

ĐA DẠNG DI TRUYỀN GIỐNG CHÓ H'MÔNG CỘC ĐUÔI TRÊN CƠ SỞ GIẢI TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÙNG SIÊU BIẾN THỨ NHẤT (HV1) CỦA D-LOOP

Phạm Thanh Hải^{1,2}, Bùi Xuân Phương¹, Trần Hữu Côi¹, Phùng Thanh Tùng¹, Ngô Quang Đức¹, Nguyễn Minh Khang³, Vũ Đình Duy^{1,2,✉}

¹Viện Sinh thái nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Hiệp hội những người nuôi chó giống Việt Nam (VKA)

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duyvu@vnmn.vast.vn

Received: 28.02.2020

Accepted: 07.4.2020

TÓM TẮT

Chó H'mông cộc đuôi là giống chó bản địa, phân bố ở vùng núi phía Bắc Việt Nam, sở hữu nhiều đặc tính quý như thông minh, nhanh nhẹn, có thể lực tốt, khả năng thích nghi với điều kiện môi trường tốt, thân thiện với con người và đặc biệt chúng có khả năng thực hiện nghiệp vụ. Nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền của giống chó H'mông cộc đuôi trên cơ sở giải trình tự nucleotide vùng siêu biến thứ nhất (HV1) trong vùng D-loop thuộc hệ gen ty thể của 45 mẫu thu ngẫu nhiên tại hai tỉnh Hà Giang và Lào Cai cho thấy chó H'mông cộc đuôi có mức độ đa dạng di truyền cao: Chỉ số đa dạng nucleotide ($Pi = 0,00801$), đa dạng haplotype ($Hd = 0,96162$) và số nucleotide khác biệt trung bình ($Kt = 5,18384$). Chó H'mông cộc đuôi đã được xác định mang 25 haplotype khác nhau thuộc nhóm haplotype (A, B, C và E). Trong đó, có 7 haplotype mới (An1 đến An7) thuộc nhóm haplotype A chưa được công bố và 18 haplotype còn lại đã được ghi nhận trước đây ở các giống chó trên thế giới. Hơn nữa, chó H'mông cộc đuôi còn mang các haplotype dạng cổ như B1, C2, E1 và E4. Đặc biệt, không có cá thể nào mang haplotype dạng D và F. Chó H'mông cộc đuôi có 38 vị trí nucleotide đa hình, gồm 32 vị trí có các đột biến thay thế nucleotide và 6 vị trí có đột biến mất hay thêm nucleotide. Hầu hết các đột biến thay thế là đồng hoán (31/32), chỉ có 1 vị trí nucleotide có dị hoán. Phân tích phát sinh chủng loài cho thấy chó H'mông cộc đuôi có quan hệ rất gần gũi với chó nguồn gốc từ khu vực Đông Á (Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc).

Từ khóa: Chó H'mông cộc đuôi, đa dạng di truyền, haplotype, phát sinh loài, vùng HV1 (D-loop).

MỞ ĐẦU

Giống Chó nhà (*Canis lupus familiaris*) là thành viên duy nhất trong họ Chó (Canidae) và là động vật có vú lâu đời nhất có thể được thuần hóa hoàn toàn trên thế giới, vì bằng chứng lịch sử cho thấy chúng có mối liên hệ lớn với con người có thể bắt nguồn từ thời kỳ tiền văn hóa xa xôi (Turnbell, Reed, 1974). Trong lịch sử thuần hóa chó, hơn 400 giống chó về mặt hình thái biến đổi nhất đã được thiết lập lại giữa hoặc trong nguồn gốc tổ tiên của chúng hay cũng bằng cách

chọn lọc nhân tạo (Tsuda *et al.*, 1997). Hơn nữa, có sự biến đổi hình thái lớn trong số hơn 400 giống chó, nhưng quan điểm phổ biến và được chấp nhận nhiều nhất, chủ yếu dựa trên các nghiên cứu về hình thái học: một loài sói (*Canis lupus*), là tổ tiên hoang dã của chó nhà (Lorenz, 1975; Zimen, 1981). Sự khác biệt trong kích thước và hình dạng giữa các giống chó vượt quá số loài trong họ chó (Canidae) (Wayne, 1986a, b). Sự khác biệt trong hành vi và sinh lý của các giống chó cũng rất đáng kể (Hart, 1995). Tuy nhiên, sự đa dạng trong quá trình thuần hóa các

giống chó đang gặp phải trở ngại lớn bởi sự thiếu các thông tin về đa dạng và biến đổi di truyền ảnh hưởng đến các đặc điểm kiểu hình. Cho đến nay, nước ta đã ghi nhận một số loài chó bản địa như chó lưng xoáy Phú Quốc, chó dạng sói, chó H'mông cọc đỏi, chó Lài và chó Bắc Hà (Nguyen Thanh Cong *et al.*, 2019). Sự tồn tại của các phân loài chó và thông tin chi tiết về chọn lọc nhân giống các giống chó bản địa tại Việt Nam còn rất ít và tản mạn. Đặc biệt, ứng dụng sinh học phân tử trong nghiên cứu các giống chó bản địa Việt Nam chưa nhiều, chỉ có loài chó lưng xoáy Phú Quốc đã được nghiên cứu khá đầy đủ (Trần Hoàng Dũng *et al.*, 2016; Thái Kế Quân *et al.*, 2016 a,b) và một vài nghiên cứu sơ bộ về chó H'mông cọc đỏi đã được thực hiện (Bùi Xuân Phương *et al.*, 2015; Nguyen Thanh Cong *et al.*, 2019), do đó cơ sở dữ liệu di truyền của các giống chó bản địa ở Việt Nam nói chung và chó H'mông cọc đỏi nói riêng còn rất hạn chế.

Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã sử dụng vùng điều khiển hoạt động phiên mã của hệ gen ty thể (control region - CR) hay còn gọi vùng D-loop có kích thước 1270 bp nằm ở vị trí nucleotide 15.458-16.727 trong phân tích nguồn gốc, quan hệ họ hàng và tiến hóa gần ở mức loài và quần thể của loài chó (Thái Kế Quân, 2019). Đặc biệt, Asch và đồng tác giả (2005) chỉ ra rằng phần biến đổi của vùng D-loop thích hợp để nghiên cứu đa dạng di truyền ở mức dưới loài Chó. 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 HV1 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 (Imes *et al.*, 2012; Trần Hoàng Dũng *et al.*, 2016). Thông tin thu được từ việc nghiên cứu sự đa dạng trình tự nucleotide vùng D-loop của hệ gen ty thể 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) và xác lập nguồn gốc của chó (Imes *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2017).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện giải trình tự nucleotide vùng gen HV1 trong vùng D-loop của hệ gen ty thể của 45 cá thể chó H'mông cọc đỏi ở hai tỉnh Hà Giang và Lào Cai của Việt Nam để xác định mức độ đa dạng di truyền, làm cơ sở khoa học cho đề xuất các giải pháp chọn giống, nhân giống và phát triển bền vững loài này ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Trong chuyến đi khảo sát thực địa từ ngày 10-25/11/2019, chúng tôi đã thu được mẫu máu ngẫu nhiên của giống chó H'mông cọc đỏi ở hai tỉnh Hà Giang và Lào Cai, Việt Nam (Bảng 1, Hình 1) làm vật liệu nghiên cứu. Tại thực địa các mẫu này được đánh số, bảo quản trong ống eppendorf 2 mL có chứa cồn 80%, và đưa về phòng thí nghiệm bảo quản trong tủ lạnh âm sâu 30⁰C cho đến khi phân tích DNA.

Bảng 1. Đặc điểm 45 cá thể chó H'mông cọc đỏi sử dụng trong nghiên cứu.

Số hiệu	Địa điểm	Kinh độ	Vĩ độ	Giới tính	Màu lông	Chiều cao (cm)	Trọng Lượng (kg)	Mã số GenBank
HM01	P. Cốc Lếu, Lào Cai	103° 57' 53"	22° 30' 3"	Cái	Đen	51,5	16	MN914882
HM02		103° 59' 38"	22° 28' 35"	Đực	Vện	53	21,5	MN914883
HM03	P. Bắc Cường, Lào Cai	103° 59' 35"	19° 45' 50"	Cái	Vện	49,6	20	MN914884
HM04		103° 59' 35"	19° 45' 50"	Cái	Vàng Kim	51,6	17	MN914885

HM05		103° 59' 35"	19° 45' 50"	Cái	Nâu đỏ	50,5	19	MN914886
HM06		103° 58' 29"	22° 28' 26"	Đực	Đen	57,5	26	MN914887
HM07		103° 58' 29"	22° 28' 26"	Cái	Đen	51,2	20	MN914888
HM08		103° 58' 29"	22° 28' 26"	Cái	Đỏ	49,4	18	MN914889
HM09	P. Nam Cường, Lào Cai	103° 59' 52"	22° 26' 37"	Cái	Vện	51	18	MN914890
HM10		104° 1' 17"	22° 25' 25"	Cái	Vện	48,6	15	MN914891
HM11		104° 1' 17"	22° 25' 25"	Cái	Vàng kim	47,4	14,5	MN914892
HM12	P. Pom Háng, Lào Cai	104° 1' 17"	22° 25' 25"	Cái	Vện	47,1	19	MN914893
HM13		104° 1' 17"	22° 25' 25"	Cái	Vàng kim	44,5	18	MN914894
HM14		104° 1' 17"	22° 25' 25"	Đực	Xám tro	50,1	17	MN914896
HM15	P. Kim Tân, Lào Cai	104° 1' 21"	22° 28' 45"	Đực	Vện	50	20	MN914897
HM16		104° 16' 34"	22° 32' 11"	Đực	Đen	53,4	20	MN914898
HM17		104° 16' 34"	22° 32' 11"	Cái	Vện	41,9	14	MN914899
HM18	TT. Bắc Hà, Lào Cai	104° 16' 34"	22° 32' 11"	Cái	Đen	47,5	9	MN914900
HM19		104° 17' 44"	20° 43' 39"	Cái	Đen	51,1	14	MN914901
HM20		104° 17' 27"	22° 31' 57"	Đực	Đen	43	16	MN914902
HM21		103° 49' 59"	22° 19' 54"	Cái	Đỏ	55,6	24	MN914903
HM22	TT. Sapa, Lào Cai	103° 49' 59"	22° 19' 54"	Cái	Vện	46,2	15,5	MN914904
HM23		103° 47' 11"	22° 24' 32"	Cái	Đen	54,1	19	MN914905
HM24	H. Quang Bình, Hà Giang	104° 30' 10"	22° 24' 43"	Đực	Đen, Đốm trắng	52,6	21	MN900871
HM25		104° 58' 37"	22° 49' 47"	Đực	Đen	50,4	16	MN900872
HM26	P. Minh Khai, Hà Giang	104° 59' 13"	22° 49' 13"	Đực	Đen	53,45	20	MN900873
HM27		104° 59' 13"	22° 49' 13"	Cái	Đen vện	44,6	13	MN900874
HM28		104° 59' 13"	22° 49' 13"	Cái	Đen	53	22	MN900875

