

PHÂN TÍCH ĐA HÌNH GEN Mc4R VÀ GHRH CỦA LỢN ĐỰC RỪNG THÁI LAN VÀ CON LAI GIỮA ĐỰC RỪNG THÁI LAN VÀ NÁI ĐỊA PHƯƠNG PÁC NẶM

Nguyễn Văn Nơi¹, Trần Văn Phùng¹ và Trần Xuân Hoàn²

¹Đại Học Nông lâm Thái Nguyên ; ²Viện Chăn Nuôi

*Tác giả liên hệ : Nguyễn Văn Nơi, Đại học Nông lâm Thái Nguyên
E-mail : vannoi85bn@gmail.com

ABSTRACT

The polymorphisms in Mc4R gene and GHRH gene of Wild boar and hybrid of Wild boar x local Pac Nam sow

The study of polymorphisms of candidate genes associated with production traits is an important tool to identify genes to be used in marker-assisted selection programs. The PCR-RFLP technique was used to analyse polymorphisms of porcine melanocortin-4 receptor (Mc4R) and growth hormone releasing hormone (GHRH) gene of Wild boar and hybrid of Wild boar X local Pac Nam sow. The result showed that: wild boar and hybrids had a GG genotype of Mc4R gene with the incidence of 100% and three genotypes AA, AB and BB of GHRH genes with the incidence 18,75%, 54,25 % and 25% respectively. Frequencies of A and B alleles of GHRH gene were 0,47 and 0,53, respectively. Pig having genotype AA of GHRH gene had a higher average daily gain than those having AB and BB genotypes, but the difference was not significant ($P>0.05$)

Key word: Pig, Polymorphisms, Mc4R gene, GHRH gene, genotype, PCR-RFLP

ĐẶT VẤN ĐỀ

Công tác giống đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả của ngành chăn nuôi, chính vì vậy chọn lọc và lai tạo các giống vật nuôi luôn được các nhà khoa học quan tâm. Trong những thập kỷ vừa qua việc chọn lọc giống vật nuôi chủ yếu dựa vào kiểu hình, nhưng đã góp phần đáng kể để nâng cao năng suất vật nuôi. Ngày nay với sự phát triển của các kỹ thuật hiện đại trong sinh học, đã hình thành xu hướng nghiên cứu chọn lọc giống vật nuôi dựa vào các chỉ thị ADN. Chọn lọc giống vật nuôi dựa vào các chỉ thị ADN, sẽ rút ngắn thời gian và tăng khả năng chính xác và hiệu quả chọn lọc. Do vậy, ngày nay nhiều công trình phân tích đa hình gen của vật nuôi nói chung và của lợn nói riêng ngày càng xuất hiện nhiều. Nghiên cứu để tìm ra mối liên kết của đa hình gen với các tính trạng kinh tế của lợn là rất quan trọng trong công tác giống. Gen Mc4R của lợn nằm trên nhiễm sắc thể số 1 (Kim 2006) đóng vai trò chính trong việc điều tiết khả năng tiếp nhận thức ăn và cân bằng năng lượng (Bruun 2006) đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Phân tích đa hình gen Mc4R của lợn cho thấy đa hình gen không chỉ có liên quan với độ dày mỡ lưng và tốc độ tăng trọng (Kim 2006; Bruun 2006; Meidtner 2006; Fan, 2009) mà còn phát hiện ra đa hình gen Mc4R liên quan với tỷ lệ mỡ dất và tỷ lệ nạc (Stachowiak 2005; Jokubka 2006).

Gen GHRH tham gia vào quá trình trao đổi chất là do tương tác với một số gen như GH; IGF1; PIT1; GHRHR; GHR (Eun Seok Cho, 2009). Gen GHRH nằm trên nhiễm sắc thể 17 (Baskin and Pomp, 1997) tham gia vào việc giải phóng hormon sinh trưởng. Đa hình gen GHRH có mối liên quan với độ dày mỡ lưng, tốc độ tăng trọng của lợn (Franco, 2005) và tỷ lệ thịt (Pierzchala, 2003; Eun Seok Cho, 2009).

