

ĐA HÌNH NUCLEOTIDE VÙNG D-LOOP GEN TY THỂ GIỐNG CHÓ XOÁY LƯNG PHÚ QUỐC

Nguyễn Hùng Cường, Nguyễn Thị Diệu Thuý
*Viện Công nghệ sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Hiện nay, trên thế giới chỉ có 3 giống chó xoáy lưng là Thai Ridgeback (Thái Lan), Rhodesian Ridgeback (châu Phi) và Phú Quốc (Kiên Giang, Việt Nam), tuy nhiên chỉ có 2 giống đầu là được đăng ký ở Hiệp hội chó giống quốc tế (Fédération Cynologique Internationale). Xoáy lưng là dãy lông mọc ngược chiều so với phần lông trên mình chó, chúng có hình dáng rất đa dạng và thường đối xứng: hình kim, hình mũi tên, yên ngựa, cây đàn, chiếc lá... là tiêu chuẩn quan trọng đánh giá. Nguồn gốc lịch sử của xoáy lưng hiện còn nhiều tranh luận. Chó Phú Quốc là một loài chó đặc trưng của đảo Phú Quốc với nhiều tính năng vượt trội trong việc giữ nhà, săn bắt, cũng như vóc dáng thanh - săn, mình thon dài, chân cao, bàn chân rộng và có màng bơi như chân vịt, ngực nở, bụng thon, tai đứng, đặc điểm đặc trưng nhất là có xoáy lông trên sống lưng. Theo Đào Văn Tiến (1977), chó Phú Quốc có nguồn gốc từ chó Dingo ở châu Úc, nhưng hiện nay có lẽ đã tuyệt chủng. Tuy nhiên, nghiên cứu gần đây của Oskarsson (2012) cho thấy chó hoang Dingo Úc và chó Polynesia có nguồn gốc từ chó ở châu Á du nhập vào, nên chó hoang Dingo không thể là tổ tiên của chó Phú Quốc. Hai nhà khoa học người Mỹ là Merle Wood và Merle Hidinger cho rằng trong quá khứ chỉ có chó xoáy Thái Lan và chó xoáy Rhodesian của Nam Phi là có dải lông xoáy trên lưng, vì vậy chó Phú Quốc phải có nguồn gốc từ chó xoáy Thái Lan. Họ giả thiết rằng 400 năm trước, các ngư dân Thái Lan đã mang chó xoáy Thái Lan đến đảo Phú Quốc và đã trở thành tổ tiên của chó Phú Quốc ngày nay.

Đa hình trình tự gen vùng D-loop ty thể đã được sử dụng trong mục đích xác định đa dạng di truyền và phân hoá giữa các quần thể của loài thuộc các vùng địa lý khác nhau. Những dữ liệu này đã góp phần giúp hiểu rõ hơn về quá trình thuần hóa và quan hệ di truyền của các giống chó. Kết quả nghiên cứu của Caries Vila và cs (1997) phân tích trình tự vùng D-loop gen ty thể của 162 con sói tại 27 quốc gia trên thế giới và 140 con chó nhà đại diện cho 67 giống cho thấy xuất hiện 26 haplotype khác nhau. Theo Pang và cs (2009) đã phân tích trình tự gen 582 bp vùng D-loop của 1.543 con chó trên thế giới đã xác định được 6 nhóm haplotype là A, B, C, D, E, và F. Trình tự gen vùng D-loop của chó Ngao Tây Tạng bộc lộ 3 haplotype (Li và Zhang, 2002).

Để giữ lại giống chó thông minh và trung thành này trước sự thoái hóa của nguồn gen (lai với giống chó khác), hiện nay huyện đảo Phú Quốc có hơn 10 trại bảo tồn chó Phú Quốc lớn nhỏ. Sự phát triển của các trại bảo tồn này đã làm cho ngành du lịch Phú Quốc tiến tới phát triển mới là du lịch sinh thái về bảo tồn chó. Luận án tiến sĩ của Hillbertz (2007) có đề cập đến việc tuyệt chủng của chó xoáy lưng Phú Quốc. Theo nhiều nhà chuyên môn vấn đề rất cần thiết đối với chó Phú Quốc hiện giờ là bảo tồn, phát triển và đăng ký chính thức giống chó xoáy lưng Phú Quốc với Hiệp hội chó Thế giới. Vì thế, việc phân tích đa dạng nguồn gen cũng như đặc điểm di truyền các gen liên quan tính trạng xoáy lưng đặc trưng của giống chó này là việc cần thiết được tiến hành và có ý nghĩa cả về thực tiễn và khoa học.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

