

ĐA HÌNH TRÌNH TỰ VÙNG ĐIỀU KHIỂN (D-LOOP) HỆ GEN TY THỂ CỦA GÀ RI, GÀ ĐÔNG TẢO VÀ GÀ TRE

Lê Tiến¹, Nguyễn Đăng Tôn², Vũ Hải Chi², Địch Thị Kim Hương², Lê Thị Thúy³, Nông Văn Hải²

¹Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học

³Viện Chăn nuôi

TÓM TẮT

Với các đặc tính như di truyền theo dòng mẹ, số lượng bản sao lớn, tốc độ đột biến cao và không tái tổ hợp, DNA ty thể được coi là công cụ hữu hiệu trong nghiên cứu lịch sử tiến hóa của gà nhà (*Gallus gallus domesticus*). DNA ty thể có tỷ lệ đột biến thay thế nucleotide rất cao, nhất là ở trong vùng điều khiển (vùng D-loop). Các đột biến này đóng vai trò rất quan trọng trong việc tìm ra nguồn gốc gà nhà. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự vùng D-loop hệ gen ty thể của 3 giống gà địa phương Việt Nam: Ri, Đông Tảo và Tre. Cặp mỗi bảo thủ L16725 và H1255 được sử dụng để khuếch đại vùng D-loop của 45 mẫu gà nghiên cứu. Trình tự 609 nucleotide từ vị trí 21 đến vị trí 629 được xác định, so sánh với nhau và so sánh với trình tự chuẩn mang mã số AP003580 trên GenBank. Kết quả cho thấy, có tổng số 387 điểm đa hình ở 45 mẫu nghiên cứu, tương ứng với sự thay đổi nucleotide ở 15 vị trí. Với các số liệu trình tự thu được, 45 mẫu cá thể nghiên cứu được phân vào 6 kiểu đơn bội. Trong đó, gà Ri và gà Đông Tảo thuộc 2 kiểu đơn bội (A và B), gà Tre thuộc 4 kiểu đơn bội (C, D, E, F). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng, trong đó trình tự mang mã số AB009443 trên GenBank của gà rừng đỏ Thái Lan được sử dụng làm nhóm ngoại. Kết quả cho thấy, cây phát sinh chủng loại gồm 2 nhánh. Gà Ri và Đông Tảo thuộc về cùng một nhánh, trong khi đó gà Tre thuộc về cả 2 nhánh của cây phát sinh chủng loại.

Từ khóa: D-loop, đa hình, gà Ri, gà Đông Tảo, gà Tre

MỞ ĐẦU

Ở nước ta có 27 giống gà (*Gallus gallus domesticus*), trong đó có tới 16 giống gà nội. Các giống gà này có ưu việt là phẩm chất thịt, trứng thơm ngon hơn so với gà nhập nội, thích ứng cao với điều kiện khí hậu Việt Nam, chịu được kham khổ, thích hợp với phương thức chăn thả truyền thống và khả năng chống chịu bệnh tật cao (Lê Thị Thúy *et al.*, 2002). Các giống gà địa phương có thể mang những gen quý có thể được sử dụng trong sản xuất. Tuy nhiên, do truyền thống chăn nuôi nhỏ lẻ theo hộ gia đình, các giống gà này thường được chăn thả tự do cùng với các giống gà nội khác ở các địa phương, và với sự du nhập của vật liệu di truyền mới do việc nhập khẩu một cách ồ ạt các giống nhập ngoại nên chúng đứng trước nguy cơ bị lai tạp, mất dần. Do đó, vấn đề bảo tồn nguồn gen các giống gia cầm quý hiếm là một yêu cầu bức thiết của thực tế. Nghiên cứu đa dạng di truyền các giống vật nuôi là bước đầu tiên trong quy trình tiến tới mục tiêu bảo tồn và cải tiến nguồn gen.

