

ĐÁNH GIÁ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN HEO RỪNG VIỆT NAM

HOÀNG NGHĨA SƠN, NGUYỄN KHẮC DUY, LÊ THÀNH LONG,

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG MAI, HÀ THANH TÙNG, LÊ THỊ CHÂU, NGUYỄN HỮU DUẨN

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

DOÃN CHÍNH CHUNG, ĐỖ MINH SĨ

Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Kết quả nghiên cứu quần thể heo rừng (bao gồm các cá thể heo rừng bản địa Việt Nam và các cá thể heo lai) cho thấy, các cá thể heo rừng bản địa Việt Nam ở khu vực Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà và rừng Tánh Linh giống nhau về mặt di truyền và nằm trong một nhóm. Heo rừng Việt Nam tách biệt về mặt di truyền so với các nhóm heo rừng châu Á khác như heo rừng Hàn Quốc, heo rừng Thái Lan và heo rừng Indonesia với khoảng cách di truyền lớn. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy quần thể heo rừng bản địa của Việt Nam có phân bố rộng từ miền Bắc cho tới khu vực Tây Nguyên.

Mở đầu

Việt Nam nằm trong khu vực Đông Nam Á, được coi là nguồn gốc phát sinh của giống heo Sus (Stefano Mona, 2007), có tới 6/8 loài đã được xác định sự hiện diện của chúng ở khu vực này. Một vài giống heo bản địa của Việt Nam đã được mô tả về mặt di truyền bằng việc sử dụng microsatellites để đánh giá sự đa dạng di truyền (N.T.D Thuy, 2006). Hơn nữa, một số biến đổi trong ADN ty thể đã được mô tả ở heo nhà Việt Nam (Naotaka Ishiguro, 2008). Tuy nhiên, mối quan hệ di truyền của quần thể heo rừng Việt Nam còn chưa được mô tả rõ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vùng D-loop ty thể để phân tích mối quan hệ di truyền của heo rừng Việt Nam và heo rừng từ các khu vực khác như Hàn Quốc, Thái Lan, Indonesia. Vùng D-loop còn được sử dụng cho việc phân tích mối quan hệ phát sinh loài dựa trên heo nhà và heo rừng ở khu vực châu Á và châu Âu (Takuma Watanobe và cs, 2004; Gui ShengWu và cs, 2007). Trong nghiên cứu này, các vị trí biến đổi của vùng D-loop được sử dụng để đánh giá khoảng cách di truyền và mối quan hệ phát sinh loài. Các dữ liệu này còn được sử dụng để so sánh với các quần thể heo rừng châu Á khác để đánh giá mối quan hệ di truyền.

Nội dung và kết quả nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu và tách chiết ADN: các cá thể heo rừng Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu này được thu nhận

từ khu vực Tánh Linh (6 mẫu), khu vực Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà (4 mẫu) và khu vực Bảo Lộc (9 mẫu) (bảng 1).

Bảng 1: sự phân bố của heo rừng

| Haplotypes | Khu vực phân bố (Accession number) | Loại |
|--------------|--|--------------------|
| VN1-VN5, VN7 | Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà (JQ898530-JQ898535) | Heo rừng Việt Nam |
| VN8-VN11 | Rừng Tánh Linh (JQ898536- JQ898539) | Heo rừng Việt Nam |
| VN12-VN20 | Bảo Lộc (KP938207-KP938215) | Heo rừng Việt Nam |
| TLSS1-TLSS4 | Sansai, Chiangmai, Thái Lan (AM779933, AM779934, AM779936, AM779937) | Heo rừng Thái Lan |
| TLMS1-TLMS6 | Mae Sariang, Chiangmai, Thái Lan (FM244683-FM244688) | Heo rừng Thái Lan |
| K1-K9 | Hàn Quốc (EF533685-EF533693) | Heo rừng Hàn Quốc |
| I1-I5 | Indonesia (AB564389, AB564391, AB564393, AB564395, AB564397) | Heo rừng Indonesia |

ADN tổng được thu nhận từ mô tai của heo rừng Việt Nam. Các mẫu mô được phá bằng dung dịch ly giải (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA và 1% sodium dodecyl sulfate) với proteinase K (1 mg/ml) (Maniatis et al., 1982). ADN sau đó được tách bằng dung dịch Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 (Sigma) và được rửa bằng ethanol (Merck). ADN tổng được huyền phù hóa bằng dung dịch TE (0,1 mM Tris-HCl và 0,1 mM EDTA) và được bảo quản ở -20°C.



