

BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH GIỚI TÍNH CHIM YẾN HÀNG-*Aerodramus fuciphagus* (Thunberg, 1812)

HỒ THỊ LOAN, ĐẶNG TẮT THẾ, NGUYỄN GIANG SƠN

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

NGUYỄN LÂN HÙNG SƠN
Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Trong nghiên cứu quần thể ở các loài động vật nói chung và ở chim (Aves) nói riêng, việc xác định giới tính có vai trò rất quan trọng việc ước đoán sự tồn tại, phát triển của loài và định hướng cho công tác bảo tồn và phát triển bền vững. Ở chim, đa số các loài rất dễ phân biệt giới tính nhờ dựa vào hình thái bên ngoài do có hiện tượng nhị hình sinh dục. Tuy nhiên, đối với những loài không có hiện tượng nhị hình sinh dục, cả thể đực, cái trưởng thành có hình thái, màu sắc bộ lông tương tự nhau thì việc xác định giới tính trở nên khó khăn hơn. Trong những trường hợp này, để xác định chính xác, người ta phải tiến hành giải phẫu xác định giới tính qua cấu tạo cơ quan sinh dục của chúng. Tuy nhiên, vấn đề này đã được giải quyết dễ dàng hơn nhờ vào đặc điểm phân tử DNA trên cơ sở kỹ thuật PCR.

Nhiễm sắc thể liên quan tới giới tính ở chim được gọi là nhiễm sắc thể W và Z. Chim đực đồng hợp tử ZZ, chim cái dị hợp tử ZW. Có vài gen liên kết với cả hai nhiễm sắc thể giới tính Z và W đã được tìm thấy, một trong số đó là gen Helicase DNA binding protein (CHD1W, CHD1Z). Đây là gen có tiến hóa rất chậm ở các loài chim, tuy nhiên, có một số vùng không phiên mã nằm xen kẽ giữa các vùng phiên mã trong gen này tiến hóa nhanh. Các đoạn không phiên mã này có kích thước khác nhau ở nhiễm sắc thể W và Z, chúng không có bản sao trên nhiễm sắc thể thường. Dựa vào những đặc điểm này, gen CHD được ứng dụng rộng rãi để xác định giới tính của hầu hết các loài chim trừ những loài chim chạy như Đà điểu [1, 2, 3, 6].

Chim Yến hàng-*Aerodramus fuciphagus* là loài đồng hình giới tính nên việc xác định giới tính dựa vào hình thái ngoài là rất khó khăn [5]. Xuất phát điểm đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sử dụng kỹ thuật PCR để xác định giới tính ở loài chim này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

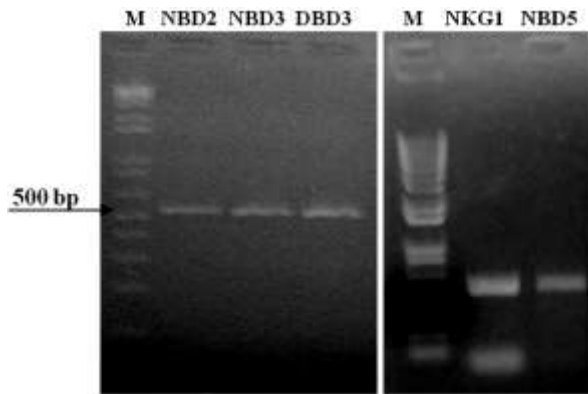
Vật liệu nghiên cứu: Chúng tôi sử dụng 03 mẫu cơ chim Yến hàng ký hiệu là NBD2, NBD3, DBD3 chưa xác định giới tính và 02 màng phôi trứng đã ấp ký hiệu NBD5 và NKG1 được thu mẫu ở tỉnh Bình Định và tỉnh Kiên Giang do Phòng Hệ thống học phân tử và Di truyền bảo tồn, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp. Mẫu được ngâm trong cồn và bảo quản ở -20°C đảm bảo cho phân tích trình tự DNA.

