

## XÁC ĐỊNH NGUỒN GỐC CHÓ PHÚ QUỐC BẰNG TRÌNH TỰ VÙNG D-LOOP TRONG GENOME TY THỂ

Trần Hoàng Dũng<sup>1</sup>, Thái Kế Quân<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thành Công<sup>1</sup>, Huỳnh Văn Hiếu<sup>1</sup>, Chung Anh Dũng<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, \*tranhoangdung1975@yahoo.com

<sup>2</sup>Trường Đại học Sài Gòn

<sup>3</sup>Viện Khoa học và Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam

**TÓM TẮT:** Chó Phú Quốc là một trong những nòi chó quý của Việt Nam, sở hữu nhiều đặc tính quý như thông minh, sức khỏe tốt, giỏi nuôi con, thân thiện với con người và quan trọng là còn giữ được một số đặc tính hoang dã của loài chó giới săn bắt. Nghiên cứu này nhằm đánh giá đa dạng di truyền để truy nguyên nguồn gốc chó Phú Quốc. Bảy mươi bảy mẫu chó Phú Quốc lưng có xoáy và 30 mẫu chó nhà thường khác (làm đối chứng) được phân tích vùng D-loop trên genome ty thể chó Phú Quốc, kết quả cho thấy chó Phú Quốc có mức độ đa dạng di truyền cao. Chó Phú Quốc mang haplotype E cao bất thường, cụ thể 16,88% mang haplotype E1 và 9,10% mang haplotype E4. Hơn nữa, chó Phú Quốc còn mang các haplotype dạng cổ như B1 (19,48%) và C2, C3 (lần lượt 9,10 và 7,79%). Chó nhà mang các haplotype phổ biến A, B và C, trong đó hai haplotype cổ là A11 và B1 chiếm tỷ lệ cao nhất (lần lượt 20 và 16,67%). Đặc biệt, không một cá thể chó nhà nào mang haplotype dạng E như đã tìm thấy ở chó Phú Quốc. Phân tích phát sinh chủng loài cho thấy chó Phú Quốc có quan hệ rất gần gũi với chó nguồn gốc từ khu vực Đông Á (Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc). Giả thuyết về tiến trình di cư và hình thành dạng xoáy lưng ở chó Phú Quốc dòng E đã được đưa ra và thảo luận.

*Từ khóa:* Chó Phú Quốc, haplotype E, phát sinh loài, vùng D-loop, đa dạng di truyền.

### MỞ ĐẦU

Sau khi genome ty thể chó (*Canis familiaris*) được giải trình tự và công bố có khoảng 16.728 bp [10], đến nay các nghiên cứu di truyền tiến hóa trên chó được nghiên cứu rất nhiều [1, 2, 5, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 25]. Bên cạnh các công trình sử dụng toàn bộ genome ty thể (mtDNA), nhiều nghiên cứu đã sử dụng vùng điều khiển hoạt động phiên mã của genome ty thể (control region - CR) hay còn gọi vùng D-loop có kích thước 1270 bp nằm ở vị trí 15.458-16.727 [4, 6, 7, 8, 9, 14, 23, 26, 28, 29]. Vùng D-loop gồm có vùng siêu biến thứ nhất (HV1), vùng lặp lại song song và vùng siêu biến thứ 2 (HV2). Nếu vùng HVI mang tính đa hình rất cao và được sử dụng trong nghiên cứu di truyền thì vùng HV2 lại rất bảo thủ, còn vùng lặp lại có sự biến động mạnh về số lần lặp lại nên gây ra khó khăn trong nghiên cứu, vì thế vùng HV2 và vùng lặp lại thường được loại bỏ khi phân tích di truyền vùng D-Loop [8]. Thông tin thu được từ việc nghiên cứu sự đa dạng trình tự vùng D-loop cũng như vùng mã hóa của

mtDNA rất có ích trong việc phân tích xác định các nhóm kiểu đơn bội (haplotype) và nhóm đơn bội (haplogroup) ở chó [7, 8], xác lập nguồn gốc của chó [1, 11, 15, 16, 18, 23, 25, 26], xây dựng cơ sở dữ liệu pháp y [9, 29] và mô tả lại sự di cư của quần thể chó [15, 16, 21, 26].

Trên thế giới hiện có hơn 400 nòi chó khác nhau nhưng có ba nòi chó có xoáy lưng là Rhodesian Ridgeback ở châu Phi, Thai Ridgeback ở Thái Lan và chó Phú Quốc ở Việt Nam. Với những đặc tính như thông minh, nhanh nhẹn, dễ huấn luyện, hình dáng đẹp... chó Phú Quốc hiện đang được nhà sưu tập chó nhân nuôi và trao đổi mua bán. Đến nay hầu như chưa có công trình nào nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền, phát sinh chủng loài hay tiến hóa của đối tượng này

Thai Ke Quan et al. (2016) [24] đã chỉ ra rằng khi sử dụng vùng D-loop để phân tích đặc tính di truyền của chó lưng xoáy Phú Quốc sống tại đảo Phú Quốc cho ra nhiều kết quả ngoài dự kiến. Theo đó, chó Phú Quốc ngoài mang các

haplotype thông dụng (dạng A, B và C) còn mang thêm dạng E là dạng rất hiếm trên thế giới. Nếu dạng E chỉ chiếm 1-2% tổng số đàn chó trên thế giới thì haplotype dạng E chó Phú Quốc lên đến 16,7%. Trình tự genome ty thể dòng E4 của chó Phú Quốc cũng được giải trình tự để phân tích phát sinh chủng loài. Kết quả cho thấy, chó Phú Quốc có quan hệ gần với chó vùng Đông Bắc Á như chó Pungsan (Triều Tiên), chó Shipa (Nhật Bản). Còn quan hệ giữa chó lưng xoáy Phú Quốc và chó lưng xoáy Thái Lan vẫn là câu hỏi cần được giải đáp.

