

ĐIỀU TRA ĐA DẠNG CÁC LOÀI THÚ VÀ LINH TRƯỞNG Ở KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN XUÂN LIÊN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

Cao Thị Hương Giang¹, Lê Đức Minh^{1,2}, Nguyễn Văn Thành¹,
Nguyễn Mạnh Hà³, Nguyễn Thị Hồng Vân¹, Nguyễn Đình Hải⁴, Đỗ Trọng Hương⁴

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, *le.duc.minh@hus.edu.vn

²Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường, ĐHQG Hà Nội

³Hội các vườn Quốc gia và Khu bảo tồn thiên nhiên Việt Nam

⁴Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Liên, Thanh Hóa

TÓM TẮT: Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên thuộc tỉnh Thanh Hóa có giá trị đa dạng sinh học cao và hệ động vật phong phú với những loài thú quý hiếm như vượn má trắng (*Nomascus leucogenys*), báo gấm (*Neofelis nebulosa*), mang Roosevelt (*Muntiacus rooseveltorum*). Nhiều nghiên cứu điều tra thực địa đã được tiến hành nhằm khảo sát về hiện trạng quần thể các loài thú tại khu bảo tồn. Tuy nhiên, phương pháp này gặp phải một số khó khăn trong quá trình nghiên cứu đối với một số loài thú có tập tính kiếm ăn vào ban đêm hay các loài thuộc bộ Linh trưởng vốn có quần thể nhỏ, hoạt động tinh khôn khó ghi nhận. Vì vậy, để khắc phục các khó khăn đó, nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phương pháp sinh học phân tử để đánh giá sự đa dạng một số loài thú cũng như các loài linh trưởng tại khu bảo tồn Xuân Liên. Dựa trên trình tự đoạn gen ty thể cytochrome b và 16S, chúng tôi tiến hành định danh cho các mẫu lông và xương động vật thu được trong quá trình khảo sát thực địa và từ các thôn, bản ở Xuân Liên. Kết quả phân tích thông tin di truyền cho thấy Xuân Liên là nơi phân bố của nhiều loài linh trưởng bị đe dọa, trong đó có ba loài khi: Khi mặt đỏ, *Macaca arctoides*; khi mốc, *Macaca assamensis*; khi vàng, *Macaca mulatta* và loài voọc xám, *Trachypithecus phayrei*. Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi cũng phát hiện loài cây tai trắng, *Arctogalidia trivirgata*, tại khu bảo tồn. Đây là ghi nhận đầu tiên của loài cây tai trắng tại khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên.

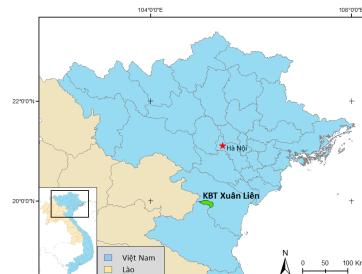
Từ khóa: *Macaca*, *Arctogalidia trivirgata*, bảo tồn đa dạng sinh học, cytochrome b, 16S, khu bảo tồn thiên nhiên.

MỞ ĐẦU

Khu bảo tồn thiên nhiên (KBTTN) Xuân Liên (hình 1) thuộc huyện Thường Xuân, tỉnh Thanh Hóa được thành lập theo Quyết định số 1476/QĐ-UB/2000 của UBND tỉnh Thanh Hóa, với diện tích 27.123 ha, thuộc địa bàn 5 xã (Bát Mọt, Yên Nhân, Vạn Xuân, Xuân Cẩm, Lương Sơn). KBTTN Xuân Liên có vị trí địa lý tiếp giáp với KBTTN Pù Hoạt (Nghệ An) ở phía Nam, và KBTTN Nậm Xam (Lào) ở phía Tây. Theo nghiên cứu của Le Trong Trai et al. (1999) [7], ba KBTTN này tạo nên một hệ tam giác khu hệ động thực vật phong phú.

