

NGHIÊN CỨU CHỈ THỊ PHÂN TỬ SSR TỪ CHÈ TRỒNG TẠI TỈNH THÁI NGUYÊN

Hoàng Thị Thu Yên^{1*}, Dương Thị Nhung¹,
Hà Thị Thanh Hoàn¹, Lê Bắc Việt², Nguyễn Huy Hoàng²

¹Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT: Chỉ thị phân tử SSR (single sequence repeat) được ứng dụng phổ biến trong chọn giống, lập bản đồ các gen có ích, xây dựng bản đồ di truyền, nghiên cứu di truyền liên kết và di truyền quần thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích đặc điểm kích thước một số đoạn SSR và đánh giá sự đa dạng genome 18 giống/dòng chè thu thập tại địa điểm: xã Tân Cương, Công ty chè Sông Cầu và xã Minh Lập (Đông Hỷ), Thái Nguyên. Kết quả khuếch đại sản phẩm PCR-SSR với 14 cặp mồi đặc hiệu từ các mẫu chè nghiên cứu đều chỉ ra sự đa dạng trình tự lặp lại của đoạn SSR và đa dạng các phân đoạn DNA được khuếch đại. Sử dụng phần mềm NTSYS version 2.1 phân tích sự đa dạng các phân đoạn DNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR-SSR, các giống/dòng chè nghiên cứu được chia thành 2 nhóm chính và có hệ số di truyền sai khác là 0,4 (1-0,6). Đồng thời, trình tự nucleotide của chỉ thị SSR liên quan đến gen mã hóa glyoxalase và sucrose 6-phosphatephosphatase được xác định và phân tích làm cơ sở nghiên cứu chỉ thị phân tử ứng dụng trong chọn tạo giống chè. Kết quả phân tích trình tự nucleotide cho thấy sự khác nhau về motif lặp lại giữa các mẫu chè nghiên cứu và trình tự đã công bố.

Từ khóa: *Camellia sinensis*, đa dạng di truyền, glyoxalase, microsatellite, SSR, sucrose 6-phosphatephosphatase.

MỞ ĐẦU

Chè là thứ nước uống tự nhiên có từ lâu đời, được tiêu thụ rộng rãi, được trồng chủ yếu ở các nước nhiệt đới của châu Á, châu Phi và châu Mỹ La tinh. Theo Wight (1959), chè, *Camellia*, có 3 loài, đó là chè Trung Quốc (*Camellia sinensis*-China), Ấn Độ (*Camellia assamica*-Assam) và loài trung gian giữa chè Trung Quốc và Ấn Độ (*Camellia assamica lasiocalyx*-Campod). Ba loài chè này là nguồn gốc cho hầu hết các loài chè trồng ở các nước trên thế giới hiện nay (Wight, 1959). Thống kê của Min et al. (2007) có khoảng 120 loài chè được trồng ở các nước châu Á, Trung Quốc có tới 97 loài, trong đó chè *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze được phân thành 4 thứ khác nhau, đó là thứ chè *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *C. sinensis* var. *pubilimba*, *C. sinensis* var. *assamica* và *C. sinensis* var. *dehungensis* (Min et al., 2007). Đặc điểm về giống và chu kỳ sống của chè phức tạp tạo nên một số hạn chế cho chọn tạo và cải tiến giống theo phương pháp truyền thống. Việc phân biệt giữa các thứ chè China, Assam và Compod gặp khó khăn do tính chất

không đồng nhất của chè (Visser, 1996). Do đó, các chỉ thị phân tử ở mức độ DNA được các nhà khoa học quan tâm sử dụng để phát hiện các biến đổi về mặt di truyền.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu đa dạng cây chè ở mức độ phân tử. Genome chè đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng các chỉ thị phân tử như chỉ thị DNA đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA) (Li et al., 2005; Lin et al., 2005; Wachira et al., 2001); chỉ thị đa hình chiều dài các đoạn DNA được khuếch đại (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) (Ji et al., 2009; Mishra et al., 2009; Wachira et al., 2001); chỉ thị đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Matsumoto et al., 1994); chỉ thị dựa vào đoạn DNA lặp lại đơn giản (single sequence repeat-SSR) (Ma et al., 2010; Sahu et al., 2012; Sharma et al., 2009; Taniguchi et al., 2012; Zhao et al., 2007). Trong đó, SSR là những đoạn trình tự DNA được lặp lại liên tiếp với những nucleotide motif ngắn (1-6 bp). Tuy