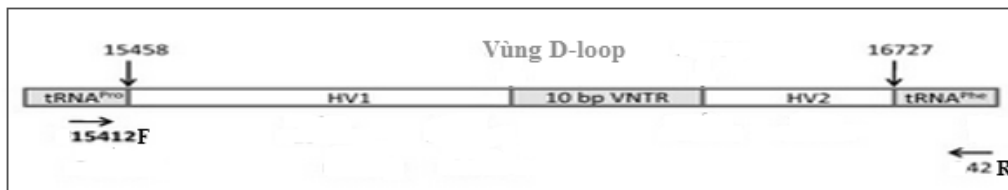
Trong báo cáo này, dữ liệu trình tự vùng D-loop trong nghiên cứu này từ 77 cá thể chó Phú Quốc và 30 chó nhà được phân tích để có thể kết luận về nguồn gốc của nòi chó quý này.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

*Thu thập mẫu:* Mẫu PQ32 đến PQ62 được thu thập tại đảo Phú Quốc và giải trình tự trước đó [24]. Các mẫu PQ63 đến PQ80 cũng được thu tại đảo Phú Quốc gần đây và là phân tích mới, riêng các mẫu PQ1 đến PQ32 được thu tại tp. Hồ Chí Minh. Ngoài mẫu chó Phú Quốc

lưng có xoáy, 30 mẫu chó nhà được thu thập ngẫu nhiên ở khu vực tp. Hồ Chí Minh để làm đối chứng. Máu chó được lấy từ tĩnh mạch chân và được bảo quản trong ống EDTA chống đông và giữ ở -70°C cho đến khi sử dụng.

*Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại vùng D-loop:* DNA toàn phần được tách chiết từ 2 ml máu có hiệu chỉnh cho phù hợp điều kiện thực tế [24]. Thành phần phản ứng khuếch đại vùng D-Loop bao gồm 2,5µl dNTP Mix (nồng độ 0,2mM); 2,5µl 10X Buffer; 0,625UI DreamTaq™ DNA polymerase; 0,5µl mỗi xuôi (nồng độ 10 µM); 0,5µl mỗi ngược (nồng độ 10 µM); 5µl DNA mẫu (nồng độ 50 ng/ml); nước cất vừa đủ 25µl. Mỗi 15412F và 42R có trình tự lần lượt là CCACTATCAGCACCCAAAG và CCTGAAACCATTGACTGAATAG theo Gundry et al. (2007) [7]. Chu kỳ luân nhiệt nhân gene: giai đoạn chuẩn bị biến tính ở 95°C trong 5 phút (1 chu kỳ); giai đoạn chính: biến tính ở 94°C trong 2 phút, mỗi bắt cặp ở 58°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút (35 chu kỳ); giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 10 phút (1 chu kỳ).



Hình 1. Vị trí bắt cặp của mỗi 15412F và 42R trên vùng D-loop

*Giải trình tự, hiệu chỉnh trình tự và xin mã số truy cập*

Các sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp tự động bằng chính cặp mỗi khuếch đại ở Công ty Nam Khoa, quận 7, thành phố Hồ Chí Minh. Trình tự DNA ở dạng giản sắc đồ (chromatogram) được hiệu chỉnh loại bỏ các vùng hoặc điểm mơ hồ do lỗi đọc trình tự bằng mắt với sự trợ giúp của phần mềm ChromaPro 1.1.4 (Technelysium) và SeaView 4.2.12. Trình tự sau hiệu chỉnh được được đề trình lên GenBank để thẩm định và cấp mã số truy cập.

*Phân tích phát sinh chủng loài trình tự*

Phương pháp khả năng tối đa (maximum likelihood), phương pháp khoảng cách (neighbor-joining) và phương pháp tiết giảm tối đa (maximum parsimony) được thực hiện bằng PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003) với các thông số tiến hóa được lấy mô hình tiến hóa tối ưu trước đó. Tất cả được chạy với độ tin cậy (bootstrap) là 1000 lần. Phương pháp xác suất hậu nghiệm được thực hiện trên phần mềm MrBayes 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), trong đó các thông số cơ bản được cài đặt theo mẫu chuẩn. Mẫu được chạy 2.000.000 lần với 1 chuỗi lạnh và 3 chuỗi nóng, cây được lưu sau mỗi 1000 lần chạy như mô tả của Hoef-Emden et al. (2005) [12].