HM29		104° 58' 53"	22° 50' 1"	Đực	Đen	51,1	14	MN900876
HM30	P. Nguyễn Trãi, Hà Giang	104° 59' 5"	22° 49' 41"	Cái	Đen	49	16	MN900877
HM31		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Đực	Vàng	50	15	MN900878
HM32		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Đực	Vàng đen	47,05	14	MN900879
HM33		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Đực	Nâu đỏ	51,2	18	MN900880
HM34		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Cái	Vện	48,5	21	MN900881
HM35	P. Trần Phú, Hà Giang	104° 59' 5"	22° 49' 41"	Đực	Đen	45,6	16	MN900882
HM36		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Cái	Vện	48,2	17	MN900883
HM37		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Cái	Vàng	45,9	16	MN900885
HM38		104° 59' 5"	22° 49' 41"	Cái	Đen	48,6	19	MN900886
HM39		104° 59' 21"	22° 49' 57"	Cái	Vàng khoang	44,6	20	MN900887
HM40		104° 59' 20"	23° 4' 5"	Đực	Trắng khoang	52,6	30	MN900888
HM41		104° 59' 20"	23° 4' 5"	Đực	Vện	46,6	15	MN900889
HM42	H. Quản Bạ, Hà Giang	104° 59' 20"	23° 4' 5"	Cái	Vện đen	47,6	16	MN900890
HM43		104° 59' 20"	23° 4' 5"	Cái	Đen	50,6	23	MN900891
HM44		104° 59' 20"	23° 4' 5"	Cái	Vàng kim	46	14,5	MN900892
HM45	H. Đồng Văn, Hà Giang	105° 21' 15"	23° 16' 40"	Đực	Nâu đỏ	55,5	21	MN900893

Bảng 2: Các giống chó tham khảo trên GenBank trong nghiên cứu.

Tên giống	Số mẫu	Địa điểm	Mã số GenBank	Ghi chú
Chó Sói Tây Tạng (Tibetan wolf) <i>Canis lupus laniger</i>	2	Trung Quốc	FJ032363; NC011218	Loài ngoài nhóm
Chó Sói hoang (<i>Canis latrans</i>) (coyote)	3	Mỹ	DQ480511; DQ480510; DQ480509	
Chó Jindo Hàn Quốc	1	Hàn Quốc	AF531741	Haplotype E1
Chó Pungsan Hàn Quốc	1	Triều Tiên	EU789662	Haplotype E1
Chó Chindo Nhật Bản	1	Nhật Bản	AB622528	Haplotype E1

Chó Shiba Nhật Bản	1	Nhật Bản	D83632	Haplotype E1
Chó Phú Quốc	2	Việt Nam	KF757297; KF757290	Haplotype E1; E4
Chó Sói Trung Quốc (Chineses wolf)	1	Trung Quốc	AY916845	
Chó Sharpei Trung Quốc	1	Trung Quốc	GU079513	



Hình 1. Giống chó H'ông cộc đuôi được lấy mẫu máu tại Hà Giang (A) và Lào Cai (B).

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit InviMag® Blood DNA Mini Kit/KFDuo (Thermo scientific, Mỹ). Các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nhân bản gen đích bằng kỹ thuật PCR

Vùng siêu biến thứ nhất thuộc vùng D-loop của hệ gen ty thể giống chó H'ông cộc đuôi được nhân bản bằng kỹ thuật PCR sử dụng các cặp mồi: DF: 5'-GCACCCAAAGCTGAGATTC-3'; DR: 5'-ACCTTGATTTTATGCGTGAGTT-3' được thiết kế dựa trên trình tự tham khảo (AY729880) trên GenBank với kích thước lý thuyết 650 bp. Mỗi phản ứng PCR có thể tích 25 μ L với các thành phần: 12,5 μ L PCR Master mix kit (2X), 1,25 μ L mồi xuôi (10 pmol/ μ L), 1,25 μ L mồi ngược (10 pmol/ μ L), 3 μ L DNA (10 - 20 ng), 7 μ L H₂O deion). Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model 9700 (GeneAmp PCR System 9700, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

gồm: 94°C trong 3 min; tiếp sau là 35 chu kỳ nối tiếp nhau với các bước: 94°C trong 45 s, 55°C trong 45 s, 72°C trong 45 s; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72°C trong 10 min, giữ sản phẩm ở 4°C.

Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự nucleotide

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại Công ty Macrogen, Hàn Quốc. Trình tự DNA sau khi giải trình tự được hiệu chỉnh và loại bỏ các tín hiệu nhiễu bằng phần mềm ChromasPro2.1.6 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Queensland, Australia) và được so sánh với các trình tự đã có trên GenBank (sử dụng công cụ BLAST trong NCBI). Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 (Hall, 1999).

Định loại haplotype

Xác định haplogroup, haplotype và các vị trí đột biến của giống chó H'ông cộc đuôi trên

vùng gen HV1 (D-loop) sử dụng công cụ định loại nhanh haplotype HV1 DNA ty thể chó (Thai Ke Quan *et al.*, 2017).

Đa dạng di truyền

Sử dụng phần mềm DnaSP 5.1 (Pablo *et al.*, 2009) để xác định chỉ số đa dạng nucleotide (Pi), đa dạng haplotype (Hd) và số nucleotide khác biệt trung bình (Kt) của giống chó H'mông cộc đuôi.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood) sử dụng phần mềm Treefinder (Jobb *et al.*, 2004) và phương pháp Bayesian inference (BI) bằng phần mềm MrBayes v 3.2.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Trước khi phân tích ML và BI, dữ liệu trình tự nucleotide sẽ được khảo sát phân bố nucleotide, kiểm tra các giả thuyết và xác định mô hình tiến hóa tối ưu sử dụng bởi Kakusan 4.0 (Tanabe, 2011) dựa trên thông tin Akaike được hiệu chỉnh (corrected AICc - Akaike Information Criterion). Mô hình tiến hóa tốt nhất được chọn cho ML là mô hình đảo chiều thời gian tổng thể (GTR) với giá trị tham số gamma (G: 0,1000 trong ML và 0,3665 trong BI) trên vùng gen HV1. Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap) trong cây ML và BI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định haplotype của giống chó H'mông cộc đuôi