03 mẫu máu chó Phú Quốc thu vào ống chống đông chứa EDTA, bảo quản 4°C cho đến khi sử dụng. Các cá thể được chọn mẫu dựa trên các đặc điểm hình thái điển hình của giống chó

Phú Quốc nuôi tại đảo này và được nhóm nghiên cứu Đại học Nguyễn Tất Thành (nhiệm vụ quy gen chó Phú Quốc) kết hợp với các chuyên gia giống tiến hành.

DNA hệ gen được tách chiết từ các mẫu máu theo phương pháp cơ bản của Ausubel và cs (1995) có cải biên phù hợp với phòng thí nghiệm. Đánh giá và phân tích sản phẩm DNA tách được bằng điện di trên gel agarose và đo quang phổ bước sóng 260/280 nm.

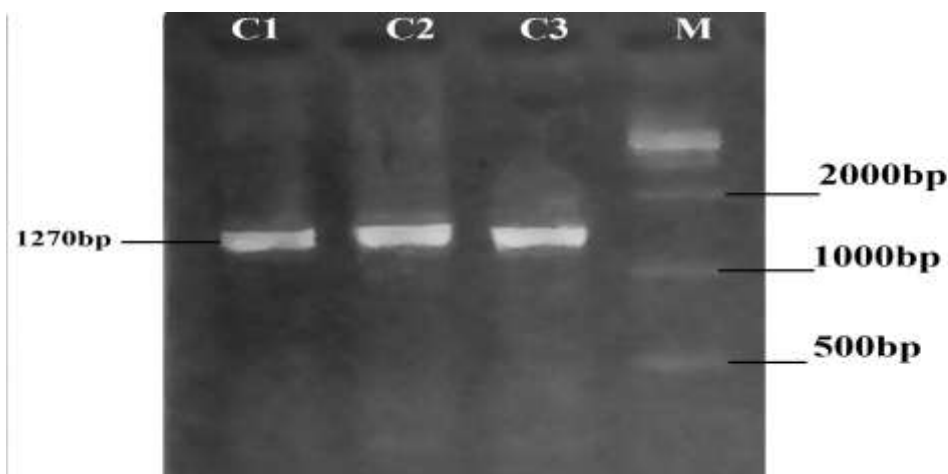
Vùng D-loop gen ty thể chó được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu Dog.Mt_F115416 và Dog.Mt_R00056 (Gundry et al., 2007). PCR được sử dụng để khuếch đại vùng gen đích. Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự gen 2 chiều trên máy đọc trình tự gen tự động ABI 3730XL (Viện Công nghệ sinh học).

Trình tự vùng D-loop gen ty thể được phân tích và so sánh bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999), cây phả hệ và quan hệ di truyền của chó Phú Quốc so với trình tự gen tham chiếu có trên ngân hàng gen được xây dựng bằng MEGA 4, với giá trị bootstrap 1.000 lần lấy mẫu lặp (Tamura et al., 2007).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Khuếch đại và đọc trình tự vùng D-loop gen ty thể

Vùng D-loop gen ty thể 3 mẫu máu chó Phú Quốc đã được khuếch đại đặc hiệu, kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR là 1 băng DNA đậm, rõ nét, không có sản phẩm phụ, kích thước phân tử tương ứng với kích thước tính toán theo lý thuyết (hình 1).



Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng D-loop gen ty thể chó Phú Quốc

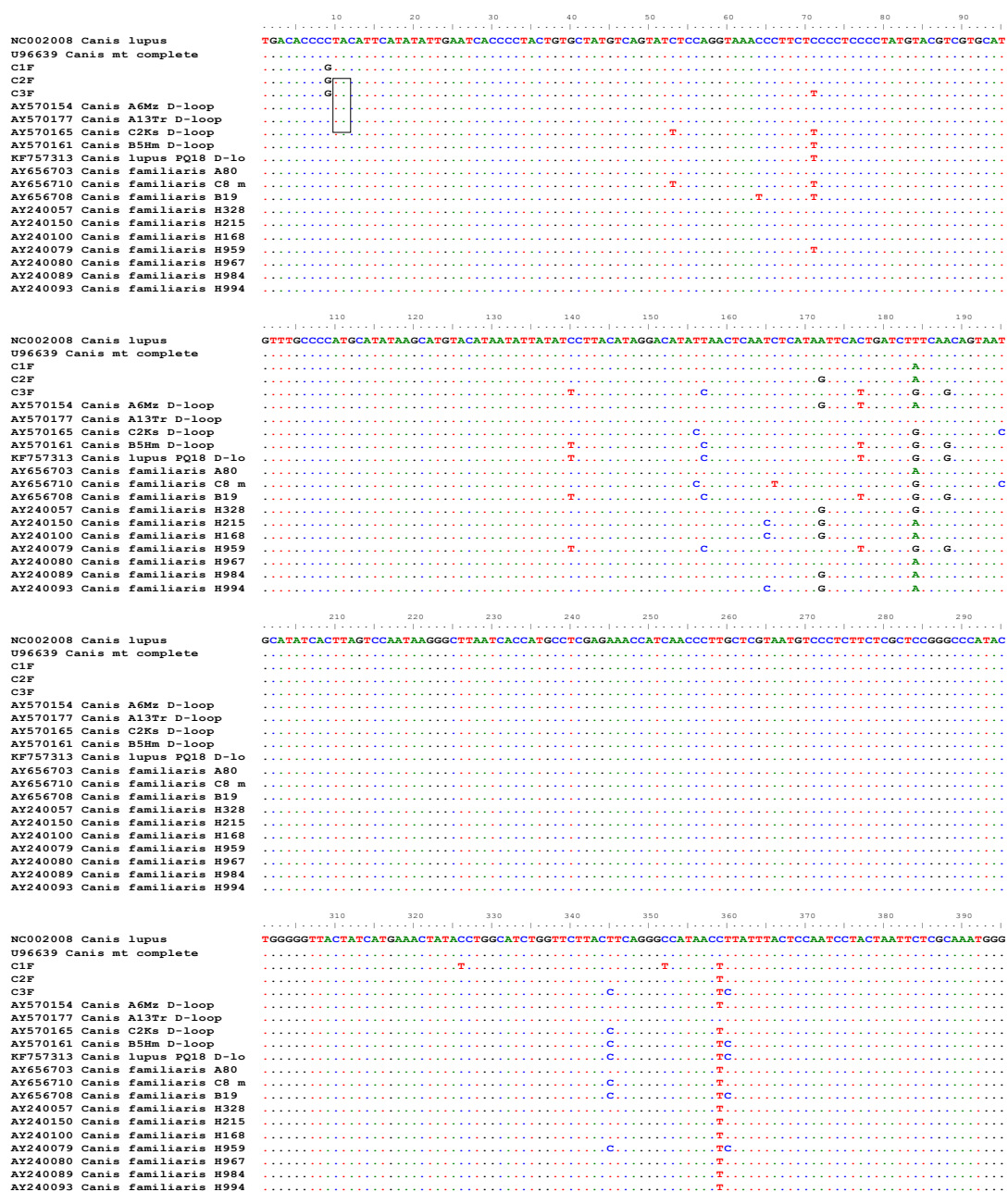
M: Chỉ thị DNA 1 kb; C1, C2, C3: các mẫu chó Phú Quốc.

