

PHÂN TÍCH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM ĐA HÌNH VÀ MỐI QUAN HỆ PHÁT SINH LOÀI CỦA LỢN RỪNG VIỆT NAM KHU VỰC TÂY NGUYÊN DỰA TRÊN TRÌNH TỰ GEN *CYTOCHROME B* TY THỂ

Nguyễn Thị Phương Mai¹, Lê Ngọc Châu²,
Nguyễn Khắc Duy², Lê Thành Long^{2*}, Hoàng Nghĩa Sơn²

⁽¹⁾Viện Sinh học Tây Nguyên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁽²⁾Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, ^(*)lelong2510@gmail.com

TÓM TẮT: Gen cytochrome b ty thể được sử dụng phổ biến trong việc đánh giá tính đa hình và mối quan hệ phát sinh loài của các cá thể lợn (*Sus scrofa*). Trong đề tài này, vùng trình tự gen cytochrome b dài 552bp được sử dụng để đa giá các điểm đột biến, điểm đa hình và mối quan hệ di truyền giữa các cá thể lợn rừng bản địa của Việt Nam, lợn rừng lai và các cá thể lợn rừng khác trên thế giới. Kết quả sắp xếp cho thấy có 9 vị trí đa hình trong các haplotype lợn rừng, trong đó đã xác định được 3 vị trí đa hình đặc trưng cho các haplotype lợn rừng bản địa của Việt Nam. Các vị trí đa hình 593, 621, 696, 843, 877 có thể tạo thành bộ trình tự đa hình đặc trưng cho lợn bản địa của Việt Nam và giúp phân biệt với các cá thể lợn rừng khác trên thế giới. Mối quan hệ di truyền giữa các cá thể lợn rừng được đánh giá bằng việc xây dựng cây NJ (Neighbour-joining). Dựa vào cấu trúc cây phân loài, 11 cá thể lợn rừng bản địa Việt Nam tách thành một nhóm riêng với phần trăm bootstrapping là 77%, trong khi đó, các cá thể lợn rừng lai lại nằm chung nhóm với các cá thể lợn rừng của Hàn Quốc và Tây Ban Nha. Trình tự vùng cytochrome b của lợn rừng bản địa Việt Nam và trình tự protein dịch mã từ vùng gen cytochrome b của lợn rừng bản địa Việt Nam được so sánh với một số loài động vật khác. Kết quả phân tích cho thấy, vùng gen cytochrome và trình tự các amino acid của protein được dịch mã từ vùng gen cytochrome b trên có tính bảo tồn cao.

Từ khóa: cây phát sinh, cytochrome b, haplotype, lợn rừng, tính đa hình nucleotide đơn.

MỞ ĐẦU

DNA ty thể được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu quan hệ phát sinh loài giữa các cá thể khác nhau hay giữa các quần thể khác nhau. Kích thước DNA ty thể khoảng 16 kb bao gồm 13 gen mã hóa protein, 22 tRNA và các gen mã hoá cho trình tự 12S và 16S [6, 11]. Đối với lợn (*Sus scrofa*), trình tự gen cytochrome b được sử dụng như là một công cụ để đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các quần thể lợn [1]. Cytochrome b đã được sử dụng trong đánh giá sự đa dạng ty thể ở các cá thể lợn châu Âu và Trung Quốc trong quá trình bản địa hóa [3], lịch sử tiến hoá của các giống lợn *Sus* [7] cũng như mức độ đa dạng di truyền trong sự phát sinh loài, cấu trúc quần thể và sự lai tạo giữa các giống ở lợn rừng châu Âu [9]. Hơn nữa, các haplotype cytochrome b của lợn châu Á còn được dùng để xác định tần suất xuất hiện trong các cá thể lợn ở châu Âu cũng như lợn bản địa ở Tây Ban Nha [1]. Ngoài ra, việc mô tả đặc tính di truyền và mối quan hệ phát sinh loài lai tạo dựa trên việc giao phối giữa cá thể lợn bản địa và cá thể lợn du nhập có thể dựa trên trình tự của cytochrome b này [2]. Việt Nam là một nước có sự đa dạng và phong phú các loài lợn rừng, phân

