

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA HÌNH VÙNG D-LOOP CỦA GIỐNG CHÓ H'MÔNG CỘC ĐUÔI ỨNG DỤNG TRONG CÔNG TÁC CHỌN GIỐNG

BÙI XUÂN PHƯƠNG⁽¹⁾, PHẠM THANH HẢI⁽¹⁾, ĐINH THẾ DŨNG⁽¹⁾,
HỒ THỊ LOAN⁽²⁾, ĐẶNG TẤT THẾ⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chó nhà là một trong những động vật được con người thuần hóa từ rất sớm. Trải qua quá trình chọn lọc tự nhiên cũng như chọn lọc nhân tạo đã hình thành các giống chó khác nhau về hình thái, màu sắc, tầm vóc... Tại Việt Nam, kết quả nghiên cứu của Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga trong giai đoạn từ 2006 - 2010 đã xác định 13 dạng chó khác nhau, trong đó có giống chó H'mông cộc đuôi [2]. Các giống chó có vai trò khác nhau tùy thuộc vào mục đích sử dụng của con người. Kết quả huấn luyện ban đầu cho thấy giống chó H'mông cộc đuôi là một trong những giống chó bản địa Việt Nam có thể sử dụng làm chó nghiệp vụ [1]. Tuy nhiên với cách thức chăn nuôi đơn lẻ cùng với việc chưa có hệ thống quản lý nhân giống riêng, các giống chó bản địa Việt Nam không tránh được sự pha tạp các nguồn gen từ những giống chó ngoại nhập cũng như sự pha lẫn nguồn gen giữa các giống chó bản địa. Do đó cần có biện pháp khôi phục, bảo tồn nguồn gen các giống chó bản địa Việt Nam.

Ty thể là một bào quan cung cấp năng lượng cho tế bào ở động vật có xương sống. Cùng với hệ gen của nhân thì ty thể có hệ gen độc lập với kích thước chiều dài từ 15 - 20 kilobases (kb) bao gồm 37 gen, trong đó 13 gen mã hóa protein, 2 rRNA, 22 gen vận chuyển tRNA [9]. Hệ gen ty thể của động vật có xương sống được coi là một trong những công cụ phổ biến để nghiên cứu mối quan hệ, nguồn gốc loài khác nhau với những đặc điểm riêng biệt của chúng bao gồm sự di truyền theo dòng mẹ [3, 6], không có sự tái tổ hợp và tốc độ tiến hóa nhanh [7]. Vùng điều khiển (D-loop) của hệ gen ty thể là vùng không mã hóa nhưng nó kiểm soát quá trình sao chép và là vùng biến đổi nhiều nhất trong hệ gen ty thể [4], vùng này có ý nghĩa trong việc nghiên cứu nguồn gốc phát sinh, quan hệ di truyền giữa các loài [10].

Việc ứng dụng ADN ty thể vào việc nghiên cứu di truyền quần thể và quan hệ phát sinh chủng loại chó bản địa trên thế giới đã thu được nhiều kết quả tích cực trong những năm gần đây. Nhóm tác giả Godinho R., Llaneza L., Blanco J.C., Lopes S., Álvares F., García E.J., Palacios V., Cortés Y., Talegón J., Ferrand N. đã sử dụng kết hợp giữa nghiên cứu về ADN ty thể với phương pháp nghiên cứu trên nhiễm sắc thể giới tính Y và nghiên cứu về microsatellite để phân tích di truyền quần thể trong quá trình lai tạo chó bản địa với chó sói hoang đại tại vùng bán đảo Iberian. Trong nghiên cứu trên, nhóm tác giả đã sử dụng kết hợp 42 microsatellite của nhiễm sắc thể thường với các microsatellite đột biến trên nhiễm sắc thể giới tính Y và trình tự ADN ty thể để xác định sự xuất hiện và biến động quần thể chó lai. Nghiên cứu đã sử dụng song song việc phân tích Bayesian và các bộ nghiên cứu mô phỏng để đánh giá sự khác biệt giữa chó bản địa và chó sói, tần số và phân bố lai tạo, lai có định hướng. Nghiên cứu thu được ba kết quả quan trọng: Không có sự khác biệt về di truyền giữa chó bản địa và chó sói hoang; giới hạn sinh sản và mở rộng phân bố của chó sói; bằng chứng về sự biến động trong quần thể lai được tạo ra bởi quá trình lai giữa chó bản địa đực và sói cái [5].