2. Phân tích trình tự gen và xây dựng cây phả hệ di truyền

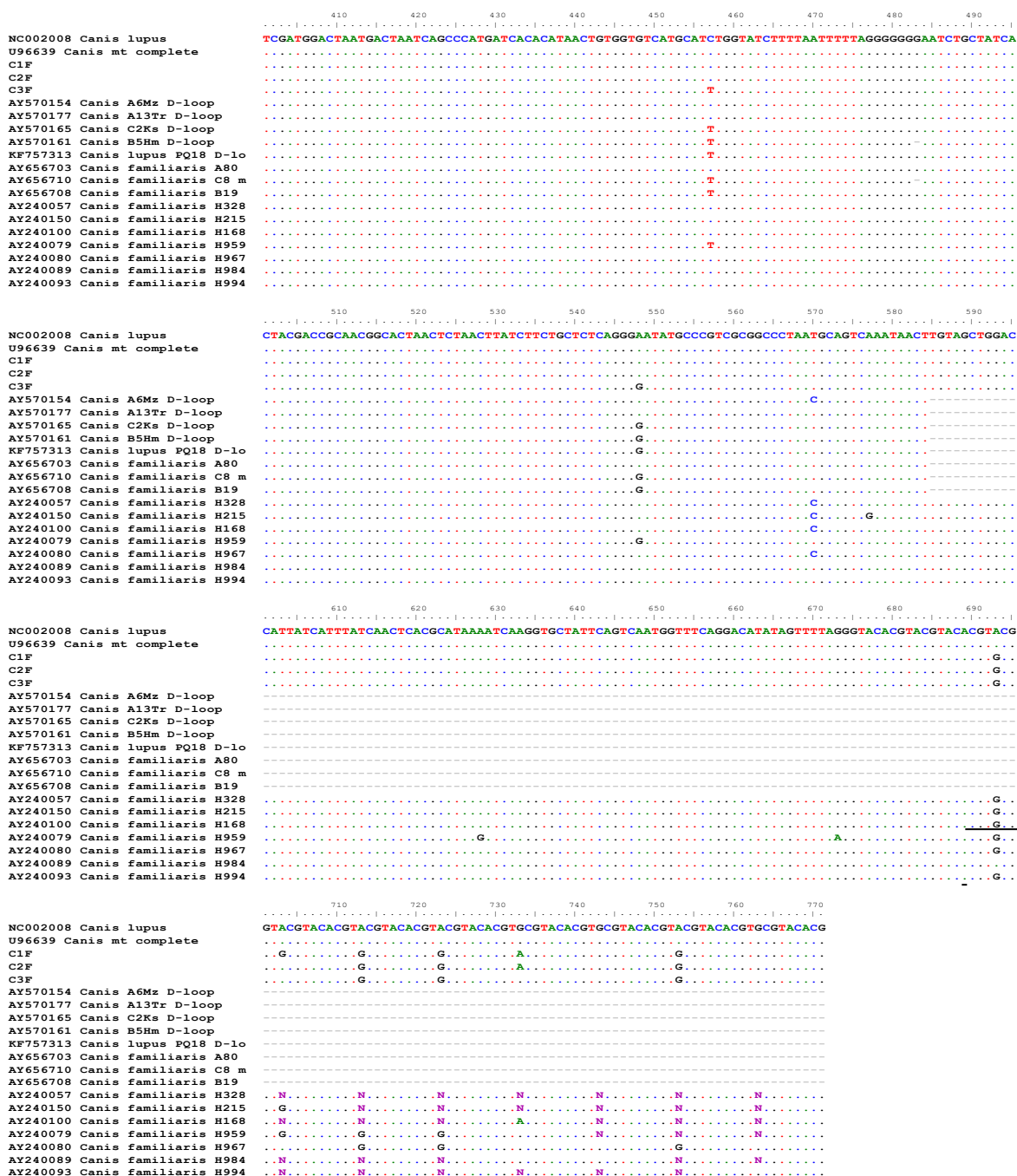
Kết quả xác định và phân tích, so sánh trình tự vùng D-loop gen ty thể chó Phú Quốc được trình bày ở hình 2.

Kết quả so sánh trình tự gen ở hình 2 cho thấy xuất hiện nhiều các vị trí biến đổi đa hình, trong đó vị trí đa hình 9:C->G chỉ xuất hiện ở 3 mẫu giống chó Phú Quốc, ngoài ra, hàng loạt điểm đa hình chung với các giống chó khác. Đáng chú ý là đoạn 10 nucleotide lặp (CGTACACGTA/G) tìm thấy ở cả chó Phú Quốc và các giống chó khác, tuy nhiên, điểm đa hình thường thấy là nucleotide cuối A->G ở các giống chó khác nhau.