bổ rộng ở nhiều vùng khác nhau như Móng Cái, Mường Khương, Kontum, Lạc Dương, Tánh Linh [8]. Tuy nhiên, việc đánh giá mối quan hệ di truyền giữa các cá thể lợn rừng Việt Nam dựa trên trình tự cytochrome b chưa được nghiên cứu và mối quan hệ phát sinh loài giữa các cá thể lợn rừng cũng như giữa các quần thể lợn rừng ở Việt Nam cũng chưa được xác định. Do đó, trong nghiên cứu này, gen cytochrome b ty thể được giải trình tự và được sử dụng để phân tích mối quan hệ phát sinh loài cũng như đánh giá tần suất xuất hiện của các haplotype cytochrome b của lợn rừng Việt Nam.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu lợn rừng

Các cá thể lợn rừng được sử dụng trong nghiên cứu này từ rừng bản địa Việt Nam được bắt ở vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà (tỉnh Lâm Đồng) và rừng Tánh Linh (tỉnh Bình Thuận), các mẫu cá thể lợn rừng lai được thu nhận ở Bảo Lộc (tỉnh Lâm Đồng). Mẫu mô da tai lợn được thu nhận, rửa sạch, bảo quản ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm. Trong đề tài này, trình tự gen

cytochrome b của các cá thể lợn rừng Việt Nam và một số cá thể lợn rừng bản địa của một số nước khác được sử dụng cho việc phân tích, đánh

giá mối quan hệ phát sinh loài cũng như tần suất haplotype cytochrome b (bảng 1).

Bảng 1. Sự phân bố các cá thể lợn rừng

STT	Vị trí phân bố	Kí hiệu cá thể lợn rừng	Giống lợn	Số lượng lợn rừng
1	Lạc Dương	VN8-VN11	Bản địa Việt Nam	4
2	Tánh Linh	VN1-VN7	Bản địa Việt Nam	7
3	Bảo Lộc	VT12-VT20	Lợn lai Việt Nam và Thái Lan	9
4	Hàn Quốc	HQ1-HQ7	Bản địa Hàn Quốc	7
5	Tây Ban Nha	TB1-TB14	Bản địa Tây Ban Nha	14
6	Uruguay	U1-U14	Bản địa Uruguay	14

Tách chiết DNA và khuếch đại PCR

Mẫu mô da tai lợn được ủ với dung dịch ly giải và proteinase K 1 mg/ml (Invitrogen) qua đêm ở 55°C. DNA tổng được tách chiết bằng PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen). DNA được bảo quản bằng dung dịch Tris-EDTA 0,1 mM (Invitrogen) ở -20°C. Thành phần PCR bao gồm 5 µl 10X PCR buffer (Sigma), 2,5 mM MgCl₂ (Sigma), 200 µM dNTP (Sigma), 0,05 đơn vị/µl Taq polymerase (Sigma), tổng phản ứng là 50 µl. Trình tự gen cytochrome b được khuếch đại bằng mỗi xuôi (5'-TCTTCGCCTTCCACTTTATCCTG-3') và mỗi ngược (5'-TGGCCCTCCTTTTCTGGTTTA-3'). Điều kiện phản ứng bao gồm: 94°C/5 phút, 35 chu kì: 94°C/30 giây, 55°C/45 giây, 72°C/45 giây, 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên 1% agarose gel (Biorad).

Giải trình tự

Sản phẩm PCR của gen cytochrome b được tinh sạch bằng ExoSAP-IT PCR Clean up kit (USB Corporation, USA) và được giải trình tự bằng hệ thống 3730XL DNA Analyzers (Macrogen, Hàn Quốc).

Phân tích dữ liệu và tính đa hình DNA

Các trình tự được phân tích bằng chương trình Genious 5.6.1. Quá trình sắp xếp các trình tự được thực hiện bằng Clustal W theo thuật toán Smith-Waterman [10]. Trình tự gen cytochrome b của lợn rừng bản địa Việt Nam và lợn lai được so sánh với các trình tự cytochrome b của lợn rừng Hàn Quốc, Tây Ban Nha và Uruguay (bảng 2).