Ở Việt Nam hiện nay, việc ứng dụng công nghệ gen trong công các nghiên cứu các giống chó bản địa đang được nhóm tác giả Trần Hoàng Dũng, Trương Nguyễn Thị Như Mai, Trần Ngọc Trinh, Huỳnh Văn Hiếu, Thái Kế Quân, Chung Anh Dũng đang thực hiện từ năm 2014 nhưng chỉ là nghiên cứu bước đầu về định dạng haplotype và truy tìm nguồn gốc chó Phú Quốc bằng trình tự vùng D-loop trong genome ty thể.

Nhằm phục hồi sự đa dạng về nguồn gen, định hướng cho quá trình nhân giống bảo tồn nguồn gen giống chó bản địa H'mông cộc đuôi, nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu sự đa hình vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi nhằm ứng dụng trong công tác chọn lọc và nhân giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Lựa chọn và thu mẫu

Thu mẫu mô tai của 120 cá thể chó bản địa H'mông cộc đuôi tại Hà Giang và Lào Cai được lựa chọn theo kiểu hình, đảm bảo phù hợp với bản tiêu chuẩn giống và được loại bỏ các yếu tố quan hệ huyết thống thông qua phỏng vấn điều tra. Trong đó, bao gồm 60 cá thể đực, được kí hiệu từ HC01 - HC60 và 60 cá thể cái được kí hiệu từ HC61 - HC120.

Mẫu được thu bằng dụng cụ chuyên biệt tại vị trí tai của chó với kích thước mẫu khoảng 3mm x 3mm và được bảo quản trong môi trường cồn 90°.

Tách chiết và nhân bản DNA

DNA tổng số được tách chiết sử dụng kit DNA của hãng Qiagen (Đức).

Nhân tổng số khoảng 600 bp đầu thuộc vùng D-loop vì đây là phần xảy ra biến đổi nhiều nhất bằng kỹ thuật PCR, sử dụng hỗn hợp PCR Taq Mastermix (Qiagen) với cặp mồi (primer) có mã hiệu và trình tự:

CaF30: 5' - ACAGCCGACACATCCTCAGCC - 3'

CaR30: 5' - CGAAGAATCGGGTGAGCGTGGC - 3'

Với chu trình nhiệt theo các bước:

Bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (s)	Số chu kì
Biến tính ban đầu	95	120	1
Biến tính	95	25	35
Bắt cặp mồi	56	25	
Kéo dài	72	40	
Hoàn thiện	72	300	1
Giữ mẫu	4	Đến khi lấy mẫu	

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch sản phẩm PCR của hãng Qiagen.

Giải trình tự

Giải trình tự sản phẩm PCR sử dụng bộ hóa chất BigDye terminator cycle sequence kit v3.1 (Applied Biosystems, Mỹ) và máy đọc trình tự ABI 3100 - Avant Genetic Analyzer.

Xử lý số liệu

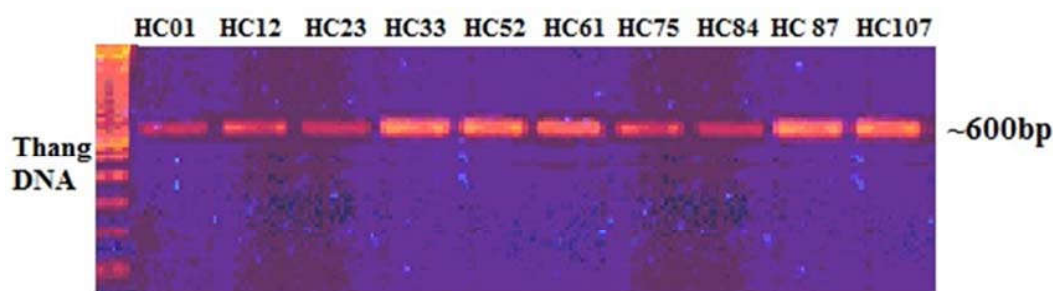
So sánh, sắp xếp, phân tích các trình tự DNA giải mã được bằng phần mềm BioEdit 7.0.0 và DnaSP. Xác định khoảng cách di truyền trên phần mềm MEGA 6.0.5 (Tamura et al., 2013) [8].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân đoạn DNA vùng D-loop bằng kỹ thuật PCR

Để có đủ số lượng DNA phục vụ công tác nghiên cứu đã tiến hành nhân đoạn D-loop bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi CaF30 và CaR30, cặp mồi được thiết kế đặc hiệu dựa trên kết quả khảo sát hơn 2.000 trình tự D-loop loài chó nhà (*Canis familiaris*) trên ngân hàng gen và được kiểm tra trên phần mềm Primer - Blast Tool uses Primer 3 và thực nghiệm. Theo lý thuyết sản phẩm thu được sau khi nhân bản bằng cặp mồi trên có chiều dài khoảng 600 bp.