Như vậy , có thể nói gen Mc4R và gen GHRH có liên quan với tốc độ tăng trọng và chất lượng thịt của lợn. Với mục đích góp phần vào công tác lai tạo giống lợn địa phương cũng như để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ thị trường, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: "*Phân tích đa hình gen Mc4R và GHRH của lợn đực rừng Thái Lan và con lai giữa lợn đực rừng Thái Lan và lợn nái địa phương Pác Nặm*"

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là lợn đực rừng Thái Lan và con lai với lợn nái Pác Nặm nuôi tại trại chăn nuôi xã Túc Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái nguyên từ tháng 1/2009 đến 11/2009.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết ADN

Mẫu mô tai của các giống lợn được thu thập từ tháng 5/2009. Mẫu được bảo quản trong ethanol tuyệt đối. Mẫu được bảo quản ở -20°C và sau đó được sử dụng để tách chiết ADN. Tách chiết ADN được thực hiện theo kit AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit của hãng Bioneer.

Phản ứng PCR

Sử dụng cặp mồi do Kim (2006) thiết kế có trình tự như sau để nhân đoạn gen Mc4R

Mồi xuôi : 5'-TACCCTGACCATCTTGATTG-3'

Mồi ngược : 5'-ATAGCAACAGATGATCTCTTTG-3'

Chu trình nhiệt : Sau khi biến tính ở 94°C thực hiện phản ứng 35 chu kỳ như sau: 94°C 1', 60°C 50 s, 72°C 1'. Sau đó kết thúc ở 72°C trong 10'.

Sử dụng cặp mồi do Baskin (1997) thiết kế có trình tự như sau để nhân đoạn gen GHRH

Mồi xuôi : 5'-GTAAGGATGC(C/T)(A/G)CTCTGGGT-3'

Mồi ngược : 5'-TGCCTGCTCATGATGTCCTGGA-3'.

Chu trình nhiệt : Sau khi biến tính ở 95°C trong 2' thực hiện phản ứng 40 chu kỳ như sau: 95°C 30 s, 60°C 45 s, 72°C 1'. Sau đó kết thúc ở 72°C trong 5'.

Phân tích đa hình gen

Sản phẩm PCR của cặp mồi Mc4R cắt bằng *TaqI*. Sản phẩm PCR của cặp mồi GHRH cắt bằng *AluI*. Sau khi cắt bằng enzyme giới hạn, phân lập độ dài các đoạn ADN bằng cách chạy điện di trên thạch agarose 2,5% trong hệ đệm 1x TBE, nhuộm bằng Ethidium bromide và soi chụp dưới đèn UV. Xác định kiểu gen cho từng cá thể dựa vào kết quả điện di.

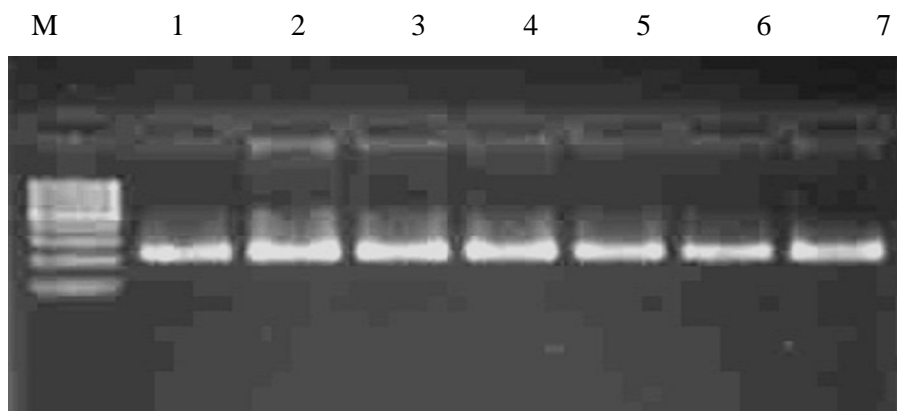
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa hình gen Mc4R

Sản phẩm PCR được nhân lên từ cặp mồi Mc4R thu được một băng, có kích thước như mong đợi 220 bp, cho thấy phản ứng PCR là đặc hiệu. Kết quả được thể hiện trên Hình 1.

