

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐA HÌNH GEN PIT1 ĐẾN TÍNH TRẠNG NĂNG SUẤT CỦA GIỐNG GÀ TÀU VÀNG

Lê Thị Thu Hà¹, Nguyễn Thị Lệ Hằng², Lê Thị Thanh Tâm³,
Nguyễn Thị Diệu Thúy⁴, Nguyễn Thị Thu⁴

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công tác lai tạo và chọn lọc giống có ý nghĩa quan trọng nhằm góp phần nâng cao năng suất, chất lượng giống và giảm giá thành sản phẩm. Bên cạnh các phương pháp chọn giống truyền thống dựa vào gia phả hay kiểu hình, thì việc tìm ra các gen, các vùng gen ảnh hưởng đến các tính trạng năng suất để hỗ trợ chọn giống được quan tâm nhiều trong những năm gần đây. Trong số các gen liên quan đến năng suất của gà, gen *PIT1* (Pituitary-specific transcription factor) được xem là gen tiền cử được nghiên cứu nhiều trên các giống/dòng gà thương phẩm, bản địa. Gà Tàu Vàng là một trong số các giống gà bản địa thuộc danh sách bảo tồn gen của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn được nuôi chủ yếu ở các tỉnh phía Nam với ưu điểm là thích nghi với điều kiện sinh thái khác nhau, chất lượng thịt thơm ngon được người tiêu dùng ưa chuộng, tuy nhiên tốc độ tăng trưởng còn hạn chế, chất lượng giống đang bị lai tạp nhiều do công tác giống chưa được kiểm soát chặt chẽ.

Gen *PIT1* thuộc họ gen mã hóa cho các protein, đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của cơ thể và điều hòa các hormone sinh trưởng như GH, prolactin, TSH- β và GHRH ở mức độ mRNA (Nie và ctv, 2008). Kết quả giải trình tự bộ gen gà năm 2006 cho thấy gen *PIT1* nằm trên nhiễm sắc thể số 1 (GGA1) với kích thước phân tử khoảng 14 kb bao gồm 7 exon và 6 intron. Kết quả nghiên cứu ghi nhận được 3 trong số 5 SNP của gen *PIT1* liên quan đáng kể đến tính trạng tăng trưởng ở gà lai White Recessive Rock x Xinghua (Nie và ctv, 2005; Nie và ctv, 2008). Đột biến C \rightarrow T trên intron 5 của gen *PIT1* có sự liên kết cao với trọng lượng 6 tuần tuổi, trọng lượng cánh, trọng lượng cơ lưng ở gà thịt thương phẩm Iran (Zahra Rodbari và ctv, 2011). Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định các đa hình của gen *PIT1* trên giống gà Tàu Vàng nuôi tại Phân viện Chăn nuôi và tìm ra mối liên quan giữa đa hình kiểu gen *PIT1* với các tính trạng năng suất sinh trưởng và sinh sản nhằm góp phần gia tăng hiệu quả trong công tác chọn giống gà.

¹ Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

² Phân viện Chăn nuôi Nam Bộ

³ Học viên cao học Công nghệ Sinh học- Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

⁴ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Gà giống Tàu Vàng thế hệ thứ 6 được nuôi tại trung tâm Bình Thắng – Phân viện chăn nuôi Nam Bộ.

Thời gian nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2013 -12/2013.

2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu máu: Tổng số 200 mẫu máu của gà Tàu Vàng thuần bao gồm 127 con gà dòng mái và 73 con gà dòng trống có cùng điều kiện chăm sóc và nuôi dưỡng được theo dõi một số chỉ tiêu năng suất sinh trưởng, sinh sản.

Tách chiết DNA (Sử dụng kit tách chiết DNA - Geneomic DNA Minipreps của Bio Basic – USA): Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của Hãng sản xuất): Eppendorf chứa 500 μ l và 800 μ l TBP buffer được ly tâm 4000 vòng/3 phút, thu cạn. Bổ sung 200 μ l TE buffer và 500 μ l TBM Buffer, vortex mạnh, ủ mẫu ở 55°C trong 30 phút. Thu dịch nổi và thêm 260 μ l ethanol 99% cho vào cột lọc, ly tâm 10.000 vòng/2 phút, rửa cạn bằng 500 μ l Wash Solution, ly tâm 10.000 vòng/ 1 phút để loại Wash Solution. Chuyển cột vào eppendorf mới, tiếp tục thêm 50 μ l Elution Buffer, ủ mẫu ở 50°C trong 2 phút, ly tâm 10.000/1 phút. Thu được dung dịch DNA, thực hiện PCR hoặc bảo quản DNA ở -20°C (Lê Thị Thu Hà và ctv, 2013).

