

PHÂN TÍCH TÍNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA GÀ CÁY CÙM BẰNG CHỈ THỊ MICROSATELLITE

Bùi Thị Thơm*, Ma Thị Trang, Trần Văn Phùng
Viện Khoa học Sự sống – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Gà Cáy Cùm là một giống gà nội được nuôi từ rất lâu đời tại khu vực miền núi phía Bắc Việt Nam. Chúng mang nhiều đặc tính quý nổi trội như có phẩm chất thịt thơm ngon, giòn, ngọt, có khả năng đề kháng rất cao và đặc biệt gà Cáy Cùm là loại gà đuôi cụp không có phao câu. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân tích tính đa dạng di truyền của quần thể gà Cáy Cùm bằng chỉ thị phân tử microsatellite. Hai mươi locus microsatellite được sử dụng để phân tích kiểu gen trên 40 cá thể gà Cáy Cùm và so sánh với một số giống gà bản địa khác của Việt Nam. Tổng số 238 alen được xác định và trung bình số alen trên một locus là 11,9, tần số dị hợp tử quan sát của gà Cáy Cùm là 0,61, hệ số cận huyết là 0,06. Khoảng cách di truyền của gà Cáy Cùm với năm giống gà đối chứng là rất xa, điều này phản ánh sự khác biệt về mặt di truyền của gà Cáy Cùm so với các giống gà khác.

Từ khóa: tính đa dạng di truyền, microsatellite, gà Cáy Cùm, alen, gà nội

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một quốc gia có tài nguyên thiên nhiên đa dạng và phong phú, đặc biệt là hệ thống động thực vật [5], [6]. Tuy nhiên tính đa dạng của hệ động vật ở Việt Nam, đặc biệt là một số quần thể vật nuôi bản địa ở các khu vực miền núi đang bị đe dọa do sự xâm nhập của các giống ngoại nhập có năng suất cao [3], [4]. Chính vì thế, nghiên cứu tính đa dạng di truyền, tiến hành bảo tồn và phát triển các giống vật nuôi bản địa đang là nhiệm vụ quan trọng của các nhà khoa học.

Gà Cáy Cùm là một trong những giống vật nuôi bản địa mang nhiều đặc tính di truyền quý, chúng có diện tích phân bố khá hẹp. Hiện nay, gà Cáy Cùm chỉ được phát hiện tại một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam như Cao Bằng, Hà Giang với số lượng nhỏ được nuôi rải rác trong các nông hộ. Gà Cáy Cùm có màu lông đa dạng: lông màu vàng nhạt có sọc nâu, con trống có lông đen pha đỏ thẫm, xám, trắng, lá chuối khô... Gà có móng chân dài sắc, cánh phát triển bay nhảy tốt, hình dáng cơ thể nhỏ gọn và đặc biệt có phần đuôi cụp (không có phao câu) khác biệt hẳn với các giống gà khác. Giống gà Cáy Cùm mang những đặc điểm di truyền quý như phẩm chất thịt ngọt, giòn, thơm ngon đặc trưng, có sức

sống và bản năng sinh tồn mãnh liệt, khối lượng trưởng thành chỉ 1,3 – 1,5 kg ở gà mái, con trống 1,6 – 1,8 kg. Con mái đẻ trứng sớm, khối lượng trứng trung bình 54g, chất lượng trứng nhiều lòng đỏ thơm ngon hấp dẫn.

Để đánh giá đa dạng di truyền và quan hệ họ hàng giữa các quần thể sinh vật, có thể sử dụng các chỉ thị hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử [7]. Trong đó sử dụng các chỉ thị sinh học phân tử với nhiều ưu điểm nổi trội như độ chính xác cao, số lượng chỉ thị không hạn chế, không phụ thuộc vào môi trường và mô [8]. Cho đến nay đã có nhiều loại chỉ thị phân tử DNA được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền như: RFLP, RAPD, AFLP, minisatellite, microsatellites, phân tích trình tự DNA ty thể [1], [2], [7], [8]. Trong đó, sử dụng chỉ thị microsatellite có nhiều lợi thế như có nhiều locus trong hệ gen, đa hình cao, nhiều alen trong một locus, chi phí vừa phải... do đó, chỉ thị microsatellite đã nhanh chóng trở thành những chỉ thị hữu hiệu và được sử dụng trong các nghiên cứu di truyền quần thể [1], [2], [8].

Mục đích của nghiên cứu này là phân tích tính đa dạng di truyền của quần thể gà Cáy Cùm bằng chỉ thị microsatellite, đồng thời so sánh với kết quả phân tích trên một số giống gà địa phương khác ở Việt Nam nhằm phục vụ cho công tác bảo tồn và phát triển giống gà Cáy Cùm.