Phân tích quan hệ phát sinh loài

Phương pháp xây dựng cây phân loài NJ (neighbour-joining) được sử dụng để xác định mối quan hệ phát sinh loài giữa các trình tự, mô hình khoảng cách di truyền được sử dụng là Tamura-Nei. Phương pháp lặp mẫu được sử dụng là Bootstrap với số lần lặp lại là 100 và ngưỡng củng cố là 50%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự đa dạng gen cytochrome b ty thể

Các trình tự được sắp xếp bằng chương trình Genious 5.6.1. Các vị trí đa hình theo chiều 5' của DNA ty thể dựa trên vùng trình tự gen cytochrome b của các cá thể lợn rừng được mô tả trong bảng 3. Các điểm đa hình nucleotide đơn tại các vị trí 877 (T/C), 879 (G/A), 882 (C/T), 886 (G/A) từ các trình tự trên được sử dụng để đánh giá mức độ khác biệt về mặt di truyền của quần thể lợn rừng. Sự phân bố của các haplotype tại các vị trí đó được dùng để đánh giá mối quan hệ phát sinh của các cá thể, quần thể lợn nhà [1, 3] và mối quan hệ di truyền giữa các cá thể lợn rừng.

Trong nghiên cứu này, các cá thể lợn rừng Uruguay có sự phân bố haplotype tại 4 vị trí trên giống như haplotype E1 (TGCG) của lợn châu Âu trong khi đó các cá thể lợn rừng Hàn Quốc có sự phân bố haplotype tại 4 vị trí trên giống như haplotype A2 (CATG) của lợn châu Á. Tuy nhiên, điều đặc biệt là phần lớn các cá thể lợn rừng Tây Ban Nha có sự phân bố haplotype giống haplotype A2 và một số lại có sự phân bố giống haplotype A1 của lợn châu Á (CATA).

Các cá thể lợn rừng bản địa Việt Nam có sự phân bố haplotype tại 4 vị trí trên là TATG. Tuy nhiên, các cá thể lợn rừng lai cũng có sự phân bố haplotype tại 4 vị trí trên (TATG) giống lợn bản địa của Việt Nam. Do đó nếu sử dụng sự phân bố các haplotype tại 4 vị trí trên để phân biệt giữa các quần thể lợn rừng bản địa Việt Nam về mặt di truyền sẽ không hiệu quả.

Phân tích cytochrome b cho thấy 9 điểm đa hình nữa (696, 843, 877, 879, 882, 943, 1040, 1077, 1137) từ các trình tự trên, trong số đó, có 3 điểm đa hình mới tại các vị trí (593, 621, 804) và chỉ xuất hiện ở 11 cá thể lợn bản địa Việt Nam. Trong khi đó, các cá thể lợn rừng lai lại có các vị trí điểm đa hình giống với các cá thể lợn rừng của Hàn Quốc, Tây Ban Nha và Uruguay. Như vậy, dựa vào các vị trí đa hình 593, 621, và 804 có thể tạo thành bộ trình tự đa hình đặc trưng cho lợn bản địa của Việt Nam, giúp phân biệt với các cá thể lợn rừng khác như của Hàn Quốc, Tây Ban Nha hay Uruguay.

Mối quan hệ phát sinh loài

Trình tự gen cytochrome b của các cá thể lợn rừng bản địa Việt Nam, lợn rừng lai được so sánh với các trình tự cytochrome b lợn rừng Hàn Quốc, Tây Ban Nha và Uruguay được lấy từ GenBank với số truy cập như bảng 3. Cây NJ (neighbor-joining) được sử dụng để đánh giá khoảng cách di truyền giữa các haploty [3].

Kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy có 3 nhóm DNA ty thể phân biệt dựa trên trình tự cytochrome b này (hình 1). Nhóm 1 bao gồm các cá thể lợn rừng Uruguay (khoảng cách di truyền trong nhóm là 0,0032). Nhóm 2 bao gồm các cá thể lợn rừng Tây Ban Nha, Hàn Quốc và lợn rừng lai (khoảng cách di truyền trong nhóm là 0,0054). Trong nhóm 2, hầu hết các cá thể lợn rừng Hàn Quốc nằm trong 1 nhóm nhỏ trong khi, đó lợn rừng lai phân thành 3 nhóm nhỏ khác. Kết quả đó cho thấy, các cá

thể lợn rừng lai ở Bảo Lộc (Lâm Đồng) có mối quan hệ di truyền gần với các cá thể lợn rừng Hàn Quốc và Tây Ban Nha hơn so với nhóm lợn rừng bản địa Việt Nam.

Nhóm 3 bao gồm các cá thể lợn rừng bản địa Việt Nam phân bố ở Lạc Dương (tỉnh Lâm Đồng) và ở Tánh Linh (tỉnh Bình Thuận) khu vực Nam Trung bộ (khoảng cách di truyền trong nhóm là 0,0078).

Tuy nhiên, không có sự tách biệt hoàn toàn về mặt di truyền giữa các cá thể lợn rừng bản địa ở Lạc Dương và Tánh Linh. Cá thể lợn rừng bản địa VN11 (Lạc Dương) cùng với cá thể lợn VN1, VN3 và VN7 (Tánh Linh) tạo thành 1 nhóm trong khi đó cá thể lợn rừng VN8, VN9, VN10 (Lạc Dương) cùng với các cá thể lợn VN2, VN4, VN5, VN6 (Tánh Linh) tạo thành 1 nhóm khác.

Phương pháp lặp mẫu Bootstrap được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài từ các trình tự trên [4]. Các giá trị bootstrap với ngưỡng 50% sau khi lặp lại 100 lần được mô tả trên các nhóm của cây phát sinh loài như hình 1. Tỷ lệ phần trăm giá trị bootstrap ở nhóm 1 (80%), nhóm 2 (85%) và nhóm 3 (77%) đều cao 70% [5], do đó, sự phân biệt thành 3 cụm nhóm phân loại trên hoàn toàn đáng tin cậy.

Mức độ tương đồng trong trình tự gen cytochrome b

Trình tự cytochrome b của cá thể lợn bản địa Việt Nam được so sánh và đánh giá tỷ lệ tương đồng với trình tự cytochrome b của một số loài động vật khác. Cá thể lợn bản địa Việt Nam VN1 được chọn làm đại diện để so sánh với các cá thể khác dựa trên trình tự cytochrome b bằng chương trình Blastn 2.2.26 (NCBI) cho thấy tỷ lệ tương đồng trong trình tự của lợn bản địa Việt Nam trình tự của bò (NC_006853) và chó (NC_002008) là cao nhất (bảng 4).

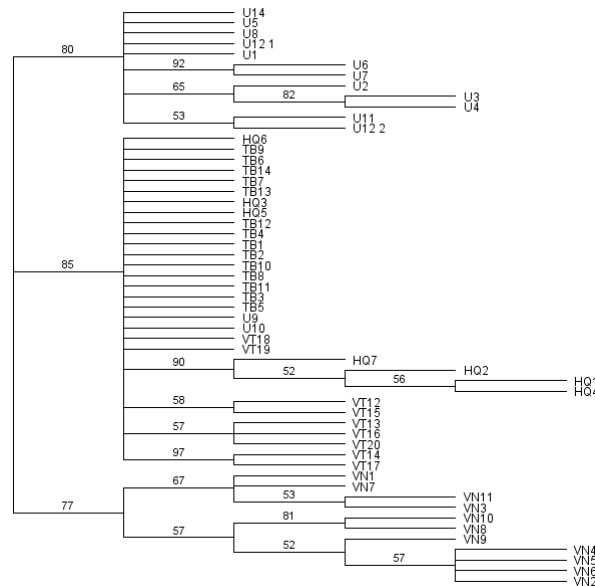
Bảng 2. Số truy cập của các trình tự từ Genbank

