XÁC ĐỊNH GIỚI TÍNH CHIM YẾN HÀNG Ở TỈNH QUẢNG NAM BẰNG KỸ THUẬT PCR

HỒ THỊ LOAN, ĐẶNG TẤT THẾ, NGUYỄN MINH ĐỨC
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

VÕ TẤN PHONG
Trường THPT Trần Quý Cáp, Quảng Nam

Ở Quảng Nam chim yến hàng (chim yến) làm tổ tự nhiên ở các hang của 4 đảo Hòn Khô, Hòn Tai, Hòn Ông và Hòn Lao của quần đảo Cù Lao Chàm [1]. Ngoài ra chim yến còn làm tổ ở các nhà xây nhân tạo thuộc các huyện Điện Bàn, Thăng Bình và TP. Hội An [6]. Sự phát triển các công nghệ dẫn dụ đã tạo ra nhiều nhà có chim yến vào làm tổ, tăng quần đàn, tuy nhiên có những nhà có yến vào làm tổ nhưng không tăng quần đàn. Bên cạnh đó trong những năm gần đây do tình hình khai thác tổ Yến quá mức ở địa phương dẫn đến số lượng cá thể trong đàn và chất lượng tổ yến có chiều hướng suy giảm [1]. Xác định tỷ lệ giới tính của đàn là một đặc trưng sinh thái cơ bản và quan trọng trong việc quản lý sự phát triển bền vững quần đàn chim yến. 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, chim yến là loài đồng hình giới tính nên việc xác định giới tính dựa vào hình thái ngoài là rất khó khăn. Nguyễn Quang Phách, 1990 [10] so sánh sự khác nhau giữa lỗ huyệt của chim yến trống và mái để xác định giới tính. Tuy nhiên sự khác nhau này chỉ quan sát được khi chim đã trưởng thành, do đó khó xác định giới tính khi chim yến chưa trưởng thành hoặc từ màng phôi.

Ngày nay những tiến bộ trong sinh học phân tử nhất là kỹ thuật PCR đã giúp các nhà nghiên cứu xác định giới tính của nhiều loài chim đồng hình, con non và màng phôi tương đối dễ dàng. Dựa vào sự khác nhau về kích thước của các vùng không phiên mã của hai gen CHD1Z và CHD1W (Helicase DNA binding protein), gen liên kết với giới tính Z và W ba bộ mồi có ký hiệu P2, P8; 1237L, 1272H; 2550F, 2718R được phát triển bởi Griffiths et al. (1998) [5], Kahn et al. (1998)[7],và Fridolfsson & Ellegren (1999)[3]. Ba bộ mồi này đã được sử dụng rộng rãi để xác định giới tính của nhiều loài chim trừ những loài chim chạy. Trên bản điện di sản phẩm PCR, chim trống đồng hợp tử (ZZ) nên có một vạch, chim mái dị hợp tử (ZW) có 02 vạch có kích thước khác nhau.

Hai bộ mồi P2, P8 và 1237L, 1272H đã được sử dụng để xét nghiệm giới tính của nhiều loài chim [9]. Tuy nhiên chưa có công bố nghiên cứu ứng dụng của 02 bộ mồi để xác định giới tính chim yến. Nghiên cứu của Hồ Thị Loan (2013)[11] cho thấy bộ mồi 2550F, 2718R không khuếch đại đồng thời gen CHD1Z và CHD1W của chim yến mái. Ở nghiên cứu trên do chưa có mẫu của chim yến trống nên trong nghiên cứu này chúng tôi tiếp tục nghiên cứu khả năng xét nghiệm giới tính chim yến bằng kỹ thuật PCR của 03 bộ mồi trên và tìm bộ mồi phù hợp để xét nghiệm giới tính của một số đàn chim yến ở Quảng Nam.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu: 25 mẫu (vỏ trứng, con non, 03 con trưởng thành) thu tại 01 nhà yến ở Thành phố Hội An, tỉnh Quảng Nam kí hiệu NQN1-25. Trong đó 02 cá thể chim yến mái kí hiệu là NQN1, NQN2 và 01 cá thể chim yến trống ký hiệu NQN3 được xác định giới tính theo

Nguyễn Quang Phách (1990) [12]. 25 mẫu con non thu tại đảo Cù Lao Chàm, tỉnh Quảng Nam kí hiệu ĐQN 5-30 chưa xác định giới tính. Tất cả các mẫu được thu vào tháng 8 năm 2013, ngâm trong cồn và bảo quản ở -20^{0}C.