Các khảo sát đa dạng sinh học gần đây cho thấy hệ động vật của KBTTN Xuân Liên có tiềm năng rất lớn về đa dạng sinh học. Theo điều tra của Viện Điều tra và Quy hoạch rừng [8], Xuân Liên là nơi phân bố của 38 loài thú, trong đó có những loài nguy cấp bị đe dọa và có

giá trị bảo tồn đặc biệt quan trọng như Bò tót (*Bos gaurus*), Voọc xám (*Trachypithecus phayrei*), Vượn đen má trắng (*Nomascus leucogenys*). Những nghiên cứu điều tra thực địa của Đặng Huy Phương và nnk. (2013) [11] đã ghi nhận 80 loài thú, thuộc 26 họ, 9 bộ, trong đó, bộ Ăn thịt (Carnivora) chiếm ưu thế, tiếp đến là bộ Linh trưởng (Primates).



Hình 1. Vị trí Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên

Có thể thấy, việc điều tra thực địa đối với các loài thú, đặc biệt là các loài linh trưởng, còn gặp khó khăn để thu được kết quả chính xác do chúng thường sống trên cây, một số loài di chuyển rất nhanh (vượn) hoặc có tập tính ăn đêm (cu li) và chúng đều có quần thể nhỏ nên khó ghi nhận ngoài thực địa. Bên cạnh đó, việc áp dụng phương pháp điều tra không phù hợp với sinh cảnh và tập tính của loài cũng có thể ảnh hưởng tới kết quả nghiên cứu. Bên cạnh các đặc điểm hình thái, giải phẫu và tập tính, việc sử dụng các chỉ thị phân tử để hỗ trợ công tác định danh loài và xác định vùng phân bố của loài trong một khu vực địa lý ngày càng trở nên phổ biến và cho hiệu quả tốt. Đặc biệt đối với những loài thú quý hiếm, khó bắt gặp trong tự nhiên, các loài nguy cấp, có số lượng cá thể ít, vùng phân bố hẹp, phương pháp này thể hiện những ưu thế nhất định như không cần thu mẫu từ cá thể sống [10]. Bằng chứng là năm 2014, loài mang Roosevelt (*Muntiacus rooseveltorum*) đã được tái phát hiện tại KBTTN Xuân Liên sau hơn 80 năm dựa trên nghiên cứu về di truyền của Le et al. (2014) [6]. Đây cũng là phát hiện chính thức đầu tiên về sự có mặt của loài mang Roosevelt tại Việt Nam khi loài này trước đây được cho rằng chỉ phân bố ở Lào.

Tuy vậy, hiện nay, chưa có nghiên cứu sinh học phân tử nào được tiến hành để đánh giá một cách chính xác mức độ đa dạng về thành phần

và số lượng các loài thú nói chung và các loài linh trưởng nói riêng tại KBTTN Xuân Liên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích thông tin di truyền để định danh và xây dựng cơ sở dữ liệu di truyền của một số loài thú và linh trưởng ở khu bảo tồn. Các mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu bao gồm các mẫu lông và xương thu được từ các di vật còn lại của các loài thú ở Xuân Liên. Để định danh loài, chúng tôi nhân dòng hai gen chỉ thị là gen cytochrome b (cytb) và gen 16S nằm trong hệ gen ty thể. Nghiên cứu này cũng sử dụng công cụ BLAST (Công cụ tìm kiếm cơ bản bằng cách so sánh trình tự giống nhau - Basic Local Alignment Search Tool) trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI để định danh các mẫu vật thu được. Kết quả thu được từ nghiên cứu này giúp xác nhận một số loài thú và linh trưởng có tại khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên, đồng thời bổ sung cho danh lục một loài thú trước đây chưa được ghi nhận tại khu bảo tồn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi bao gồm 24 mẫu xương và 12 mẫu lông thu tại KBTTN Xuân Liên (bảng 1). Tất cả các mẫu được thu bằng phương pháp gián tiếp từ các mẫu vật đã chết và được bảo quản khô. Chúng tôi tiến hành giải trình tự hai gen ty thể gồm rRNA 16S và cytochrome b từ các mẫu này.

