

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ CÁC GIỐNG CHÈ Ở VIỆT NAM

Trần Đức Trung¹, Lê Tuấn Nghĩa¹, Lê Thị Thu Trang¹, Nguyễn Văn Thiệp²

TÓM TẮT

Để góp phần vào công tác chọn tạo giống chè mới có năng suất cao, chất lượng tốt trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành phân tích sự đa dạng di truyền của 38 giống/dòng chè bằng chỉ thị phân tử RAPD. Kết quả đã cải tiến, xây dựng được qui trình tách chiết, tinh sạch ADN ở chè với độ tinh sạch, nguyên vẹn và nồng độ cao, sử dụng tốt cho nghiên cứu nhận dạng ADN bằng PCR. 12 mỗi RAPD được sử dụng trong nghiên cứu đều cho phản ứng nhân bội ở các giống/dòng chè. Số lượng alen ghi nhận được ở tất cả các mẫu là 184 alen, trung bình mỗi mẫu chè có 47 băng đa hình. Phân tích quan hệ di truyền cho thấy, các giống/dòng chè có sự đa dạng cao với hệ số tương đồng di truyền dao động trong khoảng 0,45 đến 0,89; ở hệ số tương đồng 0,72 đã phân chia 38 giống/dòng chè thành 6 nhóm khác nhau có quan hệ chặt chẽ về nguồn gốc và vùng địa lý.

Từ khoá: Chè, đa dạng di truyền, chỉ thị phân tử RAPD.

1. MỞ ĐẦU

Chè là cây công nghiệp rất có giá trị về mặt dinh dưỡng cũng như khả năng chữa trị một số bệnh. Theo hệ thống phân loại thực vật, chè thuộc ngành hạt kín *Angiospermae*, lớp song tử diệp *Dicotyledonae*, bộ chè *Theales*, họ chè *Theaceae*, chi chè *Camellia*, loài *Camellia sinensis*. Trong tự nhiên, cây chè phân bố chủ yếu ở châu Á, những vùng khí hậu ôn đới như Trung Quốc hay nhiệt đới như: Ấn Độ, Thái Lan, Myanmar, Việt Nam và một số nước khác. Ngày nay, chè đã trở thành cây trồng có giá trị kinh tế cao và được trồng phổ biến rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới [1, 2].

Ở Việt Nam, cây chè và văn hóa uống chè đã được biết đến từ lâu. Trải qua thời gian dài bên cạnh những giống chè bản địa đã được biết đến, công tác lai tạo truyền thống cùng với nhập nội những giống chè có giá trị từ nước ngoài đã làm phong phú tập đoàn các giống chè ở nước ta.

Từ trước đến nay, công tác chọn tạo giống chè ở Việt Nam chủ yếu vẫn theo phương pháp truyền thống dựa trên các đặc tính nông học và đặc điểm hình thái của các giống/dòng chè làm bố mẹ [2]. Phương pháp này thường không đạt hiệu quả cao do không đánh giá trước được khả năng tạo ưu thế lai cũng như bất thụ của các cặp lai có khoảng cách di truyền không phù hợp. Chính vì lý do này mà công tác chọn tạo giống chè còn gặp rất nhiều khó khăn và kết quả đạt được còn hạn chế.

Hiện nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học, rất nhiều vấn đề còn tồn tại trước đây của công tác chọn giống truyền thống đã được giải quyết. Một trong những ứng dụng của công nghệ sinh học trong chọn tạo giống được áp dụng rất phổ biến là sử dụng các chỉ thị phân tử trong công tác chọn tạo giống [3, 7], hay còn được gọi là chọn giống nhờ chỉ thị (Marker-Assisted Selection – MAS).

Trên thế giới đã có những nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền với các giống chè như ở: Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc, v.v. [5, 6, 8]. Ở Việt Nam, những nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền các giống chè còn rất hạn chế, chưa có nhiều cơ sở dữ liệu mang tính tổng quát phục vụ công tác chọn tạo giống chè [2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) với mục đích là đánh giá tính đa dạng di truyền của một số giống/dòng chè đang được trồng ở Việt Nam, góp phần phục vụ công tác chọn tạo giống chè đạt hiệu quả cao hơn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Mẫu lá chè được thu thập từ 38 giống/dòng chè khác nhau, trong đó có 13 giống bản địa, 22 giống nhập nội và 3 giống lai (Bảng 1).