Kiểm tra nồng độ DNA: Sản phẩm DNA được xác định bằng cả 2 phương pháp định tính (điện di trên gel agarose 1%) và định lượng bằng máy quang phổ Spectrophotometer-3000 (BioRad, Mỹ) ở bước sóng 260nm và 280nm. Độ tinh sạch của DNA tối ưu khi giá trị OD₂₆₀/OD₂₈₀ nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0 và DNA có nồng độ >50ng/ μ l được dùng thực hiện phản ứng khuếch đại PCR.

Trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu: cặp môi sử dụng trong nghiên cứu này được tổng hợp bởi hãng Macrogen dựa thiết kế của Nei và ctv (2008) với trình tự như sau:

5'- GGGGATTTTGCCACTTTAGGG-3' (môi xuôi)

5'-TGGGTAAGGCTCTGGCACTGT- 3' (môi ngược).

Phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction): Sử dụng kit GoTaq® Green Master Mix (Promega), thành phần phản ứng PCR với thể tích 25 μ l bao gồm Buffer 2X, môi xuôi (10pmol), môi ngược (10pmol), DNA mẫu và nước cất 2 lần. Chu trình nhiệt được thực hiện với cặp môi chuyên biệt, gồm các giai đoạn (I) 94°C/3 phút (II) 35 chu kỳ: 94°C/30 giây-58°C/45 giây-72°C/60 giây (III) 72°C/5 phút giữ ở 4°C (Lê Thị Thu Hà và ctv, 2013).

Phản ứng PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism): Sản phẩm PCR đạt yêu cầu (cho kích thước đúng như mong muốn), tiếp tục được cắt enzyme giới hạn *TaqI* để tìm các điểm đa hình. Phản ứng PCR-RFLP gồm 2,5 µl Buffer 10X, 1,0 µl enzyme, 15 µl sản phẩm PCR và nước khử ion vừa đủ 20 µl. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 65°C (10-16 giờ). Sau đó sản phẩm PCR-RFLP được kiểm tra trên gel agarose (2%), đọc kết quả gel bằng hệ thống đèn UV (Lê Thị Thu Hà và ctv, 2013).

2.1 Các chỉ tiêu theo dõi

- Khối lượng (KL) gà mới nở (1 ngày tuổi), 4, 8, 12, 14, 19 tuần tuổi.
- Tăng trọng bình quân ngày (TTBQ).
- Năng suất trứng (NST): 12 tuần.
- Khối lượng trứng (KLT).

Bảng 1. Năng suất sinh sản của gà Tàu Vàng khảo sát

Tính trạng	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến động	Giá trị thấp nhất	Giá trị cao nhất
SLTBQ	30,66	7,12	23,21	11	52
KLTBQ	48,66	4,49	9,24	38,59	59,95

2.3. Phân tích xử lý số liệu

Số liệu được phân tích theo mô hình tuyến tính tổng quát (Minitab ver 17, 0)

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + \xi_{ij}$$

Trong đó, μ là trung bình chung, A là ảnh hưởng của kiểu gen, B là yếu tố ảnh hưởng đến tính trạng năng suất của gà, (A*B) là tương tác giữa kiểu gen và ảnh hưởng tính trạng năng suất; ξ_{ij} là sai số.

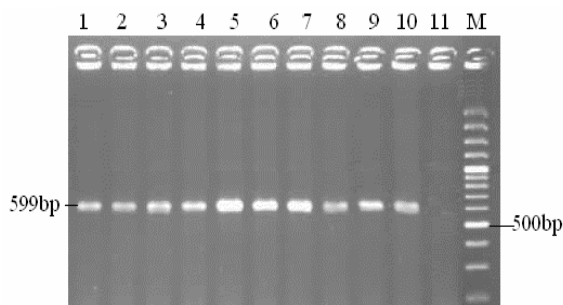
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phát hiện đa hình và xác định kiểu gen

Kết quả khuếch đại đoạn gen PIT1 bằng kỹ thuật PCR được trình bày ở hình 1. Sản phẩm PCR là một băng DNA đặc hiệu, rõ nét và có kích thước phân tử 442 bp.