Bảng 1. Thông tin và kết quả BLAST các phân đoạn gen được giải trình tự của các mẫu thu tại khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên

Tên mẫu	Loại mẫu	Gen	Kết quả BLAST trên Genbank (Accession no.)	Loài	Chi số tương đồng (Ident)	Tài liệu tham khảo
K1	Xương	16S	KF830702	<i>M. mulatta</i>	99%	Ma et al. (Unpublished)
K2	Xương	16S	KF830702	<i>M. mulatta</i>	99%	Ma et al. (Unpublished)
K3	Xương	Cytb	AF294622	<i>T. phayrei</i>	99%	Karanth et al. (Unpublished)
K4	Lông	16S	KM360179	<i>M. arctoides</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K5	Lông	Cytb	KM360179	<i>M. arctoides</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K6	Lông	Cytb	KJ567055	<i>M. arctoides</i>	98%	Liedigk et al., 2014
K7	Lông	Cytb	KM360179	<i>M. arctoides</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K8	Lông	16S	KM360179	<i>M. arctoides</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K9	Lông	16S	KM360179	<i>M. arctoides</i>	99%	Liu et al. (Unpublished)
K10	Lông	Cytb	KM360179	<i>M. arctoides</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K11	Lông	16S	KM360179	<i>M. arctoides</i>	99%	Liu et al. (Unpublished)
K12	Xương	Cytb	AF125140	<i>A. trivirgata</i>	99%	Veron et al., 2000

K13	Xương	Cytb	AF125140	<i>A. trivirgata</i>	98%	Veron et al., 2000
K14	Xương	Cytb	KF830702	<i>M. mulatta</i>	98%	Ma et al. (Unpublished)
K16	Xương	Cytb	AF294622	<i>T. phayrei</i>	99%	Karanth et al. (Unpublished)
K17	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K18	Xương	Cytb	DQ355482	<i>M. assamensis</i>	98%	Ziegler et al., 2007
K19	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K20	Xương	Cytb	AF294622	<i>T. phayrei</i>	99%	Karanth et al. (Unpublished)
K22	Xương	Cytb	AF294622	<i>T. phayrei</i>	99%	Karanth et al. (Unpublished)
K23	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K24	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K25	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K26	Xương	Cytb	AF294622	<i>T. phayrei</i>	99%	Karanth et al. (Unpublished)
K27	Lông	16S	KF830702	<i>M. mulatta</i>	99%	Ma et al. (Unpublished)
K28	Lông	16S	KF830702	<i>M. mulatta</i>	99%	Ma et al. (Unpublished)
K29	Lông	16S	KM360179	<i>M. arctoides</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K30	Lông	Cytb	AY969047	<i>M. assamensis</i>	98%	Liu et al. (Unpublished)
K31	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K32	Xương	Cytb	AF125140	<i>A. trivirgata</i>	98%	Veron et al., 2000
K33	Xương	16S	KF990122	<i>M. assamensis</i>	99%	Jiang et al., 2014
K34	Xương	Cytb	AF125140	<i>A. trivirgata</i>	98%	Veron et al., 2000
K35	Xương	Cytb	KJ567056	<i>M. thibetana</i>	98%	Liedigk et al., 2014
K36	Xương	Cytb	AF125140	<i>A. trivirgata</i>	98%	Veron et al., 2000

Bảng 2. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gen	Tên mồi	Kích thước	Trình tự mồi	Tài liệu tham khảo
Cytb	L14724	450bp	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	Irwin et al. (1991)
	H15149		5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCC TCA-3'	
16S	AR	567bp	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Palumbi et al. (1991)
	BR		5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	

Phương pháp tách chiết ADN tổng số và nhân dòng gen

Các mẫu vật được tách chiết ADN tổng số bằng bộ kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Đức) theo quy trình được mô tả trong nghiên cứu của Lê Đức Minh và nnk. (2013) [10]. ADN tổng số thu được được tiến hành xác định nồng độ, độ tinh sạch và kích thước bằng phương pháp đo quang phổ trên máy BioMate 3 Spectrophotometer, đồng thời điện di kiểm tra trên gel Agarose 1% trong đệm TBE 1X. Các mẫu ADN tổng số đáp ứng đủ độ tinh sạch và kích thước cần thiết sẽ được chúng tôi sử dụng làm khuôn cho phản ứng nhân dòng gen PCR.