Phương pháp nghiên cứu: DNA tổng số của 05 mẫu nghiên cứu được tách chiết bằng bộ Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Đức). Nhân bản một phần vùng gen CHD bằng kỹ thuật PCR sử dụng PCR Taq Mastermix (Qiagen) với cặp mồi: 2550F, 2718R (Fridolfsson, Ellegren, 1999), chu trình nhiệt theo Fridolfsson, Ellegren (1999) và được thực hiện trên máy Eppendorf Mastercycle. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%. Sản phẩm PCR của mẫu NBD2 được giải trình tự theo phương pháp giải trình tự trực tiếp bằng máy AB 3730XL. Trình tự gene được so sánh trực tuyến trên Ngân hàng gene (Genebank) bằng phần mềm BLAST [4].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Điện di sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR nhân bản đoạn DNA đích được điện di, kết quả thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR (M: 1000bp DNA ladder)

Ảnh điện di sản phẩm PCR cho thấy tất cả các mẫu nghiên cứu đều có một băng sản phẩm đặc hiệu với cùng kích thước khoảng hơn 500bp. Các tác giả Fridolfsson và Ellegren [3] đã thiết kế cặp mồi 2550F, 2718R sử dụng cho các con cái có nhiễm sắc thể dị hợp tử giới tính, cho phép thu được hai sản phẩm PCR với kích thước khác nhau từ 150-250bp, còn con đực với nhiễm sắc thể giới tính đồng hợp tử nên chỉ thu được một sản phẩm PCR. Tuy nhiên, khi phân tích giới tính một số loài bằng cặp mồi 2550F, 2718R chỉ thu được một sản phẩm PCR cho cả con đực và con cái. Nguyên nhân do cặp mồi này không nhân bản đồng thời đoạn gen CHD1W và CHD1Z của con cái mà chỉ khuếch đại đoạn gen CHD1W, khi đó có thể xác định giới tính dựa vào kích thước khác nhau của sản phẩm PCR [2]. Tuy nhiên, do chỉ có một sản phẩm PCR trên bản điện di của 05 mẫu nghiên cứu với kích thước bằng nhau, nên chưa thể xác định được giới tính của 05 mẫu chim này. Để xác định giới tính của 05 mẫu chim yến này cần xác định cặp mồi 2550F, 2718R đã nhân bản thành công đoạn gen CHD1W hay CHD1Z. Do đó cần giải trình tự một sản phẩm PCR (mẫu NBD2) để kiểm tra sản phẩm PCR thuộc gene nào.

2. Giải trình tự đoạn gen đích từ các mẫu nghiên cứu

Đã xác định được trình tự DNA đích của mẫu nghiên cứu có chiều dài 457bp. Đối chiếu trình tự DNA này với cơ sở dữ liệu trình tự DNA (Genbank) bằng chương trình BLAST cho thấy trình tự DNA thu được có sự tương đồng cao nhất 94% với các trình tự gen chromosome W chromo-helicase-DNA binding protein (CHD1W) của loài *Phalacrocorax carbo* (mã hiệu JX901066, AB080661) như trong bảng 1. Tuy không có trình tự tương đồng của loài nghiên cứu trên ngân hàng gene, nhưng do trình tự nghiên cứu tương đồng cao với đoạn gen CHD1W của chim, nên dự đoán nó thuộc nhiễm sắc thể W.

Kết quả này cho thấy cặp mồi 2550F, 2718R không đồng thời khuếch đại 2 vùng gen CHDW và CHDZ trên con cái của loài chim yến *A. fuciphagus* mà chỉ khuếch đại 1 phần gen CHDW. Như vậy các mẫu nghiên cứu NBD2, NBD3, DBD3, NKGI, NBD5 là của chim yến cái.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khi gặp điều kiện sống bất lợi, chim có khả năng tự điều chỉnh giới tính [7]. Trong điều kiện tự nhiên, khả năng chịu đựng với những bất lợi môi trường

của chim cái kém hơn chim đực. Chim tự điều chỉnh giới tính của đàn bằng cách sinh ra nhiều chim cái hơn chim đực.

Sử dụng kỹ thuật PCR để xét nghiệm giới tính đơn giản, nhanh và kết quả chính xác. Hơn nữa, thành công từ việc xác định giới tính từ mẫu màng phôi trứng mở ra một cách xác định giới tính không ảnh hưởng tới đàn chim yến. Theo dõi tỷ lệ đực cái các đàn chim yến mỗi mùa sinh sản, nhất là những đàn yến mới nhân nuôi để đánh giá chất lượng của môi trường sống đối với đàn chim yến là rất hữu ích cho việc quản lý và phát triển đàn yến.