Heo cỏ (heo mồi) tại Bảo Lộc, Đà Oai, tỉnh Lâm Đồng

Giải trình tự và phân tích dữ liệu: sản phẩm PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT PCR Clean up kit và được sử dụng làm khuôn cho giải trình tự. Các trình tự nucleotide được xác định bằng hệ thống 3730XL ADN Analyzer (Macrogen, Hàn Quốc). Việc so sánh trình tự của vùng D-loop ADN ty thể được thực hiện cho 19 cá thể heo rừng Việt Nam và các cá thể heo rừng khác từ Genbank (bảng 1). Quá trình so sánh này được thực hiện bằng phần mềm MEGA5 (Koichiro Tamura, 2011). Trình tự vùng D-loop ty thể được xếp đúng cột bằng chương trình CLUSTAL W. Mô hình Tamura và Nei được sử dụng để xác định khoảng cách di truyền. Phương pháp Neighborjoining được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài (Saitou N and Nei M, 1987). Phân tích bootstrap (lặp lại 1000 lần) được sử dụng để đánh giá mức độ tin cậy của các nhánh cây phát sinh loài.

Kết quả

Khuếch đại ADN: kết quả cho thấy, toàn bộ 19 mẫu heo rừng Việt Nam được khuếch đại thành công với cặp mỗi trên. Trình tự khuếch đại dài 602 bp. Điều đó cho thấy, cặp mỗi mitL76 và mitH6 phù hợp với việc khuếch đại vùng D-loop của heo rừng Việt Nam.

Những biến đổi trong trình tự vùng D-loop: có 2 nhóm heo rừng Việt Nam trong nghiên cứu này. 9 trong 19 cá thể heo rừng Việt Nam có các vị trí nucleotide biến đổi giống với heo rừng Thái Lan và nhóm này được gọi là heo lai (VN12-VN20). Các cá thể còn lại được gọi là nhóm heo rừng bản địa Việt Nam (VN1-VN5, VN7-VN11). 18 điểm đa hình được xác định ở 10 cá thể heo rừng bản địa Việt Nam và 3 điểm là các điểm đa hình mới. 10 trình tự của heo rừng bản địa Việt Nam đã được công bố trên cơ sở dữ liệu của DDBJ/EMBL/GenBank (Accession Number JQ898530-JQ898539). 9 haplotype của heo rừng lai (VN12-VN20) có đặc điểm di truyền giống với các cá thể heo rừng Thái Lan tại các vị trí 14, 100, 115, 127, 220, 246 và 526, trong khi đó 10 haplotype heo rừng bản địa Việt Nam thì khác biệt về mặt di truyền so với heo rừng Thái Lan. Các vị trí biến đổi đặc trưng của heo rừng bản địa Việt Nam được tìm thấy tại các vị trí 127, 220 và 246. Các vị trí này khác biệt hoàn toàn so với các cá thể heo

rừng lai cũng như heo rừng châu Á khác. Bảng 2 mô tả khoảng cách di truyền giữa các quần thể heo rừng. Đánh giá sai số chuẩn được thực hiện với phương pháp bootstrap (1000 lần lặp lại). Việc phân tích được xây dựng dựa trên mô hình Tamura-Nei (Tamura K and Nei M, 1993). Sự khác biệt giữa các trình tự được sử dụng để đánh giá so sánh tiến hoá (Tamura K and Kumar S, 2002). Các kết quả cho thấy, heo rừng bản địa Việt Nam khác biệt về mặt di truyền so với heo rừng vùng Sansai ($d = 0,025 \pm 0,006$) và vùng Mae Sariang ($d = 0,023 \pm 0,006$) của Thái Lan. Trong khi đó, khoảng cách di truyền của heo lai so với heo vùng Sansai ($d = 0,009 \pm 0,003$) và Mae Sariang ($d = 0,009 \pm 0,003$) của Thái Lan nhỏ hơn so với heo rừng bản địa Việt Nam. Khoảng cách di truyền của heo rừng bản địa Việt Nam so với Indonesia là lớn nhất ($d = 0,046 \pm 0,009$).

