

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LÊ QUANG THƯƠNG

NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA DẠNG
DI TRUYỀN MỘT SỐ GIỐNG CHÈ ĐẶC SẢN TRỒNG
TẠI THÁI NGUYÊN BẰNG KỸ THUẬT SSR

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LÊ QUANG THƯƠNG

NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA DẠNG
DI TRUYỀN MỘT SỐ GIỐNG CHÈ ĐẶC SẢN TRỒNG
TẠI THÁI NGUYÊN BẰNG KỸ THUẬT SSR

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. HOÀNG THỊ THU YẾN

THÁI NGUYÊN - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chúng tôi. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Lê Quang Thương

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **TS. Hoàng Thị Thu Yến** - Giảng viên Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - người đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô và tập thể cán bộ phòng thí nghiệm Khoa Khoa học Sự sống, cảm ơn lãnh đạo Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới các cán bộ công tác tại Viện Khoa học sự sống - Đại học Thái Nguyên đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Nhân dịp này tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tập thể cán bộ, Công ty chè Sông Cầu - Huyện Đồng Hỷ - Thành Phố Thái Nguyên, nhân dân vùng chè Trại Cài - Minh Lập - Đồng Hỷ và Vùng chè Tân Cương - Thành Phố Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong thời gian tôi thu thập vật liệu nghiên cứu làm đề tài.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp và nhóm nghiên cứu di truyền đã luôn cổ vũ, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Tác giả

Lê Quang Thương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cây chè.....	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây chè	3
1.1.2. Đặc điểm di truyền của cây chè	4
1.1.3. Tình hình sản xuất chè trên thế giới và ở Việt Nam	5
1.1.4. Đặc điểm một số dòng chè trồng tại Thái Nguyên	9
1.2. Tình hình nghiên cứu đa dạng genome chè ở Việt Nam và thế giới	13
1.2.1. Tình hình nghiên cứu đa dạng genome chè trên thế giới.....	13
1.2.2. Tình hình nghiên cứu đa dạng genome chè ở Việt Nam	15
1.3. Một số phương pháp sinh học phân tử sử dụng trong nghiên cứu tính đa dạng genome sinh vật.....	17
1.3.1. Kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms - đa hình độ dài các đoạn cắt giới hạn)	17
1.3.2. Kỹ thuật AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - đa hình độ dài các đoạn được nhân bản chọn lọc).....	18
1.3.3. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	18
1.3.4. Kỹ thuật SSR (Simple Sequence Repeat - trình tự lặp lại đơn giản)	19

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu	22
2.1.1. Nguyên liệu	22
2.1.2. Hóa chất.....	22
2.1.3. Thiết bị	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu lá chè	23
2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	23
2.2.3. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose.....	25
2.2.4. Phương pháp xác định hàm lượng và kiểm tra độ tinh sạch DNA tổng số	26
2.2.5. Phương pháp PCR - SSR	26
2.2.6. Phân tích số liệu	28
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Tách chiết DNA tổng số từ lá chè.....	29
3.2. Phân tích chỉ thị SSR ở các mẫu chè nghiên cứu.....	31
3.3. Mối quan hệ di truyền giữa các mẫu chè nghiên cứu dựa trên phân tích PCR - SSR.....	41
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	46
CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO	48
PHỤ LỤC	53

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt	Nghĩa tiếng Anh
bp	Cặp base	base pair
đtg	Cộng sự	et al
DNA	Axit Deoxynucleic	Deoxyribonucleic acid
EDTA	EDTA	Ethyen Diamin Tetraacetic Acid
kb	Kilo base	Kilobase = 1000 bp
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp	Polymerase Chain Reaction
RNA	Axit Ribonucleic	Ribonucleic Acid
TAE	TAE	Tris acetat EDTA
VNTR	VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
RAPD	DNA đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên	Random Amplify Polymorphism DNA
Primer F	Mũi xuôi	Primer Forward
Primer R	Mũi ngược	Primer Reverse
SSR	Trình tự lặp lại đơn giản	Simple Sequence Repeat
AFLP	Đa hình độ dài các đoạn được nhân bản chọn lọc	Amplified Fragment Length Polymorphism
RFLP	Đa hình độ dài các đoạn cắt giới hạn	Restriction Fragment Length Polymorphism
EtBr	EtBr	Ethidium Bromide
dNTP	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
PIC	PIC	Polymorphism Information Content