nhiên, tùy từng loài mà số lượng nucleotide trong mỗi đơn vị lại có thể thay đổi từ một đến hàng chục và số lượng đơn vị lặp lại có thể biến động từ 2 đến hàng nghìn lần. SSR xuất hiện phổ biến trong hệ genome của sinh vật nhân chuẩn và sự đa hình của chúng được khảo sát bằng phương pháp PCR (Lagercrantz et al., 1993). Trình tự SSR được xác định từ trình tự DNA genome và cDNA/EST (EST-Expression Sequence Tag). Chỉ thị SSR có nguồn gốc từ cDNA/EST có ưu điểm giảm chi phí và thời gian xây dựng chỉ thị do các đoạn cDNA/EST liên quan trực tiếp đến các gen chức năng, vì vậy, chỉ thị SSR phát triển từ nguồn dữ liệu này có ích hơn (Sahu et al., 2012). Parida et al. (2006) đã xác định và mô tả các motif lặp từ các gen đơn bản ở các cây ngũ cốc (lúa, lúa mì, ngô, lúa miến, lúa mạch) và *Arabidopsis*. Chỉ thị SSR bắt nguồn từ các gen đơn bản này được mong đợi có tính chất đặc trưng cao khi chúng thuộc các vùng bảo thủ của genome (Parida et al., 2006).

Đến nay, chỉ thị phân tử SSR được mô tả với nhiều đặc tính như độ đa dạng cao, phân bố rộng trong genome, di truyền theo quy luật Mendel. Với các đặc điểm này, SSR trở thành chỉ thị di truyền được quan tâm nhất trong chọn giống và còn được ứng dụng để lập bản đồ các gen có ích, xây dựng bản đồ di truyền, nghiên cứu di truyền liên kết và di truyền quần thể (Goldstein et al., 1995; Gonzalo et al., 2005; Wight, 1959; Wu et al., 1993). Với nhiều ưu điểm, chỉ thị SSR được ưa chuộng nhất trong nghiên cứu đánh sự đa dạng genome cũng như phân tích sự đa hình của các gen chức năng ở chè. Đến nay có rất ít chỉ thị SSR được phát triển dựa vào trình tự từ DNA genome chè (Freeman et al., 2004; Hung et al., 2007). Chỉ thị SSR được xác định chủ yếu tập trung vào trình tự EST của các gen đơn bản (Ma et al., 2010; Sahu et al. 2012; Sharma et al., 2009; Taniguchi et al., 2012; Zhao et al., 2007). Khi so sánh các đoạn EST ở chè với các gen đã biết chức năng từ các loài khác cho thấy hầu hết các chỉ thị SSR-EST liên quan đến các quá trình sinh học, thành phần cấu tạo tế bào và chức năng phân tử của gen ở chè. Tuy nhiên, mối liên quan của các chỉ thị SSR-EST với các gen thực hiện các chức năng này ở chè vẫn chưa được

nghiên cứu.

Việt Nam là nước có lịch sử trồng chè lâu đời. Cho đến nay, chè đã được trồng ở khắp 34 tỉnh, thành. Việt Nam đứng thứ 5 trên thế giới về sản xuất và xuất khẩu chè (Lương Văn Vượng và nnk., 2013). Theo Đỗ Văn Ngọc (2000), sản xuất chè giữ vai trò quan trọng trong cơ cấu sản xuất nông nghiệp, sản phẩm chè là mặt hàng xuất khẩu quan trọng. Ở Việt Nam loài chè có 4 loại: chè Trung Quốc lá nhỏ ở vùng Lạng Sơn, búp nhỏ xanh tím đỏ năng suất thấp; chè Trung Quốc lá to điển hình là chè trung du lá to ở Phú Thọ, Tuyên Quang, Yên Bái, Thái Nguyên; chè Shan (chè tuyết) ở Hà Giang, Nghĩa Lộ (Suối Giàng), Mộc Châu, Lâm Đồng, Tam Đường; chè Ấn Độ là chè Assamica ở Phú Hộ, Pleiku, Lâm Đồng. Các giống chè được trồng ở Việt Nam có thể được chọn lọc dựa trên các đặc điểm hình thái, phương pháp lai tạo, gây đột biến bằng bức xạ, hóa chất và phương pháp nhân giống vô tính bằng cách ghép, giâm cành. Bên cạnh đó, có nhiều giống chè được nhập nội từ các nước như Trung Quốc, Nhật Bản.

Các công trình nghiên cứu về cây chè chủ yếu đi sâu nghiên cứu đặc tính hoá sinh, đặc điểm hình thái, giải phẫu lá, thân, đặc điểm sinh trưởng, phát triển, năng suất, chất lượng và chọn tạo giống chè bằng phương pháp truyền thống (Hoàng Văn Chung, 2012; Lương Văn Vượng và nnk., 2013). Việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử vào đánh giá hệ gen của cây chè trong chọn tạo giống là một vấn đề mới. Nguyễn Minh Hùng và nnk. (2004) đã sử dụng kỹ thuật RAPD để nghiên cứu tính đa hình của một số dòng chè đột biến. Nguyễn Thị Thu Hương và nnk. (2010) đã sử dụng kỹ thuật này để phân tích sự đa dạng trình tự genome ở các dòng chè Shan. Một số giống chè trồng ở xã Tân Cương, vùng chè đặc sản nổi tiếng của Thái Nguyên cũng được phân tích bằng kỹ thuật RAPD bởi Hoàng Thị Thu Yên và nnk. (2012). Nghiên cứu của Trần Đức Trung (2009) đã đánh giá sự đa dạng di truyền 96 giống/dòng chè trồng ở Việt Nam bằng kỹ thuật PCR-SSR.