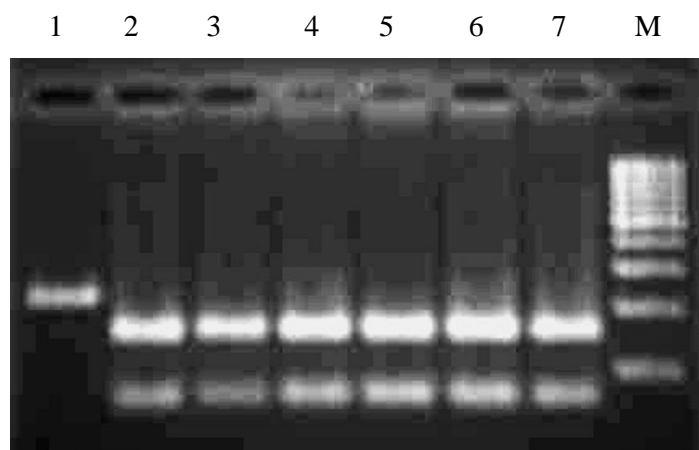
Qua hình 1 cho thấy sản phẩm PCR hoàn toàn phù hợp để phân tích đa hình bằng enzyme *TaqI*. Sản phẩm PCR của cặp mồi Mc4R cắt bằng *TaqI* có thể thu được ba kiểu gen tương ứng là: Kiểu AA có một băng tương ứng 220 bp; kiểu AG có 3 băng tương ứng là 220 bp, 150 bp và 70 bp; kiểu GG có 2 băng tương ứng là 150 bp và 70 bp.

Tuy nhiên trong thực tế khi phân tích trên đàn lợn lai chúng tôi chỉ thu được một kiểu gen đồng hợp tử GG chứa điểm cắt đa hình bằng enzyme *TaqI*.



Hình 1: Sản phẩm PCR của cặp mồi *Mc4R*
M: Marker 100 bp; 1: Sản phẩm PCR của lợn đực; 2-7: Sản phẩm PCR của lợn lai

Sản phẩm PCR nhân lên từ cặp mồi *Mc4R* sau khi cắt bằng enzym *TaqI*, được phân biệt bằng điện di. Kết quả phổ điện di được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2: Sản phẩm PCR của cặp mồi *Mc4R* cắt bằng *TaqI*
M: Marker 100 bp; 1: Sản phẩm PCR; 2: Kiểu gen của lợn đực; 2-7: Kiểu gen của lợn lai

Sau khi phân tích 63 mẫu lợn lai và 1 mẫu lợn đực rừng Thái Lan chúng tôi thu được duy nhất một kiểu gen GG. Tỷ lệ kiểu gen và tần số alen của gen *Mc4R* được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ kiểu gen và tần số alen của gen *Mc4R*

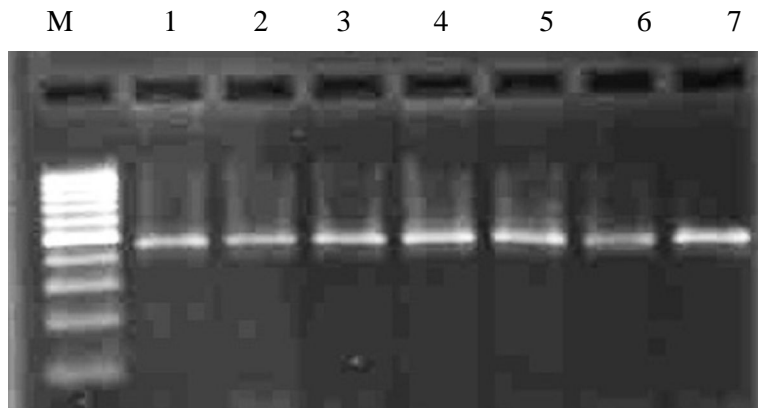
n	Tỷ lệ kiểu gen %			Tần số alen	
	AA	AG	GG	A	G
64	0	0	100	0	1

Số lợn lai sử dụng trong phân tích đa hình gen được sinh ra từ 5 ổ lợn nái Pác Nặm. Kết quả cho thấy chỉ thu được một kiểu gen GG duy nhất trong đàn lợn lai, trong khi đó con lợn đực rừng Thái Lan cũng mang kiểu gen GG, điều này chứng tỏ khả năng 5 con lợn nái Pác Nặm đều mang một kiểu gen đồng hợp tử GG. Kết quả nghiên cứu của Stachowiak (2005) cho thấy tần số alen A ở lợn Đại Bạch và Landrace của Ba Lan tương ứng là 0,76 và 0,29. Trong đó lợn Landrace mang alen A có tốc độ tăng trọng cao, và tỷ lệ mỡ dất thấp hơn so với lợn mang alen G. Nhưng lợn Đại Bạch mang alen A làm tăng tỷ lệ mỡ dất. Theo kết quả nghiên cứu của Jokubka (2006) lợn Trắng của Lithuanian mang tần số alen A và G tương ứng là 0,41 và 0,59.