Sản phẩm PCR 45 mẫu của giống chó H'mông cộc đuôi sau khi được giải trình tự hai chiều (xuôi và ngược) của vùng gen HV1 được hiệu chỉnh, ghép nối với sự trợ giúp của phần mềm chromasPro 2.1.6 để loại bỏ các vùng tín hiệu nhiễu và các đỉnh màu không rõ ràng. Tổng số 45 trình tự nucleotide sau hiệu chỉnh đã thu được đoạn trình tự có kích thước 650 bp, đúng kích thước lý thuyết và được lần lượt đưa vào công cụ định loại haplotype của Thai Ke Quan và đồng tác giả (2017) để xác định haplogroup,

haplotype và các vị trí đột biến làm cơ sở đánh giá sự đa dạng di truyền giống chó H'mông cộc đuôi. Tất cả 45 mẫu này đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế với mã số GB (MN914882 đến MN900893) và xác định được 25 haplotype thuộc 4 haplogroup là A, B, C và E (Bảng 3). Trong đó, hầu hết các mẫu đều nằm trong haplogroup A (41/45; 91,1%), nhóm haplogroup B, C, và E đều chỉ có 1 mẫu thuộc các nhóm này, chiếm tỷ lệ rất thấp.

Dựa trên trình tự nucleotide đa hình đơn (SNP) của vùng D-loop, các nhà nghiên cứu đã xác định được 6 haplogroup của các giống chó trên thế giới là A, B, C, D, E, và F (Li, Zhang, 2012; Pang *et al.*, 2009; Savolainen *et al.*, 2002; Thai Ke Quan *et al.*, 2016 a,b). Trong đó, 71,3% chó mang haplogroup A; 95,9% mang haplogroup A, B hoặc C. Cả 3 nhóm (A, B, C) đều phân bố trên toàn thế giới với tần suất ngang nhau (97,4%) (trừ nhóm C không có ở châu Mỹ). Ngược lại, ba nhóm haplogroup D, E và F là các haplogroup hiếm (chiếm chưa đến 3%), trong đó nhóm E và F chỉ chiếm 1-2% 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) (Bjornerfeldt *et al.*, 2006; Nguyen Thanh Cong *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2009; Tanabe, 2006). 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 giống chó trên thế giới không phải là kết quả của quá trình thuần hóa chúng ở từng khu vực địa lý khác nhau mà do quá trình di cư và quá trình giao phối giữa các giống với nhau. Điều này lý giải vì sao các giống khác nhau có thể mang nhiều haplotype khác nhau và một haplotype có thể tìm thấy ở nhiều giống chó khác nhau (Trần Hoàng Dũng *et al.*, 2016). Nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ ra rằng trong 45 cá thể giống chó H'mông cộc đuôi tìm ra 25 haplotype thuộc 4 nhóm A, B, C và E hoàn toàn phù hợp với các công bố trên thế giới và đây sẽ là nguồn thông tin rất cần thiết, quan trọng giúp làm sáng tỏ nguồn gốc chó H'mông cộc đuôi của Việt Nam.

Bảng 3. Nhận dạng haplotype của 45 cá thể chó H'mông cộc đuôi trong nghiên cứu.

Haplogroup	Haplotype	Các vị trí đột biến	Số lượng	Tần suất (%)
A	A3	A15627G T15639A C15814T T16025C	2	4,44
	A11	T15639A C15814T T16025C	4	8,89
	A29	A15627G T15639A G15652A C15814T	4	8,89
	A44	T15639A G15652A C15814T	1	2,22
	A62	A15627G T15639A T15751C C15814T C15959T T16025C A16034G	6	13,33
	A73	A15627G T15639A G15652A T15665C C15814T	3	6,67
	A85	A15627G C15630T T15639A C15814T T16025C	2	4,44
	A99	T15620C A15627G T15639A C15750T C15814T T16025C	1	2,22
	A106	A15627G C15630T T15639A C15814T C15912T T16025C	1	2,22
	A121	A15627G T15639A T15650C C15814T C15959T T16025C	1	2,22
	A131	C15487T A15627G T15639A C15814T C15959T T16025C A16033G	2	4,44
	A138	A15627G T15639A C15814T C15959T T16025C A16034G	3	6,67
	A140	A15627G T15639A C15814T A15931- C15959T T16025C A16033G	1	2,22
	A143	A15627G T15639A G15652A T15665C C15814T C15841T A15931-	1	2,22
	An1	T15625C T15639A G15652A C15814T	1	2,22
	An2	T15639A A15811G C15814T T16025C A16033G	1	2,22
	An3	C15486T A15627G T15639A C15814T C15959T T16025C A16034G	1	2,22
	An4	A15627G T15639A G15652A T15665C C15807T C15814T C15841T A15931-	1	2,22
	An5	T15505C A15627G C15630T T15639A C15814T T16025C A16033G	2	4,44
	An6	A15627G T15639A C15814T C15959T T16025C A16032G	2	4,44
An7	A15626G A15627G T15639A C15814T C15959T T16025C A16034G	1	2,22	
B	B1	C15526T C15595T T15612C C15632T T15639G A15643G G15652A T15800C C15814T T15815C C15912T C15955T A16003G	1	2,22
C	C2	C15508T C15526T T15611C T15639G T15650C T15800C C15814T C15912T G15938- C15955T A16003G	1	2,22
E	E1	C15526T A15553G C15632T T15639A G15652A T15800C A15811G C15814T C15912T G15938- C15955T A16003G	1	2,22

E4 C15526T A15553G C15632T T15639A G15652A T15800C A15811G C15814T C15912T G15938-A16003G 1 2,22

Chú ý: haplotype An1, An2, An3, An4, An5, An6 và An7 là các haplotype mới thuộc nhóm haplogroup A.