Ban đầu, phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại đoạn gen 16S. Gen này có chứa những vùng gen bảo thủ cao trong hệ gen ty thể

và đã được chứng minh là một chỉ thị phân tử hiệu quả trong các nghiên cứu phân loại và nhận dạng loài trong các nghiên cứu của Tillmar et al. (2013), Yang et al. (2014), Sarri et al (2014) [13, 15, 20]. Với các mẫu không cho kết quả khi nhân gen này, chúng tôi tiến hành nhân dòng phân đoạn gen cytochrome b (450bp) để tăng khả năng nhân gen thành công đối với các mẫu bị đứt gãy ở đoạn gen đích do chất lượng ADN thấp. Do có tốc độ biến đổi phù hợp, hệ cơ sở dữ liệu đa dạng và phổ biến, gen cytochrome b được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về phân loại học và quan hệ phát sinh chủng loại ở mức độ loài và phân loài của lớp thú như nghiên cứu của Meyer (1994), Castresana (2001) [3, 9]. Các cặp mồi dùng trong phản ứng PCR để tiến hành khuếch đại những phân đoạn gen mong muốn đã được sử dụng thành công trong các nghiên

cứ trước đây ở nhóm thú như Irwin et al. (1991), Palumbi et al. (1991) [5, 11]. Trình tự các cặp môi được thể hiện trong bảng 2. Chúng tôi sử dụng Hotstart Taq của Qiagen để tiến hành nhân gen vì loại Taq này giúp tăng hiệu quả PCR ở các mẫu có nồng độ ADN tổng số thấp. Các bước tiến hành phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình của Lê Đức Minh và nnk. (2013) [10].

Sản phẩm PCR được tiến hành điện di kiểm tra trên gel Agarose 1% trong môi trường đệm TBE 1X. Các sản phẩm PCR thành công được tiến hành tinh sạch bằng bộ kit PCR Purification (Thermo) và được gửi giải trình tự hai chiều tại First Base, Malaysia.

Phương pháp xác định loài sử dụng công cụ BLAST

Kết quả giải trình tự hai chiều nhận được sẽ được đối chiếu với nhau để thu về một trình tự duy nhất bằng phần mềm Sequencer ver 4.1. Trình tự thu được sau hiệu chỉnh ở định dạng file fasta (.fas) sẽ được đối chiếu với các trình tự trên ngân hàng gen (NCBI) bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Công cụ này cho phép chúng tôi bước đầu định danh đến mức độ loài của các trình tự thu được bằng cách xác định các trình tự tương đồng với trình tự này trong cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen (GenBank). Cụ thể là công cụ BLAST tìm kiếm những trình tự có điểm số bắt cặp cao giữa chuỗi truy vấn và các chuỗi trong cơ sở dữ liệu bằng cách sử dụng phương pháp tìm kiếm đơn giản. Trên cơ sở phương pháp phỏng đoán, đầu tiên công cụ BLAST tìm những trình tự tương đồng thông qua phát hiện các đoạn bắt cặp ngắn theo từng bộ ba nucleotit gối lên nhau giữa trình tự cần truy vấn và trình tự có sẵn trong cơ sở dữ liệu. Tiếp đó, nếu mỗi bộ ba này đạt tới một ngưỡng T tối thiểu được tính toán bằng ma trận điểm (scoring matrix), chúng sẽ được đưa vào sắp xếp thẳng hàng (alignment) bởi thuật toán được sử dụng trong công cụ BLAST. Thuật toán này gần giống với giải thuật Smith-Wartermann. Tuy nhiên, Altschul et al. (1990) [2] đã chỉ ra thuật toán bắt cặp trình tự tối ưu của Smith-Wartermann có tốc độ truy cứu rất chậm khi tìm kiếm trên một cơ sở dữ liệu gen quá lớn như

ngân hàng gen. Vì vậy, giải thuật trong công cụ BLAST dùng một hướng tiếp cận đơn giản, dù ít chính xác hơn Smith-Wartermann nhưng lại cho tốc độ nhanh hơn gấp 50 lần [12].

BLAST sẽ cho ra kết quả các trình tự tương đồng được thể hiện ở dạng bảng đi kèm với thông tin của trình tự trên ngân hàng gen cùng với các chỉ số tương đồng (ident), độ dài của chuỗi trình tự được bắt cặp ở dạng phần trăm (query cover), điểm số bắt cặp giữa 2 trình tự. Trình tự nào có điểm số tương đồng cao hơn sẽ có mức độ giống nhau cao hơn. Dựa vào chỉ số tương đồng của các trình tự, chúng tôi sẽ đưa ra kết quả giám định loài cho các mẫu vật nghiên cứu.