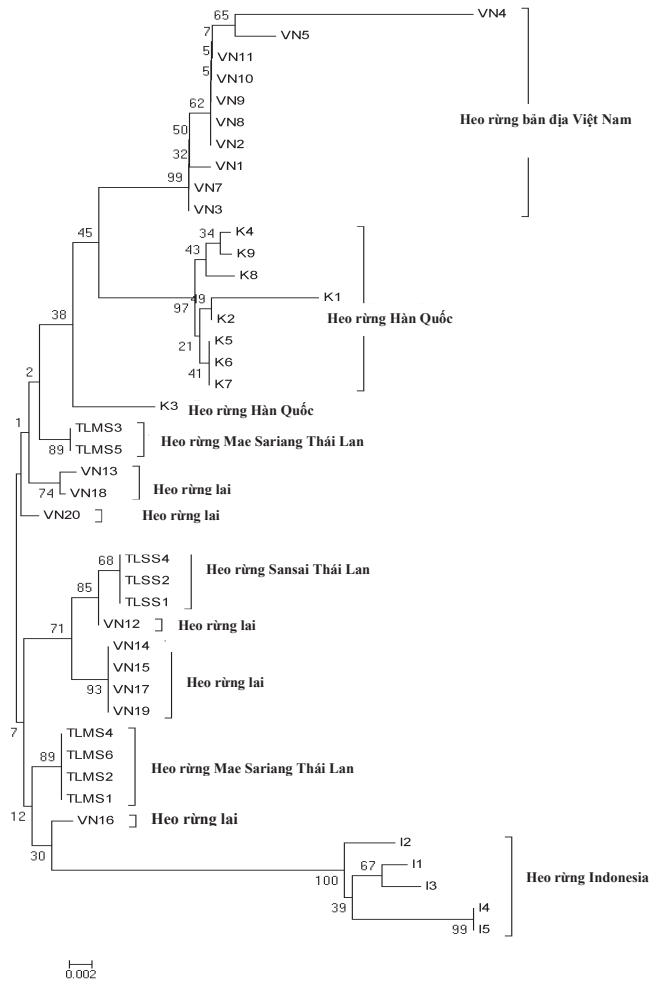
Bảng 2: ma trận khoảng cách di truyền Tamura-Nei giữa các quần thể heo rừng

| Quần thể | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. Heo rừng bản địa Việt Nam | | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,009 |
| 2. Heo rừng lai | 0,025 | | 0,003 | 0,003 | 0,005 | 0,008 |
| 3. Heo rừng Thái Lan Sansai | 0,025 | 0,009 | | 0,004 | 0,006 | 0,008 |
| 4. Heo rừng Thái Lan Mae Sariang | 0,023 | 0,009 | 0,013 | | 0,005 | 0,008 |
| 5. Heo rừng Hàn Quốc | 0,024 | 0,023 | 0,027 | 0,020 | | 0,009 |
| 6. Heo rừng Indonesia | 0,046 | 0,044 | 0,044 | 0,040 | 0,050 | |

Các haplotype được chia thành 3 nhóm chính dựa trên cây neighbor-joining bao gồm: Indonesia, Hàn Quốc và Việt Nam (hình 1). Nhóm Indonesia với giá trị bootstrap 100% bao gồm các haplotype I1 đến I5. Nhóm Hàn Quốc với giá trị bootstrap 97% bao gồm các haplotype K1 đến K2 và K4 đến K9. Nhóm heo rừng bản địa Việt Nam với giá trị bootstrap 99% bao gồm các haplotypes VN1 đến VN5 và VN7 đến VN11. Các cá thể heo rừng bản địa Việt Nam được thu nhận từ rừng Tánh Linh và Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà, tuy nhiên chúng đều nằm trong một nhóm. 3 haplotype VN1, VN3, VN7 nằm trong nhóm với giá trị bootstrap 49%, các haplotype khác (VN2, VN4, VN5 và VN8-VN11) nằm trong nhóm với giá trị bootstrap 61%. 5 haplotype heo rừng lai (VN12, VN14, VN15, VN17 và VN19) nằm cùng nhóm với các haplotype heo rừng vùng Sansai Thái Lan (TLSS1-TLSS4) với giá trị bootstrap 71%. 3 haplotype heo rừng lai (VN13, VN18, VN20) có mối quan hệ di truyền gần gũi với haplotypes heo rừng khu vực Mae Sariang Thái Lan với giá trị bootstrap 89%.



