

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**NGUYỄN THỊ LINH ĐAM**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR TRONG CHỌN  
GIỐNG BẠCH ĐÀN LAI (*EUCALYPTUS UROPHYLLA* x *E. EXSERTA*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**Hà Nội, 2017**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

**NGUYỄN THỊ LINH ĐAM**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR TRONG CHỌN  
GIỐNG BẠCH ĐÀN LAI (*EUCALYPTUS UROPHYLLA* x *E. EXSERTA*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 60 42 01 14**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**TS. Nguyễn Việt Cường**

**Hà Nội, 2017**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến TS. Nguyễn Việt Cường – Trưởng bộ môn Lai giống và sinh học hạt phấn đã trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn lãnh đạo Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, phòng đào tạo sau đại học Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật – Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam, các thầy cô giáo cùng toàn thể anh chị em đồng nghiệp đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành tốt chương trình học và luận văn của mình.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè và các đơn vị công tác đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn của mình.

*Tôi xin trân trọng cảm ơn!*

*Hà Nội, ngày      tháng      năm 2017*

**Học viên**

**Nguyễn Thị Linh Đàm**

## MỤC LỤC

<b>LỜI CẢM ƠN.....</b>	<b>i</b>
<b>MỤC LỤC.....</b>	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....</b>	<b>iv</b>
<b>DANH MỤC HÌNH ẢNH.....</b>	<b>v</b>
<b>DANH MỤC BẢNG BIỂU.....</b>	<b>vi</b>
<b>ĐẶT VẤN ĐỀ.....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....</b>	<b>3</b>
<b>A. Ngoài nước.....</b>	<b>3</b>
1.1. Những nghiên cứu về chọn giống bạch đàn.....	3
1.2. Giới thiệu về chỉ thị SSR và một số ứng dụng trong chọn giống.....	5
1.2.1. Giới thiệu về chỉ thị SSR (Simple Sequence Repeat).....	5
1.2.2. Ưu điểm của chọn giống bằng chỉ thị phân tử.....	7
1.2.3. Một số ứng dụng của chỉ thị phân tử trong chọn giống.....	9
<b>B. Trong nước.....</b>	<b>15</b>
1.3. Những nghiên cứu về chọn giống bạch đàn ở Việt Nam.....	15
1.4. Ứng dụng của chỉ thị phân tử trong chọn giống ở Việt Nam.....	17
<b>CHƯƠNG II. MỤC TIÊU, NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>20</b>
2.1. Mục tiêu.....	20
2.2. Nội dung.....	20
2.3. Vật liệu nghiên cứu.....	20
2.3.1. Vật liệu sử dụng để sàng lọc các cặp môi SSR đa hình.....	20
2.3.2. Vật liệu sử dụng để phân tích sự liên quan của các cặp môi SSR với tính trạng sinh trưởng của bạch đàn lai.....	21
2.3.3. Các cặp môi SSR sử dụng trong nghiên cứu.....	24
2.4. Hóa chất và thiết bị.....	24

2.4.1. Hóa chất .....	24
2.4.2. Thiết bị.....	25
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.5.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ mẫu lá .....	25
2.5.2. Phương pháp đo nồng độ bằng quang phổ kế .....	26
2.5.3. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).....	26
2.5.4. Phương pháp điện di trên gel agarose 1%.....	27
2.5.5. Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 5%.....	27
2.5.6. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu.....	29
<b>CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>32</b>
3.1. Thu thập thông tin về trình tự từ các môi SSR có liên quan đến loài bạch đàn .....	32
3.2. Sàng lọc các cặp môi SSR để tìm ra các cặp môi SSR đa hình .....	34
3.2.1. Tách chiết ADN tổng số và điện di kiểm tra .....	34
3.2.2. Xác định điều kiện PCR tối ưu cho việc nhân đoạn SSR .....	36
3.2.3. Kết quả phân tích sự đa hình bằng điện di trên gel polyacrylamide... ..	38
3.3. Xác định các cặp môi SSR liên quan đến sinh trưởng nhanh.....	47
3.4. Kiểm chứng các chỉ thị có liên quan đến tính trạng sinh trưởng.....	53
<b>CHƯƠNG IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>59</b>
1. Kết luận .....	59
2. Kiến nghị.....	59
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>67</b>

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

TT	Chữ viết tắt	Giải thích
1	ADN	Acid Deoxyribonucleic
2	AFLP	Amplified Fragments Length Polymorphism
3	ARN	Acid Ribonucleotide
4	bp	Cặp base (base pair)
5	C:I	Chloroform : Isoamyl Alcohol
6	CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
7	dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
8	EDTA	Ethylene Diamin Tetra Acetate
9	OD	Optical density
10	PCR	Polymerase Chain Reaction
11	RAPD	Random Amplified Polymorphic ADN
12	QTL	Quantative trait locus
13	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
14	SSR	Simple sequence repeat
15	TAE	Tris acetic EDTA
16	TBE	Tris boric EDTA
17	UV	Tia tử ngoại (Ultraviolet)
18	UC	Bạch đàn lai giữa Uro và Camal
19	UE	Bạch đàn lai giữa Uro và Eserta

**DANH MỤC HÌNH ẢNH**

<b>Bảng</b>	<b>Nội dung</b>	<b>Trang</b>
Hình 3.1	Kết quả điện di ADN tổng số các mẫu lá bạch đàn lai	35
Hình 3.2	Kết quả điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi SSR ở 56°C	37
Hình 3.3	Kết quả điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi SSR ở 58°C	37
Hình 3.4	Mức độ đa hình của một số cặp mồi EMBRA	39
Hình 3.5	Kết quả điện di sản phẩm PCR các mẫu với chỉ thị EMBRA39	46
Hình 3.6	Kết quả điện di 9 dòng bạch đàn lai với EMBRA229	55
Hình 3.7	Kết quả điện di 9 dòng bạch đàn lai với EMBRA78 trên gel polyacrylamide 5%	56
Hình 3.8	Kết quả điện di 9 dòng bạch đàn lai với EMBRA209 trên gel polyacrylamide 5%	56