* Tel: 0985382125 Email: buithom@gmail.com

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU*Thu mẫu*

Thu thập 40 mẫu máu của gà Cáy Cùm tại tỉnh Cao Bằng cùng 247 mẫu đối chứng của năm giống gà địa phương khác là 55 mẫu gà Đông Cảo, 55 mẫu gà Mía, 55 mẫu gà Ri, 55 mẫu gà Tàu, 27 mẫu gà nhiều cựa. Các mẫu máu được thu từ tĩnh mạch cánh và bảo quản trong dung dịch EDTA trong -20°C .

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tiến hành tách chiết từ các mẫu máu theo bộ kit tách DNA của hãng Qiagen (Đức). Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA sau khi tách chiết được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và trên máy đo quang phổ kế.

Nhân DNA đặc hiệu

Hai mươi cặp mỗi microsatellite được sử dụng theo dự án AVIANDIV dùng để đánh giá các đặc điểm di truyền quần thể gà và được chuẩn hóa trong năm phản ứng PCR đa môi. Mỗi phản ứng PCR đa môi được thực hiện với tổng thể tích 25 μl gồm có các thành phần: Đệm PCR 10x, 2 mM mỗi loại dNTP (A,T,G,C), 25 mM Mg^{2+} , 10 pM mỗi môi mỗi loại, 1,5 unit enzyme DNA taq polymerase. Phản ứng PCR đa môi được thực hiện theo chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút, 30-35 chu kỳ với: 94°C trong 30-45 giây, 55°C trong 30-45 giây, 72°C trong 30-45 giây, 72°C trong 10 phút.

Phân tích đa hình alen các locus microsatellite

1 μl của tất cả các sản phẩm multiplex-PCR sau khi bổ sung 25 μl đệm Sample Loading Solution Beckman Coulter và 0,15 μl thang DNA chuẩn (DNA size standard Beckman Coulter) được tiến hành phân tách bằng hệ thống điện di mao quản trên máy giải trình tự tự động CEQ8000 của hãng Beckman Coulter. Kích thước các alen được phân tích tự động bằng phần mềm Genetics analysis system cho máy CEQ8000 phiên bản 9.0.

Phân tích thống kê

Một số các chỉ tiêu như: Số lượng alen, trung bình số lượng alen trên mỗi locus, tần số dị

hợp tử quan sát (H_0), dị hợp tử lý thuyết (H_e), các giá trị thống kê F theo Wright (Wright's F-statistics), khoảng cách di truyền, hệ số cận huyết F_{is} được ước lượng bằng phần mềm Genetix. Phân tích mối quan hệ di truyền, thiết lập sơ đồ hình cây giữa các nhóm, giống bằng phần mềm Population và Treeview. Sự cân bằng di truyền theo định luật Hardy-Weinberg của từng locus được kiểm tra bằng phần mềm Genepop. Giá trị thông tin đa hình (PIC) của mỗi locus được tính theo:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i p_j^2$$

Trong đó: p_i, p_j là tần số của alen i và j , k là số lượng alen của mỗi locus.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**Số lượng và tần số của các alen**

Kết quả phân tích 20 locus microsatellite trên tổng số 287 mẫu gà trong đó có 40 mẫu gà Cáy Cùm và 247 mẫu của năm giống gà đối chứng thu được tổng số 238 alen và trung bình số alen trên mỗi locus cho toàn bộ mẫu phân tích là 11,9. Kết quả này cao hơn so với các nghiên cứu trước đây trên giống gà của Đài Loan và Việt Nam [2], [8].

Tổng số alen thu được từ phân tích gà Cáy Cùm là 124 alen và trung bình số alen trên một locus là 6,2. Số alen của mỗi locus dao động từ 3 ở locus MCW098, MCW022, MCW037, MCW330 đến 15 alen ở locus LEI09. Kết quả thu được từ bảng 2 cho thấy tổng số alen phân tích được của gà Cáy Cùm thấp hơn các giống gà khác như gà Mía (153), gà Tàu Vàng (155), gà nhiều cựa (140). Bên cạnh đó tần số alen của mỗi locus trên gà Cáy Cùm cũng khác biệt so với các giống gà khác, thể hiện có 15 alen chỉ xuất hiện trên gà Cáy Cùm như ở locus MCW216 alen 151, locus MCW014 alen 171, locus LEI234 alen 251 và 259, locus LEI192 alen 285; 339; 453 và 461... Sự xuất hiện các alen đặc trưng và khác nhau về tần số alen của các locus microsatellite ở mỗi giống là những yếu tố làm nên sự sai khác di truyền giữa các giống.