Để xác thực kết quả BLAST, chúng tôi tiến hành xác định khoảng cách di truyền trong một số nhóm trình tự thu được bằng phần mềm PAUP v4.0, sử dụng mô hình Kimura-2-Parameter.

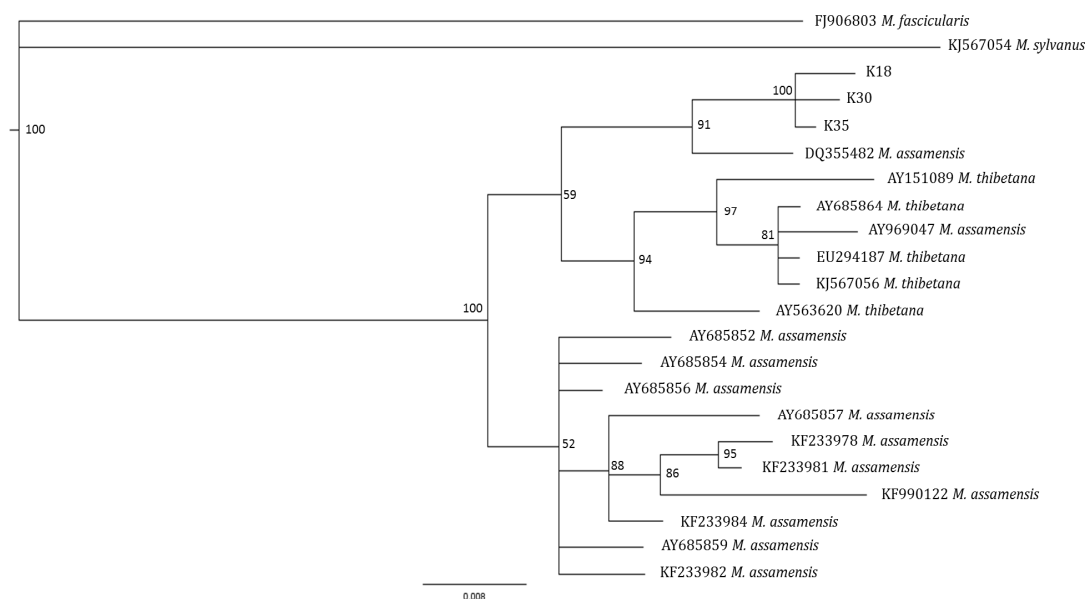
Cây phát sinh chủng loại cũng được xây dựng dựa trên phương pháp Bayesian để làm rõ mối quan hệ di truyền của một số trình tự nghiên cứu mà kết quả BLAST không định danh được rõ ràng. Chúng tôi xác định mô hình tiến hóa phù hợp cho cơ sở dữ liệu bằng phần mềm Modeltest v3.7 và sử dụng phần mềm MrBayes v3.4 để tiến hành xây dựng cây. Phân tích được thực hiện với việc bắt đầu từ một cây ngẫu nhiên và chạy trong 10×10^6 thế hệ. Bốn chuỗi Markov gồm một nóng và ba lạnh được cài đặt theo giá trị mặc định và được lấy mẫu sau 1000 thế hệ. Hai phân tích độc lập được tiến hành song song. Cuối cùng, cần xác định thời gian thế hệ của các điểm lấy mẫu dựa trên điểm số Loglikelihood mà tại đó chuỗi Markov bắt đầu ổn định, các cây ở trước thời điểm lấy mẫu này sẽ được loại bỏ bằng hàm burn-in. Sau phân tích, nhánh nào có giá trị xác suất hậu nghiệm (Posterior probability - PP) $\geq 95\%$ sẽ được coi là có độ tin cậy cao.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành tách chiết, nhân dòng và giải trình tự thành công 34 mẫu vật, trong đó có 12 mẫu lông và 22 mẫu xương (bảng 1). Dựa trên phân tích trình tự ADN của hai gen nghiên cứu, bước đầu đã xác định được 23 mẫu thuộc ba

loài khỉ thuộc giống *Macaca* ở Xuân Liên, trong đó có 9 mẫu khỉ mặt đỏ (*M. arctoides*), 9 mẫu khỉ mốc (*M. assamensis*), 5 mẫu khỉ vàng (*M. mulatta*), với chỉ số tương đồng khá cao (98-99%) và chỉ số query cover cao nhất đạt được là 100%. Trong nghiên cứu về phát sinh chủng loại của loài *M. fascicularis*, các trình tự nucleotit của gen cytochrome b [1] thu được đã được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank bằng công cụ