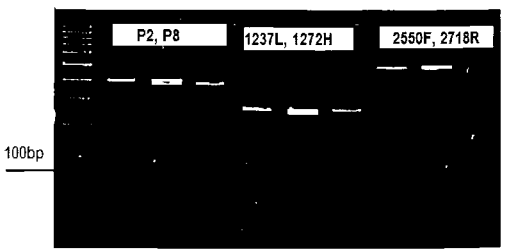
Phương pháp nghiên cứu: DNA tổng số của ba mẫu NQN1, 2 và 3 được tách chiết bằng bộ kít Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Đức), DNA tổng số của các mẫu còn lại được tách chiết bằng chelex 5% theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhân bản một phần vùng gen CHD1 bằng kỹ thuật PCR sử dụng PCR Taq Mastermix (Qiagen) với các cặp mồi: P2,P8; 1237L, 1272H; 2550F, 2718R. Chu trình nhiệt theo Griffiths et al. (1998)[5], Kahn et al. (1998)[7], và Fridolfsson & Ellegren (1999)[3] được thực hiện trên máy Eppendorf Mastercycle. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, 5% và trên gel polyacriamide 8%. Sản phẩm PCR của mẫu NQN1 được giải trình tự theo phương pháp giải trình tự trực tiếp bằng máy AB 3730XL. Trình tự gen được so sánh trực tuyến trên ngân hàng gen (Genbank) bằng phần mềm Blast [4].

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Điện di sản phẩm PCR

Theo thiết kế của Griffiths et al. (1998)[5], Kahn et al. (1998)[7] hai bộ mồi P2, P8 và 1237L, 1272H khuếch đại đoạn gen CHD1W có chiều dài hơn đoạn CHD1Z từ 10-80 bp, trên bản điện di con mái dị hợp từ nhiễm sắc thể giới tính sẽ có hai vạch sản phẩm PCR còn con trống đồng hợp từ nhiễm sắc thể giới tính nên chỉ cho một vạch sản phẩm PCR. Với 02 bộ mồi này khi điện di sản phẩm PCR của chim yến trống và mái trên gel agarose 2%, 5%, chỉ có một vạch sản phẩm PCR, vì vậy chúng tôi điện di trên gel acryamide 8%. Kết quả điện di được thể hiện ở Hình 1.

Ảnh điện di sản phẩm PCR cho thấy: Bộ mồi 2550F và 2718R: Bộ mồi này không khuếch đại gen CHD1Z của chim yến. Trên hình ảnh điện di đo mẫu chim yến trống NQN3 đồng hợp tử giới tính ZZ nên âm tính còn hai mẫu chim yến mái NQN1 và 2 chỉ có một vạch sản phẩm PCR. Trong kỹ thuật PCR có hiện tượng âm giả vì vậy khó xác định chắc chắn mẫu âm tính đó thuộc chim yến trống. Sản phẩm PCR của 02 mẫu chim yến mái và 01 mẫu chim yến trống với bộ mồi 1237L, 1272H đều có kích thước gần 300bp, do vậy không thể phân biệt giới tính chim yến bằng bộ mồi này.



Hình 1: **Ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn DNA đích (M: 100 bp DNA ladder)**

Với bộ mồi P2, P8 sản phẩm PCR mẫu chim yến mái NQN2 có hai vạch có kích thước gần bằng nhau nhưng mẫu chim yến mái NQN1 chỉ có 01 vạch có kích thước gần 400bp và gần bằng kích thước của mẫu chim yến trống NQN3. Như vậy bộ mồi này không khuếch đại đồng thời 02 gen CHD1Z và CHD1W của chim yến mái NQN1 mà chỉ khuếch đại đoạn gen CHD1W có chiều dài gần bằng với đoạn gen CHD1Z của chim yến trống. Hơn nữa, điện di trên gel acryamide khá phức tạp nên bộ mồi này cũng không thích hợp để xét nghiệm giới tính chim yến hàng. Như vậy cả ba cặp mồi P2, P8; 1237L, 1272H; 2550F,2718R đều không thích hợp để xét nghiệm giới tính chim yến.