Bảng 4. 25 haplotype đa hình của 45 cá thể chó H'ông cộc đuôi trong nghiên cứu.

Table with 25 rows (A3 to E4) and 45 columns. Each cell contains a number from 1-9 or a nucleotide letter (A, C, G, T, -). Row A3-143 are haplotypes belonging to group A. Row An1-7 are newly identified haplotypes in group A. Row B1, C2, E1, E4 belong to other groups.

Tổng số 45 trình tự DNA vùng siêu biến thứ nhất (HV1) thuộc vùng D-loop của 45 mẫu chó trong nghiên cứu đã xác định được 25 haplotype khác nhau, trong đó có 7 haplotype mới (An1 đến An7) thuộc haplogroup A chưa được công bố, 18 haplotype còn lại đã được ghi nhận trước đây ở các giống chó trên thế giới (Bảng 3). Các trình tự mang haplotype thuộc các haplogroup thường gặp là A, B, C chiếm đến 95,56%, không có trường hợp nào mang haplotype thuộc nhóm D và F. Đáng chú ý, đã xuất hiện 2 haplotype (E1 và E4) chiếm 4,44% mang haplotype thuộc nhóm

E là nhóm hiếm trên thế giới. Trong số các haplotype thuộc nhóm A, B, C của giống chó H'ông cộc đuôi có một tỷ lệ cao (44,45%) các haplotype phổ quát (Universal type haplotype – UT haplotype) là A11, A29, A62, A73, A138. Các haplotype này cũng thường được ghi nhận với tỷ lệ cao trong nhiều nghiên cứu đã công bố (Ardalan et al., 2015; Imes et al., 2012; Pang et al., 2009; Thai Ke Quan et al., 2016a,b). Hơn nữa, chó H'ông cộc đuôi còn mang các haplotype dạng cô như B1 và C2. Bùi Xuân Phương và đồng tác giả (2015) đã xác định được

8 haplotype trong 120 cá thể thu ngẫu nhiên từ mẫu tai của chó H'mông cộc đuôi tại Hà Giang và Lào Cai. Tuy nhiên các haplotype này chưa được đối chiếu, so sánh và nhận dạng tên haplotype với các haplotype đã công bố trên thế giới. Gần đây, Nguyen Thanh Cong và đồng tác giả (2019) đã xác định được 15 haplotype khác nhau bao gồm: A22, A29, A44, A65, A73, A121, B5, C2 và 7 haplotype mới trong 31 cá thể thu ngẫu nhiên từ mẫu lông của chó H'mông cộc đuôi tại các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam và các hộ chăn nuôi ở Hà Nội. Ngoài các haplotype đã được công bố bởi Nguyen Thanh Cong và đồng tác giả (2019), trong nghiên cứu của chúng tôi đã bổ sung thêm 20 haplotype (13 haplotype thuộc nhóm A, B, C và 7 haplotype mới chưa đặt tên) cho giống chó H'mông cộc đuôi ở Việt Nam.

Kết quả này đã làm tăng số lượng các haplotype được tìm thấy ở giống chó H'mông cộc đuôi là 32 haplotype, cao hơn số lượng haplotype được tìm thấy ở chó xoáy Phú Quốc (15 haplotype) và chó nhà Việt (15 haplotype) (Trần Hoàng Dũng *et al.*, 2016).

Đa dạng di truyền giống chó H'mông cộc đuôi

Trên toàn bộ chiều dài DNA vùng siêu biến thứ nhất (HV1) thuộc vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi có 38 vị trí nucleotide đa hình, gồm 32 vị trí có các đột biến thay thế nucleotide và 6 vị trí có đột biến mất hay thêm nucleotide (indel mutation). Hầu hết các đột biến thay thế là đồng hoán (31/32), chỉ có 1 vị trí nucleotide 15639 là có dị hoán (Bảng 4).

Bảng 5. Mức độ đa dạng nucleotide ở giống chó H'mông cộc đuôi.

Giống chó	Pi	Hd	Kt	Nguồn tham khảo
Chó H'mông cộc đuôi	0,00801	0,9616	5,18384	Trong nghiên cứu
Chó lưng xoáy Phú Quốc	0,014588	0,9042	8,519596	Thái Kế Quân <i>et al.</i> , 2019
Chó nhà Việt Nam	0,014035	0,8814	8,182424	
Chó Pungsan, Triều Tiên	0,011367	0,9064	6,615385	Pang <i>et al.</i> , 2009; Savolainen <i>et al.</i> , 2002
Chó Jindo, Hàn Quốc	0,006645	0,7308	3,867199	
Chó Thái Lan	0,008599	0,9493	5,595971	
Chó Shepherd Đức	0,008681	0,6842	5,052632	Kopan <i>et al.</i> , 2009; Okumura <i>et al.</i> , 1996; Savolainen <i>et al.</i> , 2002;
Chó Shiba, Nhật Bản	0,012221	0,8161	7,112644	
Chó Ngao Tây Tạng	0,006645	0,8063	3,867389	Ren <i>et al.</i> , 2017
Chó Kangal, Thổ Nhĩ Kỳ	0,015272	0,8407	8,888482	Pang <i>et al.</i> , 2009; Savolainen <i>et al.</i> , 2002
Chó Maltese	0,011758	0,8046	6,855172	Takahasi <i>et al.</i> , 2002
Chó chăn cừu Bồ Đào Nha	0,008291	0,4841	4,825397	Asch <i>et al.</i> , 2005
Chó Serra da Estrela Bồ Đào Nha	0,016842	0,8520	9,802139	