Lợn mang kiểu gen AA có tốc độ tăng trọng và tỷ lệ nạc cao hơn và độ dày mỡ lưng thấp. Bruun (2006) nghiên cứu trên bốn giống lợn Hampshire, Landrace, Duroc và Yorkshire của Đan Mạch cho biết tần số alen A của cả bốn giống đều rất cao, tương ứng là 1; 0,32; 0,96 và 0,55. Các kết quả trên cho thấy trong các giống lợn ngoại có tốc độ tăng trọng nhanh và tỷ lệ nạc cao đều mang tần số alen A khá cao. Như vậy để có thể nghiên cứu ứng dụng chỉ thị đa hình gen Mc4R trong công tác chọn lọc của lợn lai Pác Nặm thì cần phải tiếp tục phân tích đa hình gen với số lượng mẫu lợn nái nhiều hơn.

Đa hình gen GHRH

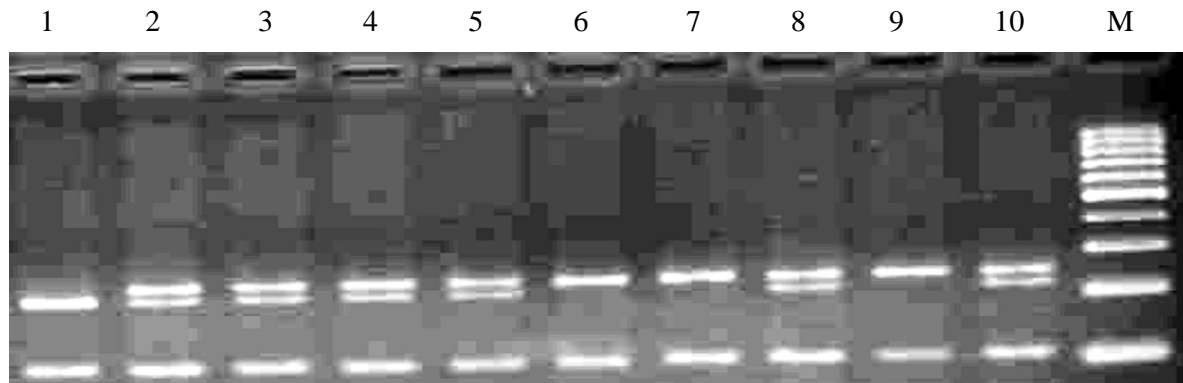
Sản phẩm PCR được nhân lên từ cặp mồi GHRH thu được một băng, có kích thước như mong đợi 455 bp. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.



Hình 3: Sản phẩm PCR của cặp mồi GHRH
M: Marker; 1: Sản phẩm PCR của lợn đực; 2-7: Sản phẩm PCR của lợn lai

Sản phẩm PCR của cặp mồi GHRH trong hình 3 là đặc hiệu, hoàn toàn phù hợp cho phân tích đa hình bằng enzym *AluI*.

Sản phẩm PCR nhân lên từ cặp mồi GHRH sau khi cắt bằng enzym *AluI* được phân biệt bằng điện di. Kết quả được thể hiện trong Hình 4.



Hình 4. Sản Phẩm PCR của cặp mồi GHRH cắt bằng *AluI*
M: Marker 100 bp. Kiểu gen AA: 6;7;9. Kiểu gen AB:2;3;4;5;8;10. Kiểu gen BB: 1

Sản phẩm PCR của cặp mồi GHRH cắt bằng *AluI* có thể thu được 3 kiểu gen tương ứng là: Kiểu AA có 4 băng tương ứng là 250 bp; 100 bp; 105 bp; 125 bp. Kiểu AB có 5 băng tương ứng là 250 bp; 230 bp; 100 bp; 105 bp; 125 bp. Kiểu BB có 4 băng tương ứng là 230 bp; 100 bp; 105 bp; 125 bp. Tuy nhiên, theo Baskin (1997) trong thực nghiệm phân tích bằng điện di

agarose các băng 100 bp; 105 bp và 125 bp khó tách biệt vì kích thước nhỏ. Do vậy để phân biệt 3 kiểu gen AA; AB và BB chỉ dựa vào các băng sau: Kiểu AA có 2 băng 250 bp và 100 bp; Kiểu AB có 3 băng 250 bp; 230 bp; 100 bp; Kiểu BB có 2 băng 230 bp và 100 bp.