Hệ gen ty thể (mtDNA), là một công cụ thường sử dụng trong các nghiên cứu về đa dạng di truyền, được chọn trong công trình này (Berlin, Ellegren,

2001; Nông Văn Hải, Phan Văn Chi, 2003). DNA ty thể có hai vùng chức năng chính vùng mã hóa và vùng điều khiển (vùng D-loop) không được dịch mã, vùng này chứa các trình tự khởi đầu cho quá trình tái bản và các trình tự điều khiển quá trình phiên mã của các gen trong vùng mã hóa. Vùng D-loop tiến hóa nhanh hơn nhiều so với các vùng khác của hệ gen ty thể, vì vậy nó là vùng thích hợp và có giá trị nhất trong phân tích di truyền quần thể, đặc biệt là đối với các nghiên cứu biến đổi di truyền bên trong loài (Fu *et al.*, 2001; Nguyen Dang Ton *et al.*, 2008). Những nghiên cứu gần đây liên quan tới việc phân tích trình tự mtDNA gà từ các mẫu vật thời tiền sử đã góp phần làm sáng tỏ giả thuyết cho rằng gà được đưa vào Nam Mỹ từ quần đảo Polynesia (Storey *et al.*, 2007), điều đó cũng cho thấy vai trò rất quan trọng của trình tự vùng D-loop ty thể trong việc xác định lịch sử thuần hóa của gà nhà (Kanginakudru *et al.*, 2008).

Như vậy, xác định và so sánh trình tự mtDNA nhất là trình tự vùng D-loop là phương pháp có độ tin cậy cao được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu di truyền quần thể. Kể từ khi trình tự toàn bộ hệ gen ty thể gà được Desjardins và Morais (1990) công bố lần đầu tiên, việc nghiên cứu DNA ty thể

gà đã và đang được phát triển tương đối rộng rãi với hàng nghìn trình tự được đăng ký trên GenBank. Trình tự hệ gen ty thể đã được sử dụng thành công trong việc xác định đa dạng di truyền của gà châu Á (Fumihito *et al.*, 1996; Niu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Komiyama *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2007; Kanginakudru *et al.*, 2008). Những dữ liệu này đã góp phần giúp hiểu rõ hơn về quá trình thuần hóa và quan hệ di truyền của các giống gà.

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về đa hình di truyền của các giống gà đã được công bố. Nguyễn Hải Hà và đồng tác giả (2000) đã chọn dòng thành công vùng D-loop ty thể của 2 cá thể gà Lô vào vector pBluescript KS(-) để phân tích trình tự nucleotide vùng D-loop nhằm so sánh quan hệ di truyền giữa 2 loài. Berthouly và đồng tác giả (2009) đã sử dụng 30 marker vi vệ tinh trên 1082 mẫu gà làm công cụ phân tử để nghiên cứu về cấu trúc di truyền của quần thể gà H'Mong thuộc tỉnh Hà Giang và đưa ra bằng chứng di truyền về hiện tượng tạp giao của nhóm gà này với gà rừng *G. gallus*. Nguyễn Đăng Tôn và đồng tác giả (2008) đã xác định trình tự 300 nucleotide từ vị trí 131 đến vị trí 430 của 80 mẫu thuộc 4 giống gà Ri, Tre, Chọi và Tàu Vàng (mỗi giống 20 mẫu), qua đó xác định được 21 vị trí đa hình nucleotide (Nguyen Dang Ton *et al.*, 2008).

Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu đánh giá tính đa dạng di truyền của 45 mẫu gà thuộc 3 giống gà Ri, Đông Tào, Tre. Đây là 3 giống gà đặc hữu ở Việt Nam với các đặc điểm kiểu hình đặc trưng riêng. Gà Ri là giống gà được nuôi phổ biến rộng rãi nhất so với các giống gà nội khác. Gà Ri có ngoại hình thon nhỏ, đầu mỏ nhỏ, mào cờ có răng cưa, mào đỏ tươi; mào phát triển ở con trống, con mái mào không phát triển; cổ thanh nhỏ dài vừa phải; ngực lép, bụng thon mềm; chân có hai hàng vẩy màu vàng có khi xen lẫn màu đỏ tươi. Gà Đông Tào: có nguồn gốc từ tỉnh Hưng Yên. Gà có dáng to, thô, đầu và ống chân rất to, ngón chân mập mấp, chân có vẩy thịt, mào kép, mào nụ, da màu vàng. Gà Tre: có lâu đời ở vùng Đông Nam Bộ, con trống có màu lông sặc sỡ: tia đen, nâu sáng, vàng chuối... lông đuôi dài, mào nụ, chân cao, săn chắc; con mái thường có màu đen (ô), đốm hoa mơ, vàng, nâu đất... nhưng kém sặc sỡ hơn. Tính đa dạng di truyền của 3 giống gà này được đánh giá thông qua việc khuếch đại, xác định và so sánh trình tự vùng D-loop hệ gen ty thể.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các mẫu sử dụng trong nghiên cứu được Viện Chăn nuôi cung cấp, gồm 15 mẫu gà Ri (Hà Nội), 15 mẫu gà Đông Tào (Hưng Yên), 15 mẫu gà Tre (Long An). DNA tổng số sử dụng trong phạm vi đề tài này được tách chiết từ máu theo quy trình của QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen).

Cặp mồi được sử dụng là L16725 (5'-AGGACTACGGCTTGAAAAGC -3') và H1255 (5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC -3') được thiết kế dựa theo các tài liệu công bố trước đây (Desjardins, Morais, 1990; Fu *et al.*, 2001; Komiyama *et al.*, 2004; Xiaojing Guan *et al.*, 2007). Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp từ các hãng Fermentas, Merck, Invitrogen và Sigma-Aldrich.

Phương pháp nghiên cứu

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR), nhằm nhân vùng D-loop, được tiến hành với tổng thể tích 50 μ l bao gồm: 1X PCR buffer, 20 pmol mồi mỗi loại, 2 unit *Taq* polymerase, 1 mM dNTPs, ~ 30 ng DNA tổng số. Việc nhân vùng D-loop được tiến hành trên máy GenAmp® PCR System 9700 (ABI) với chu trình nhiệt: 95°C - 5 phút; 30 chu kỳ (95°C - 30 giây, 55°C - 50 giây 72°C - 120 giây); 72°C - 10 phút.

Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 0,8% và tinh sạch bằng kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

Trình tự đoạn D-loop được xác định trên máy phân tích trình tự DNA tự động ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm DNA Sequencing Analysis v5.3.1, SeqScape® v2.6 và BioEdit v7.0.9.

Cây phát sinh chủng loại của 45 mẫu gà được xây dựng theo phương pháp NJ (neighbor-joining) và phương pháp ML (maximum likelihood) (Tamura *et al.*, 2007), thông qua phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v4.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại vùng D-loop

Vùng D-loop được nhân bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi H1255 và L16750. Đây là cặp mồi bảo thủ, nó có thể được sử dụng cho nhiều loài, giống khác

nhau trong bộ gà, khi sử dụng cặp mồi này, chúng tôi dự tính sẽ nhận được đoạn D-loop có kích thước 1227 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% cho thấy các băng DNA đều sáng đậm, rõ nét, có kích thước phân tử vào khoảng 1,3 kb, phù hợp với tính toán lý thuyết.

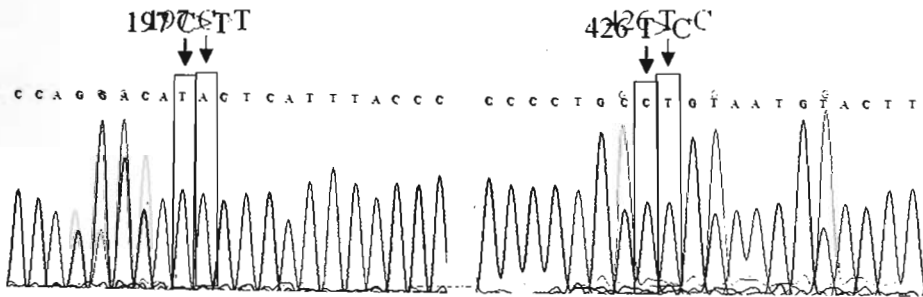
So sánh trình tự nucleotide của các mẫu nghiên cứu với trình tự chuẩn trên GenBank