Vật tư, hóa chất: Các môi RAPD sử dụng trong nghiên cứu được sản xuất bởi các hãng Operon Biotechnologies Inc. và Korean Biotech. Inc. (Bảng 2). Các vật tư, hóa chất khác như enzym *Taq*, dNTPs, v.v... được mua từ các hãng chuyên cung cấp vật tư hóa chất cho nghiên cứu về công nghệ sinh học như: BioRad, Sigma, Fermentas, v.v...

¹ Viện Di truyền nông nghiệp, ² Viện KHKT Nông - lâm nghiệp miền Núi phía Bắc

Bảng 1. Danh sách các giống/dòng chè sử dụng trong nghiên cứu

Số TT	Tên giống	Nguồn gốc	Số TT	Tên giống	Nguồn gốc
1	1A	Phú Thọ	20	TRI 777	Srilanka
2	5A	Phú Thọ	21	Tham Vè	Hà Giang
3	F16	Phú Thọ	22	Chất Tiên	Hà Giang
4	PH1	Phú Thọ	23	Cù Dẻ Phùng	Hà Giang
5	Trung du hỗn hợp	Phú Thọ	24	Lao Chày	Hà Giang
6	Số 1	Giống lai	25	Lũng Phìn	Hà Giang
7	Số 9	Giống lai	26	Nậm Ngật	Hà Giang
8	Số 36	Giống lai	27	Bát Tiên	Đài Loan
9	Đại Bạch Trà	Trung Quốc	28	Ô Kim Tuyên	Đài Loan
10	Hùng Đình Bạch	Trung Quốc	29	Ô Long Thanh Tâm	Đài Loan
11	Phúc Vân Tiên	Trung Quốc	30	Assam	Ấn Độ
12	PT95	Trung Quốc	31	Kasarigou	Ấn Độ
13	Thiết Bảo Trà	Trung Quốc	32	Manipur	Ấn Độ
14	Trung Quốc lá nhỏ	Trung Quốc	33	Monochai	Ấn Độ
15	Gruizia 162	Gruizia	34	Swinglaybari	Ấn Độ
16	Gruizia 2	Gruizia	35	Hoocmon	Nhật Bản
17	KonKhitDa	Gruizia	36	Tô Hiệu	Lạng Sơn
18	Macomen	Lào	37	Mộc Châu	Sơn La
19	Pousang	Lào	38	Jetinga	Miền Điện

Bảng 2. Danh sách các mồi RAPD được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Hãng cung cấp
OPA9	GGGTAACGCC	Operon Bio. Inc.
OPA12	TCGGCGATAG	Operon Bio. Inc.
OPQ13	GGAGTGGACA	Operon Bio. Inc.
OPV2	AGTCACTCCC	Operon Bio. Inc.
OPV6	ACGCCCAGGT	Operon Bio. Inc.
OPV12	ACCCCCCACT	Operon Bio. Inc.
BIO 04	GTGACGCTCC	Korean Bio. Inc.
BIO 07	GTTTCGCTCC	Korean Bio. Inc.
BIO 12	CAATCGCCGT	Korean Bio. Inc.
BIO 14	AGCCAGCGAA	Korean Bio. Inc.
BIO 16	CTGAGACGGA	Korean Bio. Inc.
BIO 19	TCGGTCATAG	Korean Bio. Inc.

2. Phương pháp

Tách chiết ADN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng quy trình tách chiết ADN tổng số từ lá chè của Gawel và Jarret (1991) có cải tiến để đáp ứng yêu cầu sử dụng trong thí nghiệm nhận dạng ADN bằng PCR.