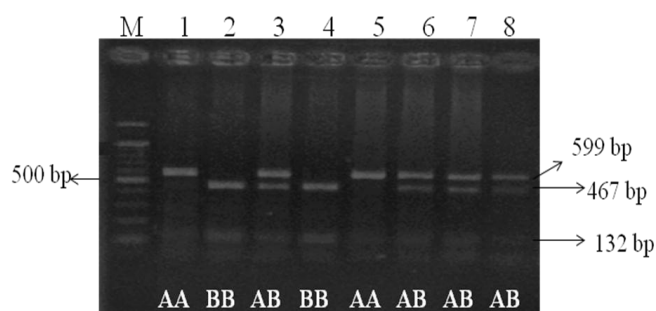
Enzyme *TaqI* có vị trí cắt là 5'...↓CGA...3'. Sản phẩm PCR được cắt bởi enzyme *TaqI* tạo nên 2 alen tương ứng: alen A không xuất hiện điểm cắt cho băng DNA với kích thước là 599bp và alen B xuất hiện điểm cắt cho 2 băng DNA với kích thước 467 bp và 132 bp. Tổ hợp 2 alen A và B tạo nên 3 kiểu gen AA (559bp), AB (559bp,

467bp; 132 bp) và BB (467bp và 132 bp) (Hình 2). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Zahra Rodbari và ctv (2011) trên đàn gà Iran thương phẩm.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen PIT1 gel agarose (1,5%)

M: Thang chuẩn 100bp; 1-10: sản phẩm PCR kích thước 599bp, giếng 11:Đc âm

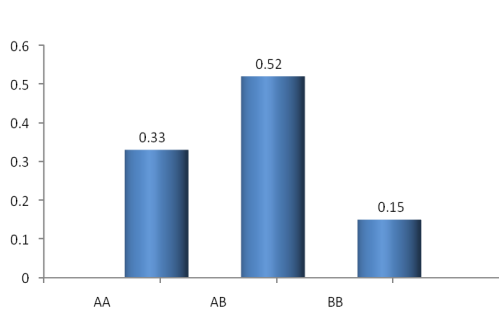


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm cắt PIT1-TaqI trên gel agarose (2%)

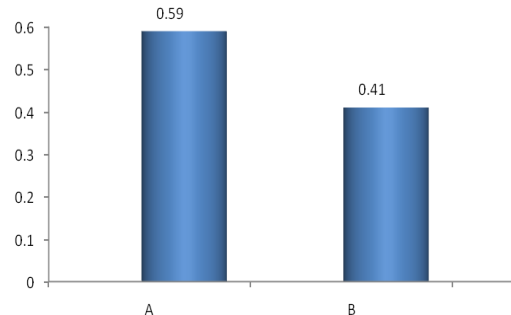
M: Thang chuẩn 100bp; 1, 5 kiểu gen AA; 2, 4 kiểu gen BB; 3, 6, 7, 8 kiểu gen AB

2. Tần số kiểu gen PIT1 tại điểm đa hình TaqI

Kết quả phân tích đa hình gen *PIT1* dựa vào enzym *TaqI* trên đàn gà Tàu vàng xuất hiện 3 kiểu gen AA, AB và BB. Biểu đồ 1 thể hiện tần số kiểu gen dị hợp tử AB chiếm cao nhất (52%), tiếp theo là nhóm gà mang kiểu gen AA (33%) và thấp nhất là gà mang kiểu gen BB (15%). Kết quả cũng cho thấy alen A chiếm tỉ lệ cao hơn alen B, theo đó tần số alen A chiếm 59% cao hơn tần số alen B chỉ có 41% trên nhóm gà thí nghiệm (Biểu đồ 2). Tần số kiểu gen ở quần thể gà thí nghiệm tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg.