Hình 4 cho thấy, kết quả phân tích đa hình gen *GHRH* của lợn lai và lợn đực thu được cả 3 kiểu gen như mong đợi là AA; AB và BB. Lợn đực rừng Thái Lan mang kiểu gen dị hợp tử AB, trong khi đó lợn lai từ 5 ổ xuất hiện cả 3 kiểu gen AA; AB và BB. Kết quả này cho thấy cả 5 con lợn nái Pác Nặm đều mang một kiểu gen dị hợp tử AB. Tỷ lệ kiểu gen và tần số alen của gen *GHRH* trong Bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ kiểu gen và tần số alen của gen *GHRH*

n.	Tỷ lệ kiểu gen %			Tần số alen	
	AA	AB	BB	A	B
64	18,75	56,25	25,0	0,47	0,53

Pierzchala (2003) sử dụng enzym *AluI* phân tích đa hình gen *GHRH* của các giống lợn Landrace; Đại Bạch; Duroc; Pietrain của Ba Lan cho thấy tỷ lệ các kiểu gen AA; AB và BB chiếm tỷ lệ tương ứng là 8,4%; 29,8% và 61,8%. Kết quả phân tích đa hình gen *GHRH* của Franco (2005) ở lợn Landrace của Braxin cho thấy lợn mang kiểu gen AA chỉ chiếm tỷ lệ 12,6%, lợn mang kiểu gen BB chiếm 37,9%. Tần số alen A và B của lợn Landrace của Braxin tương ứng là 0,37 và 0,63. Kết quả nghiên cứu của Eun Seok Cho (2009) ở các giống lợn Duroc; Landrace và Yorkshire của Hàn Quốc cho thấy ở lợn Yorkshire kiểu gen AB có tỷ lệ cao hơn (51,8%), nhưng ở lợn Duroc và Yorkshire kiểu gen BB chiếm tỷ lệ cao hơn, tương ứng là 51,8% và 68,2%. Qua các kết quả trên cho thấy lợn mang kiểu gen đồng hợp tử AA ở một số giống lợn ngoại chiếm tỷ lệ thấp nhất trong cả 3 kiểu gen. Trong quần thể lợn nái Pác Nặm nuôi ở Túc Chanh lợn mang kiểu gen AA cũng chiếm tỷ lệ thấp nhất. Tuy nhiên để có kết luận về đa hình gen *GHRH* của lợn nái Pác Nặm thì cần phải phân tích với số mẫu nhiều hơn trong một số quần thể khác. Để đánh giá ảnh hưởng của kiểu gen tới khả năng tăng trọng, chúng tôi so sánh tốc độ tăng trọng trung bình hàng ngày của lợn lai ở giai đoạn từ tháng thứ 7 đến tháng thứ 8. Đây là giai đoạn lợn lai có tốc độ tăng trọng cao nhất trong quá trình phát triển. Kết quả trong Bảng 3.

Bảng 3. Tốc độ tăng trọng hàng ngày của lợn lai từ tháng thứ 7 đến tháng thứ 8 (Mean ± SE)

	Kiểu gen		
	AA	AB	BB
n	12	35	16
Tốc độ tăng trọng (gam/ngày)	130,56 ± 14,92	106,86 ± 10,07	122,50 ± 13,79

Theo kết quả phân tích đa hình gen *GHRH* của một số tác giả cho thấy lợn mang kiểu gen AA có một số tính trạng khác biệt so với lợn mang kiểu gen AB và BB. Lợn mang kiểu gen AA có độ dày mỡ ở vai cao hơn lợn mang kiểu gen AB (Pierzchala 2003). Kết quả của Franco (2005) lợn mang kiểu gen AA có tốc độ tăng trọng cao hơn đáng kể so với lợn mang kiểu gen AB và BB. Kết quả nghiên cứu của Eun Seok Cho (2009) lợn mang kiểu gen AA có tỷ lệ thịt xẻ cao hơn lợn mang kiểu gen BB.