Heo sóc Tây Nguyên



Hình 1: cây phát sinh loài được thiết lập từ các trình tự heo rừng bản địa Việt Nam, heo rừng lai và các cá thể heo rừng châu Á khác dựa trên trình tự vùng D-loop bằng phương pháp phân tích Neighbour-Joining

Kết luận

Dữ liệu trong đề tài này cho thấy, heo rừng bản địa Việt Nam khác biệt về mặt di truyền so với heo rừng lai dựa trên trình tự vùng D-loop ty thể. Khoảng cách di truyền của heo rừng lai và heo rừng Thái Lan nhỏ hơn so với heo rừng bản địa Việt Nam và heo rừng Thái Lan. 7 vị trí biến đổi của heo rừng Thái Lan được quan sát thấy ở các cá thể heo lai. Do đó, các cá thể heo lai này có mối quan hệ di truyền gần với heo rừng Thái Lan hơn các cá thể heo rừng bản địa Việt Nam. Các cá thể heo rừng bản địa Việt Nam gần đây được lai với heo rừng Thái Lan (Luu et al, 2010). Các cá thể heo rừng được thu nhận ở khu vực Bảo Lộc đều là heo rừng lai, chúng có các đặc điểm giống với heo rừng Thái Lan về hình thái và kích thước (Lee, 2002). Việc phân tích cây phát sinh loài cho thấy, các cá thể heo rừng lai (VN12, VN14, VN15, VN17 và VN19) nằm cùng

nhóm với heo rừng vùng Sansai Thái Lan, điều đó cho thấy các cá thể heo rừng lai này có nguồn gốc từ vùng Sansai Thái Lan. Các cá thể heo rừng lai còn lại có mối quan hệ gần gũi với heo rừng vùng Mae Sariang Thái Lan, chứng tỏ chúng có thể có nguồn gốc từ vùng Mae Sariang của Thái Lan.

Việt Nam nằm trong vùng có sự đa dạng heo rừng lớn nhất thế giới (Vittorio Lucchini, 2004). Ở Việt Nam có 2 loài heo rừng là *Sus scrofa* và *Sus bucculentus* (Colin P. Groves, 1997). Tuy nhiên trong nghiên cứu này, tất cả các cá thể heo rừng được thu nhận là *Sus Scrofa*. Các cá thể heo rừng thu nhận từ khu vực Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà và rừng Tánh Linh đều nằm trong một nhóm. Khoảng cách di truyền giữa các cá thể trong từng nhóm rất nhỏ, ở nhóm Bidoup - Núi Bà là 0,000, còn nhóm Tánh Linh là 0,0126±0,003. Trong khi đó khoảng cách di truyền giữa 2 nhóm này là 0,005±0,0004, điều đó chứng tỏ không có sự khác biệt lớn về mặt di truyền trong quần thể heo rừng bản địa Việt Nam. Giá trị bootstrap ở hầu hết các nhóm heo rừng lớn hơn 70%, thể hiện mức độ tin cậy lớn trong sự phân nhánh của cây phát sinh loài (Higgs, 2005). Dựa trên khoảng cách di truyền và cây phát sinh loài, có thể thấy heo rừng bản địa Việt Nam khác biệt hoàn toàn về mặt di truyền so với heo rừng Hàn Quốc, Thái Lan và Indonesia. Khoảng cách di truyền trung bình trong quần thể heo rừng bản địa Việt Nam là 0,0079±0,0019, giá trị này nhỏ hơn rất nhiều so với khoảng cách di truyền giữa heo rừng bản địa Việt Nam với các nhóm heo rừng khác. Khoảng cách di truyền giữa heo rừng bản địa Việt Nam và heo rừng Indonesia là lớn nhất, sự khác biệt về mặt địa lý của nhóm heo rừng Indonesia có thể là nguyên nhân tạo nên sự khác biệt lớn về mặt di truyền này (Vittorio Lucchini, 2004) ✍

Tài liệu tham khảo

1. Cann L, Brown M, Wilson C (1984), "Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA", *Genetics*, **106**, pp. 479-499.
2. Colin P.G, George B.S, George A & Khamkhoun K (1997), "Rediscovery of the wild pig *Sus bucculentus*", *Nature*, **386**, pp. 335.
3. Giuffra E, Kijas H, Armager V, Carlborg O, Jeon T, Andersson L (2000), "The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression", *Genetics*, **154**, pp. 1785-1791.