Bảng 1. Danh sách các cặp môi microsatellite, vị trí trên nhiễm sắc thể, nhiệt độ gắn môi và khoảng cách thước các alen

Locus	NST	Trình tự môi (5' -> 3') xuôi (ở trên), môi ngược (ở dưới)	Tm	GeneBank	Khoảng alen
MCW295	4	ATCACTACAGAACACCCCTCTC TATGTATGTGACCCAGATATCC	60	G32052	88-106
ADL112	10	GGCTTAAGCTGACCCATTAT ATCTCAAATGTAATGCGTGC	58	G01725	120-134
MCW216	13	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	60	AF030586	139-149
MCW014	6	TATTGGCTCTAGGAAGTGTG GAAATGAAGGTAAGACTAGC	58	L40040	164-182
MCW098	4	GGCTGCTTTGTGCTCTTCTCG CGATGGCGTAATGTCAAGT	60	L40074	261-265
MCW078	5	CCACACGGAGAGGAGAAGGTCT TAGCATATGAGTGTACTGAGCTTC	60	L43686	135-147
MCW111	1	GCTCCATGTGAAGTGGTTTA ATGTCCACTTGTCAATGATG	60	L48909	96-120
MCW222	3	GCAGTTACATTGAAATGATTTCC TTCTCAAACACTAGAGAAGAC	60	G31996	220-226
LEI094	4	GATCTCACAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	60	X83246	247-287
MCW183	7	ATCCCAGTGTGAGTATCCGA TGAGATTACTGGAGCCTGCC	58	G31974	296-326
LEI234	2	ATGCATCAGATTGGTATTCAA CGTGGCTGTGAACAAATATG	60	Z94837	216-364
LEI192	6	TGCCAGAGCTTCAGTCTGTG GCATTAAGTATGTTTATTGTC	60	Z83797	244-370
ADL268	1	CTCCACCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	60	G01688	102-116
MCW037	3	ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA GAAAGCTCACATGACACTGCGAAA	64	L43676	154-160
MCW067	10	GCCTACTGTGTGCTGCAGTTT GAGATGTAGTTGCCACATTCCGAC	60	G31945	176-186
MCW206	2	ACATTAAGACTGACTGTAC CTTGACAGTGTGATTAATG	60	AF030579	221-249
MCW248	W29	GTTGTTCAAAGAAGATGCATG TTGCATTAAGTGGGCACTTTC	60	G32016	205-225
MCW081	5	GTTGCTGAGAGCCTGGTGACG CCTGTATGTGGAATTACTTCTC	60	L43636	112-135
LEI166	3	CTCCTGCCCTTAGCTACGCA TATCCTCTGGAGTTT	60	X85531	354-370
MCW330	17	TGGACCCTCATCAGTCTGACAG AATGTTTCATAGAGTTCCTGC	60	G32085	256-300

Bảng 2. Số lượng alen được xác định của từng locus trên môi quần thể gà nghiên cứu

Locus	Đông cao	Mía	Ri	Tàu Vàng	Nhiều cựa	Cáy Cùm	Toàn bộ 6 quần thể
MCW295	6	8	5	9	6	6	10
ADL112	4	4	3	4	4	4	4
MCW216	5	6	4	6	5	4	7
MCW014	6	6	8	7	7	7	10
MCW098	2	3	3	2	2	3	4
LEI234	14	26	15	24	19	12	39
MCW 11	6	5	4	7	6	6	9
MCW 07	2	3	4	4	3	6	6
MCW 22	3	2	4	4	3	3	5
LEI 09	11	12	11	13	9	15	21
MCW 18	7	9	8	12	9	8	14
ADL268	5	6	4	5	6	5	8
MCW037	4	4	6	4	3	3	6
MCW067	4	5	6	4	4	6	7
MCW206	8	9	8	8	10	6	15
LEI192	16	18	10	16	16	13	34
MCW081	3	3	4	4	5	5	8
MCW248	4	6	4	5	9	4	9
LEI166	8	7	6	7	7	5	10
MCW330	9	11	9	10	7	3	12

Tần số dị hợp tử và tính đa dạng di truyền

Tần số dị hợp tử lý thuyết (He), tần số dị hợp tử quan sát (Ho), trung bình số alen và hệ số cận huyết (Fis) được tính chính xác ở gà Cáy Cùm và năm giống gà đối chứng được thể hiện ở bảng 3.