Dựa vào trình tự một phần gen CHD1W của mẫu NBD2 trong nghiên cứu của Hồ Thị Loan (2013)[11] và vùng gen CHD1Z của các loài *Emberiza leucocephalos*, *Oporornis philadelphia* có mã hiệu genbank GQ370063, GQ368704 [4] để thiết kế mồi nhân bản đoạn gen CHD1Z. Mồi có ký hiệu và trình tự sau: AIF: 5' TGA TTC GTC TAC GAG AAA GT 3'. Sử dụng cặp mồi AIF và 2718R nhân bản vùng gen CHD1Z của 03 mẫu chim yến NQN1, 2 và 3. Giải trình tự mẫu NQN1 kết quả giải trình tự sau:

Giải trình tự đoạn gen đích từ các mẫu nghiên cứu

Đã xác định được trình tự DNA đích của mẫu NQN1 có chiều dài hơn 600 bp. 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 84% với các trình tự gen chromosome Z chromo-helicase-DNA binding protein (CHD1Z) của loài chim cắt lưng xám (*Falco columbarius*) có mã hiệu genbank KF601357 như trong bảng 1. Tuy không có trình tự tương đồng của loài nghiên cứu trên ngân hàng gen, nhưng do trình tự nghiên cứu tương đồng cao với đoạn gen CHD1Z của chim, nên dự đoán nó thuộc nhiễm sắc Z.

Bảng 1

Kết quả so sánh trình tự gen của mẫu NQN1
Falco columbarius chromo-helicase-DNA binding protein-Z (CHDZ) gene, exons 17, 18 and partial cds

Sequence ID: gb|KF601357.1| Length: 630 Number of Matches: 1

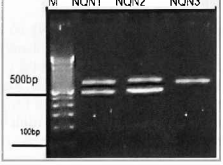
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
620 bits(336)	4e-174	536/620(85%)	16/620(2%)	Plus/Plus

```
Query  1    CGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCCCAGATGGTGAGAATGCTGGACATCCTAGCAGAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  23   CGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATGGTGAGGATGCTGGACATCCTAGCAGAG  82
Query  61   TATCTGAAGTATCGTACAGATTTCCCTTTCAGGTAAAGA-CTTGGTAGTAGTAGCCAAAA  119
            |||||||||||||||| ||| ||||||||||| ||||  | |||||| ||||||||||| |
Sbjct  83   TATCTGAAGTATCGT-CAG-TTTCCCTTTCAAGTAAGAATCTTGGTGGTAGTAGCCAAGA  140
Query  120  AGCTTTCATCTTGAATATAAGAAAAATCTCttttttACTCTGAGGCTGACAGAGAAATG  179
            || ||| |||||||||||||||||||||| ||| |||||||||||| || ||||| | ||
Sbjct  141  AGTTTTGATCTTGAATATAAGAAAAATCT-TTTCTTTACTCTGAGGGTGGCAGAGCACTG  199
Query  180  GAACAAGTTGATCAGTGGTTATGTCATTTCCATCCTTGGTGACATTCACTAGTCACCTGG  239
            ||||||||||  ||| |||||||  || ||||||||  ||||||||||  || ||||| |
Sbjct  200  GAACAAGTTGTCCAGAGGTTATGGAATCTCCATCCTCTGTGACATTCAAAAGCCACCTTG  259
Query  240  GTGTGACCTTGGGCAACCTGCTTTGGCTGTTGTCACCAGAGGAGAGAAGTTAGACTCTAT  299
               |||||||||| |||||| |||  ||||     || ||| || | ||||||||   ||
Sbjct  260  ACATGACCTTGGGGAACCTGATTTACCTGTCCCTGCCTGAGTAGGGGAGTTAGACAAGAT  319
Query  300  GACCTCCACATATCCCTTCTACCCTAAACTGTTTTGGGATTATGTGATTTTTACCACTTT  359
            |||||||| |  ||||||| | ||| |||||||||| |||||||| || ||||||| |||
Sbjct  320  GACCTCCAGAGGTCCCTTCCAACCTCAACTGTTTTGTGATTATGTCATCTTTACCATTTT  379
Query  360  GCTCAAGGAAACATATATGAAGAAGTGTTATTTTTCTAGAAAGACTAGCAATTGCTATAT  419
            ||| ||| ||| ||||| ||| |||||||||||||||||||||| | |||||||| ||||
Sbjct  380  GCTTAAGAAAAGATATAAGAAAAAGTGTTATTTTTCTAGAAAGATTGGCAATTGCAATAT  439
```

```
Query  420  GCTAAATAGTATTTTGAAATTAAACTGATGAACTAAAAAATTAT----A----T-TA--A  468
Sbjct  440  GCTAAATAATATTTTGAAATTAAACTGATGAATTAAAAAATTATGTGAAGTGTTGTATTA  499
Query  469  TGttttttttCCTTCCCTTAACGCTTTTGGCAGCTGAGAATTCCCAGTTGCTCTGATTTTG  528
Sbjct  500  CTTTTTTTTCCTTCACATAACAGTTTTGGCAGCTGAGAATT-CAAGTTGCTCTGATTTTG  558
Query  529  AATATTGTGCAAGAATTACTTTTTAACTGTAGTATTCGATCTCTTTAGAGACTTGATGGA  588
Sbjct  559  AATATAGTATAAGAATTACTTTTTAACTGTAGTATTCAATGTCTTTAGAGACTTGATGGA  618
Query  589  TCAATAAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACT  620
Sbjct  619  TCAATAAAAGGGGAACTGAGGAAACAAGCACT  650
```