Nhận dạng ADN (PCR)

Phản ứng PCR được chuẩn bị bao gồm các thành phần: đệm PCR 1X, 0,2mM dNTP mỗi loại, 1,9mM Mg^{2+} , 1 đơn vị Taq DNA polymerase, 10pM mỗi RAPD, 50ng ADN khuôn trong tổng thể tích phản ứng là 20 μ l. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy chu trình nhiệt Mastercycler của hãng Eppendorf theo chương trình sau: 95°C trong 3 phút, {72°C

trong 1 phút, 35°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút} lặp lại 35 lần; {72°C trong 10 phút và 4°C đến khi kết thúc PCR}. Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose 3% ở 100V trong 1,5h. Sau khi điện di, bản gel được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh bằng máy soi UV Transilluminator.

Phân tích số liệu

Phần mềm NTSYSpc2.0 đã được sử dụng để xác định mối tương quan di truyền và thiết lập cây quan hệ di truyền giữa các giống chè sử dụng trong nghiên cứu này.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách chiết ADN từ chè

Chè là thực vật có chứa nhiều polysaccharide, polyphenol và các thành phần chất tan khác trong lá. Chính vì vậy, việc tách chiết ADN từ lá chè gặp rất nhiều khó khăn. Các thành phần: Polysaccharide, polyphenol và các chất tan khác ảnh hưởng tới quá trình tinh sạch ADN làm cho ADN thu được không đạt yêu cầu về nồng độ, độ nguyên vẹn và tinh sạch cần thiết cho phản ứng PCR [4]. Để khắc phục điểm này, căn cứ vào qui trình tách chiết của Gawel và Jarret (1991), chúng tôi đã thay đổi một số thành phần và nồng độ hóa chất, điều kiện tách chiết nhằm thu được kết quả tốt hơn như: Sử dụng đệm CTAB 5% kết hợp với dung dịch Sarcosyl 2% thay cho hỗn hợp CTAB 2% và SDS 1%, kéo dài thời gian ủ mẫu

tách ở 65°C kết hợp lắc nhẹ nhằm tạo điều kiện tốt để loại bỏ hoàn toàn polysaccharide. Thêm vào đó, để loại bỏ các thành phần chất tan và tinh sạch ADN thu được, chúng tôi đã sử dụng hai bước chiết bằng dung dịch Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1) và Chloroform: Isoamylalcohol (24:1) ngay sau khi thu được dung dịch chiết ADN.

Sau khi tách chiết 3g mẫu lá chè chúng tôi đã nhận được các mẫu ADN có trọng lượng trung bình 2µg và có tinh sạch, độ nguyên vẹn cao (hình 1) đáp ứng tốt yêu cầu sử dụng cho thí nghiệm PCR.



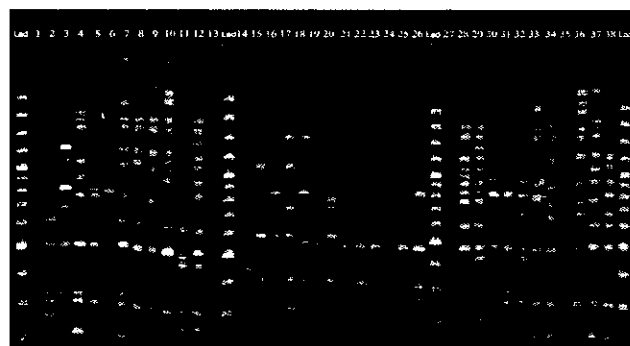
Hình 1. Kết quả điện di ADN tổng số của các giống/dòng chè

Từ 1 đến 20: các giống/dòng chè; Lam 1: lambda 100ng/µl

2. Nhận dạng ADN sử dụng mỗi RAPD

Nhân ADN sử dụng mỗi RAPD (Hình 2, 3, 4) thường cho nhiều băng ADN có kích thước khác nhau. Sự bất cập vào khuôn ADN của mỗi RAPD có thể không ổn định nên chúng tôi đã lặp lại mỗi thí nghiệm ba lần. Tổng cộng đã tiến hành 1.368 phản ứng PCR (38 mẫu x 12 mỗi x 3 lần). Qua theo dõi thí nghiệm chúng tôi thấy, sản phẩm PCR giữa 3 lần thí nghiệm lặp lại không có sự khác biệt. Như vậy, nhân ADN sử dụng mỗi RAPD đáp ứng được yêu cầu phân tích đa dạng di truyền giữa các giống/dòng chè.

