

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

DƯƠNG THỊ HOA

**CHỌN LỌC MỘT SỐ CHỈ THỊ SSR CÓ MỨC ĐỘ ĐA
HÌNH CAO PHỤC VỤ ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN
KEO TAI TƯỢNG (*Acacia mangium* Willd.) VÀ KEO LÁ TRÀM
(*Acacia auriculiformis* A.Cunn. ex Benth.)**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội, 2014

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

DƯƠNG THỊ HOA

**CHỌN LỌC MỘT SỐ CHỈ THỊ SSR CÓ MỨC ĐỘ ĐA
HÌNH CAO PHỤC VỤ ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN
KEO TAI TƯỢNG (*Acacia mangium* Willd.) VÀ KEO LÁ TRÀM
(*Acacia auriculiformis* A.Cunn. ex Benth.)**

**Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 60420114**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. HÀ HUY THỊNH
TS. NGHIÊM QUỲNH CHI**

Hà Nội, 2014

LỜI CẢM ƠN

Luận văn được hoàn thành theo chương trình đào tạo Cao học hệ chính quy tập chung khóa 16 (2012 – 2014) tại trường Đại Học Thái Nguyên.

Tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Hà Huy Thịnh, TS. Nghiêm Quỳnh Chi, ThS. Lê Sơn đã dành nhiều thời gian, công sức truyền đạt những kiến thức, kinh nghiệm quý báu và dành những tình cảm tốt đẹp cho tác giả trong quá trình thực hiện luận văn.

Tác giả chân thành cảm ơn phòng đào tạo Sau đại học – Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật, các thầy cô giáo, đã quan tâm giúp đỡ tác giả trong quá trình nghiên cứu luận văn này.

Tác giả cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo Viện nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học, các bạn đồng nghiệp và gia đình đã nhiệt tình giúp đỡ về tinh thần, vật chất và đóng góp nhiều ý kiến quý báu cho việc hoàn thiện luận văn.

Mặc dù đã có nhiều cố gắng, nhưng do kinh nghiệm còn hạn chế, nên luận văn không thể tránh khỏi những thiếu sót. Tác giả mong nhận được những ý kiến đóng góp của các thầy cô giáo và các đồng nghiệp..

Tác giả xin cam đoan rằng số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa được sử dụng để bảo vệ một học vị nào và các thông tin trích dẫn trong luận văn đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 1 tháng 12 năm 2014

Tác giả

Dương Thị Hoa

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
MỤC LỤC	ii
DANH MỤC CÁC BẢNG	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ	vii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu	3
1.1.1. Keo lá tràm (<i>Acacia auriculiformis</i>)	3
1.1.2. Keo tai tượng (<i>Acacia mangium</i>)	4
1.2. Tổng quan về chỉ thị SSR	5
1.2.1. Khái niệm chỉ thị SSR	5
1.2.2. Tính chất của chỉ thị SSR	6
1.2.3. Sự phát triển môi của SSR	7
1.2.4. Các loại chỉ thị SSR	7
1.2.5. Cơ chế hình thành chỉ thị SSR	8
1.2.6. Vai trò của chỉ thị SSR	9
1.2.7. Ưu điểm và hạn chế của chỉ thị SSR	10
1.2.8. Các phương pháp phát hiện chỉ thị SSR	11
1.3. Ứng dụng chỉ thị phân tử với cây lâm nghiệp	13
1.3.1. Vai trò của chỉ thị phân tử trong nghiên cứu cải thiện giống cây rừng	14
1.3.2. Một số kết quả ứng dụng chỉ thị phân tử với Keo lá tràm và Keo tai tượng	15
1.3.2.1. Kết quả nghiên cứu ngoài nước	15
1.3.2.2. Kết quả nghiên cứu trong nước	17
CHƯƠNG 2: MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.1. Mục tiêu nghiên cứu	20
2.2. Nội dung nghiên cứu	20
2.3. Vật liệu nghiên cứu	20

2.4. Thời gian - địa điểm nghiên cứu:.....	20
2.5. Hóa chất và thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	21
2.5.1. Hóa chất tách chiết ADN	21
2.5.2. Hóa chất tiến hành phản ứng PCR.....	21
2.5.3. Hóa chất điện di.....	22
2.5.4. Trang thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	23
2.6. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.6.1. Phương pháp tách chiết ADN.....	23
2.6.2. Phương pháp sàng lọc môi đa hình cao và đánh giá đa dạng di truyền.....	24
2.6.3. Phương pháp tiến hành phản ứng PCR	25
2.6.3.1. Phương pháp PCR.....	26
2.6.3.2. Phương pháp PCR đa môi (Muitlplex PCR).....	26
2.6.4. Phương pháp điện di trên gel poly acryamide.....	27
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	29
3.1. Sàng lọc các môi hoạt động tốt trên hai loài Keo tai tượng và Keo lá tràm.....	29
3.1.1. Kết quả tách chiết ADN cho Keo tai tượng và Keo lá tràm	29
3.1.2. Sàng lọc các môi đa hình với số lượng mẫu nhỏ.....	30
3.1.2. Sàng lọc các môi đa hình với số lượng mẫu lớn.....	33
3.2. Hoàn thiện phản ứng PCR đa môi (multiplex PCR)	36
3.3. Đánh giá mức độ đa dạng di truyền của 2 loài nghiên cứu	38
3.3.1. Đa dạng di truyền ở mức độ loài	38
3.3.2. Đa dạng di truyền giữa các xuất xứ	41
3.3.2.1. Đa dạng di truyền giữa các xuất xứ Keo lá tràm.....	41
3.3.2.2. Đa dạng di truyền giữa các xuất xứ Keo tai tượng.....	42
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ.....	48
4.1. Kết luận	48
4.2. Tồn tại.....	49
4.3. Kiến nghị.....	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO	50