STT	Giống lợn	Số truy cập (Accession number)
1	Bản địa Hàn Quốc	AY830162, AY830164, AY830166, AY830168, AY830170, AY830172, AY830174
2	Bản địa Tây Ban Nha	HM010461- HM010474
3	Bản địa Uruguay	GU937806 - GU937819

Bảng 3. Vị trí đột biến và đa hình của vùng gen cytochrome b (552 bp) giữa các cá thể lợn rừng

Haplotype	Vị trí Nucleotide																				
	5 9 3	6 0 8	6 1 0	6 2 1	6 9 6	8 0 4	8 4 3	8 4 9	8 7 7	* 8 9	* 8 2	* 8 6	9 2 7	9 4 3	1 0 2	1 0 2	1 0 4	1 0 7	1 0 8	1 1 7	
Trình tự tương đồng	T	A	A	C	G	T	C	T	C	A	T	G	C	A	C	A	A	T	C	G	
Lợn rừng Uruguay	U1	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	.	.	G	C	T	A
	U2	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	.	G	G	C	T	A
	U3	N	.	.	.	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	G	C	G	C	.	A
	U4	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	A	C	G	C	T	A
	U5	N	.	.	.	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	A	C	G	C	.	A
	U6	N	.	.	.	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	A	C	G	C	.	A
	U7	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	A	.	G	C	T	A
	U8	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	.	.	G	C	T	A
	U9	A	.	T	.	T	G	N	.	.	G	.	.	G	C	.	A
	U10	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	.	.	G	C	.	A
	U11	A	.	T	.	T	G	C	.	.	G	.	.	G	C	.	A
	U12	A	.	T	.	T	.	C	A
	U13	G
	U14	A
Lợn rừng Hàn Quốc	HQ1	
	HQ2	.	G	G	
	HQ3	C	T	
	HQ4	C	T	
	HQ5	C	T	
	HQ6	C	T	
	HQ7	A	
Lợn rừng Tây Ban Nha	TB1	A	
	TB2	A	
	TB3	A	
	TB4	A	
	TB5	A	
	TB6	
	TB7	
	TB8	
	TB9	
	TB10	
	TB11	
	TB12	
	TB13	
	TB14	
Lợn rừng bán địa Việt Nam	VN1	C	G	G	T	A	C	T	.	T		
	VN2	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN3	.	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN4	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN5	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN6	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN7	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN8	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN9	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN10	C	.	.	T	A	C	T	.	T		
	VN11	.	.	.	T	A	C	T	.	T		
Lợn rừng lai	VT12	C	.	.	C	G	T	C	.	C		
	VT13	C	.	.	C	G	T	C	.	C	.	.	A			
	VT14	.	.	.	C	G	T	C	.	C			
	VT15	C	.	.	C	G	T	C	.	C			
	VT16	C	.	.	C	G	T	C	.	C	.	.	A			
	VT17	.	.	.	C	G	T	C	.	C			
	VT18	G	.	.	C	G	T	C	.	C	.	.	A				
	VT19	C	.	.	C	G	T	C	.	C				
	VT20	C	.	.	C	G	T	C	.	C	.	.	A				

Các vị trí nucleotide giống nhau được mô tả bằng dấu chấm in đậm. Cột đầu tiên là thứ tự các haplotype của lợn rừng. Dòng đầu tiên là trình tự tương đồng được tạo ra sau khi các trình tự cytochrome được sắp xếp bằng Clustal W. Vị trí nucleotide được gạch chân là các vị trí đa hình các Nucleotide đơn. Vị trí các nucleotide được đánh dấu sao là các vị trí được sử dụng để phân biệt các haplotype của lợn châu Âu và lợn châu Á.



Hình 1. Mối quan hệ giữa các cá thể lợn rừng bản địa Việt Nam, lợn rừng lai, Hàn Quốc, Tây Ban Nha và Uruguay được mô tả bằng cây NJ (Neighbour-joining) dựa trên trình tự 552 bp của gen cytochrome b. Giá trị Bootstrap (ngưỡng 50% và được lặp lại 100 lần) được mô tả trên các node của cây NJ.