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Khuếch đại, giải trình tự, hiệu chỉnh và thẩm định trình tự

DNA tổng số của các mẫu máu chó sau khi được tách chiết được sử dụng để khuếch đại vùng D-loop và cho giải trình tự. Các trình tự thô được cắt bỏ các tín hiệu có biên độ không ổn định và khó phân biệt với tín hiệu nền ở hai đầu đoạn mồi, hai mạch DNA được giữ lại có biên độ các đỉnh khá đều, khoảng cách các đỉnh không chồng chất lên nhau và phân biệt rõ ràng với tín hiệu nền. Trình tự vùng D-loop sau cùng có chiều dài 582 bp tương ứng từ 15458 đến vị trí 16039 được đưa vào phân tích. Hai mươi ba trình tự vùng D-loop chó Phú Quốc thu tại tp. Hồ Chí Minh đã được GenBank thẩm định và cấp mã số truy cập từ KF757290 đến KF757313

### Định loại haplotype chó Phú Quốc

Theo nguyên tắc định loại haplotype dựa trên vùng D-loop [17], 77 mẫu chó Phú Quốc trong nghiên cứu này mang các haplogroup A, B và C như các nòi chó khác trên thế giới. Tuy nhiên, như đã được đề cập, số cá thể chó Phú Quốc mang haplotype E cao bất thường, bao gồm 13 cá thể mang haplotype E1 và 7 cá thể mang haplotype E4 (lần lượt chiếm 16,88 và 9,10%). Hơn nữa, chó Phú Quốc còn mang các haplotype dạng cổ như B1 (19,48%) và C2, C3 (lần lượt 9,10 và 7,79%) khá cao (bảng 1). Ngược lại, 30 mẫu chó nhà mang haplotype A, B và C đều không tập trung, các haplotype phân tán xuyên suốt haplogroup. Trong đó, hai haplotype cổ là A11 và B1 chiếm tỷ lệ cao nhất (lần lượt 20% và 16,67%). Điều này cho thấy tính đa dạng di truyền chó nhà Việt Nam rất cao. Đặc biệt, không một cá thể chó nhà nào mang haplotype dạng E như đã tìm thấy ở chó Phú Quốc (bảng 1).

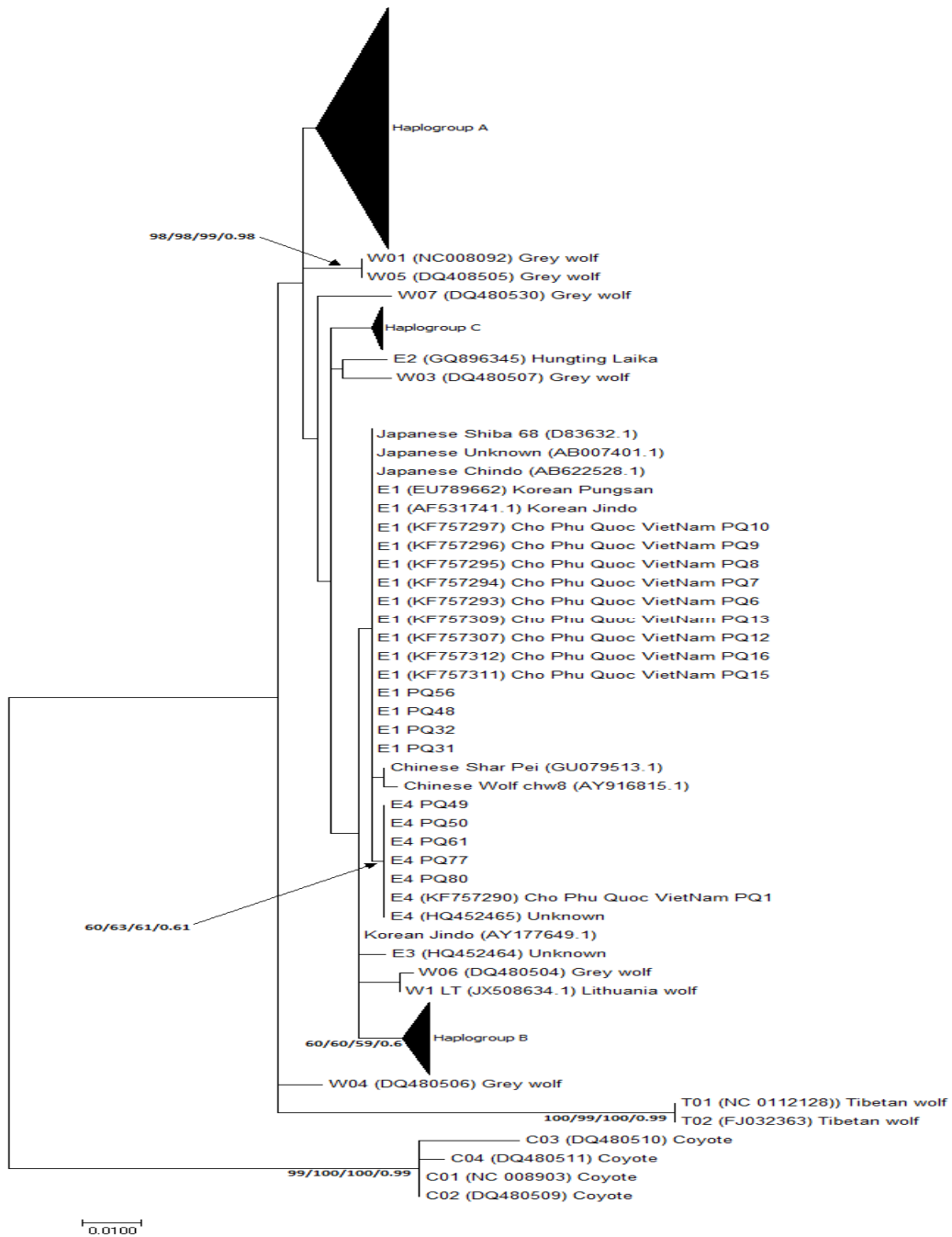
### Phân tích nguồn gốc phát sinh chủng loài bằng trình tự vùng D-loop

Để truy tìm nguồn gốc chó Phú Quốc cũng như quan hệ tiến hóa với các nhóm chó khác, cây phát sinh chủng dựa trên trình tự vùng D-loop được xây dựng. Bộ dữ liệu phân tích gồm 276 trình tự chứa các haplogroup A, B, C, E và F, sói xám (ký hiệu W01-W09), sói Tây Tạng

(ký hiệu T01-T02), sói Trung Quốc (ký hiệu chw8), sói hoang (ký hiệu C01-C04) được đưa vào phân tích như gợi ý của Li & Zhang (2012) [13] để giúp xác lập nguồn gốc và làm nhóm đối chứng ngoại.