Sau khi điện di sản phẩm PCR của 38 mẫu chè với 12 mỗi RAPD, chúng tôi thu được kết quả sau đây: Phần lớn các giống/dòng chè trong nghiên cứu này đều cho hình ảnh nhận dạng ADN với 12 mỗi RAPD; chỉ 84 trong tổng số 456 tổ hợp (tương đương 18,4%) không có sản phẩm nhận dạng ADN. Tất cả 12 mỗi RAPD đều cho băng đa hình với các mẫu ADN chè sử dụng trong nghiên cứu. Tổng số băng đa hình thu được là 1.787 băng, trung bình mỗi mỗi RAPD cho khoảng 149 băng/38 mẫu, mỗi mẫu cho 47 băng/12 mỗi RAPD. Dựa trên thang DNA Ladder 100plus, chúng tôi xác định được các băng đa hình có kích thước từ 200bp đến 3.000bp. Có tổng số 184 alen được ghi nhận, trung bình mỗi mỗi RAPD có 15,3 alen. Mỗi RAPD cho nhiều alen nhất là OPV 12 (26 alen) và BIO 04 (24 alen), mỗi RAPD cho ít alen nhất là BIO 16 (4 alen).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các giống/dòng chè với mỗi OPV2

Từ 1 đến 38: STT các giống/dòng chè, Lad: DNA Ladder 100 plus



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các giống/dòng chè với mỗi OPV6

Từ 1 đến 38: STT các giống/dòng chè, Lad: DNA Ladder 100 plus



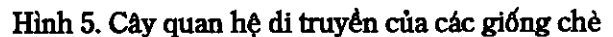
Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các giống/dòng chè với mỗi BIO19

Từ 1 đến 38: STT các giống/dòng chè, Lad: DNA Ladder 100 plus

3. Phân tích quan hệ di truyền giữa các giống/dòng chè

Từ hình ảnh điện di, chúng tôi tiến hành ghi nhận các băng ADN tại các vị trí theo nguyên tắc: có băng ADN ký hiệu 1, không có băng ADN ký hiệu 0. Số liệu được tập hợp, xử lý và phân tích bằng phần mềm NTSYSpc 2.0.

5A đều có nguồn gốc Phú Thọ. Nhóm 4: Gồm Assam, Kasarigou, Manipur, Swinglaybari, Monochai, Tô Hiệu, Mộc Châu, Jetinga. Phần lớn các giống trong nhóm này có xuất xứ từ Ấn Độ. Nhóm 5: Gồm Gruizia 162, Gruizia 2, Konkhitda. Các giống này có nguồn gốc từ Gruizia. Nhóm 6: Gồm 15 giống còn lại, đa phần các giống trong nhóm này có nguồn gốc từ Hà Giang.



M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	
1.00																																						
0.80	1.00																																					
0.72	0.78	1.00																																				
0.66	0.76	0.79	1.00																																			
0.80	0.76	0.77	0.72	1.00																																		
0.67	0.68	0.69	0.71	0.74	1.00																																	
0.60	0.65	0.72	0.72	0.69	0.74	1.00																																
0.65	0.68	0.67	0.71	0.71	0.74	0.84	1.00																															
0.65	0.67	0.72	0.72	0.70	0.79	0.80	0.82	1.00																														
0.60	0.60	0.60	0.63	0.61	0.73	0.67	0.73	0.76	1.00																													
0.66	0.71	0.68	0.68	0.67	0.78	0.68	0.71	0.76	0.72	1.00																												
0.64	0.70	0.66	0.70	0.66	0.77	0.71	0.72	0.79	0.76	0.83	1.00																											
0.79	0.71	0.66	0.61	0.76	0.70	0.59	0.63	0.63	0.63	0.70	0.86	1.00																										
0.83	0.72	0.67	0.63	0.78	0.68	0.57	0.61	0.66	0.63	0.69	0.68	0.83	1.00																									
0.73	0.71	0.64	0.62	0.74	0.69	0.63	0.66	0.68	0.64	0.66	0.66	0.77	0.72	1.00																								
0.64	0.63	0.63	0.64	0.68	0.67	0.63	0.63	0.67	0.64	0.68	0.70	0.68	0.67	0.83	1.00																							
0.66	0.64	0.66	0.61	0.70	0.65	0.61	0.58	0.60	0.53	0.64	0.63	0.72	0.72	0.79	0.77	1.00																						
0.73	0.72	0.67	0.64	0.79	0.72	0.61	0.66	0.64	0.63	0.69	0.67	0.77	0.78	0.76	0.73	0.75	1.00																					
0.83	0.73	0.67	0.60	0.80	0.71	0.60	0.65	0.66	0.64	0.71	0.68																											

