

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

TRẦN THỊ THU HÀ

**PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA BA LOÀI CÂY BÓ MẸ
(*EUCALYPTUS UROPHYLLA*, *E. CAMALDULENSIS*, *E. EXSERTA*)
LÀM CƠ SỞ ĐỂ XÂY DỰNG CÁC TỔ HỢP BẠCH ĐÀN LAI KHÁC LOÀI**

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

TRẦN THỊ THU HÀ

**PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA BA LOÀI CÂY BỐ MẸ
(*EUCALYPTUS UROPHYLLA*, *E. CAMALDULENSIS*, *E. EXSERTA*) LÀM
CƠ SỞ ĐỂ XÂY DỰNG CÁC TỔ HỢP BẠCH ĐÀN LAI KHÁC LOÀI**

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 bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Việt Cường - Bộ môn Lai giống – Viện NS Giống và CNSH lâm nghiệp, người đã tận tình giúp đỡ, chỉ bảo, hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu và hoàn thiện luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy, cô giáo của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật; Ban lãnh đạo Viện NC Giống và CNSH lâm nghiệp cùng các đồng nghiệp đã giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi gửi lời cảm ơn đến bạn bè và người thân trong gia đình đã động viên, giúp đỡ tôi trong thời gian vừa qua.

Cuối cùng tôi xin kính chúc quý thầy, cô, anh, chị và gia đình dồi dào sức khỏe, thành công trong sự nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 16 tháng 10 năm 2017

Học viên

Trần Thị Thu Hà

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
MỤC LỤC	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	3
1.1. Một số nghiên cứu trong chọn giống cây bạch đàn	3
1.1.1. <i>Trên thế giới</i>	3
1.1.2. <i>Tại Việt Nam</i>	6
1.2. Các loại chỉ thị phân tử dựa trên kỹ thuật ADN	8
1.3. Ưu điểm của chọn giống bằng chỉ thị phân tử	13
1.4. Một số nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong phân tích đa dạng di truyền và chọn giống cây lâm nghiệp	15
1.4.1. <i>Trên thế giới</i>	15
1.4.2. <i>Tại Việt Nam</i>	20
CHƯƠNG 2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. Mục tiêu.....	25
2.2. Nội dung nghiên cứu	25
2.3. Đối tượng, vật liệu và địa điểm nghiên cứu.....	25
2.3.1. <i>Đối tượng</i>	25
2.3.2. <i>Các cặp môi SSR sử dụng trong nghiên cứu</i>	27
2.3.3. <i>Địa điểm nghiên cứu</i>	27
2.3.4. <i>Hóa chất</i>	27
2.3.5. <i>Thiết bị</i>	28

2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	28
2.4.1. Các phương pháp sử dụng trong phòng thí nghiệm	28
2.4.2. Các phương pháp ngoài hiện trường.....	35
2.4.3. Phương pháp xử lý số liệu.....	37
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	40
3.1. Phân tích đa dạng di truyền của các cây bố mẹ đã chọn.....	40
3.1.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số.....	40
3.1.2. Kết quả phản ứng PCR từ ADN tổng số của các mẫu bạch đàn với các môi SSR	40
3.1.3. Kết quả phân tích quan hệ di truyền giữa các cây bố mẹ chọn lai giống.....	41
3.2. Xây dựng các tổ hợp lai	45
3.2.1. Xác định thời điểm nở hoa, kết quả của các cây bố mẹ tham gia lai giống	45
3.2.2. Lai giống	46
3.2.3. Khảo nghiệm các tổ hợp bạch đàn lai tại Trường Sơn – Lương Sơn - Hòa Bình	48
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	55
4.1. Kết luận	55
4.2. Kiến nghị.....	55
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	56
Tiếng Việt:.....	56
Tiếng Anh:.....	58
PHỤ LỤC	62

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Acid Deoxyribonucleic
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
APS	Amonium Persulfate
ARN	Axit Ribonucleic
bp	Base pair
cM	Centi Morgan
CTAB	Cetyltrimethyl Amonium Bromide
CTPT	Chỉ thị phân tử
cs	Cộng sự
CU	Dòng bạch đàn lai <i>E. camaldulensis</i> x <i>E. urophylla</i>
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetra Acetic Acid
ISSR	Inter-Simple sequence repeat
kb	Kilo base
MAS	Marker Assisted Selection
Nu	Nucleotide
PCR	Polymerase chain reaction.
PU	Dòng bạch đàn lai giữa <i>E. pellita</i> và <i>E. urophylla</i>
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate

SNP	Single nucleotide polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
STS	Sequence Tagged Sites
TBE	Tris-Boric Acid-EDTA
TE	Tris-EDTA
UC	Dòng bạch đàn lai giữa <i>E. urophylla</i> và <i>E. camaldulensis</i>
UE	Dòng bạch đàn lai <i>E. urophylla</i> và <i>E. exserta</i>
UP	Dòng bạch đàn lai giữa <i>E. urophylla</i> và <i>E. pellita</i>

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
	Bảng 2.1. Danh mục các cây bạch đàn bố mẹ được sử dụng trong nghiên cứu	26
	Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR.....	31
	Bảng 3.1. Khoảng cách di truyền giữa 19 cây bạch đàn.....	41
	Bảng 3.2. Vật hậu học của các loài cây tham gia lai giống	45
	Bảng 3.3. Danh mục 61 tổ hợp lai giữa 3 loài bạch đàn.....	46
	Bảng 3.4. Sinh trưởng các tổ hợp bạch đàn lai Hòa Bình.....	48
	Bảng 3.5. Sinh trưởng của các tổ hợp bạch đàn lai thuận nghịch.....	51
	Bảng 3.6. Đánh giá hình thái các tổ hợp bạch đàn lai Hòa Bình.....	51

DANH MỤC CÁC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
	Hình 2.1. Cây bố mẹ U4 ($D_{1.3}=17,9$ cm) (U4 - sinh trưởng chậm)	27
	Hình 2.2. Cây bố mẹ U3 ($D_{1.3}=39,8$ cm) (U3 – sinh trưởng nhanh).....	27
	Hình 2.3. Mẫu lá bảo quản	29
	Hình 2.4. Chu trình nhiệt phản ứng PCR	32
	Hình 2.5. Lắp đặt dàn giáo lai giống.....	36
	Hình 2.6. Chọn hoa và khử đực	36
	Hình 2.7. Chụp bao cách ly	36
	Hình 3.1. Kết quả điện di tinh sạch ADN tổng số 19 cây bạch đàn	40
	Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR-SSR của môi EMBRA229 và EMBRA165 với 19 mẫu bạch đàn trên gel polyacrylamide 4,5%	41
	Hình 3.3. Cây phân loại di truyền của 19 cây bạch đàn.....	42
	Hình 3.4. Quan hệ di truyền giữa 19 cây bạch đàn.....	42
	Hình 3.5. Tổ hợp bạch đàn lai C4U4 ở Hòa Bình.....	53

MỞ ĐẦU

Bạch đàn là cây lâm nghiệp sinh trưởng nhanh, có khả năng thích nghi với nhiều vùng sinh thái nên được xem là một trong những loài cây dẫn đầu về trồng rừng sản xuất trên thế giới với tổng diện tích đạt 20,07 triệu ha vào năm 2014. Gỗ bạch đàn được sử dụng cho ngành xây dựng, đóng đồ nội thất, nguyên liệu chế biến ván ép, ván dăm và ngành công nghiệp giấy cũng như sản phẩm sinh khối cho ngành năng lượng.

Nghiên cứu chọn giống bạch đàn là một khâu quan trọng trong chương trình cải thiện giống cây rừng, với mục tiêu chính là tăng nâng cao chất lượng sản phẩm gỗ, cải thiện các đặc tính sinh học như: tính chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi, chống chịu sâu, bệnh...

Hiện nay, ứng dụng chỉ thị phân tử trong phân tích đa dạng di truyền làm cơ sở cho quá trình chọn giống là hướng nghiên cứu có triển vọng. Có nhiều loại chỉ thị phân tử như: AFLP, RFLP, RAPD, SSR, STS, SNP,... mỗi kỹ thuật có ưu nhược - điểm riêng, trong đó được sử dụng phổ biến là chỉ thị RAPD và SSR.

Chỉ thị RAPD phù hợp cho nghiên cứu những loài mới chưa biết rõ thông tin về trình tự ADN và chưa có nghiên cứu nào phát triển bộ chỉ thị cho loài này. Do chỉ thị RAPD là đơn đơn với trình tự là một chuỗi nucleotide ngắn (5-12 nucleotide) bắt cặp ngẫu nhiên ở nhiều vị trí nên khi sử dụng chỉ thị RAPD trong nghiên cứu, kết quả của mỗi lần thí nghiệm có thể khác nhau, vì vậy cần phải có sự lặp lại các thí nghiệm. Trong khi đó, chỉ thị SSR là các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên hai đầu của các đoạn lặp lại có trình tự rất đặc hiệu và thống nhất chung cho cùng một đoạn ADN không phân biệt các cá thể trong cùng một loài, nhưng giữa các cá thể trong cùng một loài thì số lần lặp lại là khác nhau. Vì vậy, việc sử dụng chỉ thị SSR cho kết quả chính xác hơn so với chỉ thị RAPD và thường được sử dụng cho nghiên cứu các loài