Bảng 1. Tần xuất các haplotype tìm thấy ở chó Phú Quốc và chó nhà

Chó Phú Quốc		
Haplotype	Số lượng	Tần suất (%)
A11	6	7,79
A17	2	2,60
A18	5	6,49
A19	6	7,79
A20	1	1,30
A24	1	1,30
A65	3	3,90
A73	2	2,60
B1	15	19,48
B5	2	2,60
B10	1	1,30
C2	7	9,10
C3	6	3,90
E1	13	16,88
E4	7	9,10
Chó nhà		
A11	6	20,0
A2	1	3,33
A8	2	6,67
A9	2	6,67
A18	1	3,33
A24	1	3,33
A29	2	6,67
A44	1	3,33
A200	1	3,33
A mới	2	6,67
B1	5	16,67
B6	1	3,33
C2	2	6,67
C3	2	6,67
C mới	2	6,67



Hình 2. Phả hệ đồ mô tả chi tiết vị trí phân bố của chó lung có xoáy Phú Quốc trong các haplogroup B, C và E (không mô tả nhóm A) trên cây tiến hóa có gốc maximum-mlLikelihood được suy luận từ 276 trình tự vùng D-loop có độ dài 562 ký tự (khoảng trống bị loại bỏ hoàn toàn). Mô hình tiến hóa là HKY+G+I (-lnL = 2865.3526) được tính bằng phần mềm jModelTest dựa theo chuẩn AICc. Giá trị bootstrap từ trái qua phải là maximum-likelihood, neighbor-joining, maximum parsimony không ràng buộc và xác suất hậu nghiệm Bayes (BP - Bayesian probability). Tỷ lệ xích biểu thị số biến đổi tại mỗi vị trí.

### Thảo luận về nguồn gốc chó Phú Quốc dựa trên vùng D-loop

Tính đa hình đơn nucleotide (Single nucleotide polymorphism - SNP) được sử dụng trong phân tích di truyền để xác định mối quan hệ di truyền giữa các cá thể cùng loài, hoặc loài gần. Dựa trên các SNP của vùng D-loop, các nhà nghiên cứu đã xác định được 6 haplogroup là A, B, C, D, E, và F [17, 21] và trong mỗi haplogroup có nhiều haplotype khác nhau do sự sai khác 1 nucleotide nào đó. Điều đó cho thấy sự khác biệt về hình thái của các nòi chó trên thế giới không phải là kết quả của quá trình thuần hóa chó sói ở từng khu vực địa lý khác nhau mà do quá trình di cư và quá trình giao phối giữa các nòi với nhau. Điều này lý giải vì sao các nòi khác nhau có thể mang nhiều haplotype khác nhau và một haplotype có thể tìm thấy ở nhiều nòi chó khác nhau. Có đến 71,3% chó mang haplogroup A; 95,9% mang haplogroup A, B hoặc C. Cả 3 nhóm đều phân bố trên toàn thế giới (trừ nhóm C không có ở châu Mỹ) với tần suất ngang nhau. Ngược lại, ba nhóm haplogroup D, E và F là các haplogroup hiếm, chỉ chiếm chưa đến 56% cá thể chó trên thế giới và chúng chỉ phân bố giới hạn ở Thổ Nhĩ Kỳ, Tây Ban Nha và vùng Scandinavia (nhóm D); ở Nhật Bản, Hàn Quốc và Trung Quốc (nhóm E) và Nhật bản, Siberia (nhóm F) [4, 15, 16, 21, 26].

Oskarsson et al. (2012) [15] khi nghiên cứu nguồn gốc chó Dingo ở châu Úc đã thu thập các nòi chó châu Á, trong đó 8 mẫu chó Phú Quốc nằm trong nhóm phổ quát cổ xưa là A11 (2 mẫu), A19 (1 mẫu), B1 (2 mẫu) và C3 (3 mẫu), không có mẫu mang haplotype E. Trong nghiên cứu này, các haplotype phổ quát cổ xưa tiếp tục được ghi nhận ở chó Phú Quốc với tần xuất cao (bảng 1). Đồng thời việc tiếp tục tìm thấy các haplotype E1 và E4, một lần nữa khẳng định haplotype E trong quần đàn chó lưng xoáy Phú Quốc không phải là bị thiên lệch trong khi lấy mẫu. Đây là một phát hiện mới mà phân tích trước đó của Oskarsson et al. (2012) [15] không tìm thấy.