Biểu đồ 1. Tần số kiểu gen PIT1 - TaqI



Biểu đồ 2. Tần số alen của gen PIT1 - TaqI

Tại Trung Quốc, kết quả nghiên cứu trên quần thể gà lai thế hệ F2 (White Recessive Rock x Chinese Xinghua) cho tần số kiểu gen AA chiếm rất cao (74,28%), tần số kiểu gen dị hợp tử AB chiếm (23,28%), tần số kiểu gen BB chiếm khá thấp (2,44%). Tần số alen A (85,92%) cao gấp nhiều lần tần số alen B(14,08%) (Nei và ctv, 2008).

Tại Iran Zahra Rodbari và cs (2011) cũng đã nghiên cứu đa hình PIT1-*TaqI* trên giống gà thịt thương phẩm. Kết quả tần số kiểu gen AA chiếm 61%, kiểu gen BB và AB có tỷ lệ lần lượt 32 % và 7 %. Trong khi đó kết quả khảo sát tần số đa hình PIT1-*TaqI* trên gà Tàu vàng cho tỉ lệ kiểu gen dị hợp tử cao nhất (52%), kiểu gen AA BB có tỉ lệ tương ứng là 33% và 15%. Trên gà thương phẩm ở Iran và gà Tàu vàng, tần số alen A đều cao hơn alen B, theo đó ở gà thịt thương phẩm Iran tần số alen A chiếm 77 %, alen B là 23 %, còn gà Tàu vàng, tần số alen A chiếm 59% và alen B chiếm 41%.

Như vậy so với các nghiên cứu trước đây, kết quả của nghiên cứu này phù hợp về tần số alen A luôn cao hơn alen B, tuy nhiên có sự trái ngược về tần số kiểu gen dị hợp tử AB và kiểu gen đồng hợp tử AA.

3. Ảnh hưởng của đa hình PIT1-*TaqI* đến năng suất sinh trưởng

Khảo sát mối quan hệ đa hình C/T/ *TaqI* (Genbank: Rs13905611) trên intron 5 của gen PIT1 với các tính trạng năng suất sinh trưởng của gà Tàu Vàng cho thấy không có sự khác biệt thống kê giữa kiểu gen AA, AB và BB với tính trạng này (trừ chỉ tiêu về khối lượng gà mới nở giữa các nhóm kiểu gen ($P < 0,05$). Sự khác biệt gần có ý nghĩa ở khối lượng gà 14 tuần ($P = 0,06$). Mặc dù vậy nhóm gà mang kiểu gen AB, BB có cân nặng cao hơn nhóm gà mang kiểu gen AA ở các giai đoạn tuổi (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của đa hình PIT1-*TaqI* đến năng suất sinh trưởng

Chỉ tiêu	BB (n=18)	AB (n=103)	AA(n=79)	P
KL mới nở	33,40 ^a ± 0,41	32,42 ^b ± 0,23	31,92 ^b ± 0,33	0,02
KL 4 tuần	322,86 ± 6,67	319,45 ± 3,70	313,15 ± 5,34	0,48
KL 8 tuần	791,83 ± 11,38	789,19 ± 6,32	784,31 ± 9,1200	0,85
KL 12 tuần	1270,71 ± 18,69	1264,12 ± 14,97	1251,43 ± 10,37	0,59
KL 14 tuần	1590,40 ± 16,37	1574,58 ± 13,11	1549,27 ± 9,08	0,06
KL 19 tuần	1961,51 ± 15,06	1960,88 ± 8,39	1947,04 ± 12,07	0,61
TTBQ	14,40 ± 0,09	14,50 ± 0,06	14,40 ± 0,09	0,62

Ghi chú: KL: khối lượng bình quân qua các tuần tuổi, TTBQ: tăng khối lượng bình quân toàn kỳ. ^{a,b}những chữ khác nhau trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Báo cáo của Jiang và ctv (2004) cho thấy đột biến không đồng nghĩa (Asn299Ile) trên exon 6 của gen *PIT1* có liên quan đến trọng lượng cơ thể gà ở tuần tuổi thứ 8. Tần số alen có sự khác nhau đáng kể giữa kiểu hình gà thịt và gà đẻ trứng.