Chất lượng sản phẩm chè được đánh giá chủ yếu dựa trên cơ sở nghiên cứu thành phần hóa học có trong chè. Trong đó, hàm lượng sucrose

trong lá chè có ảnh hưởng tới hương thơm, độ ngậy của sản phẩm (Đỗ Ngọc Quý, 2003); glyoxalase đóng vai trò quan trọng như một chất chống ung thư (Scheckhuber et al., 2010; Valeriu et al., 2006). Với mục đích tìm kiếm chi thị phân tử có tiềm năng ứng dụng trong chọn giống chè, chúng tôi tiến hành phân tích chi thị SSR ở một số giống/dòng chè trồng ở các địa phương của Thái Nguyên và nghiên cứu trình tự nucleotide chi thị SSR liên quan đến gen mã hóa glyoxalase và gucose 6-

phosphatephosphatase tham gia tổng hợp sucrose.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng lá của một số giống/dòng chè được thu thập tại công ty chè Sông Cầu (M1-M16), xã Minh Lập (M17) thuộc huyện Đồng Hỷ, và xã Tân Cương (M18), Thái Nguyên. Thông tin về các mẫu chè nghiên cứu được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Các mẫu chè nghiên cứu

Ký hiệu	Tên giống	Nguồn gốc	Ký hiệu	Tên giống	Nguồn gốc
M1	Keo Am Tích	Trung Quốc	M10	Nhật Lá Tròn	Nhật Bản
M2	Shan	Việt Nam	M11	Nhật Lá Dài	Nhật Bản
M3	Kim Tuyên	Trung Quốc	M12	PH8	Giống lai (Tri777-Kim Tuyên)
M4	Phú Thọ 10	Việt Nam	M13	PH10	Giống lai (Trung Quốc và Việt Nam)
M5	Long Vân	Trung Quốc	M14	Bát Tiên	Trung Quốc
M6	Phúc Vân Tiên	Trung Quốc	M15	LDP1	Giống lai (Đại Bạch Trà-Trung Quốc và PHI - Ấn Độ)
M7	LDP2	Giống lai (Đại Bạch Trà-Trung Quốc và PHI - Ấn Độ)	M16	Trung Du (dòng 1)	Việt Nam
M8	Hùng Đình Bạch	Trung Quốc	M17	Trung Du (dòng 2)	Việt Nam
M9	Tri 777	Việt Nam	M18	Trung Du (dòng 3)	Việt Nam

Bảng 2. Thông tin về cặp môi sử dụng trong nghiên cứu

S T T	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước dự kiến	Motif lặp	Tương đồng hệ protein ở Arabidopsis	Tài liệu tham khảo
1	YS17	F: GGGAATTCAGACAGACAC R: CCGTTCAGTGTAGTAGATCG	160-200 bp	(TC) ₂₅	At3g22110	
2	YS27	F: GGGGATAGTACAAACACACAAC R: GCTCCTCTTCTTCACCACTT	80-110 bp	(GA) ₉	At1g05010	
3	YS28	F: GTCCCCATTGCTCTTAGTTT R: GACAATCATTGCCACCACAT	170-200 bp	(TG) ₁₂ (GA) ₁₃	At4g00165	Sharma et al. (2009)
4	YS34	F: GCCAAAATTCCATCTAGGG R: TGCAACTCGTATGTGGACC	160-200 bp	(TTC) ₁₈ (GA) ₁₀	At4g25890	
5	YS52	F: GAACCAACCCAGTCTATACTCC R: AGCACACGCCATCCAATC	90-120 bp	(GA) ₁₄	Không có trình tự tương đồng	
6	YTS 46	F: AACACCATAAGCTCATCTAC R: ACTCCATTCACCGCTACTAT	95-120 bp	(AG) ₁₂	At1gG15380	Ma et al. (2010)
7	YTS 64	F: AGTTGGCTGAATCAGTCCCTT R: GCTTAAATCACAATTCAAAGC	260 -275bp	(TTGTT) ₅	At5g20830	
8	YS73	F: GTCAAGACGCCACTACAGT R: GACTGTGTAACCTGCCAAGAC	150-220 bp	(TAA) ₁₂	Không có trình tự tương đồng	
9	YS78	F: CACCGCTTGACTAAAATGG R: AAACATCAACCGTATGGGC	130-170 bp	(TTC) ₁₃	Không có trình tự tương đồng	Sharma et al. (2009)
10	YS83	F: GAGGATTTGGGTTGTGAAC R: TCATTCTCTGGCATCACC	250-600 bp	(TGG) ₉	At4g13850	
11	YTS 98	F: TCACCACTTCCCTTGATAG R: GCATTGGCAATATGAACATG	230-245 bp	(AAAT) ₅	Không có trình tự tương đồng	Ma et al. (2010)

12	YTS 104	F: AGTGAATATCCGTGGACAGC R: ATGATAGCAAATCTCCAAAC	285-300 bp	(TC) ₁₀	At1g02130
13	YTS 110	F: TGCAGAAATGGCGTCGAGTA R: CTTGGAAAGGAACAGGCGTA	200-210 bp	(AG) ₁₁	At1g22460
14	YTS 119	F: CACAAATAATCCACTCTTCC R: ACTATGATCGTAACGCACAG	400-410 bp	(AG) ₁₀	At231090

Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi các hãng tên tuổi: Thermo scientific, Qiagen. Môi được đặt từ hãng alpha DNA (bảng 2).