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

STT	Viết tắt	Nghĩa đầy đủ
1	Aa	Keo lá trà
2	Am	Keo tai tượng
3	Bp	Base pair
4	SSR	Trình tự lặp lại đơn giản
5	PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp
6	RFLP	Đa hình về chiều dài các đoạn giới hạn
7	N_a	Số alen trung bình
8	H_o	Tỉ lệ dị hợp tử quan sát
9	H_e	Tỉ lệ dị hợp tử mong đợi
10	T_m	Nhiệt độ bắt cặp
11	$P\%$	Tỉ lệ đa hình
12	F	Hệ số cố định
13	F_{is}	Hệ số tương đồng
14	F_{st}	Hệ số cận huyết

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Thành phần phản ứng PCR	25
3.1	Kết quả đo nồng độ ADN và OD260nm/280nm	29
3.2	Kết quả sàng lọc môi bằng phương pháp cho điểm	31
3.3	Một số cặp môi có mức độ đa hình cao cho Keo lá trà	34
3.4	Một số cặp môi có mức độ đa hình cao cho Keo tai tượng	35
3.5	Kết quả hoàn thiện phản ứng PCR đa môi	37
3.6	Đa dạng di truyền của 2 loài Keo nghiên cứu	39
3.7	Đa dạng di truyền giữa các xuất xứ Keo lá trà	41
3.8	Hệ số tương đồng di truyền các xuất xứ Keo lá trà	43
3.9	Đa dạng di truyền giữa các xuất xứ Keo tai tượng	44
3.10	Hệ số tương đồng di truyền các xuất xứ Keo tai tượng	47

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Chỉ thị SSR (Microsatellites)	6
1.2	Cơ chế bắt chéo lỗi trong giảm phân	8
1.3	Cơ chế trượt lỗi trong quá trình sao mã	9
3.1	Hình ảnh điện di sản phẩm tách chiết ADN	30
3.2	Hình ảnh điện di mức điểm 2	32
3.3	Hình ảnh điện di mức điểm 5	33
3.4	Hình ảnh điện di phản ứng đa môi nhóm 1	37
3.5	Hình ảnh điện di phản ứng đa môi nhóm 2	38
3.6	Hình ảnh điện di phản ứng đa môi không hoạt động tốt cho tất cả các môi thành phần	38
3.7	Quan hệ di truyền giữa các xuất xứ Keo lá trà	46
3.8	Quan hệ di truyền giữa các xuất xứ Keo tai tượng	46

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

TT	Tên biểu đồ	Trang
3.1	Tỷ lệ đa hình đánh giá bằng phương pháp cho điểm	32
3.2	Tần số alen trung bình cho các locut trên cả 2 loài Keo nghiên cứu	35
3.3	Đa dạng di truyền mức độ loài cho 2 loài Keo nghiên cứu	39

ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.) và Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) là những loài cây trồng rừng chủ lực trong chiến lược phát triển rừng đến năm 2020 bởi khả năng sinh trưởng nhanh, thích nghi tốt và gỗ của chúng được sử dụng với nhiều mục đích: gỗ xẻ (đồ mộc, gỗ xây dựng, sàn nhà...), giấy và năng lượng.

Kỹ thuật chỉ thị phân tử ADN (DNA- based markers) đã và đang là một công cụ hữu ích để đánh giá đa dạng di truyền, nghiên cứu về tổ chức genome, bản đồ liên kết (linkage maps) và mức độ tiến hóa của nhiều loài cây rừng (Ahujia, 2001). Nhiều loại chỉ thị ADN đã được sử dụng trong những nghiên cứu này như RFLP (Đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn), RAPD (Đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn), minisatellites (chỉ thị vệ tinh) và microsatellites (chỉ thị vi vệ tinh hay chỉ thị SSR). Trong đó, chỉ thị SSR được sử dụng trong nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền cho nhiều loài cây lâm nghiệp (Jeffrey et al. 2000; Wang et al. 2001). Hơn thế nữa, chỉ thị SSR cũng được ứng dụng trong nghiên cứu quản lý hệ thống rừng giống, vườn giống như nghiên cứu tỷ lệ giao phấn chéo, di cư gen, nhiễm phấn từ bên ngoài, nhầm lẫn trong rừng trồng, xác định bố mẹ lai giống và xác định phả hệ cho nhiều loài cây như keo, bạch đàn, thông...(Butcher,1999) [20].

Các nghiên cứu sử dụng chỉ thị SSR trong đánh giá đa dạng di truyền một số loài keo trên thế giới đã được tiến hành và có những kết quả nhất định. Nhưng việc sử dụng các chỉ thị này tại Việt Nam cho cả 2 loài Keo tai tượng và Keo lá tràm còn có nhiều hạn chế, đặc biệt là với Keo lá tràm. Do khả năng khuếch đại của các mồi SSR trên các loài keo này là tương đối khác nhau, các chỉ thị có thể hoạt động tốt trên Keo tai tượng nhưng lại không hoạt động cho Keo lá tràm hoặc ngược lại. Một hạn chế nữa là số lượng chỉ thị SSR ở các nghiên cứu trước đây chưa nhiều nên có thể kết quả đem lại không lớn. Vì thế,