Trình tự 609 nucleotide của 45 mẫu thuộc 3 giống gà Ri, Đông Tảo, Tre, được xác định bằng mồi L16725, sau khi phân tích được so sánh với trình tự gà White Leghorn gốc Nhật Bản mang mã số AB003580 trên GenBank.

Kết quả cho thấy, các mẫu nghiên cứu có khá nhiều vị trí đa hình so với trình tự chuẩn. Tổng cộng 45 mẫu có 387 điểm đa hình, tương ứng với sự thay đổi nucleotide ở 15 vị trí so với trình tự gà White Leghorn. Đây là một con số khá lớn song nó phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy vùng điều khiển D-loop có tần số đột biến cao nhất trong hệ gen ty thể. Có thể đây là các vị trí nucleotide nhạy cảm với các yếu tố môi trường ảnh hưởng tới quá trình tái bản của mtDNA. Thêm vào đó, do sự tái bản

của mtDNA thiếu cơ chế sửa chữa nên sự thay thế nucleotide được di truyền qua các thế hệ, tạo thành điểm đa hình giữa các mẫu (Li *et al.*, 1998). Mẫu có ít vị trí đa hình nhất là 5 vị trí, trong khi đó mẫu có nhiều vị trí đa hình nhất là 10 vị trí. Các vị trí có sự sai khác với trình tự chuẩn chủ yếu xảy ra sự thay thế C bằng T hoặc T bằng C: trong tổng số 387 điểm đa hình của 45 mẫu có tới 210 điểm có sự thay thế C bằng T, chiếm tỷ lệ 54,26% và tương ứng với 8/15 vị trí sai khác nucleotide so với trình tự AP003580; 140 điểm xảy ra sự thay thế T bằng C, chiếm tỷ lệ 36,18% và tương ứng với 5/15 vị trí; vị trí 192 thay thế G bằng A với 30 điểm đa hình chiếm tỷ lệ 7,75%; vị trí 261 thay thế A bằng G với 7 điểm đa hình chiếm tỉ lệ 1,81%.

Trong 3 giống gà nghiên cứu thì gà Ri có 10 vị trí xảy ra sự thay thế nucleotide với tổng số 146 nucleotide bị thay thế, gà Đông Tảo có 10 vị trí thay thế với 140 nucleotide bị thay thế và gà Tre có 101 nucleotide bị thay thế tương ứng với 12 vị trí nucleotide. Các vị trí đa hình hay gặp nhất ở các mẫu nghiên cứu là *C223T* (38 mẫu), *C236T* (38 mẫu), *T241C* (42 mẫu), *T290C* (38 mẫu). Đặc biệt, đa hình *C197T* và *T426C* là 2 đa hình có ở cả 45 mẫu nghiên cứu (Hình 1).



Hình 1. Hai đa hình có mặt trên toàn bộ 45 mẫu nghiên cứu.

Đáng chú ý là sự thay thế nucleotide ở gà Đông Tảo rất giống với gà Ri, 10 vị trí xảy ra sự thay thế nucleotide ở gà Đông Tảo đều có ở gà Ri, qua đó cho thấy sự đồng nhất đáng kể về mặt di truyền giữa các mẫu thuộc 2 giống nghiên cứu, điều này cũng phù hợp với sự gần gũi về phân bố địa lí của 2 giống này, gà Đông Tảo có ở tỉnh Hưng Yên còn gà Ri tập trung chủ yếu ở các tỉnh miền Bắc trong đó có Hưng Yên. Cả 2 giống gà đều có 6 vị trí xảy ra sự thay thế C bằng T (các vị trí 197, 223, 226, 236, 276 và 295), 3 vị trí xảy ra sự thay thế T bằng C (vị trí 241, 290 và