Cũng trong dữ liệu của Oskarsson et al. (2012) [15], 7 cá thể Thai Ridgeback mang haplotype A11, A18, A35, A6, A7, A8 và B4

được ghi nhận. Đây là các haplotype phổ quát và cổ xưa (nhóm A6, A7 và A8 được xếp vào nhóm haplotype cổ Arc1). Không cá thể nào của nòi Thai Ridgeback mang haplotype dạng E. Nhưng có 6 mẫu chó mang haplotype nhóm E, trong đó 4 mẫu E1 (AF531741) ở Thái Lan, Việt Nam; 01 mẫu E3 (HQ452464) ở Indonesia và 1 mẫu E4 ở Thái Lan, nhưng thuộc nhóm chó lưng không xoáy.

Như vậy có thể thấy, chó lưng xoáy Phú Quốc đến nay là chó lưng có xoáy duy nhất trên thế giới phát hiện có mang haplotype E1 với tần xuất rất cao trên 15%, nòi chó lưng có xoáy Thái Lan không có hoặc chưa phát hiện haplotype E, còn chó lưng xoáy châu Phi tìm kiếm trên GenBank cũng không thấy mang haplotype E mà chỉ mang haplotype A1.

Mở rộng khu vực phân bố của chó mang haplotype E, nhiều nghiên cứu đã tìm thấy một số lượng rất nhỏ haplotype E ở các nòi lưng bình thường như nòi Shiba, nòi Chindo Nhật Bản, nòi Shar-Pei Trung Quốc, nòi Jindo Hàn Quốc [2, 13, 15, 21, 26].

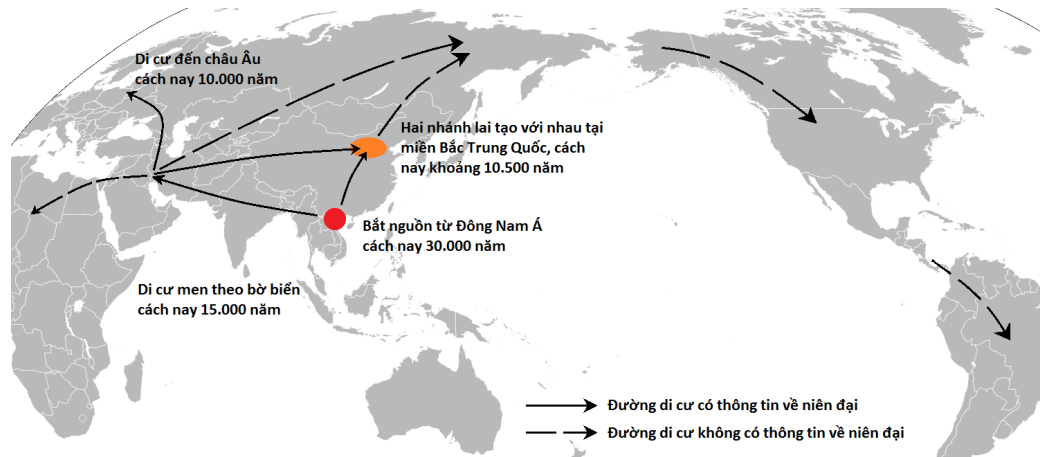
Các dữ liệu tương quan giữa haplotype và nòi chó cho thấy đặc điểm haplotype E và đặc tính lưng có xoáy không có quan hệ tuyến tính bậc 1, nó không phải độc quyền cho chó Phú Quốc, nhưng nếu chó lưng có xoáy Phú Quốc mang haplotype E thì chắc chắn đây là nhóm chó hiếm và là định hướng để chọn lọc bảo tồn.

Parker et al. (2004) [18] nghiên cứu hệ thống microsatellite của chó sói và 85 nòi chó nhà phổ biến cho thấy chó được chia thành 2 nhóm chính. Nhóm thứ nhất là chó cổ xưa như chó Trung Quốc (chó Shar-pei, chó Chow Chow), chó Nhật Bản (chó Shiba và chó Akita), chó vùng Bắc Mỹ (chó Siberian, chó Husky và chó Alaskan Malamute), chó bản địa châu Phi (chó Basenji), Chó Tây Nam châu Á (chó Afghan Hound và Saluki). Nhóm thứ 2 là nhóm chó hiện đại bao gồm hầu hết chó châu Âu chia ra làm 3 nhóm nhỏ là chó chăn gia súc xuất hiện trước, sau là chó săn và cuối cùng là chó bảo vệ.

Wang et al. (2015) [27] phân tích toàn bộ genome của 52 nòi chó phổ biến trên cho thấy, chó xuất phát từ chó sói cách đây hơn 33.000 ngàn năm. Vị trí chúng xuất phát được cho là tại Đông Nam châu Á, quanh vùng rìa biên giới

giữa Việt Nam và Trung Quốc ngày nay, sau đó phát tán ra khắp thế giới. Nghiên cứu này cũng đã tái xác nhận kết quả trước đó khi tiến hành phân tích mtDNA của Pang et al. (2009) [16] cho thấy, chó nhà có nguồn gốc ở phía Nam sông Dương Tử, Trung Quốc khoảng 16.000

năm trước. Trong đó nhóm chó vùng Đông Bắc Á (như Bắc Trung Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản) được cho là chỉ mới xuất hiện khoảng 10.000 năm do sự lai tạp giữa một dòng chó di cư ngược từ phía Tây với chó địa phương tại phía Bắc Trung Quốc.



Hình 3. Một trong hai con đường giả định về vị trí xuất tích của chó nhà từ Đông nam Á (vùng rìa biên giới Việt Nam và Trung Quốc ngày nay). Chó từ Đông Nam Á sau đó đã lan truyền khắp thế giới theo con đường vẽ liên tục hoặc đường đứt quãng trên hình, vẽ lại từ Wang et al. (2016) [27].