BLAST. Kết quả thống kê cho thấy chỉ số tương đồng thu được cao nhất từ nghiên cứu này là 97%, chỉ số query cover trung bình là 95%. Các trình tự này đều đảm bảo tính xác thực về phân loại và sau đó đã được sử dụng để thực hiện những nghiên cứu phát sinh chủng loại sâu hơn. Kết quả này khẳng định ba loài khỉ thuộc giống *Macaca* ghi nhận được tương ứng với các loài điều tra trước đây.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại dựa trên dữ liệu đoạn gen cytochrome b (450bp) phân tích bằng phương pháp Bayesian chạy trong 10×10^6 thế hệ, chọn mẫu cách 1000 thế hệ. Chỉ số nằm trên mỗi nhánh là xác suất hậu nghiệm thu được. Phân tích được thực hiện dựa trên mô hình tiến hóa TrN+I như phần mềm ModelTest lựa chọn. Chỉ số burnin=14.

Đáng chú ý là một trình tự cytochrome b đã cho kết quả BLAST có chỉ số tương đồng cao nhất (99%) tương ứng với loài khỉ mốc *M. assamensis* (Accession number: DQ355482). Tuy nhiên, dựa trên điểm số bắt cặp và chỉ số query cover, trình tự đích KJ567056 của loài khỉ Tây Tạng (*M. thibetana*) lại đạt được số điểm cao nhất, kèm theo chỉ số tương đồng cao (98%). *M. thibetana* là loài linh trưởng vốn chỉ có phân bố tự nhiên ở Trung Quốc. Vì vậy, để làm rõ hơn kết quả này, chúng tôi đã xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phương pháp Bayesian dựa trên dữ liệu gen cytochrome b của hai loài khỉ này, bao gồm các trình tự thu được từ nghiên cứu này và các trình tự trên Genbank (hình 2).

Kết quả thu được cho thấy, trình tự K35 có mối quan hệ di truyền gần gũi với hai trình tự K18 và K30 (PP = 100%). Các trình tự này và trình tự *M. assamensis* (DQ355482) trên ngân hàng gen hợp thành một nhánh riêng với xác suất hậu nghiệm PP = 91%. Cây phát sinh chủng loại của chúng tôi cho thấy hai loài khỉ thuộc giống *Macaca* này không có sự phân tách rõ ràng khi *M. thibetana* nằm giữa các nhánh *M. assamensis* khác. Các nghiên cứu về phát sinh chủng loại trên hệ gen ty thể của Li & Zhang (2005), Chakraborty (2012), Sun et al. (2010) [4, 8, 14] đã chứng minh kết quả tương tự về mối quan hệ gần gũi giữa *M. thibetana* và *M. assamensi*. Như vậy, dựa trên các bằng chứng

về sinh học phân tử của nghiên cứu này và các nghiên cứu khác trước đây *M. thibetana* có thể không phải là một loài riêng biệt. Tuy nhiên, để kết luận chính xác hơn, cần có những nghiên cứu sử dụng nhiều mẫu vật từ các vùng phân bố khác nhau và sử dụng nhiều chỉ thị phân tử gồm cả gen ty thể và gen nhân. Dựa trên cây phát sinh chủng loại, chúng tôi kết luận các mẫu thu được tại KBTTN Xuân Liên thuộc loài khỉ mốc, *M. assamensis*.

Kết quả phân tích thông tin di truyền cho thấy có 5 mẫu tương đồng với loài voọc xám (*Trachypithecus phayrei*) với chỉ số tương đồng cao là 99%.