TIÊU BAN ĐA DẠNG SINH HỌC VÀ BẢO TỒN

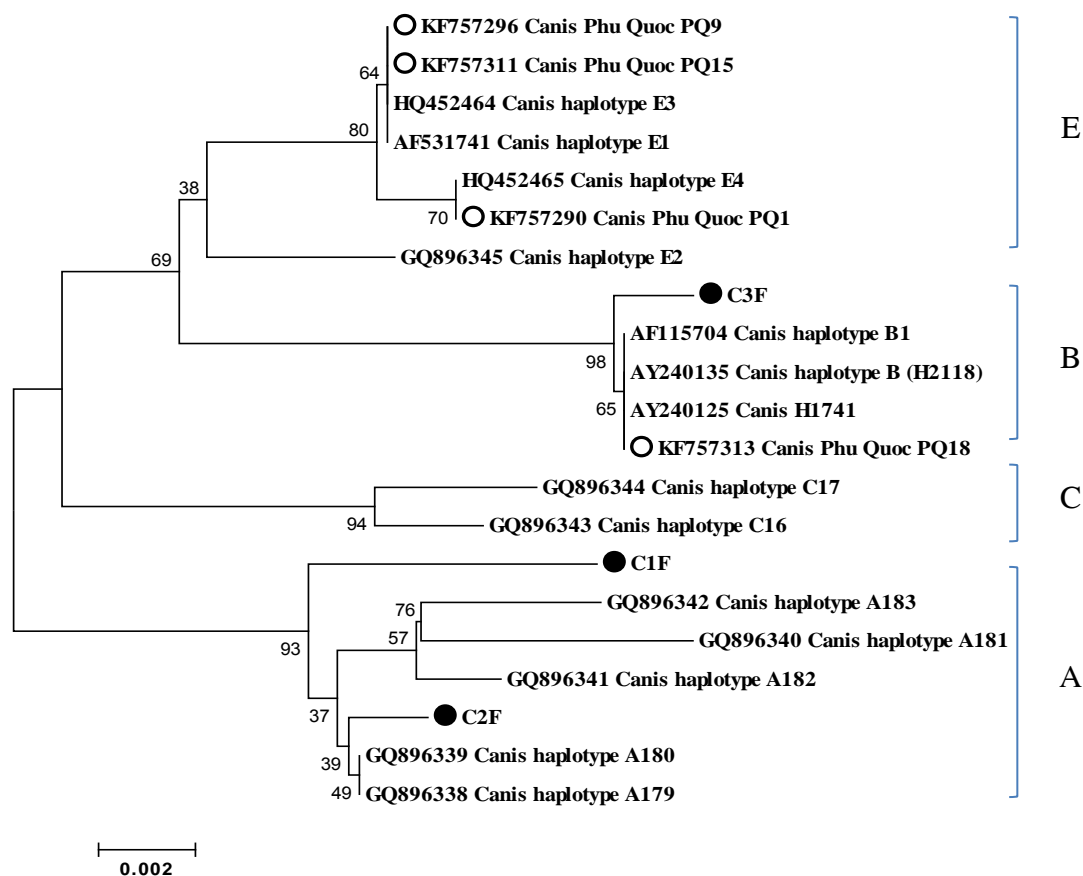


Hình 2: Trình tự vùng D-loop gen ty thể chó Phú Quốc (C1, C2 và C3) so sánh với các trình tự gen tham chiếu Genbank



Hình 3: Trình tự vùng D-loop gen ty thể chó Phú Quốc (C1, C2 và C3) so sánh với các trình tự gen tham chiếu Genbank (tiếp)

Cây phả hệ xây dựng từ trình tự gen vùng D-loop chó Phú Quốc và các trình tự gen tương đồng tham chiếu trên ngân hàng gen sử dụng phần mềm MEGA6.1 với phương pháp Neighbour Joining, cùng phép thử bootstrap 1,000 lần (hình 3).



