di cư dài của Ong khoái, khoảng cách giữa các núi đá ở Tam Đường (nơi Ong đá trú đông vào mùa thu-đông) và Tân Uyên (nơi Ong đá làm tổ và thu sản phẩm vào mùa xuân-hè) cách nhau chỉ khoảng 30-50km lại có nhiều haplotype giống hệt nhau. Chẳng hạn, haplotype Tamduong4 của đàn ong ở Tam Đường giống hệt của đàn ong ở Tân Uyên (haplotype Tanuyen4). Tương tự 3 haplotype Tanuyen3, Tamduong1, Tanuyen2 thu từ các đàn ong ở núi đá của 2 huyện cũng không có sai khác một nucleotide nào (hình 3). Điều này chứng tỏ một số đàn Ong đá làm tổ và khai thác mật ở Tân Uyên từ tháng 4-10 đã di cư về trú đông ở Tam Đường các tháng còn lại trong năm. Di cư trong khoảng cách ngắn có lẽ liên quan đến quá trình tiến hóa về phân bố của Ong đá. Loài ong này chỉ làm tổ ở vùng núi cao > 1000m so với mặt biển, nơi có áp suất thấp, độ ẩm cao [8]; đây là hạn chế để loài ong này có thể di cư với quãng đường dài để tìm nơi ở mới trong mùa khan hiếm thức ăn [1]. Underwood [9] dùng phương pháp đánh dấu ong thợ đã tìm được nhiều đàn Ong đá ở Nepal, dọc dãy Himalaya chỉ di cư từ sườn núi bên này sang ngay sườn núi bên kia để trú đông.

III. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hai loài Ong đá và Ong khoái được phân biệt dựa vào 45 đột biến điểm đặc trưng trên trình tự đoạn đích thuộc gen COII của 2 loài Ong khoái và Ong đá. Đa hình trình tự của gen COII còn là những chỉ thị để xác định tập tính di cư của Ong khoái và Ong đá. Kết quả nghiên cứu tạo cơ sở để đưa ra phương pháp bảo tồn hiệu quả 2 loài ong này, nhất là Ong đá, vì chúng có vùng phân bố hẹp, quãng đường di cư ngắn và thời gian trú đông dài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arias M. C., Sheppard W. S., 2005. Mol. Phylogenet. Evol., 37 (1): 25-35.
2. Cao L. F., Niu D. F., He S. Y., Kuang H. O., Hu F. L., 2012. Journal of Yi Chuan, 34 (8): 1057-63.
3. Cao L. F., Zheng H. Q., Chen X., Niu D. F., Hu F. L., Hepburn H. R., 2012. Journal of Apicultural Research, 51 (3): 245-251.
4. Koeniger N., Koeniger G., 1980. J. Apic. Res., 19: 21-34.
5. Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. Briefings in Bioinformatics, 5: 150-163.
6. Lê Quang Trung, Nguyễn Tường Vân, 2012. Tuyển tập Báo cáo Khoa học về Nghiên cứu và Giảng dạy sinh học ở Việt Nam, Hà Nội 10/2012, tr. 741-748.
7. Raffiudin R., Crozier R. H., 2007. Mol Phylogenet Evol., 43 (2): 543-552.
8. Trung L. Q., Dung P. X., Ngan T. X., 1996. Apidologie, 27: 487-488.
9. Underwood B. A., 1990. Apis laboriosa. Natl. Geogr. Res., 6: 276-290.
10. Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R., 1991. Biotechniques, 10: 507.

**DISTINGUISH *Apis dorsata* FROM *Apis laboriosa*
AND RESEARCH ON THEIR SEASONAL MIGRATORY BEHAVIORS
BASED ON POLYMORPHISM OF COII GENE ON mtDNA**

LE QUANG TRUNG

SUMMARY

Giant honeybees of *Apis dorsata* and *A. laboriosa* are two of five species in the list of conservation in Vietnam. Determination of the two species and research on their seasonal migratory behavior are important for effective conservation of them. In this research, worker bees of 24 colonies of the 2 species were collected from different seasons in 5 localities within North-western regions to Nghe An province. Targeted 574bp on COII gene of the sampled bees were analysed. Two clades for *A. dorsata* and *A. laboriosa* species from Neighbor Joining tree with significant bootstrap confidence intervals of 100% revealed that *A. dorsata* and *A. laboriosa* were two genetically separate species. In addition, 45 typical point mutations along the targeted COII haplotypes of the two species molecularly characterised their 2 different species. 100% of homology between haplotypes of *A. dorsata* collected from some Northwestern regions and Nghe An province indicated this species took very long seasonal migration during the year. Otherwise, no point mutation of haplotypes of *A. laboriosa* collected from both end of Hoang Lien range in two different seasons pointed out short distance of seasonal migration of this species. Polymorphism in sequence of COII gene could be therefore applied to distinguish other honeybee species of *A. florea* and *A. andreniformis*, which are also in conservation in Vietnam.