426), vị trí 192 thay thế G bằng A. Với các mẫu gà Tre, trong 12 vị trí xảy ra sự thay thế nucleotide thì có tới 7 vị trí mà sự thay thế giống với gà Ri và gà Đông Tảo (các đa hình *C197T*, *C223T*, *C236T*, *T241C*, *T290C*, *C295T* và *T426C*), điều này cho thấy sự gần gũi về mặt di truyền của 3 giống gà nghiên cứu. Thêm vào đó, gà Tre còn có 5 vị trí nữa có sự sai khác với trình tự gà White Leghorn (các đa hình *T147C*, *C205T*, *A261G*, *T286C* và *C371T*), ngoài ra ở gà Tre không có 3 đa hình *G192A*, *C226T* và *C276T*. Sự khác biệt này của gà Tre so với gà Ri và

gà Đông Tào cũng phù hợp với sự phân bố của gà Tre, giống này tập trung chủ yếu ở các tỉnh Đông Nam Bộ, đây là khu vực không có sự sinh sống của gà Đông Tào còn sự có mặt của gà Ri cũng không phổ biến như ở miền Trung và miền Bắc.

Trên cơ sở trình tự nucleotide thu được, chúng tôi tiến hành phân loại các mẫu nghiên cứu vào các kiểu đơn bội khác nhau. Kết quả, 45 mẫu của 3 giống gà được phân vào 6 kiểu đơn bội ký hiệu theo thứ tự từ A đến F (Bảng 1).

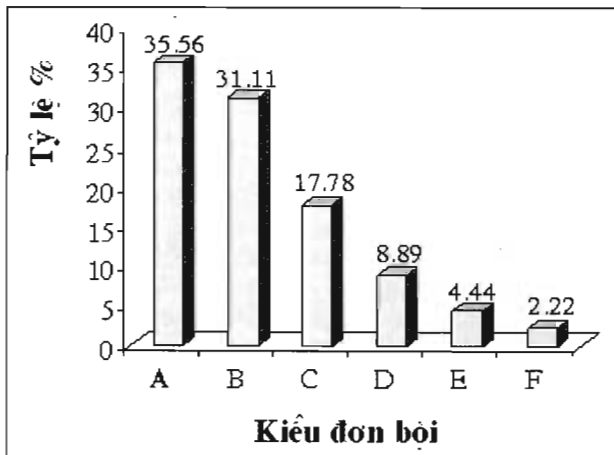
Theo kết quả bảng 1 gà Ri thuộc 2 kiểu đơn bội là A (11 mẫu) và B (4 mẫu). Gà Đông Tào thuộc 2 kiểu đơn bội là A (5 mẫu) và B (10 mẫu). Các mẫu gà Ri và gà Đông Tào đều thuộc về 2 kiểu đơn bội A và B, điều đó cho thấy mối quan hệ gần gũi giữa 2

giống gà này. Trong khi đó, gà Tre thuộc 4 kiểu đơn bội là C (8 mẫu), D (4 mẫu), E (2 mẫu) và F (1 mẫu), qua đó cho thấy sự biến đổi di truyền đáng kể bên trong nội bộ giống gà Tre.

Trong 6 kiểu đơn bội thì kiểu đơn bội A có số lượng mẫu nhiều nhất: 16/45 mẫu, chiếm tỷ lệ 35,56% tổng số mẫu nghiên cứu; kiểu đơn bội B có 14 mẫu, chiếm 31,11%. Kiểu đơn bội C, D, E, và F chỉ tìm thấy ở gà Tre. Kiểu đơn bội C được tìm thấy có 8 mẫu, chiếm tỷ lệ 17,78%; kiểu đơn bội D có 4 mẫu, chiếm tỷ lệ 8,89%; kiểu đơn bội E có 2 mẫu, chiếm tỷ lệ 4,44% và kiểu đơn bội F chỉ có 1 mẫu, chiếm tỷ lệ 2,22%. Tần số phân bố của các kiểu đơn bội vùng D-loop hệ gen ty thể 3 giống gà nghiên cứu được minh họa trên hình 2.