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết theo kit GeneJET™ Plant DNA Genomic Purification Mini (Thermo scientific).

Kỹ thuật PCR-SSR: Dựa trên cơ sở các dữ liệu môi SSR đã công bố bởi Sharma et al. (2009), Ma et al. (2010), chúng tôi thực hiện kỹ thuật PCR-SSR với 14 cặp môi sử dụng khuôn là DNA hệ gen của 18 giống/dòng chè nghiên cứu (bảng 2). Phản ứng được thực hiện trong 12,5 µl thể tích với các thành phần: 6,25µl master mix (Qiagen), 0,5 µl mỗi F (10mM), 0,5 µl mỗi F (10mM), 1 µl DNA (40 ng/µl); 4,25 µl H₂O. Chu trình nhiệt của phản ứng là: 94°C trong 3 phút, (94°C trong 1 phút, 54-56°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây) lặp lại 32 chu kỳ, 72°C trong 10 phút và lưu giữ ở 4°C.

Điện di DNA trên gel polyacrylamide: Sản phẩm PCR-SSR được điện di trên gel polyacrylamide 8% (2,4 ml TBE 5x, 3,2ml acrylamide, 200 µl APS, 18 µl Tedmed và 6,4 ml H₂O), nhuộm gel trong ethidium bromide và chụp ảnh bằng Gel Doc (Pharmacia Amersham Biotech).

Phân tích số liệu: Dựa vào hình ảnh điện di sản phẩm PCR-SSR, sự xuất hiện các băng điện di được ước lượng kích thước dựa vào marker chuẩn và thống kê các băng điện di với từng môi ở từng mẫu nghiên cứu. Sự xuất hiện hay không xuất hiện các băng điện di được tập hợp để phân tích số liệu theo nguyên tắc: số 1- xuất hiện phân đoạn DNA và số 0- không xuất hiện phân đoạn DNA. Các số liệu này được xử lý trên máy tính theo chương trình NTSYSpc version pc 2.1 (Applied Biostatistics) để xác định quan hệ di truyền của các giống/dòng chè.

Xác định và phân tích trình tự một số đoạn SSR: Sản phẩm PCR -SSR được tinh sạch

và xác định trình tự trực tiếp trên máy ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Kết quả trình tự gen được phân tích, so sánh bằng phần mềm sinh học chuyên dụng (Sequence Scanner, BLAST, Bioedit).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

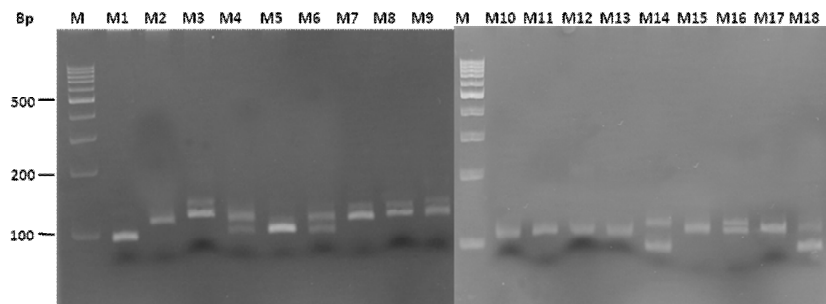
Phân tích chỉ thị SSR ở các mẫu chè nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR-SSR

Zhao et al. (2008) lần đầu tiên xác định được 24 chỉ thị SSR từ 2119 EST ở chè. Sharma et al. (2009) đã thống kê có 2181 đoạn EST từ cơ sở dữ liệu NCBI cây chè, trong đó có 1223 gen có trình tự SSR từ 2-34 nucleotide. Trong 109 gen phân tích nghiên cứu có chứa 120 SSR được xác định, 61 SSR thuộc loại lặp lại 2 nucleotide (50,8%), 37 lặp 3 nucleotide (30,8%), 8 lặp lại 4 nucleotide (6,67%), 9 lặp 5 nucleotide (7,5%) và 5 lặp lại 6 nucleotide (4,16%). Theo thống kê của Ma et al. (2010), ở chè có 6899 đoạn EST được công bố trên ngân hàng gen và có thêm 74 chỉ thị SSR-EST mới được nghiên cứu thực nghiệm. Sahu et al. (2012) thống kê được 12852 đoạn EST ở chè, theo tính toán lý thuyết có 1636 đoạn EST chứa 2371 SSR. Nhóm nghiên cứu này cho rằng loại trình tự SSR lặp 1 nucleotide là phổ biến nhất (65,9%), tiếp theo là lặp 2 nucleotide (24,6%), lặp 3 nucleotide (7,8%), lặp 4 nucleotide (0,8), lặp 5 nucleotide và 6 nucleotide (0,8). Bằng phương pháp lập thư viện cDNA từ chè Nhật Bản, Taniguchi et al. (2012) đã nghiên cứu được 17.458 EST có trong 5,262 đơn gen, trong đó 1,835 gen có chứa motif lặp SSR.