Nghiên cứu của Nei và ctv (2005) cũng đưa ra kết luận alen T và C trong đa hình PIT1-*TaqI* có lợi cho sự phát triển của gà. Alen C liên kết cao với QTL quy định đặc điểm thành phần cơ thể PIT1 liên quan đáng kể với đường kính đùi ($P < 0,05$), liên

quan cao với tính trạng tăng cân và chiều dài chân ở gà 84 ngày tuổi ($P < 0,01$). Việc mất hoặc thêm 57 bp trên intron 2 ảnh hưởng đáng kể đến trọng lượng cơ thể trọng lượng ức trọng lượng chân ở giai đoạn gà 1-8 tuần tuổi (Qiu và ctv (2006). Một SNP khác trên exon 6 là đa hình *PIT1 - TasI* có liên quan với tăng trọng trung bình hàng ngày (TTBQ) ở giai đoạn 0-4 tuần, khối lượng gà ở 21, 28, 35; ở 63 ngày tuổi. Alen T trong đa hình *PIT1-TasI* thuận lợi cho sự phát triển nhanh trọng lượng ở gà (Nei và ctv, 2008). Cheng và ctv (2009) đã nghiên cứu ảnh hưởng của MR1 (*PIT1-TaqI*) với tính trạng phát triển trọng lượng cơ thể ngỗng. Kết quả nghiên cứu của Zahra Rodbari và ctv (2011) cho thấy đa hình *PIT1-TaqI* liên kết cao với trọng lượng cơ thể ở tuần thứ 6, trọng lượng thịt xẻ, trọng lượng cánh, trọng lượng đùi và trọng lượng cơ lưng ở gà thương phẩm Iran. Tổng hợp các kết quả trên cho thấy alen B có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của gà Tàu vàng, nhóm gà mang kiểu gen BB và AB có khuynh hướng tăng trưởng cao hơn nhóm gà mang kiểu gen đồng hợp tử AA.

Nhiều tác giả nước ngoài ghi nhận trên quần thể gà lai Trung quốc đa hình *PIT1* với alen B quy định đặc điểm thành phần cơ thể và có mối liên kết giữa kiểu gen B với các tính trạng chất lượng thịt xẻ (Nei và ctv, 2005; Nei và ctv, 2008; Zahra Rodbari và ctv, 2011).

4. Ảnh hưởng kiểu gen lên tính trạng năng suất sinh sản

Theo dõi số lượng và khối lượng trứng của gà trong thời gian 12 tuần để để phân tích, đánh giá mối liên kết giữa kiểu gen *PIT1* với số lượng và khối lượng trứng. Số lượng trứng bình quân khoảng 30,66 quả/mái và khối lượng trứng bình quân khoảng 48,66 gam trên gen *PIT1* (Bảng 4). Theo Khadem và ctv (2010) số lượng trứng gà bản địa Iran trong 12 tuần tuổi đầu tiên đạt bình quân 29 quả/mái, khối lượng trứng bình quân đạt được 43,8 gam. Như vậy, kết quả của nghiên cứu này cho kết quả thấp hơn về số lượng cũng như khối lượng trứng so với kết quả nghiên cứu trên gen *PIT1* đối với gà Tàu Vàng.

Kết quả khảo sát tính trạng trứng của gà thí nghiệm cho thấy ở gà có nhóm alen B số lượng trứng cao hơn gà thuộc nhóm alen A, nhóm gà mang kiểu gen AB và BB có số lượng trứng cao hơn nhóm gà mang kiểu gen AA. Theo đó số lượng trứng bình quân ở gà mang kiểu gen BB chiếm cao nhất (32,71 quả), thấp nhất ở gà mang kiểu gen AA (29,36 quả). Sự sai khác về số lượng trứng trên gen *PIT1* không có ý nghĩa về thống kê ($p > 0,05$). Ngược lại khối lượng trứng ở nhóm gà mang kiểu gen AA và AB cao hơn nhóm gà mang kiểu gen BB. Khối lượng trứng ở gà mang kiểu gen AA cao nhất (49,89 gam), tiếp theo là nhóm gà mang kiểu gen AB (48,4 gam) thấp nhất ở gà mang kiểu gen BB (46,25 gam), có sự khác biệt thống kê về khối lượng trứng bình quân giữa gà mang kiểu gen AA và BB ($p < 0,05$) (Bảng 5). Kết quả nghiên cứu của Khadem và ctv

(2010) trên gà đẻ Iran, cho thấy số lượng trứng bình quân của gà giữa các kiểu gen có sai khác thống kê trên gen IGF-1 ($p < 0,05$) và có sự khác biệt thống kê về khối lượng trứng bình quân giữa các kiểu gen ở gà trên gen IGF-II ($p < 0,01$).