Đặc biệt, chúng tôi đã thu được 5 trình tự cytochrome b có độ tương đồng cao (98%) với loài cây tai trắng, *Arctogalidia trivirgata*. Đây là loài trước đây chưa được ghi nhận trong danh mục các loài thú của khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu của Walston & Duckworth (2003), Willcox et al. (2012), Wilting et al. (2010) [17, 18, 19] cho thấy việc có ít ghi nhận loài này ở Việt Nam chủ yếu là do phương pháp khảo sát không phù hợp, ví dụ sử dụng bẫy ảnh đặt trên mặt đất và khảo sát ban ngày sẽ không ghi nhận được loài thú ăn đêm và chuyên hoạt động trên cây như cây tai trắng. Các đặc điểm đó đã gây trở ngại cho quá trình khảo sát, ghi nhận về loài thú này. Khoảng cách di truyền giữa các trình tự cytochrome b của *Arctogalidia trivirgata* mà chúng tôi thu được so với trình tự đích trên GenBank (Accession number: AF125140) nằm trong khoảng 1,4%-1,8%. Nghiên cứu trên gen cytochrome b của Veron et al. (2015) [16] đã cho thấy khoảng cách di truyền trung bình của loài cây tai trắng là 3,5%. Qua dữ liệu này có thể khẳng định rằng kết quả xác định loài của chúng tôi nằm trong khoảng tin cậy. Do đó, nghiên cứu này giúp khẳng định sự tồn tại của loài cây tai trắng ở Xuân Liên.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy KBTTN Xuân Liên là nơi phân bố của nhiều loài linh trưởng nguy cấp có tên trong Sách đỏ Việt Nam và của thế giới cần được bảo vệ, trong đó có ba loài khỉ: *M. arctoides*,

M. assamensis, *M. mulatta*, và loài voọc xám *T. phayrei*. Kết quả nghiên cứu cũng khẳng định sự tồn tại của loài cây tai trắng ở Xuân Liên, đây cũng ghi nhận đầu tiên về loài cây tai trắng trong khu bảo tồn.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Ban quản lý Khu Bảo tồn Thiên nhiên Xuân Liên đã tài trợ nghiên cứu này. Đặc biệt xin được cảm ơn các cán bộ và người dân địa phương tại đây đã tận tình giúp đỡ chúng tôi trong việc thu mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdul-Latiff M. A. B., Ruslin F., Vun V. F., Mohd-Hashim A., Rovie-Ryan J. J., Abdul-Patah P., Lakim M., Roos C., Yaakop S., Md-Zain B. M., 2014. Phylogenetic relationships of Malaysia's long-tailed macaques, *Macaca fascicularis*, based on cytochrome b sequences. *ZooKeys*, 407: 121-140.
2. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.
3. Castresana J., 2001. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4): 465-471.
4. Chakraborty D., 2012. Genes in space and time: Population genetic structure and demographic history of two primate species, the Arunachal macaque *Macaca munzala* and bonnet macaque *Macaca radiata*. Thesis of Manipal University: 155.
5. Irwin D. M., Kocher T. D., Wilson A. C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
6. Li Q. Q., Zhang Y. P., 2005. Phylogenetic relationships of the Macaques (Cercopithecidae: Macaca), inferred from mitochondrial DNA sequences. *Biochemical Genetics*, 43: 375-386.
7. Meyer A., 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends Ecological Evolution*, 9: 278-280.