Các giống chè sử dụng trong nghiên cứu này có tính đa dạng cao, có hệ số tương đồng di truyền dao

động trong khoảng 0,45 đến 0,89. Các giống chè trong cùng một nhóm có sự liên quan chặt với nhau thể hiện nguồn gốc xuất xứ và vùng địa lý của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

(1). Arun Dev Sharma, Prabhjot Kaur Gill and Prabhjeet Singh, *DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants*, Plant Molecular Biology Reporter 20, December 2002, page 415a-415f.

(2). Jou Ann Lai, Wei Chen Yang, Ju Ying Hsiao, *An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers*, Botaniacal Bulletin of Academia Sinica, Vol 42, 2001, page 93-100.

(3). L. Chen and S. Yamaguchi, *RAPD markers for discriminating tea germplasms at the inter-specific level in China*, Plant Breeding 124, 2005, page 404-409.

(4). Linus I. Masumbuko, Tomas Bryngelsson, Emmarold E. Mneney and Bjorn Salomon, *Genetic diversity in Tanzanian Arabica coffee using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers*, Hereditas 139, 2003, page 56-63.

(5). Lưu Thị Ngọc Huyền, Vũ Đức Quang, Hoàng Tuyết Minh, *Sử dụng phương pháp RAPD trong nghiên cứu đa hình một số dòng lúa phục vụ cho công tác chọn giống*, Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. NXB Khoa học Kỹ thuật HN, 1999.

(6). Nguyễn Hữu La, *Thu thập, bảo quản, đánh giá tập đoàn giống chè ở Phú Hộ*, Tuyển tập các công trình nghiên cứu về chè 1988-1997. NXB Nông nghiệp, 1998, tr 191-207.

(7). Trần Thị Lư, Nguyễn Văn Niệm, *Kết quả 10 năm nghiên cứu giống chè*, Tuyển tập các công trình nghiên cứu về chè 1988-1997. NXB Nông nghiệp, tr.50-66, 1998, tr 50-66.

(8). Shiv Shankar Kaundun, Young-Goo Park, *Genetic structure of six Korean tea populations as revealed by RAPD-PCR markers*, Crop Sci., vol. 42, 2002, page 594-601.

GENETIC DIVERSITY OF TEA VARIETIES COLLECTED IN THE NORTH OF VIETNAM

Tran Duc Trung, La Tuan Nghia, Le Thi Thu Trang, Nguyen Van Thiep

Summary

In this research, we carried out to analyze the genetic diversity of the collected tea varieties in the North of Vietnam using the RAPD primers. The results indicated that 184 DNA bands were detected for all the analyzed tea samples, each sample had 47 DNA bands in the average. The analysis of genetic relationship showed that the high diversity among the tea studied varieties. The genetic similarity among tea varieties were from 0.45 to 0.89. The 38 analyzed tea varieties were clustered in 6 groups based the 72% genetic similarity level. The tea varieties in the each group had closely related to their origin and geographical region.

Keywords: Tea, genetic diversity, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD primer).

Người phản biện: GS.TSKH. Trần Duy Quý