Bảng 3. Ảnh hưởng của kiểu gen *PIT1* lên tính trạng của năng suất sinh sản

Chỉ tiêu	AA (42)		AB (70)		BB (14)		P
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
SL Trứng	29,36	7,06	31,03	7,20	32,71	6,62	0,25
KL Trứng	49,89 ^a	4,88	48,40 ^{ab}	4,04	46,25 ^b	4,61	0,02

Ghi chú: SL: Số lượng trứng bình quân, KL: Khối lượng trứng bình quân; ^{a,b} những chữ khác nhau trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

IV. KẾT LUẬN

Tại đa hình *PIT1-TaqI* đã xác định được 3 kiểu gen AA, AB và BB trên đàn gà Tàu vàng nuôi tại Phân viện Chăn nuôi. Tần số alen A (59%) chiếm nhiều hơn alen A (41%). Không có sự khác biệt thống kê giữa các kiểu gen với tính trạng tăng trưởng ($P > 0,05$), trừ khối lượng gà mới nở, mặc dù vậy cân nặng ở nhóm gà mang kiểu gen BB có khuynh hướng cao hơn nhóm gà mang kiểu gen AA và AB. Số lượng trứng ở gà mang nhóm gen BB (32,71 quả), cao hơn so với gà mang kiểu gen AA (29,36 quả) và AB (31,03 quả), tuy nhiên không có sự khác biệt thống kê ($P > 0,05$). Khối lượng trứng của gà mang kiểu gen AA (49,89g) cao hơn so với gà mang kiểu gen AB (48,40 g) và BB (46,25g), có sự khác biệt về khối lượng trứng giữa gà mang kiểu gen AA và BB ($P < 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jiang R., Li J., Qu L., Li., Yang N., (2004), A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary- specific transcription factor (POU1F1) gene associated with growth rate, *Animal Genetics*, 35, 344–346.
2. Khadem A., Hafezian H., Rahimi-Mianji H. (2010), Association of single nucleotide polymorphisms in IGF-I, IGF-II and IGF-BP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station. *African Journal of Biotechnology*, 9(6): 805-810.
3. Lê Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Hiền, Nguyễn Thị Thùy Tiên, Nguyễn Lê Giang Thanh, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Thị Lệ Hằng, Phạm Tất Thắng, Trần Văn Tịnh và Đỗ Võ Anh Khoa. Đa hình kiểu gen IGF-BP2 (Insulin like

factor binding protein 2) và PIT1 (Pituitary specific transcription factor) trên giống gà Tàu vàng. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc phía Nam 2013.

4. Nie Q.H., Lei M.M., Ouyang J.H., Zheng H., Yang G.F., Zhang X.Q (2005), Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genetic. Selection Evolum.* 37: 339-360.

5. Nie Q.H., Fang M.X., Xie L., Zhou M., Liang Z.M., Luo Z.P., Wang G.H., Bi W.S., Liang C.J, Zhang W., Zhang X.Q (2008), The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. *BMC Genetic.* 9: 20-24.

6. Qiu F.F., Nie Q.H., Jin W.Y, Ouyang J.H, Lin S.M., Sun H., Zhang X.Q (2006), Association of a 57 bp insertion/deletion in chicken PIT1 gene with growth and carcass traits. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis.* 28 (2): 284-288.

7. Zahra Rodbari, Masoud Alipanah, Hamid Reza Seyedabadi, Cyrus Amirinia (2011), *Identification of a single nucleotide polymorphism of the pituitary-specific transcriptional factor 1 (Pit 1) gene and its association with body composition trait in Iranian commercial broiler line, African Journal of Biotechnology,* 10 (60): 12979-12983.

Ngày nhận bài: 20/3/2015

Người phản biện: TS. Phạm Mạnh Hưng

Ngày phản biện: 21/4/2015

Ngày duyệt đăng: 14/5/2015