Trung bình số alen được xác định ở các nhóm dao động từ 6,2 đến 7,7 trong đó ở gà Cáy Cùm là 6,2. Tần số dị hợp tử quan sát dao động từ

0,54 đến 0,61, trong đó thể hiện cao nhất là ở gà Cáy Cùm (0,61). Kết quả nghiên cứu này cao hơn so với những nghiên cứu trước đây trên một số giống gà của Việt Nam, Đài Loan và Trung Quốc [2], [12]. Kết quả nghiên cứu cho thấy gà Cáy Cùm có tính đa dạng di truyền tương đối cao, tần số dị hợp tử quan sát cao hơn các giống gà khác trong nghiên cứu này (0,61), hệ số cận huyết của gà Cáy Cùm là 0,06 cũng

thấp hơn so với các giống khác. Điều này cho thấy quần thể gà Cáy Cùm được chọn lọc và bảo tồn từ nhiều dòng, gia đình khác nhau nên chúng vẫn giữ được tính đa dạng di truyền và tránh được sự giao phối cận huyết.

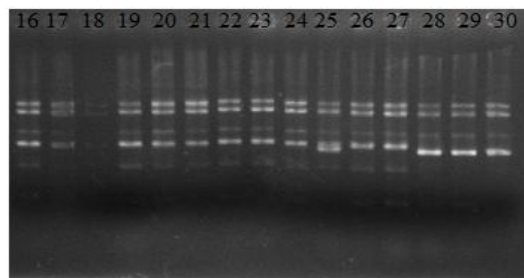
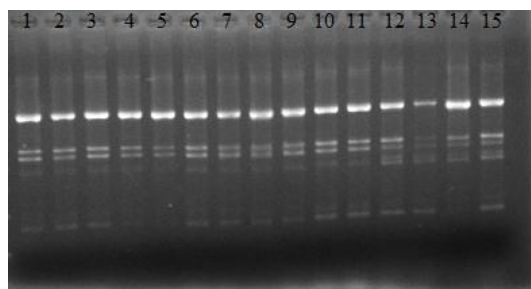
Cây phân loại di truyền

Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa gà Cáy Cùm với các giống gà phân tích được xây dựng theo phương pháp Neighbour Joining (NJ) dựa trên khoảng cách di truyền dưới dạng cây có gốc và không gốc được thể hiện ở hình 2. Qua hình 2 cho thấy cây phân loại được chia thành 2 nhánh giữa gà Cáy Cùm với các giống gà khác, nhánh thứ nhất bao gồm gà Cáy Cùm và gà nhiều cựa, nhánh thứ 2 là gà Mía và Đông Cao, gà Ri và Tàu Vàng.

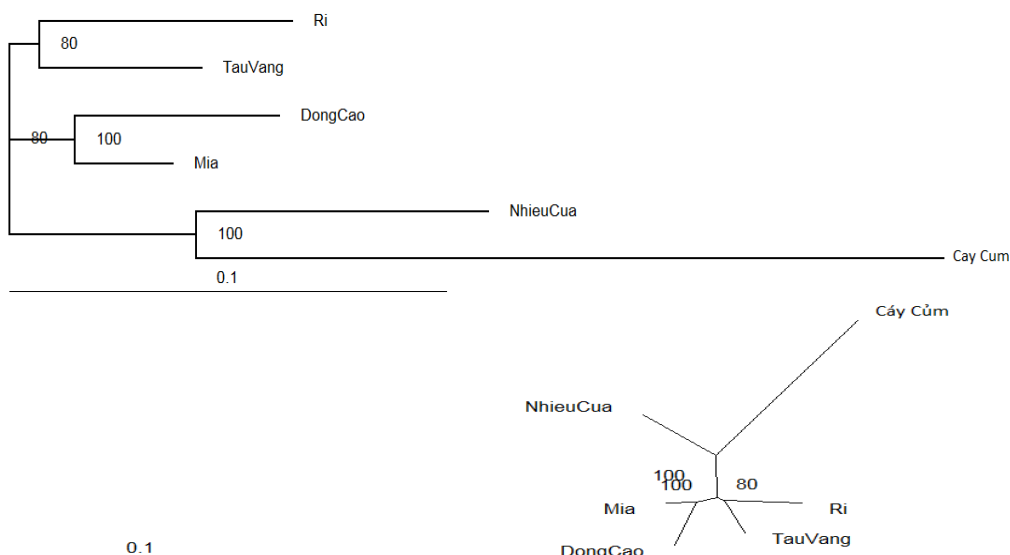
truyền phù hợp với kết quả phân tích khoảng cách di truyền ở bảng 4, gà Cáy Cùm phân thành nhánh rất biệt lập so với các giống gà khác. Giá trị bootstrap giữa các nhánh trên cây phân loại di truyền cao ở hình 2 thể hiện mức độ tin cậy của việc xây dựng cây phân loại về mối quan hệ di truyền giữa các giống gà.