Klütsch et al. (2011) [11] cho thấy, do số lượng cá thể nhóm D, E và F khá nhỏ nên việc truy tìm nguồn gốc của 3 nhóm này rất khó khăn. Do các nhóm này chỉ tìm thấy ở khu vực địa lý giới hạn nên điều này cho thấy khả năng chúng xuất phát từ phép lai giữa chó nhà và chó sói địa phương trong khoảng thời gian gần đây. Đây được gọi là hiện tượng thuần hóa chó sói lần 2. Và vì mới xuất hiện từ lần thuần hóa thứ 2 nên các haplotype mới sẽ rất khó phát tán ra vùng địa lý khác vốn đã có các haplotype dòng cổ xưa A, B và C khác ngụy trị từ trước. Ghi nhận nhóm E chỉ tìm được thấy ở những khu vực Đông Á (Nhật Bản, Hàn Quốc) và Đông Nam Á (Việt Nam, Thái Lan và Indonesia) nên có thể chó mang haplotype E đã có nguồn gốc ban đầu cùng nhóm A, B và C [11, 16] nhưng chúng đã không lan ra khỏi khu vực Đông Á.

Với nhóm chó Nhật Bản (và Triều Tiên) mang haplotype E, Tanabe (2007) [26] dựa trên các bằng chứng sinh học phân tử và gene di truyền đã giải thích rằng vào thời kỳ đồ đá mới (thời Jomon từ 14.000 đến 400 TrCN) các con

chó đầu tiên từ Đông Nam Á và Tây Nam Á đã xâm nhập vào Nhật Bản sau đó lan khắp Nhật Bản. Đến thời Yoyoi (từ 300 đến 250 TrCN) và thời Kofun (250 TrCN đến 580 SCN) chó Nhật xâm nhập bản đảo Triều Tiên, tại đây chúng giao phối với chó bản địa. Các nòi chó Nhật Bản vì thế mang các haplotype phổ quát nhưng cũng mang các haplotype hiếm như haplotype E đã tìm thấy.

Ngoài ra, Salmon-Hillbertz et al. (2007) [20] nghiên cứu đặc tính lưng có xoáy trên chó Thái và châu Phi cho thấy là do đột biến gene Ridge (xoáy lưng) nằm trên nhiễm sắc thể số 18, chó có xoáy lưng mang kiểu gene R/R hoặc R/r, chó lưng bình thường mang kiểu gene r/r. Theo đó thì đột biến lưng có xoáy đã xuất hiện ngẫu nhiên trong quần thể chó nhưng ở dạng bị kìm hãm, chỉ khi chúng đủ mạnh để tạo dạng R/- thì chúng mới biểu hiện ra kiểu hình. Chó lưng có xoáy Thái và châu Phi là hai nòi chó tuy không có quan hệ huyết thống đã có cùng kiểu hình lưng có xoáy là do sự tăng tần xuất allen R trong quần thể một cách độc lập.

Như vậy, với các dữ liệu thu thập được, cùng các giả định từ các nghiên cứu trước có thể đưa ra các giả định về nguồn gốc chó lưng xoáy Phú Quốc như sau:

Chó mang haplotype E là nòi chó xuất phát từ lần thuần hóa thứ 2 chó sói. Đó là kết quả của phép lai giữa một chó đực nhà mang haplotype bất kỳ A, B hoặc C và 1 chó sói cái xám. Những chó mang haplotype dòng E phân bố hẹp, có thể ở khu vực hoang dã như bìa rừng chứ không trong khu vực làng mạc. Vì vậy, haplotype dòng E ít phát tán ra ngoài. Chó mang haplotype dòng E ban đầu lưng bình thường, không xuất hiện xoáy lưng. Vì vậy, các cá thể chó mang haplotype E vẫn tìm thấy ở Thái Lan hay Nhật Bản có lưng không xoáy. Nguồn gốc của chó mang haplotype dòng E có thể là khu vực Đông Nam Á hơn là Đông Á.

Quá trình di cư của người dân từ đất liền đã mang đồng thời các nòi chó mang haplotype A, B, C và E lên đảo Phú Quốc. Tại đây, trong điều kiện cách ly địa lý và sinh sống thiếu thốn, các cá thể chó mang haplotype E phát triển quần đàn tốt hơn do chúng có bản năng hoang dã, dễ thích ứng với tập tính săn bắt tìm mồi. Đồng thời do bị cách ly địa lý và quan hệ đồng huyết khiến cho gene R tăng tần xuất. Vì vậy, chó có xoáy lưng xuất hiện ở hầu hết các haolgroup A, B, C và E có trên đảo.

Dòng chó lưng có xoáy sau đó được mang trở lại đất liền. Có thể do quan niệm chó đực mới là chó giống nên chỉ có chó Phú Quốc lưng có xoáy đực mới được mang đi phối giống, còn chó cái mang haplotype E lại không được ưu ái chọn lựa. Vì vậy chó cái dòng E từ đảo Phú Quốc không có hoặc ít có điều kiện quay trở lại đất liền. Ngược lại, tại đất liền, phép lai giữa chó lưng xoáy Phú Quốc đực và chó cái nhà Thái Lan đã giúp gene R phát tán; còn haplotype của con lai là do chó mẹ Thái Lan quyết định. Vì vậy, chó lưng có xoáy Thái Lan xuất hiện nhưng chỉ mang các haplotype phổ biến A, B và C. Còn các cá thể mang haplotype E ở đất liền Thái Lan do tần xuất quá nhỏ nên không có cơ hội được chọn để giao phối tạo ra dòng chó lưng xoáy mang haplotype E như chó lưng xoáy Phú Quốc.