Khả năng xét nghiệm giới tính chim yến của bộ mồi AI17F, 2550F và 2781R

Sử dụng 03 mẫu NQN1-3 để kiểm tra khả năng xét nghiệm giới tính chim yến của bộ mồi AIF, 2550F và 2781R. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% được thể hiện ở hình 2



Hình 2: **Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn DNA đích**
*Chú giải.*M: 100 bp DNA ladder

Kết quả điện di cho thấy 02 mẫu chim yến mái kí hiệu NQN1, 2 dị hợp tử nhiễm sắc thể giới tính có 02 vạch trên bản điện di có kích thước khoảng 500bp và 600bp. Mẫu chim yến trống kí hiệu NQN3 đồng hợp tử nhiễm sắc thể giới tính nên chỉ có 01 vạch trên bản điện di có kích thước khoảng 600bp. Kiểm tra kết quả giải trình tự xác nhận đoạn gen có chiều dài 500 bp thuộc gen CHD1W và đoạn gen có chiều dài hơn 600bp thuộc gen CHD1Z do đó bộ mồi này hoàn toàn thích hợp để xét nghiệm giới tính của chim yến. Sử dụng bộ mồi AIF, 2550F và 2781R để xét nghiệm tỷ lệ giới tính của các mẫu chim yến hàng thu được ở yến và đảo yến tỉnh Quảng Nam, kết quả thể hiện ở hình 3.

Hình 3: **Tỷ lệ chim yến trống và mái của chim yến hàng thu tại nhà yến và đảo yến tỉnh Quảng Nam**

Tỷ lệ chim yến mái ở cả các mẫu thu tại nhà yến ở Hội An (55%) và đảo Cù Lao Chàm (60%) cao hơn chim yến trống (45% và 40%). Thông thường tỷ lệ giới tính của chim non mới sinh là 1:1 có nghĩa là 50% cá thể là chim mái và 50% cá thể là chim trống, nhiều nghiên cứu đã chứng minh khi gặp điều kiện sống bất lợi chim tự sẽ điều chỉnh giới tính của đàn thông qua con non. Trong điều kiện tự nhiên, khả năng chịu đựng với những bất lợi môi trường của chim mái kém hơn chim trống, chim tự điều chỉnh giới tính của đàn bằng cách sinh ra nhiều chim mái hơn chim trống [11]. Hơn nữa chim yến là loài rất chung thủy khi đến tuổi sinh sản chúng kết đôi và sống với nhau cho tới khi một cá thể chim bị chết [10]. Chính vì vậy cần nghiên cứu tuổi thọ, tỷ lệ tử vong của từng giống và thường xuyên xét nghiệm giới của hai đàn yến để có kế hoạch khai thác tổ và điều chỉnh môi trường sống hợp lý rất hữu ích cho việc quản lý và phát triển đàn yến ở TP. Hội An và quần đảo Cù Lao Chàm tỉnh Quảng Nam.