Sau khi nhân bản tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR và chạy điện di kiểm tra trên gel agrose 1%. Một số kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di nhân đoạn DNA vùng D-loop

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu có độ dài ~600 bp phù hợp với lý thuyết khi thiết kế cặp mồi. Sản phẩm PCR không xuất hiện vạch phụ, không bị tạp nhiễm. Tuy nhiên, thông qua sản phẩm PCR không xác định được đặc điểm đa hình của D-loop, bởi vậy cần tiến hành giải trình tự vùng D-loop bằng kỹ thuật và máy đọc trình tự ABI 3100 - Avant Genetic Analyzer.

Xác định trình tự và đặc điểm đa hình đoạn D-loop

Sau khi sử dụng bộ hóa chất BigDye terminator cycle sequence kit v3.1 (Applied Biosystems, Mỹ) và máy đọc trình tự ABI 3100 - Avant Genetic Analyzer. Để giải trình tự sản phẩm PCR vùng D-loop, cùng với việc sử dụng phần mềm BioEdit 7.0.0 và DnaSP sắp xếp, so sánh và phân loại 120 trình tự từ 120 mẫu xác định 10 điểm đa hình và tạo thành 8 kiểu đa hình tức 8 kiểu Haplotype kí hiệu từ Hap1 đến Hap8. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Các kiểu đa hình vùng D-loop giống chó H'mông cộc đuôi

Điểm đa hình (SNP)	74	89	92	94	112	114	127	421	487	495
Kiểu đa hình										
Hap1	T	G	T	C	T	G	T	C	C	A
Hap2	-	A	C	-	-	A	-	-	T	-
Hap3	-	-	C	-	-	-	-	T	-	G
Hap4	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-
Hap5	C	-	C	-	-	A	-	-	T	-
Hap6	-	-	C	-	C	-	-	T	-	-
Hap7	-	-	C	-	-	A	C	-	T	-
Hap8	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-

Bảng 1 cho thấy, nếu lấy Hap1 làm chuẩn, xác định được 10 điểm đa hình được xác định tại vị trí nucleotide 74, 89, 92, 94, 112, 114, 127, 421, 487, 495. Các điểm đa hình chỉ là biến đổi đồng hoán các nucleotide bị thay thế không có điểm nào thêm hoặc bớt nucleotide, trong đó có 10 điểm thay thế từ T-C (1 điểm T72C, 7 điểm T92C, 1 điểm T112C và 1 điểm T127C); 4 điểm G-A (1 điểm G89A, 3 điểm G94A); 7 điểm C-T (2 điểm C94T, 2 điểm C421T và 3 điểm C487T); 1 điểm A-G (A495G).

Bảng 2. Tỷ lệ các kiểu đa hình vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi

STT	Kiểu Hap	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
1	Hap1	25	20,83
2	Hap2	15	12,50
3	Hap3	17	14,17
4	Hap4	12	10,00
5	Hap5	10	8,33
6	Hap6	16	13,33
7	Hap7	13	10,83
8	Hap8	12	10,00
Tổng		120	100

Qua bảng 2 có thể thấy các kiểu đa hình xuất hiện với tỷ lệ khác nhau. Kiểu đa hình Hap1 chiếm tỷ lệ cao nhất đạt 20,83%, kiểu đa hình Hap5 thấp nhất với tỷ lệ 8,33%. Các kiểu đa hình Hap8, Hap4, Hap7, Hap6, Hap2, Hap3 có tỷ lệ lần lượt là: 10%, 10,83%, 12,50%, 13,33% và 14,17%.

Như vậy vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi có sự thay đổi và đa dạng về các kiểu đa hình.