Để củng cố giả thuyết trên, các nghiên cứu

về sau cần đánh giá tần xuất các haplogroup A, B, C và E ở chó lưng và không xoáy ở đất liền như khu vực Rạch Giá, Hà Tiên, ... Đồng thời cũng cần đánh giá tần xuất gene R để ghi nhận mức độ phân tán của gene này trong quần đàn chó Phú Quốc. Ngoài ra, cần sử dụng nhiễm sắc thể Y như là marker để đánh giá khả năng di truyền theo dòng cha của chó Phú Quốc [3, 5] và tìm hiểu thời gian phân kỳ của nòi chó Phú Quốc.

## KẾT LUẬN

Vùng D-loop một lần nữa tỏ ra là marker tin cậy trong phân tích đa dạng di truyền và tìm kiếm nguồn gốc động vật. Tần xuất haplotype E ở chó Phú Quốc cao trên 15% ở 77 mẫu phân tích cho thấy đây không phải là hiện tượng thiên lệch mẫu. Phân tích phát sinh chủng loại cho thấy chó Phú Quốc có quan hệ gần gũi với nhóm chó Nhật Bản, Triều Tiên, Hàn Quốc. Kết hợp với các dữ liệu và các giả định từ phân tích trước đã giúp đưa ra giả định về nguồn gốc chó Phú Quốc. Khả năng hình thành quần đàn chó Phú Quốc vừa có lưng xoáy vừa mang haplotype E, trong khi tại sao chó lưng xoáy Thái Lan lại không mang haplotype E. Điều này cũng gợi ý rằng bảo tồn nguồn gene chó Phú Quốc nguyên thủy cần phải tìm kiếm các cá thể có haplotype E và lưng có xoáy.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi chân thành cảm ơn Bộ Khoa học & Công nghệ đã tài trợ cho đề tài cấp Nhà nước thuộc chương trình Quỹ gen để thực hiện nghiên cứu này (Hợp đồng số 01/2015-HĐ-NVQG)

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ana E.P., Lahoussine O., Mohsen K., Jose' M., Francisco P.-F., Michael W. B., 2006. Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: Diversity and phylogenetic affinities. *J Hered*, 97(4), 318 - 330.
2. Ardalan A., Kluetsch C. F., Zhang A. B., Erdogan M., Uhlen M., Houshmand M., Tepeli C., Ashtiani S. R., Savolainen P., 2011. Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but

- implies dog-wolf hybridization. *Ecol Evol*, 1(3): 373-385.
3. Bannasch D., Bannasch M., Ryun J., Famula T., Pedersen N., 2005. Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm Genome*, 16(4): 273-280.
  4. Bjornerfeldt S., Webster M. T., Vila C., 2006. Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication. *Genome Res*, 16(8): 990-994.
  5. Ding Z.-L., Oskarsson M., Ardalan A., Angleby H., Dahlgren L.-G., Tepeli C., Kirkness E., Savolainen P., Zhang Y.-P., 2012. Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity*, 108(5): 507-514.
  6. Eichmann C., Parson W., 2007. Molecular characterization of the canine mitochondrial DNA control region for forensic applications. *Int J Legal Med*, 121(5): 411-416.
  7. Gundry R. L., Allard M. W., Moretti T.R., Honeycutt R. L., Wilson M. R., Monson K. L., Foran D. R., 2007. Mitochondrial DNA analysis of the domestic dog: Control region variation within and among breeds. *J Forensic Sci*, 52(3): 562-572.
  8. Imes D. L., Wictum E. J., Allard M. W., Sacks B. N., 2012. Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes. *Forensic Sci Int Genet*, 6(5), 630-639.
  9. Just R. S., Irwin J. A., O'Callaghan J. E., Saunier J. L., Coble M. D., Vallone P. M., Butler J. M., Barritt S. M., Parsons T. J., 2004. Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Sci Int*, 146 Suppl: S147-149.
  10. Kim K. S., Lee S. E., Jeong H. W., Ha J. H., 1998. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol Phylogenet Evol*, 10(2): 210-220.
  11. Klütsch C. F. C., Seppälä E. H., Fall T., Uhlén M., Hedhammar Å., Lohi H., Savolainen P., 2011. Regional occurrence, high frequency but low diversity of mitochondrial DNA haplogroup d1 suggests a recent dog-wolf hybridization in Scandinavia. *Anim Genet*, 42(1): 100-103.
  12. Hoef-Emden K., Tran H-D., Melkonian M., 2005. Lineage-specific variations of congruent evolution among DNA sequences from three genomes, and relaxed selective constraints on *rbcL* in *Cryptomonas* (Cryptophyceae). *BMC Evol Biol.*, 5: 56.
  13. Li Y., Zhang Y., 2012. High genetic diversity of Tibetan Mastiffs revealed by mtDNA sequences. *Chin Sci Bull*, 57(13): 1483-1487.
  14. Okumura N., Ishiguro N., Nakano M., Matsui A., Sahara M., 1996. Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds (*Canis familiaris*). *Anim Genet*, 27(6): 397-405.
  15. Oskarsson M.C., Klutsch C.F., Boonyaparakob U., Wilton A., Tanabe Y., Savolainen P., 2012. Mitochondrial DNA data indicate an introduction through Mainland Southeast Asia for Australian dingoes and Polynesian domestic dogs. *Proc Biol Sci*, 279(1730): 967-974.
  16. Pang J. F., Kluetsch C., Zou X. J., Zhang A. B., Luo L. Y., Angleby H., Ardalan A., Ekstrom C., Skollermo 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(12): 2849-2864.
  17. Pereira L., Van Asch B., Amorim A., 2004. Standardisation of nomenclature for dog mtDNA D-loop: a prerequisite for launching a *Canis familiaris* database. *Forensic Sci Inter*, 141(2-3): 99-108.
  18. Parker H. G., Kim L. V., Sutter N. B., Carlson S., Lorentgen T. D., Malek T. B.,



