

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

Nguyễn Minh Quế

**ĐÁNH GIÁ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ
MẪU DỄ VÀ NGHIÊN CỨU BẢO TỒN NGUỒN GEN DỄ
TRÙNG KHÁNH - CAO BẰNG BẰNG KỸ THUẬT
NUÔI CÂY MÔ - TẾ BÀO THỰC VẬT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, năm 2009

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

Nguyễn Minh Quế

**ĐÁNH GIÁ MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ
MẪU DỄ VÀ NGHIÊN CỨU BẢO TỒN NGUỒN GEN DỄ
TRÙNG KHÁNH - CAO BẰNG BẰNG KỸ THUẬT
NUÔI CÂY MÔ - TẾ BÀO THỰC VẬT**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 60.42.30

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN: TS NGUYỄN THỊ TÂM

Thái Nguyên, năm 2009

LỜI CẢM ƠN

Để có được kết quả này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, chân thành đến cô giáo - TS Nguyễn Thị Tâm đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn các kỹ thuật viên phòng Công nghệ tế bào thực vật, phòng Di truyền - Khoa Sinh - KTNN, trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn toàn thể các thầy cô giáo khoa Sinh - KTNN và khoa Sau đại học trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của gia đình và các bạn bè đồng nghiệp.

Mặc dù có nhiều cố gắng, song không tránh khỏi những sai sót. Tôi rất mong sự đóng góp ý kiến, chỉ bảo của các quý thầy cô và các bạn.

Thái Nguyên, ngày 25 tháng 08 năm 2009

Tác giả

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu này là của riêng tôi, các số liệu trong công trình này là hoàn toàn trung thực, chính xác. Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về những kết quả này.

Tác giả

Nguyễn Minh Quế

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đặc điểm hình thái và hệ thống phân loại dẻ	3
1.2. Vai trò của cây dẻ	7
1.3. Một số thành tựu của nuôi cấy mô - tế bào thực vật trong nhân giống và bảo tồn nguồn gen một số cây trồng	7
1.4. Ứng dụng của kỹ thuật RAPD trong đánh giá mối quan hệ di truyền của một số loài thực vật	12
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Vật liệu	16
2.1.1. Vật liệu thực vật	16
2.1.2. Hoá chất và thiết bị	16
2.2. Phương pháp nghiên cứu	19
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu nuôi cấy mô - tế bào	19
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu mối quan hệ di truyền của một số mẫu dẻ bằng kỹ thuật RAPD	22
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	26
3.1. Kết quả đánh giá mối quan hệ di truyền giữa một số mẫu dẻ bằng kỹ thuật RAPD	26
3.1.1. Tách chiết và tinh sạch DNA từ các mẫu lá dẻ	26
3.1.2. Kết quả phân tích điện di sản phẩm PCR - RAPD	27
3.1.3. Mối quan hệ di truyền của các mẫu dẻ nghiên cứu	31
3.2. Kết quả của nhân giống vô tính dẻ Trùng Khánh - Cao Bằng bằng kỹ thuật <i>in vitro</i>	34
3.2.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của cồn 70 ^o và javen 65% đến khử trùng hạt	34

3.2.2. Ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nhân chồi của dẻ Trùng Khánh trong ống nghiệm	35
3.2.3. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ dẻ	42
3.2.4. Kết quả đưa cây ra ngoài môi trường tự nhiên	44
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	48
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ	50
TÀI LIỆU THAM KHẢO	51
PHỤ LỤC	56

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần cơ bản môi trường WPM	17
Bảng 2.2. Trình tự các nucleotid của 10 môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu	19
Bảng 3.1. Hàm lượng và độ tinh sạch DNA của 5 mẫu dẻ nghiên cứu	26
Bảng 3.2. Đa hình về phân đoạn DNA được nhân bản của 10 môi ngẫu nhiên	27
Bảng 3.3. Hàm lượng thông tin tính đa hình (PIC) của 5 mẫu dẻ	28
Bảng 3.4. Giá trị tương quan kiểu hình (r) theo 3 cách tính về hệ số tương đồng	32
Bảng 3.5. Hệ số tương đồng giữa các mẫu dẻ nghiên cứu	32
Bảng 3.6. Kết quả khử trùng hạt dẻ Trùng Khánh	34
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng phát sinh chồi	36
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của tổ hợp kinetin và BAP đến sự phát sinh chồi	39
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA đến khả năng tạo cụm chồi	41
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ dẻ	43
Bảng 3.11. Kết quả đưa cây ra môi trường tự nhiên	45