Khoảng cách di truyền và ứng dụng trong chọn lọc nhân giống

Theo kết quả điều tra khảo sát của Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, các giống chó bản địa Việt Nam chủ yếu được nuôi thả tự do, đơn lẻ trong các hộ gia đình, việc quản lý, nhân giống tự phát [9], do đó không chỉ nguồn gen của giống chó H'mông cộc đuôi mà của các giống chó bản địa khác có khả năng bị pha tạp. Bởi vậy, để nâng cao hiệu quả chọn lọc cũng như phục hồi nguồn gen vốn có của giống chó H'mông cộc đuôi đã tiến hành xác định khoảng cách di truyền bằng phần mềm MEGA 6.0.6 dựa trên kết quả phân tích đặc điểm đa hình đoạn D-loop. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Khoảng cách di truyền giữa các haplotype

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8
Hap1								
Hap2	0,007							
Hap3	0,005	0,009						
Hap4	0,004	0,007	0,005					
Hap5	0,007	0,004	0,009	0,007				
Hap6	0,005	0,009	0,004	0,005	0,009			
Hap7	0,007	0,004	0,009	0,007	0,004	0,009		
Hap8	0,002	0,005	0,004	0,002	0,005	0,004	0,005	

Bảng 3 cho thấy khoảng cách di truyền cao nhất đạt 0,009 (Hap3-Hap2; Hap3-Hap5; Hap6-Hap2; Hap6-Hap5; Hap3-Hap7; Hap7-Hap6) và khoảng cách di truyền thấp nhất là 0,002 (Hap8-Hap1 và Hap8-Hap4). Các kiểu đa hình khác có khoảng cách di truyền từ 0,004 đến 0,007.

Từ kết quả nghiên cứu khoảng cách di truyền đã xác định được các cặp bố mẹ và cách ghép đôi, tuy nhiên việc chọn lọc các cá thể bố mẹ còn phụ thuộc vào đặc điểm hình thái, hành vi và các dạng thần kinh nhằm khai thác huấn luyện sau này. Kết quả chọn lọc ghép đôi được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Cách ghép đôi giữa các cá thể đực - cái

SST	Đực	Cái	KCDT	STT	Đực	Cái	KCDT	STT	Đực	Cái	KCDT
1	HC31	HC113	0.009	28	HC43	HC73	0.009	55	HC5	HC81	0.009
2	HC37	HC113	0.009	29	HC45	HC73	0.009	56	HC54	HC81	0.009
3	HC39	HC113	0.009	30	HC47	HC73	0.009	57	HC7	HC81	0.009
4	HC1	HC117	0.009	31	HC5	HC73	0.009	58	HC31	HC82	0.009
5	HC12	HC117	0.009	32	HC54	HC73	0.009	59	HC37	HC82	0.009
6	HC19	HC117	0.009	33	HC7	HC73	0.009	60	HC39	HC82	0.009
7	HC23	HC117	0.009	34	HC1	HC79	0.009	61	HC1	HC87	0.009
8	HC3	HC117	0.009	35	HC12	HC79	0.009	62	HC12	HC87	0.009
9	HC40	HC117	0.009	36	HC19	HC79	0.009	63	HC19	HC87	0.009
10	HC43	HC117	0.009	37	HC23	HC79	0.009	64	HC23	HC87	0.009
11	HC45	HC117	0.009	38	HC3	HC79	0.009	65	HC3	HC87	0.009
12	HC47	HC117	0.009	39	HC40	HC79	0.009	66	HC40	HC87	0.009
13	HC5	HC117	0.009	40	HC43	HC79	0.009	67	HC43	HC87	0.009
14	HC54	HC117	0.009	41	HC45	HC79	0.009	68	HC45	HC87	0.009
15	HC7	HC117	0.009	42	HC47	HC79	0.009	69	HC47	HC87	0.009
16	HC31	HC61	0.009	43	HC5	HC79	0.009	70	HC5	HC87	0.009
17	HC37	HC61	0.009	44	HC54	HC79	0.009	71	HC54	HC87	0.009
18	HC39	HC61	0.009	45	HC7	HC79	0.009	72	HC7	HC87	0.009
19	HC31	HC65	0.009	46	HC1	HC81	0.009	73	HC31	HC87	0.009
20	HC37	HC65	0.009	47	HC12	HC81	0.009	74	HC37	HC87	0.009
21	HC39	HC65	0.009	48	HC19	HC81	0.009	75	HC39	HC87	0.009
22	HC1	HC73	0.009	49	HC23	HC81	0.009	76	HC31	HC97	0.009
23	HC12	HC73	0.009	50	HC3	HC81	0.009	77	HC37	HC97	0.009
24	HC19	HC73	0.009	51	HC40	HC81	0.009	78	HC39	HC97	0.009
25	HC23	HC73	0.009	52	HC43	HC81	0.009	79	HC31	HC98	0.009
26	HC3	HC73	0.009	53	HC45	HC81	0.009	80	HC37	HC98	0.009
27	HC40	HC73	0.009	54	HC47	HC81	0.009	81	HC39	HC98	0.009

Qua bảng 4 có thể thấy rằng khoảng cách di truyền của các cá thể cao nhất là 0,009, đảm bảo cho việc nhân giống tạo đàn con có tính đa dạng, nâng cao hiệu quả chọn lọc. Kết quả cũng chỉ ra có 81 phép ghép đôi nhân giống từ 14 cá thể đực được kí hiệu: HC1, HC3, HC5, HC7, HC19, HC23, HC31, HC37, HC39, HC40, HC43, HC45, HC47, HC54 và 11 cá thể cái được kí hiệu: HC113, HC117, HC61, HC65, HC73, HC79, HC81, HC82, HC87, HC97, HC98.