Bảng 3. Tần số dị hợp tử quan sát (Hob), dị hợp tử lý thuyết, trung bình số alen (MNE) và giá trị hệ số cận huyết (Fis) ở các giống gà nghiên cứu

Giống	Hep	Hob	MNE	Fis
Đông Cao	0,60	0,55	6,3	0,10
Mía	0,64	0,54	7,6	0,15
Ri	0,64	0,58	6,3	0,09
Tàu Vàng	0,69	0,59	7,7	0,14
Nhiều cựa	0,67	0,60	7,0	0,10
Cáy Cùm	0,66	0,61	6,2	0,06



Hình 1. Kết quả chạy điện di các mẫu gà Cáy Cùm với chỉ thị MCW098



Hình 2. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa gà Cáy Cùm và một số giống gà khác được xây dựng dựa trên kết quả phân tích microsatellite

KẾT LUẬN

Quần thể gà Cay Cùm nghiên cứu có tính đa dạng di truyền cao thể hiện ở tần số dị hợp tử các locus gen phân tích (0,66) và hệ số cận huyết thấp (0,06). Dựa trên chỉ thị microsatellite, gà Cay Cùm có khoảng cách di truyền rất xa so với các giống gà khác. Giống gà Cay Cùm cần được bảo tồn và phát nguồn gen để duy trì tính đa dạng di truyền nguồn gen gà của Việt Nam nói riêng và thế giới nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cuc N. T. K., H. Simianer, H. Eding, H. V. Tieu, and V. C. Cuong et al. (2010), "Assessing genetic diversity of Vietnamese local chicken breeds using microsatellites", *Anim. Genet.*, 41, pp. 545–547.
2. Cuc N. T. K., S. Weigend, H. V. Tieu, and H. Simianer (2011), "Conservation priorities and optimum allocation of conservation funds for Vietnamese local chicken breeds", *J. Anim. Breed. Genet.*, 128, pp. 284–294.
3. Berthouly, C., G. Leroy, V. T. Nhu, H. H. Thanh, and B. Bed'Hom et al. (2009), "Genetic

analysis of local Vietnamese chickens provides evidence of gene flow from wild to domestic populations", *BMC Genet.*, 10:1, pp. 1

4. Besbes B., M. Tixier-Boichard, I. Hoffmann, and G. L. Jain (2008), "Future trends for poultry genetic resources", *Proceedings of the International Conference of Poultry in the 21st Century: Avian Influenza and Beyond 2007*, pp. 5-7.
5. Tixier-Boichard, M., F. Leenstra, D. K. Flock, P. M. Hocking, and S. Weigend (2012), "A century of poultry genetics", *Worlds Poult. Sci. J.*, 68, pp. 307–321.
6. Vo Q. (1978), *The life of birds (in Vietnamese)*, Science and Technology Publishing House, Hanoi, Vietnam, pp. 1–151.
7. Dessie T., N. Dana, W. Ayalew, and O. Hanotte (2012). "Current state of knowledge on indigenous chicken genetic resources of the tropics: domestication, distribution and documentation of information on the genetic resources", *Worlds Poult. Sci. J.*, 68, pp. 11–20.
8. Pham Manh Hung (2013), *Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Asian domestic chicken populations base on microsatellites*, PhD thesis. National Chung Hsing University, Taiwan.

ABSTRACT

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF A NATIVE CHICKEN BREED – 'THE CAYCUM' USING MICROSATELLITE MARKER

Bui Thi Thom*, Ma Thi Trang, Tran Van Phung

Institute of Life – TNU

The Cay Cum, a favorite native chicken breed, has been domesticated for hundreds of years in North mountainous regions in Vietnam. They have acquired several particular characteristics, such as, premium chicken quality, rumpless, and highly resistance to diseases. As genetic diversity investigation is the main goal of this paper, twenty microsatellite loci were used to detect genetic diversity over a number of 40 individuals, and compared to other local breeds in Vietnam. Totally, 238 alleles were found. Allelic polymorphism is at the value of 11.9. The observed heterozygosity, and inbreeding coefficient are 0.61, and 0.06, respectively. Using 5 controls, the significant difference in genetic distance of this tailless chicken further suggest unrelated relationships with the others.

Key words: *genetic diversity, microsatellite, Cay Cum chicken, allele, native chicken*

Ngày nhận bài: 08/8/2017; Ngày phản biện: 06/9/2017; Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

* Tel: 0985382125 Email: buithom@gmail.com