Trong nhóm động vật có vú, mức độ tương đồng của cá thể VN1 giảm dần theo thứ tự bộ, chó, ngựa, chuột, người (bảng 4). Tỷ lệ này tiếp tục giảm khi so sánh với các động vật không thuộc nhóm có vú (gà, ếch). Điều đó cho thấy, lợn rừng bản địa Việt Nam có mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự cytochrome b gần với

bò và chó hơn so với ngựa, chuột và người.

Trình tự amino acid của một phần cytochrome b dài 184 amino acid (hình 2) được dịch mã từ trình tự gen cytochrome b dài 552 bp và được so sánh với trình tự amino acid cytochrome b của các động vật khác từ GenBank với các mã số truy cập được mô tả trong bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid của cytochrome b ở các loài động vật khác nhau

Loài	Accession number	Tỷ lệ tương đồng nucleotide (%)	Tỷ lệ tương đồng protein (%)
Bò (<i>Bos taurus</i>)	NC_006853	80	82,1
Chó (<i>Canis caballus</i>)	NC_002008	80	82,6
Ngựa (<i>Equus caballus</i>)	NC_001640	78	80,4
Chuột (<i>Mus musculus</i>)	NC_005089	75	77,7
Gà (<i>Gallus gallus</i>)	NC_001323	74	69,6
Người (<i>Homo sapiens</i>)	NC_012920	73	72,3
Ếch (<i>Xenopus laevis</i>)	NC_001573	72	66,8

Kết quả phân tích bằng Clustal W cho thấy, tỷ lệ tương đồng của trình tự amino acid của cytochrome b lợn bản địa Việt Nam so với các động vật có vú khác đều cao hơn tỷ lệ tương đồng trình tự nucleotide của gen cytochrome b.

Trong khi đó, tỷ lệ tương đồng của trình tự amino acid của cytochrome b ở lợn bản địa Việt Nam so với động vật không thuộc nhóm có vú lại thấp hơn so với tỷ lệ tương đồng trình tự nucleotide của gen cytochrome b. Tỷ lệ tương

đồng gen cytochrome b của lợn rừng bản địa Việt nam so với người thấp hơn so với gà nhưng tỷ lệ tương đồng trình tự amino acid của cytochrome b ở lợn rừng bản địa Việt Nam so

với người lại cao hơn so với gà. Điều đó cho thấy trình tự các amino acid trong cytochrome b ở động vật có vú có tính bảo tồn cao.

```

1      10      20      30      40      50      60
RALLEFLHEAGSNNPTGISSDIDKIPFHPYTYTIKDILGALFIIILLILLVLFSPDLLGDPDN
70      80      90      100     110     120
YTPANPLNTPPHIKPE*YFLFAYAILRSIPNKLGGVLAIVASILILILMPILHTSKQRSII
130     140     150     160     170     180
FRPLSQCLF*ILVADLIITLT*IGGQPVÉHPFTIIGQLÁSILYFLIILVLIPIITSIIENLL
184
K
    
```

Hình 2. Trình tự amino acid của cytochrome b (184 amino acid) được dịch mã từ trình tự gen cytochrome b (552 bp).

KẾT LUẬN

Như vậy, so sánh trình tự cytochrome b ty thể và đánh giá mối quan hệ phát sinh loài cho thấy lợn rừng bản địa Việt Nam (ở Lạc Dương, tỉnh Lâm Đông và Tánh Linh, tỉnh Bình Thuận) là một nhóm phân biệt với các quần thể lợn rừng khác trên thế giới như Hàn Quốc, Tây Ban Nha hay Uruguay thông qua việc các haplotype lợn rừng bản địa Việt Nam chứa các đa hình nucleotide đơn đặc trưng tại các vị trí 593.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Chương trình Tây Nguyên 3 đã hỗ trợ về kinh phí cho đề tài nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Clop A., Amills M., Noguera J.L., Fernandez A., Capote J., Ramon M.M., Kelly L., Kljas J.M.H., Andersson L., Sanchez A., 2004. Estimating the frequency of Asian Cytochrome B haplotypes in standard European and local Spanish pig breeds. *Genet. Sel. Evol.*, 36: 97-104.
2. Garcia G., Vergara J., Lombardi R., 2011. Genetic characterization and phylogeography of the wild boar *Sus scrofa* introduced into Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2): 329-337.
3. Fang M., Andersson L., 2006. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Pros. R. Soc. B*, 273: 1803-1810.
4. Felsenstein J., 1985. Confidence limits on

phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783791.