III. KẾT LUẬN

03 bộ mồi 2550F, 2718R và P2, P8 và 1237L, 1272H không thích hợp để xác định giới tính chim yến hàng. Thiết kế thành công bộ mồi AIF, 2550F và 2781R để xét nghiệm giới tính chim yến hàng.

Đã xác định thành công giới tính của 50 mẫu chim yến bằng kỹ thuật PCR trong đó nguyên liệu sử dụng bao gồm cả mẫu vỏ trứng đã ấp, con non. Tỷ lệ chim yến mái cao hơn chim yến trống ở cả các mẫu thu tại nhà yến ở Hội An và tại đảo yến Cù Lao Chàm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Đinh Thị Phương Anh, Võ Tấn Phong,** 2011. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh thái của chim Yến hàng trong điều kiện tự nhiên tại Cù Lao Chàm, Hội An, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng, số 3 (44)
2. **Ellegren, H.,** 2000. Trends in Ecology Evolution, 15(5): 188 - 192.
3. **Fridoffsson, A. K., H. Ellegren,** 1999. Avian Biology Journal 30: 116 - 121.
4. **Genbank:** http://www.ncbi.nlm.nih.gov
5. **Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, R. J. Dawson,** 1998. A DNA test to sex most birds, Mol Ecol 7:1071–5.
6. **Lê Hữu Hoàng,** 2014. Tầm quan trọng của công tác quy hoạch và một số giải pháp cơ bản phát triển bền vững nghề nuôi chim yến tại Việt Nam, Kỷ yếu hội thảo khoa học toàn quốc Phát triển nghề nuôi chim yến tại Việt Nam theo hướng bền vững, Hà Nội, tr.26-55.
7. **Kahn, N. W., John J. and Quinn T.,** 1998. Chromosome-specific intron size differences in the Avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds, The Auk, 115: 1074 - 1078.
8. **Hồ Thị Loan, Đặng Tất Thế, Nguyễn Lân Hùng Sơn, Nguyễn Giang Sơn,** 2013. Bước đầu ứng dụng kỹ thuật PCR để xác định giới tính chim Yến hàng - Aerodramus fuciphagus (Thunberg, 1812), Báo cáo khoa học về sinh thái và tài nguyên sinh vật, Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 5, Nxb. Nông nghiệp, trang 1446-1449.
9. **Morinha, F., J. A. Cabral, E. Bastos,** 2012. Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods, Theriogenology, 78 (4): 703-714.
10. **Nguyễn Quang Phách,** 1990. Tạp chí Sinh học XII (3): 16-20.
11. **Trivers R. L., D. E. Willard,** 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring, Science (179): 90 - 91.

SEX IDENTIFICATION OF WHITE-NEST SWIFTLETS IN QUANG NAM PROVINCE USING PCR TECHNIQUE

HO THI LOAN, DANG TAT THE, NGUYEN MINH DUC, NGUYEN LAN HUNG SON, VO TAN PHONG

SUMMARY

The White-nest swiftlets live in natural caves of Cu Lao Cham Islands; besides they nest in man-made building in Hoi An city, Thang Binh, Dien Ban of Quang Nam provin. Sex identification of birds based on genes located on Z and W sex chromosomes. Female birds carry one copy of both Z and W, and male birds carry two copies of Z sex chromosomes. The three primerP2,P8; 1237L, 1272H; 2550F,2718R developed by Griffiths et al. (1998), Kahn et al. (1998) and Fridolfsson & Ellegren (1999) are universal primers, They amplify two introns of sex specific CHD1 gene of both Z and W chromosomes. This allows discrimination between the products from the Z and W chromosomes on a gel. Consequently, males are identified by 1 band and females by 2 bands on a gel. But those three primers can't identify sex of White-nest swiftlets. The new primer AIF 2550F,2718R are designed to identify sex of birds. Fifty samples (embryonic membranes, juveniles) collected from two colonies of house and cave swiftlets are sex determinated by new pair primers. The percentage of females higher than males are both of house and cave swiftlets.