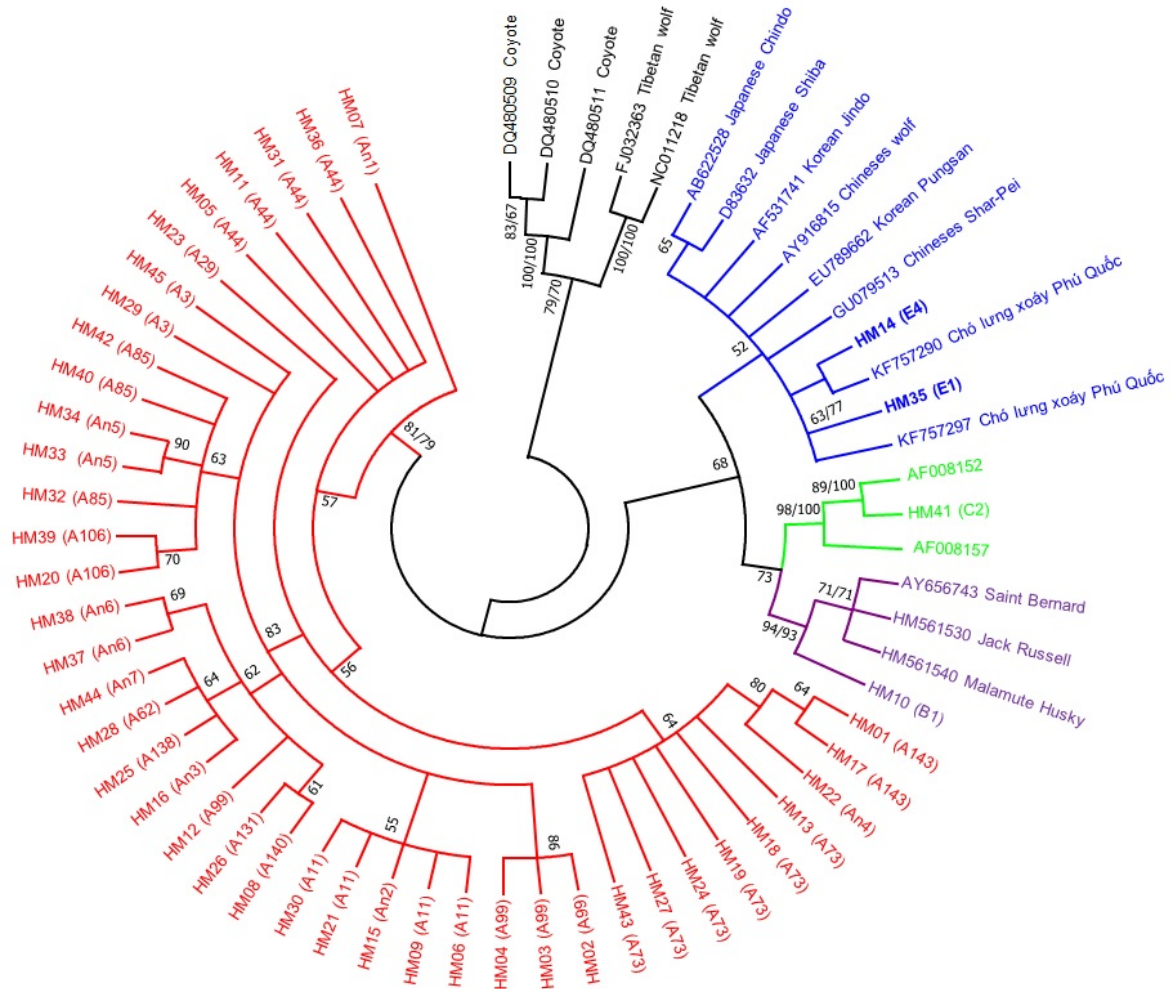
Chú ý: Chỉ số đa dạng nucleotide (Pi), đa dạng haplotype (Hd) và số nucleotide khác biệt trung bình (Kt)

Chỉ số đa dạng nucleotide (Pi), đa dạng haplotype (Hd) và số nucleotide khác biệt trung bình (Kt) là các tham số cơ bản được sử dụng để đánh giá mức độ đa dạng di truyền. Hd là thước đo tính duy nhất của một kiểu haplotype cụ thể trong một quần thể nhất định, nó phản ánh sự phong phú haplotype trong một quần thể (Fu,

1997). Pi và Kt mức độ đột biến haplotype (Tajima, 1989). Kết quả ở Bảng 4 chỉ ra chỉ số Pi, Hd và Kt ở giống chó H'mông cộc đuôi lần lượt là 0,00801; 0,96162; 5,18384, tương ứng. Số nucleotide khác biệt trung bình (Kt = 5,18384) và chỉ số đa dạng nucleotide (Pi = 0,00801) giữa các haplotype của chó H'mông cộc đuôi cao hơn 4

giống (Jindo, Nhật Bản; Chó Ngao Tây Tạng, chó Shepherd Đức và chó chăn cừu Bồ Đào Nha) nhưng lại thấp hơn hẳn 8 giống (chó lung xoáy Phú Quốc, chó nhà Việt Nam, chó Thái Lan, Pungsan Triều Tiên, Shiba Nhật Bản, Kangal Thổ Nhĩ Kỳ, Maltese và Serra da Estrela Bồ Đào Nha). Với 25 haplotype được phát hiện trong 45

mẫu khảo sát, chỉ số đa dạng haplotype của giống chó H' mông cọc đuôi ($Hd = 0,96162$), chỉ ra xác suất để bắt gặp hai mẫu có haplotype khác nhau là cao (96,162%). So với một số giống chó khác trên thế giới, mức độ đa dạng haplotype ở giống chó H' mông cọc đuôi cao hơn nhiều so với 12 giống chó khác trên thế giới (Bảng 5).