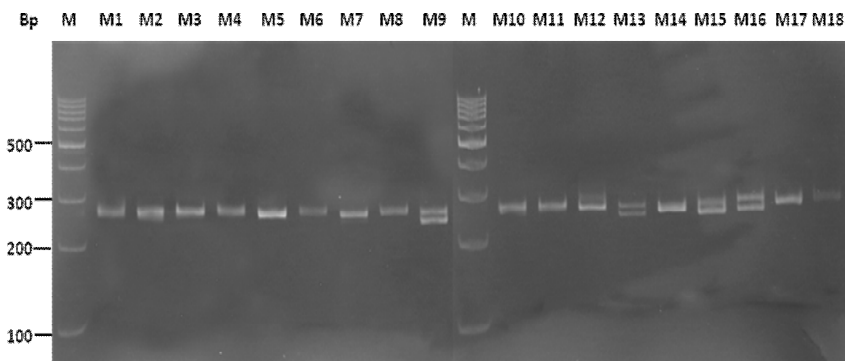
Nghiên cứu của chúng tôi thu được khi điện di sản phẩm PCR-SSR của 14 cặp môi với 18 giống/dòng chè nghiên cứu chỉ ra sự đa dạng các alen. Kết quả điện di sản phẩm PCR-SSR ở 2 môi đặc trưng nhất được thể hiện trên hình 1, hình 2. Với chỉ thị SSR môi YTS46, sản phẩm PCR-SSR dự kiến có kích thước khoảng 80-110

bp (Ma et al., 2010). Kết quả ở hình 1 cho thấy sản phẩm PCR-SSR của 18 giống/dòng chè nghiên cứu có kích thước giống như tính toán lý thuyết. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các phân đoạn DNA xuất hiện dao động trong khoảng 100-150 bp. Trong đó, phân đoạn DNA có kích thước 100 bp chỉ xuất hiện ở mẫu M1 mà không xuất hiện ở tất cả các mẫu còn lại. Phân đoạn DNA có kích thước khoảng 120 bp xuất hiện ở 6 mẫu đó là M2, M11, M12, M13, M15 và M17. Ở vị trí phân đoạn DNA có kích thước khoảng 110 bp xuất hiện ở các mẫu M5,

M10; còn lại các mẫu khác không thấy xuất hiện. Ở 4 mẫu M3, M7, M8 và M9 xuất hiện hai phân đoạn DNA có kích thước tương ứng khoảng 130 bp và 150 bp. Mẫu M16 xuất hiện hai phân đoạn DNA có kích thước tương ứng khoảng 120 bp và 130 bp. Ở 4 mẫu M4, M6, M14 và M18 cũng xuất hiện hai phân đoạn DNA với kích thước tương ứng khoảng 110 bp và 130 bp. Như vậy, giữa các giống/dòng chè nghiên cứu có sự đa dạng alen và kết quả này phù hợp với công trình nghiên cứu đã công bố (Ma et al., 2010; Sharma et al., 2009).



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-SSR của 18 mẫu chè với môi YTS46
M: Marker 100 bp; 1-18 (M1-M18) thứ tự mẫu nghiên cứu theo bảng 1



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-SSR của 18 mẫu chè với môi YTS64
M: Marker 100 bp; M1-M18: thứ tự mẫu nghiên cứu theo bảng 1

Theo kết quả đã công bố của Ma et al. (2010), cặp môi YTS64 (mã số GE651667) khuếch đại đoạn gen có kích thước dao động trong khoảng 260-275 bp. Kết quả thể hiện trong hình 2 cho thấy, sản phẩm nhân gen với môi YTS64 xuất hiện các phân đoạn DNA với kích thước dao động từ 240-275 bp và dao động từ 1-2 phân đoạn. Như vậy, môi YTS64 có tất cả các vị trí băng xuất hiện đều đa hình. Đặc

biệt, hai mẫu M9 và M13 xuất hiện hai băng có kích thước tương ứng là 240 bp và 260 bp; Mẫu M15 và M16 cũng xuất hiện hai băng nhưng kích thước tương ứng khoảng 260 bp và 270 bp. Ở vị trí phân đoạn DNA có kích thước 265 bp xuất hiện duy nhất ở mẫu M17 còn các mẫu khác thì không xuất hiện. Mẫu M18 (chè trung du-Tân Cương) xuất hiện băng ở vị trí kích thước cao nhất là 275 bp còn các mẫu còn lại

không xuất hiện. Tiếp theo là ở vị trí có kích thước 270 bp, số mẫu xuất hiện các phân đoạn DNA nhiều nhất (với 12/18 mẫu nghiên cứu).