4. KẾT LUẬN

- Sử dụng cặp mồi CaF30 và CaR30 nhân bản thành công đoạn DNA thuộc vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi với độ dài 600 bp đảm bảo cho nghiên cứu tiếp theo và phù hợp với các kết quả khác đã công bố.

- Trình tự vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi có 8 kiểu đa hình tại 10 vị trí bao gồm: 74, 89, 92, 94, 112, 114, 127, 421, 487, 495. Các điểm đa hình là đồng hoán với sự thay thế các nucleotide 10 điểm T-C, 4 điểm G-A, 7 điểm C-T và 1 điểm A-G.

- Với các cá thể được lựa chọn, khoảng cách di truyền của các kiểu đa hình cao nhất là 0,009; thấp nhất là 0,002 và từ đây có thể xây dựng các cách ghép đôi để tạo ra thế hệ sau có tính đa dạng di truyền cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Hữu Côi, Bùi Xuân Phương, Đinh Thế Dũng, Nguyễn Tiến Tùng, *Khả năng huấn luyện chó nghiệp vụ giống H'mông cộc đuôi và chó dạng sói*, Tạp chí KHKT chăn nuôi, 2011, **2**(143):27-31.
2. Bùi Xuân Phương, Đinh Thế Dũng, Trần Hữu Côi, *Thành phần khu hệ chó nhà tại một số tỉnh phía bắc và bắc Trung bộ Việt Nam*, Tuyển tập BCKH về Sinh thái nhiệt đới, Nxb. Nông nghiệp, 2010, tr.157-163.
3. Avise J.C., Arnold J. and Ball R.M. Jr., *Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics*, Ann. Rev. Syst. Ecol., 1987, **18**:489-522.
4. Clayton D.A., *Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA*, Annu. Rev. Cell Biol., 1991, **7**:453-478.
5. Godinho R., Llaneza L., Blanco J.C., Lopes S., Álvares F., García E.J., Palacios V., Cortés Y., Talegón J., Ferrand N., *Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves ADN domestic dogs in the Iberian Peninsula*, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal. rgodinho@mail.icav.up.pt, 2011 Dec; **20**(24):5154-66, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05345.x. Epub 2011 Nov 9.
6. Gyllenstein U., Wharton D., Josefsson A. and Wilson A.C., *Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice*, Nature, 1991, **352**:255-257.

7. Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R.G., Vigilante L. and Erlich H.A., *Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes*, Ann. J. Hum. Genet., 1991, **48**:370-382.
8. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., *MEGA6.0.5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0.5*, 2013.
9. Wallace D.C., *Mitochondrial genes and disease*, Hosp, Pract., 1986, **21**:77-92.
10. Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M., Gyllenstein U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.J., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D. and Stoneking M., *Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics*, J. Biol., 1985, **26**:375-400.

SUMMARY

A STUDY ON D-LOOP REGION POLYMORPHISM OF H'MONG SHORT TAIL DOG BREED APPLIED IN DOG BREEDING

The study was carried out on 120 tissue samples from domestic H'mong dogs with short tail, including 60 samples from males and 60 samples from the females. The study results showed that the D-loop region of the H'mong short tail dog breed is polymorphic. The sequence of the D-loop region of these dogs has 8 polymorphic variants in 10 locations, including: 74, 89, 92, 94, 112, 114, 127, 421, 487, 495. The polymorphisms are transition with nucleotide substitutions 10 points TC, 4 points GA, 7 points CT and 1 point AG. The highest and the lowest genetic distance of the polymorphic variant is 0.009 and 0.002 respectively and it is able to build the pairing scheme to create the next generation with the highest genetic diversity.

Từ khóa: Dogs Vietnamese indigenous dog, Breed of dogs H'mong with short tails. D-loop gene.

Nhận bài ngày 22 tháng 6 năm 2015

Hoàn thiện ngày 3 tháng 10 năm 2015

⁽¹⁾ *Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.*

⁽²⁾ *Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*