Hình 3. Mối quan hệ di truyền 45 mẫu chó H' mông cọc đuôi trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng HV1 bằng phương pháp ML và BI. Các số trên các nhánh tượng trưng cho sự hỗ trợ bootstrap. Loài Sói hoang (Coyote) và Sói Tây Tạng (Tibetan wolf) là loài ngoài nhóm.

Mối quan hệ di truyền giữa 45 mẫu chó H' mông cọc đuôi

Để có cái nhìn tổng quát về mối quan hệ di truyền giữa 45 mẫu chó H' mông cọc đuôi trong nghiên cứu, sơ đồ mối quan hệ di truyền của các

giống chó theo cả 2 phương pháp ML và BI đã được thiết lập và các kết quả nhận được là như nhau (Hình 3). Các phân tích ML và BI đã tạo ra với thông số tương ứng $(-lnL) = 1474,752$ và $1644,137$. Ngoài ra, thông tin về trình tự nucleotide vùng gen HV1 ở một số giống chó

khác nhau trên thế giới đã được sử dụng trong thiết lập sơ đồ hình cây (Bảng 2). Kết quả phân tích cho thấy biểu đồ hình cây được chia thành các nhóm riêng rẽ khác nhau thể hiện cho các haplogroup (A, B, C và E). Các cá thể trong cùng một haplogroup có quan hệ gần gũi nhau về mặt di truyền và đều nằm vào trong từng nhóm riêng biệt trên biểu đồ hình cây. Điều đáng chú ý trong 45 cá thể chó H'mông cộc đuôi, chúng tôi đã xác định được 4 cá thể mang haplotype dạng hiếm trên thế giới như HM10 (B1), HM (C2), HM35 (E1) và HM14 (E4). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra dựa vào các haplotype hiếm có thể xác định được nguồn gốc các giống chó (Nguyen Thanh Cong *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2009; Thai Ke Quan *et al.*, 2016 a,b; Trần Hoàng Dũng *et al.*, 2016). Pang và đồng tác giả (2009) xác định nhóm haplotype 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). Mặt khác, Trần Hoàng Dũng và đồng tác giả (2016) đã chỉ ra, không một cá thể chó nhà nào mang haplotype dạng E như đã tìm thấy ở chó lưng xoáy Phú Quốc và giống chó này có nguồn gốc từ khu vực Đông Á. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho phép nhận định chó H'mông cộc đuôi có chung nguồn gốc với loài chó lưng xoáy Phú Quốc, chó Pungsan Triều Tiên, chó Jindo Hàn Quốc, chó Shiba và Chindo Nhật Bản và chó Shar-Pei Trung Quốc.

KẾT LUẬN

Tổng số 25 haplotypes thuộc 4 haplogroup khác nhau (A, B, C và E) đã được xác định dựa trên phân tích vùng siêu biến thứ nhất (HV1) trong vùng D-loop của 45 mẫu máu chó H'mông cộc đuôi. Trong đó đã được xác định có 7 haplotype mới (An1 đến An7). Ghi nhận đầu tiên 02 cá thể chó H'mông cộc đuôi (HM14 và HM35) chứa 2 haplotype thuộc nhóm hiếm trên thế giới (E1 và E4), đây là thông tin trong việc truy tìm nguồn gốc chó H'mông cộc đuôi ở Việt Nam. Mức độ đa dạng di truyền của loài chó H'mông cộc tương đối cao ($H_d = 0,96$; $P_i = 0,008$).

Lời cảm ơn: Công trình là sản phẩm của nhiệm vụ cấp TT Nhiệt đới Việt - Nga "Bảo tồn phát

triển và đề nghị tổ chức giống chó thế giới (FCI) công nhận tiêu chuẩn giống tạm thời cho giống chó H' mông cộc đuôi”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ardalan A, Oskarsson MCR, Asch B, Rabakonandrianina E, Savolainen P (2015) African origin for Madagascan dogs revealed by mtDNA analysis. *Royal Society Open Science* 2(5): 140552.
- Asch VB, Pereria L, Pereria F, Santa-Rita P, Lima M, Amorim A (2005) MtDNA diversity among four Portuguese autochthonous dog breeds: A fine-scale characterisation. *BMC Genetics* 6: 37.
- Bjornerfeldt S, Webster MT, Vila C (2006) Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication. *Genome Res* 16(8): 990-994
- Bùi Xuân Phương, Phạm Thanh Hải, Đinh Thế Dũng, Hồ Thị Loan, Đặng Tất Thế (2015) Nghiên cứu sự đa hình vùng D-loop của giống chó H'mông cộc đuôi ứng dụng trong công tác chọn giống. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới* 9: 11-18.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-25.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hart BL (1995) Analysing breed and gender differences in behaviour. In: The domestic dog. Its evolution, behaviour and interactions with people (Serpell J, ed). *Cambridge: Cambridge University Press*: 65-77.
- Imes DL, Wictum EJ, Allard MW, Sacks BN (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.
- Jobb G, Haeseler A, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4: 18
- Kopan E, Sarac GC, Acan SC, Savolainen P, Togan I (2009) Genetic relationship between Kangal, Akbash and other dog populations. *Discrete Applied Mathematics* 157(10): 2335-2340