- Johnson G. S., DeFrance H. B., Ostrander E. A., Kruglyak L., 2004. Genetic structure of the pure bred domestic dog. *Science*, 304: 1160-1164.
19. Ronquist F. L., Huelsenbeck J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572-1574.
20. Salmon-Hillbertz N. H. C., Isaksson M., Karlsson E. K., Hellmen E., Pielberg G. R., Savolainen P., Wade C. M., von Euler H., Gustafson U., Hedhammar A., Nilsson M., Lindblad-Toh K., Andersson L., Andersson G., 2007. Duplication of FGF3, FGF4, FGF19 and ORAOV1 causes hair ridge and predisposition to dermoid sinus in Ridgeback dogs. *Nat Genet*, 39(11): 1318-1320.
21. Savolainen P., Zhang Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T., 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298(5598): 1610-1613.
22. Swofford D. L., 2003. *PAUP\**. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4: Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.
23. Tsuda K., Kikkawa Y., Yonekawa H., Tanabe Y., 1997. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes & Genetic Systems*, 72(4): 229-238.
24. Thai Ke Quan, Nguyen Van Tu., Tran Ngoc trinh, Huynh Van Hieu, Chung Anh Dung., Tran Hoang Dung, 2016. Evaluation of genetic diversity of Phu Quoc ridgeback dogs based on mitochondrial DNA Hypervariable-1 region. *Journal of Biotechnology*, 14(1A): 245-253.
25. van Asch B., Pereira L., Pereira F., Santa-Rita P., Lima M., Amorim A. 2005. MtDNA diversity among four Portuguese autochthonous dog breeds: a fine-scale characterisation. *BMC Genet*, 6: 37.
26. Tanabe Y., 2006. Phylogenetic studies of dogs with emphasis on Japanese and Asian breeds. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 82(10): 375-387.
27. Wang G. D., Zhai W., Yang H. C., Wang L., Zhong L., Liu Y. H., Fan R. X., Yin T. T., Zhu C. L., Poyarkov A. D., Irwin D. M., Hytönen M. K., Lohi H., Wu C. I., Savolainen P., Zhang Y. P., 2016. Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world. *Cell Res*. 26(1): 21-33.
28. Webb K. M., Allard M. W., 2009. Identification of forensically informative SNPs in the domestic dog mitochondrial control region. *J. Forensic Sci.*, 54(2): 289-304.
29. Wetton J. H., Higgs J. E., Spriggs A. C., Roney C. A., Tsang C. S. F., Foster A. P., 2003. Mitochondrial profiling of dog hairs. *Forensic Sci Int*, 133(3): 235-241.

**ORIGIN OF PHU QUOC RIDGEBACK DOG  
BY USING MITOCHONDRIAL D-LOOP SEQUENCES**

**Tran Hoang Dung<sup>1</sup>, Thai Ke Quan<sup>2</sup>,  
Nguyen Thanh Cong<sup>1</sup>, Huynh Van Hieu<sup>1</sup>, Chung Anh Dung<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Nguyen Tat Thanh Univeristy

<sup>2</sup>Sai Gon University

<sup>3</sup>Institute of Agricultural Science for Southern Viet Nam

**SUMMARY**

Phu Quoc ridgeback dog is among valuable dog breeds of Vietnam with precious characteristics, such as smart, good health, friendly to human and most importantly, still keeping some features of wild hunting dogs. The purpose of this research is to evaluate the genetic diversity in order to trace the origin of Phu Quoc ridgeback dogs. D-loop region on mitochondrial genome of seventy-seven samples of Phu Quoc ridgeback dogs and thirty samples of village dogs (as control) have been analysed and showed that Phu Quoc ridgeback dogs have high genetic diversity. Phu Quoc ridgeback dogs have an unusually high frequency of haplotype E, particularly 16.88% with haplotype E1 and 9.10% with haplotype E4. Furthermore, Phu Quoc ridgeback dog also has ancestor haplotypes, such as B1 (19.48%) and C2, C3 (respectively 9.10 and 7.79%). Normal dogs have general haplotype A, B and C, in which two ancestor haplotype A1 and B1 shares the highest proportions (20 and 16.67% respectively). Especially, there is no village dog sample carried haplotype E as found in Phu Quoc ridgeback dogs. Analysing the phylogenetic tree showed that Phu Quoc ridgeback dogs have a close relationship to dogs originated from East Asia (China, Japan and Korea). The hypothesis of migration and ridgeback formation processes of Phu Quoc ridgeback dogs has been addressed and discussed.

*Keywords:* D-loop region, genetic diversity, haplotype E, phylogeny, Phu Quoc ridgeback dog.

*Ngày nhận bài:* 20-5-2016