Theo nghiên cứu của chúng tôi, cặp môi YTS110 thu được các phân đoạn DNA có kích thước dao động từ 285- 310 bp, trong khi nghiên cứu của Ma et al. (2010) cho kết quả đoạn SSR khoảng 200 -210 bp. Điều này cho thấy, có thể chỉ thị thị YTS110 có sự sai khác nhau về motif lặp lại AG và có sự đa hình cao. Kết quả điện di sản phẩm PCR-SSR của 11/14 mẫu còn lại cũng thể hiện tính đa hình rõ rệt và tương tự với kết quả nghiên cứu của Sharma et al. (2009) và Ma et al. (2010).

Mối quan hệ di truyền giữa các dòng chè dựa trên phân tích PCR-SSR

Từ kết quả phân tích kỹ thuật PCR-SSR với 14 cặp môi thông kê được tổng số 69 phân đoạn DNA nhân bản từ 18 mẫu chè nghiên cứu, trong đó có 68 phân đoạn cho tính đa hình (chiếm 98,51%) và không đa hình là 1 phân đoạn (chiếm 1,49%). Kích thước các phân đoạn DNA được nhân bản trong khoảng từ 80 bp đến 500 bp. Số lượng các phân đoạn tương ứng với mỗi môi nằm trong khoảng 3 đến 7 phân đoạn, trong đó môi nhân bản được ít phân đoạn DNA nhất là cặp môi YTS98 (3 phân đoạn), và môi nhân được nhiều phân đoạn DNA nhất là môi YS27 (7 phân đoạn).

Bảng 3. Hệ số tương đồng di truyền của 18 mẫu chè nghiên cứu

R/C	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18
M1	1																	
M2	0,127	1																
M3	0,681	0,742	1															
M4	0,56	0,742	0,727	1														
M5	0,621	0,681	0,666	0,757	1													
M6	0,56	0,681	0,606	0,787	0,818	1												
M7	0,606	0,636	0,681	0,681	0,772	0,863	1											
M8	0,696	0,666	0,772	0,742	0,651	0,651	0,757	1										
M9	0,56	0,621	0,545	0,575	0,606	0,666	0,712	0,727	1									
M10	0,545	0,666	0,681	0,772	0,721	0,681	0,696	0,696	0,5	1								
M11	0,636	0,727	0,621	0,651	0,681	0,651	0,606	0,606	0,53	0,757	1							
M12	0,56	0,681	0,545	0,666	0,666	0,636	0,681	0,621	0,545	0,651	0,742	1						
M13	0,5	0,59	0,545	0,575	0,666	0,606	0,621	0,56	0,515	0,681	0,712	0,757	1					
M14	0,53	0,56	0,666	0,666	0,696	0,636	0,651	0,651	0,545	0,681	0,621	0,696	0,666	1				
M15	0,575	0,575	0,651	0,621	0,621	0,56	0,575	0,545	0,53	0,606	0,666	0,712	0,712	0,803	1			
M16	0,5	0,59	0,515	0,545	0,666	0,636	0,681	0,59	0,636	0,56	0,59	0,727	0,757	0,757	0,742	1		
M17	0,606	0,727	0,621	0,56	0,712	0,621	0,666	0,636	0,651	0,606	0,666	0,712	0,681	0,681	0,666	0,833	1	
M18	0,545	0,606	0,59	0,681	0,742	0,681	0,666	0,666	0,612	0,666	0,575	0,681	0,621	0,772	0,666	0,712	0,757	1

Dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn DNA của các mẫu khi điện di sản phẩm PCR-SSR, chúng tôi xác định hệ số đa dạng di truyền của các mẫu chè nghiên cứu ở mức độ phân tử bằng cách sử dụng phần mềm NTSYSpc version 2.1. Kết quả thu được hệ số di truyền giữa 18 mẫu chè nghiên cứu dao động trong khoảng từ 0,5 đến 0,863 (bảng 3). Trong đó, hai giống M6 (chè Phúc vân tiên) và M7 (chè LDP2), có hệ số tương đồng lớn nhất là 0,863; còn các cặp giống M1 (chè Keo am tích), M13 (chè PH10) và M16 (chè trung du), có hệ số tương đồng thấp nhất là 0,5.