- Li Y, Zhang YP (2012) High genetic diversity of Tibetan Mastiffs revealed by mtDNA sequences. *Chinese Science Bulletin* 53(13): 1483-1487.
- Lorenz K (1975) Foreword. In: The Wild Canids: Their Systematics, Behavioural Ecology and Evolution (ed.: Fox, M.W.) *Van Nostrand Reinhold, New York*.
- Marinov M, Teofanova D, Gadjev D, Radoslavov G, Hristov P (2018) Mitochondrial diversity of Bulgarian native dogs suggests dual phylogenetic origin. *PeerJ* 6: e5060.
- Nguyen Thanh Cong, Nguyen Thi Ai, Nguyen Thi Thanh Thao, Le Tuan Loc, Tran Thi Bich Huy, Pham Cong Hoat, Thai Ke Quan, Tran Hoang Dung (2019) Evaluation of genetic diversity of H'mong bobtail based on mitochondrial D-loop sequence. *J Anim Husbandry Sci Technics* 249: 17-22.
- 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: 397-405.
- Pablo Librado, Julio Rozas (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Pang JF, Kluetsch C, Zou XJ, Zhang AB, Luo LY, Angleby H, Ardalan A, Ekström C, Skölleremo A, Lundeborg J, Matsumura S, Leitner T, Zhang YP, 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.
- Ren Z, Chen H, Yang X, Zhang C (2017) Phylogenetic analysis of Tibetan mastiffs based on mitochondrial hypervariable region I. *J Genet* 96: 119-125.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBAYES 2.3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585- 95
- Takahasi S, Miyahara K, Ishikawa H, Ishiguro N, Suzuki M (2002) Lineage classification of canine inheritable disorders using mitochondrial DNA haplotypes. *J Vet Med Sci.* 64(3): 255-259.
- Tanabe AS (2011) Kakusan 4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol Ecol Resour* 11: 914-921.
- 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.
- Thái Kế Quân (2019) Nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể chó Phú Quốc dựa trên trình tự HV1 thuộc vùng CR trên hệ gen ty thể. Luận án Tiến sĩ. *Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*.
- Thai Ke Quan, Chung Anh Dung, Tran Hoang Dung (2017) Canis mtDNA HV1 database: a web-based tool for collecting and surveying Canis mtDNA HV1 haplotype in public database. *BMC Genetics* 18(60).
- Thai Ke Quan, Huynh Van Hieu, Chung Anh Dung, Tran Hoang Dung (2016a) Evaluation of genetic diversity of Vietnamese dogs based on mitochondrial dna hypervariable-1 region. *Научный результат. Серия «Физиология»* 2(3): 45-50.
- Thai Ke Quan, Nguyen Van Tu, Tran Ngoc Trinh, Huynh Van Hieu, Chung Anh Dung, Tran Hoang Dung (2016b) Evaluation of genetic diversity of Phu Quoc ridgeback dogs based on mitochondrial DNA hypervariable – 1 region. *JBiotechnol* 14(1A): 245-253.
- Trần Hoàng Dũng, Thái Kế Quân, Nguyễn Thành Công, Huỳnh Văn Hiếu, Chung Anh Dũng (2016) Xác định nguồn gốc chó Phú Quốc bằng trình tự vùng D-Loop trong genome ty thể. *Tạp chí Sinh học* 38(2): 269-278.
- 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 Genet Syst* 72: 229-238.
- Turnbell PF, Reed CA (1974) The fauna from the terminal Pleistocene of Palegawra Cave, a Zarzian occupation site in northeastern Iraq. *Fieldiana Anthropol* 63: 81-146.
- Wayne RK (1986a) Cranial morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphological change. *Evolution* 40: 243-261.
- Wayne RK (1986b) Limb morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphological change. *J Morphol* 187: 301-319.
- Zimen E (1981) The Wolf: His Place in the Natural World. *Souvenir Press, London*.

GENETIC DIVERSITY OF H'MONG SHORT TAIL DOG BASED ON SEQUENCING OF THE D-LOOP HYPERVARIABLE – 1 REGION (HV1)

Pham Thanh Hai^{1,2}, Bui Xuan Phuong¹, Tran Huu Coi¹, Phung Thanh Tung¹, Ngo Quang Duc¹, Nguyen Minh Khang¹, Vu Dinh Duy^{1,2}

¹*Institute of Tropical Ecology, Vietnam - Russian Tropical Centre*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Vietnam Kennel Association (VKA)*

SUMMARY

The H'mong short tail dog is breed indigenous dogs, distributed in mountainous areas of northern Vietnam. H'mong short tail dog possesses many valuable properties such as intelligence, agility, good health, good shape, human friendliness, ease of training and it can fully meet the needs of war Dogs intelligence, strength, good parenting, people friendly and more importantly, still keeping wild characteristics of hunting dogs. The total 45 samples (blood) collected from 45 individuals in two provinces of Northern Vietnam (Ha Giang and Lao Cai), were used to assess genetic diversity based on sequencing hypervariable – 1 region (HV1) in D-loop genes. In the current study showed that genetic diversity of H'mong short tail dog was high with nucleotide diversity ($P_i = 0.00801$), haplotype diversity ($H_d = 0.96162$) and average number of nucleotide differences ($K_t = 5.18384$). Furthermore, 25 different haplotypes were recorded and divided into four main groups: A, B, C, and E. Of which, seven new haplotypes in haplogroups A (An1 to An7) and 18 haplotypes have been published in the world. In addition, H'mong short tail dog was found rare haplogroups (B1, C2, E1 and E4). Notably, there is none individuals contain haplotype of haplogroups (D and F). H'mong short tail dog were identified 38 single nucleotide polymorphisms, including 32 nucleotide base substitution/base insertion and 6 nucleotide indel mutation. Almost mutation was transversion (31/32) and only one nucleotide transition mutations. Phylogenetic tree shown that H'mong short tail dog have close relationship with dogs origin from East Asia (China, Japan and Korea).

Keywords: *Genetic diversity, H'Mong short tail dog, HV1 (D-loop region), haplotype, haplogroup*