5. Higgs P.G. and Attwood T.K., 2005. *Bioinformatics and Molecular Evolution*, Blackwell Publishing Company, 170.
6. Kim K. I., Lee J. H., Li K., Zhang Y. P., Lee S. S., Gongora J., Moran C., 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.*, 33: 19-25.
7. Mona S., Randi E., Ponzetta M. T., 2007. Evolutionary history of the genus *Sus* inferred from cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 757-762.
8. Nguyen T. D. T., E. Melchinger-Wild, Kuss A.W., Nguyen V.C., Bartenschlager H. and Geldermann H., 2006. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites, *J. Anim. Sci.*, 84: 2601-2608.
9. Scandura M., Iacolina L., Apollonio M., 2011. Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure and wild x domestic hybridization. *Mammal Rev.*, 41(2): 125-137.
10. Smith T. F., Waterman M.S., 1981. Identification of common molecular subsequences, *Journal of Molecular Biology* 147: 195-197.
11. Toro M. A., Rodriganez J., Silio L., Rodriguez M. C., 2000. Genealogical analysis of a closed herd of black hairless Iberian pigs. *Cons. Biol.* 14: 1843-1851.

**AN ANALYSIS OF POLYMORPHISM AND A PHYLOGENETIC TREE USING
MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B OF WILD BOAR IN THE CENTRAL
VIETNAM HIGHLANDS**

**Nguyen Thi Phuong Mai¹, Le Ngoc Chau²,
Nguyen Khac Duy², Le Thanh Long², Hoang Nghia Son²**

⁽¹⁾Tay Nguyen Institute of Biology, VAST

⁽²⁾Institute of Tropical Biology, VAST

SUMMARY

Mitochondrial DNA have been used to study phylogenetic relationships in pigs (*Sus scrofa*). In this study, mitochondrial cytochrome b sequences was used to assess variable and polymorphism positions and genetic relationships in Vietnamese native wild boar, Vietnamese hybrid wild boar (Thailand wild boar and Vietnamese wild boar) and various other wild boars (Korean wild boar, Spain wild boar and Uruguay wild boar). DNA samples were collected from wild boar ears and mitochondrial cytochrome b sequences were amplified with specific primers, then sequenced with 3730 DNA Analyzer. 552 bp of cytochrome b sequence were used for alignment. Results showed that 9 polymorphism positions were found in haplotypes and 3 new polymorphism positions specifically appeared in 11 Vietnamese native wild boars. An NJ (Neighbour-joining) tree was constructed to assess genetic relationships of different wild boars. Bootstrap values (threshold of 50% after 100 replicates) were used to assess the confidence in branching order. The phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b displayed three distinct mtDNA clades, one of Uruguay wild boar, one of Korean wild boar, Spain wild boar, Vietnamese hybrid wild boar and one of Vietnamese native wild boar. Genetic distances for mitochondrial cytochrome b sequences showed that Uruguay mtDNA haplotypes (0.0032) and a group of Korean, Spain and Vietnam hybrid haplotypes (0.0054) and Vietnam native haplotypes (0.0078) formed three clusters that are well separated from each other. The bootstrap percentages of three clades are higher than 70%, hence assignments of haplotypes into three clades are very reliable and indicating that the Vietnamese native wild boar group is genetically independent from other wild boar groups.

Keywords: haplotype, mitochondrial cytochrome b, phylogenetic tree, single nucleotide polymorphism, wild boar.

Ngày nhận bài: 21-6-2012