Bảng 1

So sánh trình tự gen của mẫu NDB2

Phalacrocorax carbo chromosome W chromo-helicase-DNA binding protein (CHD1W) gene, partial cds			
Sequence ID: gb JX901066.1 Length: 460Number of Matches: 2			
Related Information			
Range 1: 15 to 274 GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match			
Query	1	CTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTAATTTTCTCTCAGATGGTGAGGATGCTAGACATC	60
Sbjct	15	CTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAGGATGCTAGACATC	74
Query	61	CTAGCAGAGTATTTGAAATATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTA	120
Sbjct	75	CTAGCAGAGTATTTGAAATATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTA	134
Query	121	GCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCACTTTATTTTAA-A-GTGT--CCTTTTGTAGAAAGA	176
Sbjct	135	GCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCACTTTATCTTAAGAAGTGTGTCTTTTGTAGAAAGA	194
Query	177	TTTATGGAAGTTTAATTTTATGTATATGAAAAGACTGGCAATTATTTA-TGCTAAATAGT	235
Sbjct	195	TTTATGAAAGTTTAATTTTACAGTATAGGAAGAGACTGGCAATTACTAAATGCTAAATAGT	254
Query	236	ATTTTGAAATGAAACTAATG	255
Sbjct	255	ATTTTGAAATGAAACTGATG	274
Range 2: 272 to 401GenBankGraphicsNext MatchPrevious MatchFirst Match			
Query	333	ATGAATTAGAAAGATGAAGTGTT--A---CTCTTATTCCCCACCCCAATTTATTTGACAA	387
Sbjct	272	ATGAATTGGAAGATGAAGTGTTACATTCCTCTTATTCCACCCCAATTTGTTTGGCAA	331
Query	388	TTGTGAATTCAAGTTGCTCCAATTAGAATATAGTAGGAATTCCTTTTAACTGTATTGTT	447
Sbjct	332	TTGAGAATTCAAGTTGCTCTGATTAGAATATAGTAGGAGTTCCTTTTAACTGTATTGTT	391
Query	448	CAATCTCTTT	457
Sbjct	392	CAATCTCTTT	401

III. KẾT LUẬN

Cặp mồi 2550F, 2718R dùng để xác định giới tính của chim không khuếch đại đồng thời hai gen CHD1Z và CHD1W của chim cái mà chỉ khuếch đại một đoạn gen có chiều dài hơn 500bp thuộc gen CHDW của chim Yến hàng *A. fuciphagus*. Đã xác định thành công giới tính của 5 mẫu chim yến bằng kỹ thuật PCR trên cơ sở phân tích 2 mẫu vỏ trứng của chim yến đã ấp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài cơ sở của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật mã số IEBR.DT.06/13-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ellegren H.**, 2000. *Trends Ecol. Evol.*, 15 (5): 188-192.
2. **Fridolfsson A. K.**, Ellegren H., 1999. *Avian Biology Journal*, 30: 116-121.
3. **Fridolfsson A. K., Ellegren H.**, 2000. *Genetics*, 155: 1903-1912.
4. Genbank: [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
5. **Hoyo del J., Elliott A., Sargatal J.**, 1999. Handbook of the birds of the world, vol. 5, Barn-owls to Hummingbirds. Lynx Edicions, Barcelona, p. 388-435.
6. **Kahn N. W., John J., Quynn T.**, 1998. *The Auk*, 115: 1074-1078.
7. **Trivers R. L., Willard D. E.**, 1973. *Science*, 179: 90-91.

SEX IDENTIFICATION OF EDIBLE-NEST SWIFTLET *Aerodramus fuciphagus* (Thunberg, 1812) USING PCR TECHNIQUE

HO THI LOAN, DANG TAT THE, NGUYEN GIANG SON, NGUYEN LAN HUNG SON

SUMMARY

Sex identification in avian species is one of the key points of avian breeding and evolutionary studies. Many avian species are considered sexually monomorphic. In monomorphic bird species, especially in young birds, it's is difficult to identify birds' sex based on only their external morphology. Through, vent sexing, laparoscopy, steroid sexing and karyotyping are methods for sex of birds. The sex of an individual is established from the genes located on sex chromosomes. Per one somatic cell, female birds have one copy of both Z and W chromosome, and male birds have two copies of Z avian sex chromosomes. The primer pairs using are 2550F, 2718R (Fridolfsson và Ellegren, 1999) amplifying sex specific CHD1 gene of both Z and W chromosomes. There are five samples (three tissue samples and two incubated egg samples) for sex identification. The single band observed on 1.5% agarose gel electrophoresis of five samples. DNA sequence of NDB2 sample belong to CHD1W of female. Thus, the five samples belong to females.