## DANH MỤC BẢNG BIỂU

<b>Bảng</b>	<b>Nội dung</b>	<b>Trang</b>
2.1	Danh mục 22 mẫu được sử dụng để sàng lọc cặp môi SSR đa hình	20
2.2	Các dòng bạch đàn lai sinh trưởng nhanh và chậm ở Bầu Bàng Bình Dương (2002-2012)	21
2.3	Các dòng bạch đàn lai được sử dụng trong nghiên cứu	22
2.4	Thành phần phản ứng PCR	26
3.1	Kết quả đo OD các mẫu ADN tổng số	35
3.2	Nhiệt độ bắt cặp của 205 cặp môi EMBRA sau khi tối ưu sử dụng trong nghiên cứu (chi tiết ở phụ lục 2)	38
3.3	Số alen và hệ số PIC của 106 cặp môi có đa hình	40
3.4	53 chỉ thị SSR có độ đa hình cao được sử dụng để sàng lọc chỉ thị SSR liên kết với sinh trưởng nhanh	42
3.5	Các kiểu gen của 104 cây được phân tích bởi chỉ thị EMBRA39	43
3.6	Kết quả điện di của 8 cặp môi liên quan đến sinh trưởng với 60 dòng	47
3.7	Tương quan của các cặp môi EMBRA với năng suất bạch đàn lai	50
3.8	Các dòng bạch đàn lai thể hiện năng suất cao và thấp tại các hiện trường khảo nghiệm Bầu Bàng Bình Dương (2002-2010)	54
3.9	Sự liên kết giữa các chỉ thị SSR với tính trạng (NS - năng suất)	54



## ĐẶT VẤN ĐỀ

Cải thiện sinh trưởng (năng suất) cây rừng là một mục tiêu chọn giống quan trọng trong nhiều chương trình nghiên cứu lâm nghiệp, tuy nhiên năng suất có hệ số di truyền thấp. Năng suất là một tính trạng số lượng phức tạp thể hiện qua các thông số đường kính và chiều cao, về cơ bản nó là tổng hợp của nhiều tính trạng khác nhau, ảnh hưởng lớn bởi các yếu tố môi trường.

Sự khác biệt về năng suất không phải do sự phân li của một hoặc hai gen mà là do sự phân li của rất nhiều gen, với ảnh hưởng của mỗi gen là nhỏ. Tính trạng số lượng không phân li thành các nhóm cụ thể, do đó ta không thể đơn giản chỉ sử dụng các nguyên lí di truyền Mendel để nghiên cứu.

Các nghiên cứu về chọn giống cây trồng lâm nghiệp trong nước và quốc tế có sự trợ giúp của công nghệ sinh học đã có những thành công nhất định, như nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống bạch đàn (*E. globulus*, *E. nitens*) đã được Bundock và cộng sự 2008; Freeman và cộng sự 2009 cho thấy các chỉ thị SSRs, RAPDs có tương quan đến sinh trưởng về đường kính cây với mức đóng góp biến dị kiểu hình từ 3,8 đến 17,9%, ngoài ra tác giả cũng chỉ ra một số tính trạng về chất lượng như mật độ gỗ, hàm lượng xenlulô, lignin cũng đóng góp cho mức biến dị từ 5,6 - 12,3% [20] [28].

Theo Brondani và cộng sự, (2006) trên bản đồ liên kết cho loài *E. grandis*, trong số 172 chỉ thị có 153 (89%) chỉ thị giữ nguyên vị trí trên bản đồ chung cho *Eucalyptus*. Trong khi đó trên bản đồ liên kết cho loài *E. urophylla* có 140 trên 152 (92%) chỉ thị giữ nguyên vị trí trên bản đồ chung [19].

Anand Raj Kumar Kullán và cộng sự (2012) đã nghiên cứu về sự di truyền của các tính trạng tăng trưởng, tỷ trọng gỗ và biểu hiện của gen ở trong hai gia đình lai trở lại giữa loài Bạch đàn urô và Bạch đàn grandis đã xác định được 2 QTL đường kính thân và 12 QTL cho tỷ trọng gỗ. Các QTLs cho đường kính và tỷ trọng gỗ cho thấy mức đóng góp biến đổi kiểu hình là 3,1 -

12,2%. Như vậy cả tính trạng chất lượng lẫn số lượng ở các nghiên cứu chỉ đóng góp dưới 18% biến dị cho các tính trạng nghiên cứu.

Một gợi ý của Bala R. Thumma và cộng sự 2010 là nghiên cứu chọn giống truyền thống có sự trợ giúp của công nghệ sinh học (chỉ thị phân tử liên kết với tính trạng sinh trưởng) để tăng hiệu quả lựa chọn cho những tính trạng số lượng có di truyền thấp, như là năng suất vẫn là cách tiếp cận có hiệu quả. Đây chính là hướng đề tài “*Nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử SSR trong chọn giống bạch đàn lai (E. urophylla x E. exserta)*” được đề xuất và thực hiện [41].

Luận văn này là một phần của đề tài “Nghiên cứu chọn giống bạch đàn lai bằng chỉ thị phân tử” giai đoạn 2012-2016, do TS. Nguyễn Việt Cường làm chủ nhiệm đề tài và tôi là cộng tác viên đề tài.