Bảng 3 cho thấy, lợn lai mang kiểu gen AA có tốc độ tăng trọng hàng ngày cao hơn lợn mang kiểu gen AB và BB. Tuy nhiên sự sai khác về tốc độ tăng trọng là không đáng kể ($P > 0,05$) là do sự biến động về tốc độ tăng trọng hàng ngày giữa các cá thể là khá cao và số cá thể theo

đôi chưa nhiều. Để đánh giá về ảnh hưởng của kiểu gen GHRH đến tốc độ tăng trọng của lợn cần phải tiếp tục nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn.

KẾT LUẬN

Lợn đực rừng Thái Lan và con lai giữa đực rừng Thái Lan và nái địa phương Pác Nặm mang gen Mc4R dạng đồng hợp tử GG với tỷ lệ 100%

Lợn đực rừng Thái Lan và con lai giữa lợn đực rừng Thái Lan và lợn nái địa phương Pác Nặm mang gen GHRH ở cả 3 dạng AA, AB và BB với tỷ lệ tương ứng là: 18,75%, 52,25% và 25%. Tần số alen A và B tương ứng là 0,47 và 0,53.

Con lai giữa lợn đực rừng Thái Lan và lợn nái địa phương Pác Nặm mang gen GHRH dạng đồng hợp tử AA có tốc độ tăng trọng hàng ngày ở giai đoạn tăng trọng cao nhất (tháng thứ 7 đến 8) cao hơn so với lợn mang kiểu gen AB và BB, tuy nhiên sự sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baskin L. C and Pomp D. (1997): Rapid Communication: Restriction Fragment Length Polymorphism in Amplification Products of the Porcine Growth Hormone-Releasing Hormone Gene. *J. Anim. Sci.* 75. p. 2285
- Bruun C. S., Jørgensen C. B., Nielsen V. H, Andersson L and Fredholm M. (2006): Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. 2006 International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 37: p. 359–362
- Eun Seok Cho, Da Hye Park, Byeong-Woo Kim, Won Youg Jung, Eun Jung Kwon and Chul Wook Kim (2009): Association of GHRH, H-FABP and MYOG polymorphisms with economic traits in pigs. *Asian – Australasian journal of Animal Sciences*. Trên web site: http://findarticles.com/p/articles/mi_6917/is_3_22/ai_n31464456/pg_2/?tag=content;coll
- Fan B., Onteru S. K., Plastow G.S and Rothschild M. F, (2009): Detailed characterization of the porcine MC4R gene in relation to fatness and growth. *Animal Genetics*, 40: p.401–409
- Franco M., Robson C. Antunes, Heyder D. Silva, Luiz R. Goulart (2005): Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. *J Appl. Genet* 46(2), p.195-200
- Kim K. S., Lee J. J., Shin H.Y., Choi B. H., Lee C. K., Kim J. J., Cho B. W. and Kim T. H. (2006): Association of melanocortin 4 receptor (MC4R) and high mobility group AT-hook 1(HMGAI) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. *Animal Genetics*, 37: p.419–421
- Jokubka R., Maak S., Kerziene S. and Swalve H. H, (2006): Association of a melanocortin 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 123: p.17–22
- Meidtner K., Wermter A.K., Hinney A., Remschmidt H., Hebebrand J. and Fries R, (2006): Association of the melanocortin 4 receptor with feed intake and daily gain in F2 Mangalitsa x Pietrain pigs. *Animal Genetics* 37: p.245– 247.
- Pierzchala M., Blicharski T., Kury J.,(2003): Growth rate and carcass quality in pigs as related to genotype at loci POU1F1/RsaI (Pit1/RsaI) and GHRH/AluI. *Animal Science Papers and Reports* vol. 21 (2003) no. 3: p.159-166 .Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzêbiec, Poland
- Stachowiak M., Szydlowski M., Obarzanek-Fojt M. and M. Switonski M, (2006): An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. *Animal Genetics*, 37: p.55–57

*Người phản biện: TS.Phạm Doãn Lâm; Ths. Trần Thị Thu Thủy