Hình 4: Cây phả hệ xây dựng từ trình tự gen vùng D-loop của chó Phú Quốc và các trình tự gen tương đồng tham chiếu trên ngân hàng gen

Kết quả hình 4 thể hiện sự phân nhóm dựa trên sự khác biệt trong trình tự nucleotide đoạn D-loop hệ gen ty thể. Trong nghiên cứu này, 2 cá thể C1F và C2F được xếp vào nhóm A trong khi C3F được xếp vào phân nhóm B1 (cùng kiểu đơn bội với chó xoáy lưng Phú Quốc PQ18 với mã KF757313). Nhóm A, B, C là các haplogroup phổ biến, phân bố trên toàn thế giới, chiếm tới 95,9% số cá thể thuộc 1 trong 3 haplogroup trên. Trong khi đó, các nhóm D, E, F là các nhóm hiếm hơn và phân bố giới hạn 1 số vùng trên thế giới. Kết quả phân tích trình tự vùng D-loop ty thể chó Phú Quốc gần đây cho thấy một số lượng khá lớn cá thể chó xoáy lưng Phú Quốc thuộc phân nhóm E, kiểu đơn bội E1 (chiếm 16,8%) và E4 (chiếm 9,1%) (Trần Hoàng Dũng và cs., 2016).

III. KẾT LUẬN

Kết quả phân tích trình tự nucleotide vùng D-loop gen ty thể cho thấy 3 cá thể chó xoáy lưng Phú Quốc có mức tương đồng cao. Cây phả hệ dựa trên trình tự gen D-loop xếp chúng thuộc vào 2 haplogroup A và B.

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn TS. Trần Hoàng Dũng, ĐH Nguyễn Tất Thành, Tp. Hồ Chí Minh đã cung cấp mẫu máu chó Phú Quốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., 1995.** *Short protocols in molecular biology*, Third edition, John Wiley & Sons, Inc.
2. **Fédération Cynologique Internationale:** www.fci.be/
3. **Gundry R. L., Allard M. W., Moretti T. R., Honeycutt R. L., Wilson M. R., Monson K. L., et al. 2007.** Mitochondrial DNA analysis of the domestic dog: Control region variation within and among breeds. *J Forensic Sci.*, 52: 562-72.
4. **Hillbertz N. S., Isaksson M., Karlsson E. K., Hellmén E., Pielberg G. R., Savolainen P., Wade C. M., von Euler H., Gustafson U., Hedhammar A., Nilsson M., Lindblad-Toh K., Andersson L. and Andersson G., 2007.** Duplication of FGF3, FGF4, FGF19 and ORAOV1 causes hair ridge and predisposition to dermoid sinus in Ridgeback dogs. *Nature Genetics* 39: 1318 - 1320.
5. **Hall T., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
6. **Li Y., Zhang Y., 2012.** High genetic diversity of Tibetan Mastiffs revealed by mtDNA sequences. *Chin Sci Bull*, 57(13): 1483-1487.
7. **Oskarsson M., 2012.** Analysis of the origin and spread of the domestic dog using Y chromosome DNA and mtDNA sequence data. Division of Gene Technology, School of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden ISBN 978-91-7501-364-0, TRITA-BIO Report 2012:6, ISSN 1654-2312.
8. **Pang J. F., Kluetsch C., Zou, X. J., Zhang A. B., Luo L. Y., Angleby H., Ardalan A., Ekström C., Sköllermo A., Lundeberg J., Matsumura S., Leitner T., Zhang Y. P. & Savolainen P., 2009.** mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol Biol Evol*, 26, 2849-64.
9. **Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.

NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF MITOCHONDRIAL D-LOOP REGION OF PHU QUOC RIDGEBACK DOG

Nguyen Hung Cuong, Nguyen Thi Dieu Thuy

SUMMARY

Phu Quoc ridge-back dog is one of the precious breeds of Vietnam, possessing many good characteristics. In the current study, the mtDNA D-loop region of Phu Quoc ridge-back dog was sequenced and analysed. High nucleotide similarity was observed in mtDNA D-loop sequence of three samples, in which nucleotide substitutions at 15464: C->G was detected in Phu Quoc dog only. Most highly polymorphic sites were identified at different sites: 15627: A->G; 15639: T->A/G; 15955: C->T, and two others at 16431 and 16672. Phylogenic tree showed the samples were clustered in to haplogroup A and B based on their nucleotide polymorphism of D-loop sequence.