Mối quan hệ di truyền của 18 giống/dòng chè nghiên cứu còn được minh họa bằng sơ đồ hình cây chia thành 2 nhánh chính (hình 3). Nhánh I gồm duy nhất 1 mẫu chè là M9 (Tri 777) và mẫu nghiên cứu này có hệ số di truyền sai khác so với các mẫu khác trong nghiên cứu thuộc nhóm II là 0,4 (1-0,6). Nhánh II gồm 17 mẫu chè còn lại và tiếp tục phân thành 2 nhánh phụ: Nhánh phụ 1 có 8 mẫu chè là M11, M12, M13, M14, M15, M16, M71 và M18. Các mẫu thuộc nhánh này có hệ số di truyền sai khác so với các mẫu thuộc nhánh phụ 2 là 0,2 (1-0,8). Trong nhánh phụ này lại chia thành 2 cụm (cụm

- regulated element binding Protein in HepG2 liver cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11): 5639-5645.
- Chen S., 2005. Role and significance of sucrose-6-phosphatase in regulating sucrose biosynthesis and carbon partitioning in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Shangdong: ULB Sachsen-Anhalt.
- Freeman S., West J., James C., Lea V., Mayes S., 2004. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea (*Camellia sinensis*). *Mol Ecol Notes*, 4: 324-326.
- Goldstein D. B., Clark A. G., 1995. Microsatellite variation in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic acids research*, 23(19): 3882-6.
- Gonzalo M. J., Oliver M., Garcia-Mas J., Monfort A., Dolcet-Sanjuan R., Katzir N., Arus P., Monforte A. J., 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *TAG Theoretical and applied genetics*, 110(5): 802-11.
- Gupta S., Ahmad N., Mohan R. R., Husain M. M., Mukhtar H., 1999. Prostate cancer chemoprevention by green tea: in vitro and in vivo inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Cancer research*, 59(9): 2115-2120.
- Hung C. Y., Wang K. H., Huang C. C., Gong X., Ge X. J., Chiang T. Y., 2007. Isolation and characterization of 11 microsatellite loci from *Camellia sinensis* in Taiwan using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Conserv Genet*.
- Nguyễn Minh Hùng, Đinh Thị Phòng, 2004. Đánh giá tính đa hình RAPD genome một số giống chè. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 2(1): 109-116.
- Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Thu Phương, Hoàng Văn Chung, Hoàng Thị Thu Yên, 2010. Bước đầu nghiên cứu đa dạng di truyền ở một số dòng chè Shan (*Camellia sinensis* var. *assamica* (Mast) Pierre sec. Phamh) bằng kỹ thuật RAPD. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thái Nguyên*, 65(3): 149-157.
- Hosoda K., Wang M. F., Liao M. L., Chuang C. K., Iha M., Clevidence B., Yamamoto S., 2003. Antihyperglycemic effect of oolong tea in type 2 diabetes. *Diabetes care*, 26(6): 1714-8.
- Ji P. Z., Jiang H. B., Huang X. Q., Zhang J., Liang M. Z., Wang P. S., 2009. Genetic diversity of ancient tea gardens and tableland tea gardens from Yunnan Province as revealed by AFLP marker. *Yi Chuan*, 31(1): 101 - 108.
- Lagercrantz U., Ellegren H., Andersson L., 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic acids research*, 21(5): 1111-1115.
- Lee M. J., Lambert J. D., Prabhu S., Meng X., Lu H., Maliakal P., Ho C. T., Yang C. S., 2004. Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(1): 132-137.
- Li J., Jiang C. J., Wang Z. X., 2005. RAPD analysis on genetic diversity of the preconcentrated core germplasms of *Camellia sinensis* in China. *Yi Chuan*, 27(5): 765-771.
- Lin S. Y., Chen I. Z., Tsai C. M., Chen Y. L., 2005. Detection of genetic relationship in Taiwan tea variety (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) with RAPD markers. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 51(4): 357-366.
- Ma J. Q., Zhou Y. H., Ma C. L., Yao M. Z., Jin J. Q., Wang X. C., Chen L., 2010. Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SSR markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae). *Am. J. Bot.*, 97(12): 153-156.
- Matsumoto S., Takeuchi A., Hayatsu M., Kondo S., 1994. Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the tea