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Sản lượng chè một số nước trên thế giới	6
Bảng 1.2. Khối lượng xuất khẩu chè của một số nước xuất khẩu chính giai đoạn 2006-2010	7
Bảng 1.3. Diện tích, sản lượng, xuất khẩu chè Việt Nam.....	9
Bảng 1.4. Cơ cấu giống chè tỉnh Thái Nguyên giai đoạn 2001 - 2010.....	10
Bảng 2.1. Danh sách tên và địa điểm thu mẫu của 25 mẫu chè nghiên cứu.....	22
Bảng 2.2. Danh mục các thiết bị, dụng cụ được sử dụng	23
Bảng 2.3. Danh sách 9 cặp môi SSR được sử dụng trong nghiên cứu.....	27
Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng PCR - SSR.....	28
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR - SSR	28
Bảng 3.1. Phổ hấp thụ DNA ở bước sóng 260nm và 280nm và nồng độ DNA tổng số của 25 mẫu chè	30
Bảng 3.2. Tổng số phân đoạn DNA của sản phẩm PCR - SSR với 9 cặp môi.....	32
Bảng 3.3. Số phân đoạn DNA xuất hiện và số phân đoạn DNA đa hình đối với mỗi môi.....	33
Bảng 3.4. Bảng hệ số tương đồng di truyền của 25 mẫu chè nghiên cứu	42

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh một số giống chè đặc sản trồng tại Thái Nguyên.....	10
Hình 1.2. Đa hình DNA SSR giữa 2 cá thể có motif $(AT)_n$	21
Hình 3.1. Ảnh điện di DNA tổng số trên gel agarose 0.8% của 25 mẫu chè nghiên cứu	29
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm SSR của 25 mẫu chè với môi YS28....	34
Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 25 mẫu chè với môi YS64.....	35
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 25 mẫu chè với môi YS27.....	36
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 25 mẫu chè với môi YS98.....	37
Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR - SSR của 25 mẫu chè với môi YS83.....	37
Hình 3.7. Điện di sản phẩm PCR - SSR với môi YTS104	38
Hình 3.8. Điện di sản phẩm PCR - SSR với môi YS3.....	39
Hình 3.9. Sơ đồ quan hệ di truyền của 25 mẫu chè nghiên cứu	44

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Cây chè (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) thuộc họ chè *Theaceae* là loại cây trồng lưu niên có thời gian thu lợi kinh tế kéo dài đến hơn 60 năm. Sản xuất và chế biến chè đã trở thành một trong những ngành kinh tế nông nghiệp quan trọng ở nhiều quốc gia với sản phẩm tạo ra có giá trị xuất khẩu cao. Chè (trà) không chỉ là thức uống giải khát hàng ngày mà còn là một nét văn hóa đặc trưng, một thứ nghệ thuật (Trà đạo) của người dân châu Á. Từ những kinh nghiệm dân gian cho đến các nghiên cứu khoa học gần đây đã khẳng định giá trị của cây chè đối với sức khỏe.

Ở Việt Nam, phát triển cây chè là một trong 10 chương trình trọng điểm về phát triển nông nghiệp nông thôn, nước ta có một số vùng trồng chè lớn như : vùng chè Tây Bắc, vùng chè Việt Bắc, vùng chè trung du Bắc Bộ, vùng chè Bắc Trung Bộ, vùng chè Tây Nguyên... [13]. Theo thống kê Việt Nam hiện có khoảng 120 giống chè, bên cạnh các giống chè lai có năng suất cao đang được trồng phổ biến ở nhiều vùng trong cả nước thì, các giống chè địa phương tuy năng suất không cao nhưng lại có chất lượng tốt, được coi là đặc sản.

Hiện nay có rất nhiều phương pháp để nghiên cứu sự đa dạng di truyền của các giống cây trồng nói chung và cây chè nói riêng như RADP, RFLP, AFLP, SSR,... Các phương pháp này đã khắc phục được nhược điểm của các phương pháp chọn giống truyền thống bởi đánh giá được hệ gen của cây trồng.

Trong những năm gần đây, diện tích trồng các giống chè địa phương có xu hướng giảm, nhiều giống chè quý hiếm sẽ bị mất dần. Như vậy, việc tìm hiểu và nghiên cứu các giống chè đặc sản của địa phương sẽ góp phần bảo tồn nguồn gen cây chè là rất cần thiết.

Nghiên cứu sự đa dạng di truyền ở mức độ DNA là cơ sở khoa học để đề xuất việc lựa chọn những giống chè có năng suất cao, chất lượng tốt, góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen. Từ đó tuyển chọn giống chè đặc sản