Bảng 1. Sự phân bố của 45 mẫu gà nghiên cứu vào các kiểu đơn bội.

Kiểu đơn bội	Giống gà	Số mẫu	Vị trí đa hình
A	Ri	11	G192A, C197T , C223T, C226T, C236T, T241C, C276T, T290C, C295T, T426C
	Đông Tào	5	
B	Ri	4	G192A, C197T , C223T, C226T, C236T, T241C, T290C, C295T, T426C
	Đông Tào	10	
C	Tre	8	T147C, C197T , C205T, C223T, C236T, T241C, T290C, T426C
D	Tre	4	C197T , C205T, T241C, A261G, T286C, C371T, T426C
E	Tre	2	C197T , T241C, A261G, T286C, T426C
F	Tre	1	C197T , A261G, T286C, C295T, T426C ,



Hình 2. Tần số phân bố của các kiểu đơn bội vùng D-loop hệ gen ty thể 3 giống gà nghiên cứu.

Sự đồng nhất về trình tự nucleotide của 3 giống gà

Phân tích sự đồng nhất giữa các trình tự nucleotide trong từng giống gà theo phương pháp Maximum Composite Likelihood, sử dụng phần mềm MEGA v4.0. Kết quả cho thấy, giống gà Ri có mức độ sai khác là thấp nhất, giá trị hệ số khoảng cách di truyền giữa các mẫu gà Ri là $d = 0,0007$ tiếp đến là gà Đông Tào có $d = 0,0008$ và mức độ sai khác lớn nhất là ở gà Tre ($d = 0,0077$); điều đó có nghĩa là các mẫu thuộc giống gà Ri có độ đồng nhất về trình tự nucleotide là cao nhất 99,93%, tiếp theo là các mẫu thuộc giống gà Đông Tào với độ đồng nhất 99,92% và cuối cùng là các mẫu gà Tre có mức độ đồng nhất là 99,23%.

Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các giống gà nghiên cứu

Phân tích mối quan hệ di truyền của 3 giống gà với gà White Leghorn cho thấy, gà Tre có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất với gà White Leghorn AP003580, giá trị hệ số khoảng cách di truyền của các mẫu gà Tre với gà White Leghorn là $d = 0,0112$, có nghĩa là sự tương đồng về trình tự nucleotide giữa các mẫu gà Tre với gà White Leghorn là 98,88%, gà Đông Tào và gà Ri có khoảng cách di truyền với gà White Leghorn gần tương đương nhau.

Trong 3 phân loài gà rừng đỏ phân bố tại Việt Nam (*G. g. gallus*, *G. g. spadiceus* và *G. g. jabouibi*) có 2 phân loài *G. g. gallus* và *G. g. spadiceus* có trình tự vùng D-loop được đăng ký trên GenBank. Do đó, chúng tôi đã sử dụng trình tự vùng D-loop ga

rừng đỏ Việt Nam mã số AB009434 thuộc phân loài *G. g. gallus* và trình tự mã số NC007235 thuộc phân loài *G. g. spadiceus* để đánh giá mối quan hệ di truyền của 2 phân loài này với 3 giống gà nghiên cứu. Kết quả cho thấy, gà rừng AB009434 có mối quan hệ di truyền gần gũi nhất với gà Tre, giá trị hệ số khoảng cách di truyền của gà rừng AB009434 với gà Tre là 0,0164, giá trị này thấp hơn của nó với gà Đông Tào ($d = 0,0190$) và với gà Ri ($d = 0,0197$). Trong khi đó, gà rừng NC007235 lại có mối quan hệ di truyền gần gũi với gà Ri và gà Đông Tào hơn là với gà Tre, giá trị hệ số khoảng cách di truyền của nó với gà Ri và gà Đông Tào là rất thấp, lần lượt là 0,0012 và 0,0005, trong khi đó giá trị này của gà NC007235 với gà Tre là 0,0113. Kết quả này cũng phù hợp với sự phân bố của các giống gà, phân loài *G. g. gallus* và gà Tre tập trung chủ yếu ở các tỉnh Nam Bộ, trong khi phân loài *G. g. spadiceus* cùng với gà Đông Tào phân bố ở miền Bắc, đây cũng là khu vực phân bố chủ yếu của gà Ri.