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 2.1. Các mẫu lá dẻ được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu	16
Hình 3.1. Kết quả điện di DNA tổng số của các mẫu dẻ trên gel agarose 0,8%	26
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-RAPD của 5 mẫu dẻ với môi TN03 và DTN2	29
Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-RAPD của 5 mẫu dẻ với môi DTN1 và OPM5	30
Hình 3.4. Biểu đồ hình cây các mẫu dẻ nghiên cứu theo hệ số của Jaccard và kiểu phân nhóm UPGMA	33
Hình 3.5. Các giai đoạn trong tạo nguyên liệu khởi đầu	35
Hình 3.6. Ảnh hưởng của BAP đến sự tạo chồi	37
Hình 3.7. Ảnh hưởng của BAP + kinetin đến sự tạo chồi	40
Hình 3.8. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng tạo chồi dẻ	42
Hình 3.9. Cây dẻ ra rễ	44
Hình 3.10. Cây dẻ con trồng ngoài môi trường tự nhiên với các giá thể khác nhau	46
Hình 3.11. Cây dẻ trồng ngoài môi trường tự nhiên sau 20 tuần	47

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là quốc gia nằm trong khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa, rất thuận lợi cho sự phát triển của thực vật nên rừng chiếm một diện tích lớn. Rừng cung cấp nguồn lâm sản, góp phần cân bằng môi trường sinh thái và điều hoà khí hậu. Từ đầu thế kỉ XX, rừng bị tàn phá nặng nề một phần do chiến tranh và một phần do tập quán du canh, di cư, đốt nương, làm rẫy, chặt phá rừng bừa bãi. Nguồn tài nguyên rừng bị cạn kiệt gây ô nhiễm môi trường làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khoẻ con người và các sinh vật sống trên trái đất. Trong những năm gần đây, Đảng và nhà nước đã có nhiều chính sách khuyến khích trồng cây gây rừng, phủ xanh đất trống đồi núi trọc và xoá đói giảm nghèo.

Dẻ là một trong những loại cây rừng được khuyến khích trồng vì cây dẻ có giá trị kinh tế cao [14]. Các bộ phận rễ, thân, lá, hoa, hạt đều có thể sử dụng [4]. Cây dẻ sống thích hợp trên điều kiện đất đồi núi khô hạn và nghèo dinh dưỡng [3]. Cách trồng dẻ hiện nay chủ yếu bằng phương pháp cắt cành hoặc cây con bầu đất trong khi hệ số nhân chồi thấp nên lâu cho thu hoạch và hiệu quả chưa cao. Họ dẻ ở Việt Nam không lớn lắm nên việc nhận biết không mấy khó khăn. Tuy nhiên, việc phân biệt các chi trong họ lại khó còn việc định loại các loài trong các chi lớn lại càng khó khăn hơn [4].

Từ những năm 80 của thế kỷ XX trở lại đây, hàng loạt kỹ thuật sinh học phân tử như: PCR, AFLP, RAPD, RFLP, SSR... đã và đang được ứng dụng vào các lĩnh vực: Phân tích và đánh giá hệ gen của thực vật nhằm xác định những thay đổi của dòng được chọn lọc ở mức độ phân tử; sử dụng các chỉ thị phân tử hỗ trợ cho chọn giống cây trồng góp phần rút ngắn thời gian chọn tạo giống; đánh giá đa dạng di truyền giữa các loài; phân lập và chuyển gen có giá trị kinh tế để nâng cao chất lượng và khả năng chống chịu với các

điều kiện bất lợi của môi trường... Thành công của sinh học phân tử hiện đại đã góp phần nâng cao năng suất và chất lượng các giống cây trồng [5], [12].

Để đánh giá mối quan hệ di truyền của một số mẫu dẻ và góp phần vào việc bảo tồn nguồn gen cây dẻ Trùng Khánh - Cao Bằng, chúng tôi chọn đề tài: **"Đánh giá mối quan hệ di truyền của một số mẫu dẻ và nghiên cứu bảo tồn nguồn gen cây dẻ Trùng Khánh - Cao Bằng bằng kỹ thuật nuôi cấy mô - tế bào thực vật"**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Phân tích mối quan hệ di truyền của một số mẫu dẻ bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

- Nghiên cứu môi trường và quy trình nhân giống *in vitro* dẻ Trùng Khánh - Cao Bằng nhằm mục đích bảo tồn nguồn gen.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Đánh giá mối quan hệ di truyền của một số mẫu dẻ bằng kỹ thuật RAPD.

3.2. Nghiên cứu bảo tồn nguồn gen cây dẻ Trùng Khánh - Cao Bằng bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

- Khử trùng mẫu: Thăm dò nồng độ cồn, javen và thời gian thích hợp để khử trùng hạt dẻ Trùng Khánh.

- Nhân chồi: Tìm hiểu môi trường tạo chồi thông qua nghiên cứu ảnh hưởng riêng rẽ và tổ hợp các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin và nhóm auxin.

- Tạo cây hoàn chỉnh: Tìm hiểu môi trường tạo rễ thông qua nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin.

- Đưa cây ra môi trường tự nhiên: Nghiên cứu giá thể và điều kiện thích hợp để đưa cây dẻ con tạo được qua nuôi cấy trong phòng thí nghiệm ra trồng ngoài môi trường.