- PAL cDNA probe Theoretical and applied genetics, 89(6): 671-675.
- Min T., Bartholomew B., 2007. 18 Theaceae. Flora of China, 12: 366 - 367.
- Mishra R. K., Chaudhury S., Ahmad A., Pradhan M., Siddiqi T. O., 2009. Molecular analysis of tea clones (*Camellia sinensis*) using ALFP markers. International Journal of Integrative Biology, 5(2): 130 -135.
- Đỗ Văn Ngọc, 2000. Giống chè, kỹ thuật trồng và chăm sóc. Viện nghiên cứu chè, Phú Thọ. Nxb. Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Đỗ Ngọc Quý, 2003. Cây chè sản xuất chế biến và tiêu thụ. Nxb. Nghệ An.
- Parida S. K., Anand Raj Kumar K., Dalal V., Singh N. K., Mohapatra T., 2006. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. TAG Theoretical and applied genetics, 112(5): 808-817.
- Sahu J., Sarmah R., Dehury B., Sarma K., Sahoo S., Sahu M., Barooah M., Modi M. K., Sen P., 2012. Mining for SSRs and FDMs from expressed sequence tags of *Camellia sinensis*. Bioinformation, 8(6): 260-266.
- Sang S., Lambert J. D., Tian S., Hong J., Hou Z., Ryu J. H., Stark R. E., Rosen R. T., Huang M. T., Yang C. S. et al., 2004. Enzymatic synthesis of tea theaflavin derivatives and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. Bioorganic & medicinal chemistry, 12(2): 459-467.
- Scheckhuber C. Q., Mack S. J., Strobel I., Ricciardi F., Gispert S., Osiewacz H. D., 2010. Modulation of the glyoxalase system in the aging model *Podospora anserina*: effects on growth and lifespan. Aging, 2(12): 969-80.
- Sharma H., Kumar R., Sharma V., Kumar V., Bhardwaj P., Ahuja P. S., Sharma R. K., 2009. Identification and cross-species transferability of 112 novel unigene-derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis*). Am J Bot, 98(6): 133 -138.
- Taniguchi F., Fukuoka H., Tanaka J., 2012. Expressed sequence tags from organ-specific cDNA libraries of tea (*Camellia sinensis*) and polymorphisms and transferability of EST-SSRs across *Camellia* species. Breeding science, 62(2): 186-195.
- Thangapazham R. L., Passi N., Maheshwari R. K., 2007. Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. Cancer biology & Therapy, 6(12): 1938-1943.
- Tian W. X., Li L. C., Wu X. D., Chen C. C., 2004. Weight reduction by Chinese medicinal herbs may be related to inhibition of fatty acid synthase. Life sciences, 74(19): 2389-2399.
- Valeriu A., Irina S., Bogdan M., Olivera L., 2006. The Glyoxalase system - A link between carbonic stress and human therapy. Revue Roumaine de Chimie, 51(9): 861-869.
- Visser T., 1996. Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze In: *In Outline of Perennial Crop Breeding in the Tropics* Edited by Ferwarda FP W. F., Veen-man H, Zonen NV. Wageningen, The Netherlands, 459-493.
- Lương Văn Vượng, Phạm Huy Thông, Lê Văn Đức, Lê Hồng Vân, 2013. Kỹ thuật sản xuất và chế biến chè xanh. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
- Wachira F., Tanaka J., Takeda Y., 2001. Genetic variation and differentiation in tea (*Camellia sinensis*) germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. Journal of Horticultural Science Biotechnology, 76(5): 557-563.
- Wight W., 1959. Nomenclature and Classification of the Tea Plant. Nature, 183: 1726-1728.
- Wu K. S., Tanksley S. D., 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Mol Gen Genet, 241(1-2): 225-235.
- Yang Y. C., Lu F. H., Wu J. S., Wu C. H., Chang C. J., 2004. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension.

- Archives of internal medicine, 164(14): 1534-1540.
- Hoàng Thị Thu Yên, Nguyễn Văn Tuấn, Hoàng Thị Ngà, 2012. Nghiên cứu đa dạng di truyền genome một số dòng chè (*Camellia sinensis*) trồng tại xã Tân Cương-Thành phố Thái Nguyên bằng kỹ thuật RAPD. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thái Nguyên, 96(8): 139-143.
- Zhao L. P., Liu Z., Chen E. L., Yao E. M. Z., Wang E. X. C., 2007. Generation and characterization of 24 novel EST derived microsatellites from tea plant (*Camellia sinensis*) and cross-species amplification in its closely related species and varieties. Conserv Genet.

INVESTIGATION SSR MARKER FROM *Camellia sinensis* GROWING IN THAI NGUYEN PROVINCE

Hoang Thi Thu Yen¹, Duong Thi Nhung¹,
Ha Thi Thanh Hoan¹, Le Bac Viet², Nguyen Huy Hoang²

¹University of Sciences, Thai Nguyen University

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

SSR molecular markers are commonly applied in breeding, mapping of useful genes, genetic mapping, researching population and linkage genetics. In this study, we analyzed the characteristics of the size of some SSR fragments and evaluated genomic diversity of 18 tea varieties/clones collected from Tan Cuong commune, Song Cau tea Company and Minh Lap commune (Dong Hy district), Thai Nguyen province. Amplification results of SSR fragments with 14 specific primer pairs from research samples are indicated sequence diversity and diversity of the DNA fragments to be amplified. Using NTSYS version 2.1 software to analysis diversity of DNA fragments amplified by PCR-SSR, research varieties/lines tea is divided into two main groups with coefficient of variation between them with the remaining 0.4. Additionally, nucleotide sequences of SSR markers which related gene encoding glyoxalase and sucrose 6-phosphatephosphatase are sequenced and analyzed as a basis for teas breeding. Investigation result indicated repeat motif different when compare research tea samples and submitted sequence.

Keywords: *Camellia sinensis*, genetics diversity, SSR, microsatellite, glyoxalase, sucrose, sucrose 6-phosphatephosphatase, tea.

Citation: Hoang Thi Thu Yen, Duong Thi Nhung, Ha Thi Thanh Hoan, Le Bac Viet, Nguyen Huy Hoang, 2017. Investigation SSR marker from *Camellia sinensis* growing in Thai Nguyen province. Tap chi Sinh hoc, 39(1): 68-79. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.7594

*Corresponding author: yenhtt@tnus.edu.vn.

Received 30 December 2015, accepted 20 March 2017