Giữa 3 giống gà thì sự sai khác về trình tự nucleotide giữa gà Đông Tào và gà Ri là thấp nhất ($d = 0,0010$), tiếp theo là gà Đông Tào và gà Tre ($d = 0,0119$), sự sai khác lớn nhất về trình tự nucleotide là giữa gà Ri và gà Tre ($d = 0,0126$). Điều đó có nghĩa là trong 3 giống gà Đông Tào, Ri, Tre thì gà Đông Tào và gà Ri có mối quan hệ di truyền gần gũi hơn so với gà Tre, sự đồng nhất về trình tự nucleotide của 2 giống gà này lên tới 99,9%. Mối quan hệ di truyền giữa 3 giống gà nghiên cứu với nhau và với gà White Leghorn AP003580, gà rừng đỏ Việt Nam AB009434 và gà rừng đỏ NC007235 được thể hiện ở bảng dưới đây:

Bảng 2. Mối quan hệ di truyền giữa các giống gà nghiên cứu.

Nhóm mẫu	AP003580	AB009434	NC007235	Đông Tào	Ri	Tre
AP003580	/	0,0134	0,0150	0,0156	0,0163	0,0112
AB009434	0,0134	/	0,0184	0,0189	0,0197	0,0164
NC007235	0,0150	0,0184	/	0,0005	0,0012	0,0113
Đông Tào	0,0156	0,0190	0,0005	/	0,0010	0,0119
Ri	0,0163	0,0197	0,0012	0,0010	/	0,0126
Tre	0,0112	0,0164	0,0113	0,0119	0,0126	/

So sánh mức độ đa dạng di truyền của 3 giống gà nghiên cứu với một số quần thể gà châu Á

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng tiến hành so sánh trình tự vùng D-loop của 45 mẫu gà địa

phương Việt Nam với các trình tự tương ứng (kích thước khoảng 400 - 440 bp) của 834 mẫu gà thu thập trên GenBank (Kanginakudru *et al.*, 2008). Trong số 879 trình tự có 755 trình tự gà nhà, 124 trình tự còn lại thuộc về các phân loài của gà rừng đỏ (RJJ). Tất

cả 879 mẫu được phân vào 9 nhóm căn cứ vào vị trí phân loại của các phân loài và khu vực địa lý mà chúng phân bố (Bảng 3).

Qua bảng trên cho thấy, 45 mẫu gà Việt Nam được phân vào 6 kiểu đơn bội, con số này nếu xét trên tổng số mẫu của từng nhóm gà thì thấp hơn rất nhiều so với các nhóm gà khác, chẳng hạn khi so sánh với 2 nhóm có số lượng mẫu thấp nhất là gà Indonesia (n = 12) và gà rừng *G. g. bankiva* (n = 6), cả hai nhóm này đều tương ứng với 6 kiểu đơn bội. Tất cả các đột biến thay thế nucleotide của nhóm gà Việt Nam đều là đột biến đồng hoán, giống với nhóm gà Indonesia và gà rừng *G. g. bankiva*. Tổng số 45 mẫu gà Việt Nam chỉ có 15 vị trí đa hình trong khi các nhóm khác con số này lớn hơn rất nhiều. Nếu xét trong nội bộ từng nhóm gà thì thì giá trị hệ số khoảng cách di truyền của gà Việt Nam cũng đạt thấp nhất (d = 0,0068), giá trị này thấp hơn rất nhiều so với 8 nhóm gà còn lại chẳng hạn như khi so sánh với gà Ấn Độ và gà Trung Quốc (d = 0,018), gà rừng *G. g. murghi* (d = 0,029). Sự khác biệt đáng kể này cho thấy mức độ đồng nhất di truyền rất cao giữa 3 giống gà Ri, Đông Tảo và gà Tre.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Trên cơ sở trình tự của 45 mẫu gà, chúng tôi đã tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Neighbor-Joining (Hình 3). Trình tự D-loop của gà rừng đỏ Thái Lan mang mã số AB009443 trên GenBank được sử dụng làm nhóm ngoại. Kết quả cho thấy, cây phát sinh chủng loại gồm 2 nhánh, nhánh thứ nhất gồm các mẫu gà Tre, nhánh này ở phần cuối lại chia thành hai nhánh nhỏ. Nhánh thứ hai gồm các mẫu gà Đông Tảo, Ri và Tre; nhánh này nhanh chóng tách thành hai nhánh nhỏ,