8. Le Minh, Thanh V. Nguyen, Ha T. Duong, Ha M. Nguyen, Long D. Dinh, Tuoc Do, Hai D. Nguyen, George Amato, 2014. Discovery of the Roosevelt's Barking Deer (*Muntiacus rooseveltorum*) in Vietnam. *Conservation Genetics*, 15: 993.
9. Lê Đức Minh, Dương Thúy Hà, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Mạnh Hà, Đinh Đoàn Long, Đỗ Tước, Nguyễn Đình Hải, 2013. Phương pháp chiết tách và nhân dòng DNA từ các mẫu mô động vật có chất lượng DNA thấp phục vụ nghiên cứu đa dạng sinh học. *Tạp chí Sinh học*, 35: 116-124.
10. Palumbi S. R., Martin A. P., Romano S., McMillan W. O., Stice L., Grabowski G., 1991. The simple fools guide to PCR, version 2.0. Privately published.
11. Đặng Huy Phương, Lê Xuân Cảnh, Nguyễn Trường Sơn, Nguyễn Đình Hải, 2013. Các loài thú ghi nhận ở khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên, tỉnh Thanh Hóa. *Tạp chí Sinh học*, 35: 26-33.
12. Sarri Constantina, Costas Stamatis, Theologia Sarafidou, Ioanna Galara, Vassilis Godosopoulos, Mathaios Kolovos, Constantina Liakou, Spyros Tastsoglou, Zissis Mamuris, 2014. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, 43: 35-41.
13. Sun B., Li J., Zhu Y., Xia D., 2010. Mitochondrial DNA variation in Tibetan macaque (*Macaca thibetana*). *Folia Zool.*, 59(4): 301-307.
14. Tillmar AO, Dell'Amico B, Welander J, Holmlund G, 2013. A universal method for species identification of mammals utilizing Next Generation Sequencing for the analysis of DNA mixtures. *PLOS ONE*: 8(12).
15. Le Trong Trai, Le Van Cham, Bui Dac Tuyen, Tran Hieu Minh, Tran Quang Ngoc, Nguyen Van Sang, Monastyrskii A. L., Eames J. C., 1999. A feasibility study for the establishment of Xuan Lien Nature Reserve, Thanh Hoa province, Vietnam. Hanoi: BirdLife International Vietnam Programme and the Forest Inventory and Planning Institute.
16. Veron G., Marie-Lilith Patou, Andrew P. Jennings, 2015. Molecular systematics of the small-toothed palm civet (*Arctogalidia trivirgata*) reveals a strong divergence of Bornean populations. *Mammalian Biology*, 80: 347-354.
17. Walston J. L., Duckworth J. W., 2003. The first record of Smalltoothed Palm Civet *Arctogalidia trivirgata* from Cambodia, with notes on surveying this species. *Small Carnivore Conservation*, 28: 12-13.
18. Willcox D. H. A., Tran Quang Phuong, Vu Long, Tran Van Bang, Hoang Minh Duc, 2012. Small-toothed Palm Civet *Arctogalidia trivirgata* records from human-influenced habitats in Vietnam. *Small Carnivore Conservation*, 47: 46-53.
19. Wilting A., Samejima H., Mohamed A., 2010. Diversity of Bornean viverrids and other small carnivores in Deramakot Forest Reserve, Sabah, Malaysia. *Small Carnivore Conservation*, 42: 10-13.
20. Yang L., Tan Z., Daren Wang, Ling Xue, Min-Xin Guan, Taosheng Huang, Ronghua Li, 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports*, 4.

ASSESSING MAMMAL DIVERSITY IN XUAN LIEN NATURE RESERVE BY MOLECULAR APPROACHES

Cao Thi Huong Giang¹, Le Duc Minh^{1,2}, Nguyen Van Thanh¹, Nguyen Manh Ha²,
Nguyen Thi Hong Van¹, Nguyen Dinh Hai³, Do Trong Huong³

¹VNU University of Science, Vietnam National University - Hanoi

²Centre for Natural Resources and Environmental Studies, Vietnam National University, Hanoi

³Xuan Lien Natural Reserve, Thanh Hoa Province

SUMMARY

Xuan Lien Nature Reserve in Thanh Hoa province has a high level of biodiversity, including such globally threatened mammals as the Clouded Leopard (*Neofelis nebulosa*), the Roosevelt's Barking Deer (*Muntiacus rooseveltorum*), and the Northern White-cheeked Gibbon (*Nomascus leucogenys*). There were several field surveys conducted to determine the number of mammal species in the protected area. Nevertheless, for some species, conventional field techniques might not be able to survey them effectively due to their behavioral ecology, e.g., nocturnal mammals or arboreal primates. To investigate mammal diversity, with a focus on nocturnal mammals and arboreal primates in Xuan Lien, we used a molecular approach by sequencing two mitochondrial genes, cytochrome b and 16S rRNA, from hair and bone samples collected in the area. Our results confirmed records of threatened primates in Xuan Lien Nature Reserve, including three species of the genus *Macaca*, viz. the Stump-tailed Macaque (*Macaca arctoides*), the Assam Macaque (*Macaca assamensis*), and the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*), and the Phayre's Leaf Monkey (*Trachypithecus phayrei*). Based on the study results, we also discovered the small-toothed palm civet (*Arctogalidia trivirgata*). This is the first record of the nocturnal mammal in Xuan Lien Nature Reserve.

Keywords: *Macaca*, *Arctogalidia trivirgata*, cytochrome b, 16S, conservation genetics, Xuan Lien Nature Reserve.

Ngày nhận bài: 7-3-2016