một nhánh gồm các mẫu gà Tre, nhánh còn lại gồm các mẫu gà Đông Tảo và gà Ri. Như vậy, gà Tre thuộc về cả hai nhánh của cây phát sinh chủng loại, điều này có thể là do có hai dạng tổ tiên tham gia vào quá trình hình thành. Trong 3 giống gà, giống gà Ri và Đông Tảo có mối quan hệ gần gũi với nhau hơn là so với gà Tre, cả hai giống này cùng thuộc về một nhánh.

KẾT LUẬN

Vùng điều khiển (D-loop) hệ gen ty thể của 45 mẫu thuộc 3 giống gà Đông Tảo, Ri, Tre với kích thước khoảng 1,3 kb đã được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu L16725 và H1255.

Trình tự 609 nucleotide từ vị trí 21 đến vị trí 629 của vùng D-loop của 45 mẫu gà nghiên cứu đã được xác định và phát hiện được 387 điểm đa hình/đột biến, tương ứng với sự thay đổi nucleotide ở 15 vị trí so với trình tự chuẩn White Leghorn AP003580.

Các phân tích về mối quan hệ di truyền cho thấy, gà Đông Tảo và gà Ri có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhau hơn là so với gà Tre, sự đồng nhất về trình tự nucleotide giữa 2 giống gà này là 99,9%; đối với từng giống riêng rẽ thì gà Ri có sự đồng nhất về trình tự nucleotide cao nhất 99,93%. Trong 3 giống gà thì gà Tre có quan hệ di truyền gần gũi nhất với gà rừng đỏ Việt Nam AB009434, trong khi đó gà Đông Tảo và gà Ri có quan hệ di truyền gần gũi hơn với gà rừng đỏ NC007235.

Cây phát sinh chủng loại của 3 giống gà được xây dựng gồm 2 nhánh trong đó gà Tre thuộc về cả 2 nhánh, gà Đông Tảo và gà Ri thuộc về một nhánh.

Bảng 3. So sánh mức độ đa dạng di truyền của gà Việt Nam so với một số quần thể gà châu Á.

Đặc điểm	Gà nhà (<i>G. g. domesticus</i>)					Gà rừng đỏ - RJF (<i>Gallus gallus</i>)			
	Việt Nam	Ấn Độ	Indonesia	Nhật Bản	Trung Quốc	<i>murghi</i>	<i>gallus</i>	<i>spadecius</i>	<i>bankiva</i>
Số mẫu	45	43	12	104	551	56	21	41	6
Số kiểu đơn bội	6	23	6	26	82	42	15	12	6
Đột biến đồng hoán	15	30	16	30	49	45	31	23	8
Đột biến dị hoán	0	20	0	3	9	47	3	4	0
Số vị trí thay thế	15	50	16	33	58	92	34	27	8
Vị trí đa hình	15	55	16	37	55	113	36	29	10
Mức độ đa dạng nucleotide	0,0068	0,018	0,015	0,021	0,018	0,029	0,022	0,023	0,012