

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

-----***-----

KHƯƠNG THỊ BÍCH

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ XÁC ĐỊNH
MARKER PHÂN TỬ ĐẶC TRƯNG NHẬN DẠNG
MỘT SỐ MẪU SÂM LAI CHÂU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2018

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

-----***-----

KHƯƠNG THỊ BÍCH

**ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ XÁC ĐỊNH
MARKER PHÂN TỬ ĐẶC TRƯNG NHẬN DẠNG
MỘT SỐ MẪU SÂM LAI CHÂU**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học:
PGS.TS. KHUẤT HỮU TRUNG**

HÀ NỘI - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn này là kết quả nghiên cứu của cá nhân tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS.Khuất Hữu Trung. Các số liệu và tài liệu được trích dẫn trong luận văn là trung thực. Kết quả nghiên cứu này không trùng với bất cứ công trình nào đã được công bố trước đó.

Tôi xin chịu trách nhiệm với lời cam đoan của mình.

Hà Nội, tháng năm 2018

Tác giả

Khương Thị Bích

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Di truyền Nông nghiệp, các thầy giáo, cô giáo đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi được học tập và hoàn thành khóa học này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Phó giáo sư - Tiến sĩ **Khuất Hữu Trung** - Phó viện trưởng - Viện Di truyền Nông nghiệp, người đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn tôi hoàn thành luận văn: ***“Đánh giá đa dạng di truyền và xác định marker phân tử đặc trưng nhận dạng một số mẫu Sâm Lai Châu.”***

Tôi xin được cảm ơn tập thể cán bộ Bộ môn Kỹ thuật Di truyền - Viện Di truyền Nông nghiệp luôn động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất - trang thiết bị để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn vô cùng sâu sắc tới gia đình, đặc biệt là bố mẹ tôi, những người luôn bên cạnh và hỗ trợ tôi về mọi mặt để tôi có thể hoàn thành tốt nhiệm vụ học tập của mình. Nhân dịp này tôi cũng trân trọng cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp những người đã luôn bên cạnh, động viên, góp ý cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Hà Nội, tháng năm 2018

Tác giả

Khuong Thị Bích

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH ẢNH	vii
PHẦN I: MỞ ĐẦU	1
PHẦN II: NỘI DUNG	4
Chương I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tình hình nghiên cứu cây Sâm Lai Châu trên Thế giới và ở Việt Nam ...	4
<i>1.1.1. Tên gọi, phân loại và hình thái</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Đặc điểm sinh thái và phân bố</i>	<i>11</i>
<i>1.1.3. Giá trị sử dụng và giá trị kinh tế</i>	<i>14</i>
<i>1.1.4. Các thành phần hoạt chất ở chi Panax</i>	<i>16</i>
1.2. Tình hình nghiên cứu đa dạng di truyền Sâm	19
1.3. Nghiên cứu bảo tồn và phát triển Sâm	21
1.4. Tổng quan phương pháp nghiên cứu về phân loại thực vật	22
<i>1.4.1. Các phương pháp dựa trên đặc điểm hình thái</i>	<i>22</i>
<i>1.4.2. Các phương pháp dựa trên chỉ thị phân tử</i>	<i>23</i>
Chương II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. Vật liệu	30
2.2. Hóa chất	31
2.3. Phương pháp nghiên cứu	31
<i>2.3.1. Tách chiết ADN tổng số</i>	<i>31</i>
<i>2.3.2. Chu trình PCR</i>	<i>32</i>
<i>2.3.3. Phương pháp điện di trên gel agarose</i>	<i>33</i>
<i>2.3.4. Phương pháp thổi gel theo kit Qiagen</i>	<i>34</i>
<i>2.3.5. Giải trình tự</i>	<i>34</i>

Chương III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	35
3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	35
3.2. Phân tích các sản phẩm khuếch đại của 25 mẫu nghiên cứu.....	36
3.3. Kết quả khảo sát trình tự vùng ITS1-5,8SrRNA-ITS2 ở các mẫu nghiên cứu	36
3.4. Kết quả so sánh trình tự nucleotid vùng ITS1-5,8SrRNA-ITS2 của các mẫu nghiên cứu.....	40
3.5. Kết quả xây dựng cây quan hệ phát sinh giữa 25 mẫu nghiên cứu.....	45
3.6. Kết quả xác định Marker phân tử phân biệt 25 mẫu Sâm nghiên cứu.....	51
PHẦN III: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	58
CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN VĂN.....	59
TÀI LIỆU THAM KHẢO	60
PHỤ LỤC: TRÌNH TỰ 25 MẪU SÂM LAI CHÂU NGHIÊN CỨU.....	70

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

AFLP	Amplified Fragments Length Polymorphism
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide(CH ₃) ₂ SO
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleoside triphosphates
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetic Acid
EtBr	Ethidium Bromide
ISSR	Inter simple sequence repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
PCR	Polymerase chain reaction. Phản ứng nhân theo chuỗi
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
SCAR	Sequence Characterised Amplification Regions
SSR	Simple sequence repeats

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Danh sách 25 mẫu Sâm.	30
Bảng 2.2. Danh sách các môi ITS sử dụng trong nghiên cứu.....	31
Bảng 3.1. Độ dài các trình tự thuộc 25 mẫu Sâm nghiên cứu và mẫu tham chiếu <i>KJ418192.1</i>	38
Bảng 3.2. Thành phần bốn loại nucleotide của 25 mẫu nghiên cứu và mẫu tham chiếu <i>KJ418192.1</i>	39
Bảng 3.3. Hệ số tương đồng di truyền giữa 25 mẫu nghiên cứu và mẫu tham chiếu <i>KJ418192.1</i> vào trình tự vùng ITS1-5,8SrRNA- ITS2.....	46

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Sơ đồ vùng ITS của các gen rDNA vùng nhân và vị trí của các môi ITS (Embong <i>et al.</i> , 2008).....	29
Hình 3.1: Ảnh điện di ADN tổng số của 25 mẫu Sâm nghiên cứu.....	35
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp môi ITS1/ITS8 trên 25 mẫu Sâm với thang chuẩn Marker 100bp và mẫu đối chứng trắng (H ₂ O).....	36
Hình 3.3: Một đoạn giản đồ có các đỉnh với 4 màu sắc khác nhau tương ứng với 4 loại nucleotide của mẫu Sâm PT7	37
Hình 3.4: Kết quả giống hàng, giống cột 25 trình tự ITS1-5,8SrRNA-ITS2 của 25 mẫu Sâm và mẫu tham chiếu <i>KJ418192.1</i>	44
Hình 3.5. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền giữa 25 mẫu nghiên cứu	47
Hình 3.6. Cây quan hệ phát sinh giữa 25 mẫu nghiên cứu và mẫu tham chiếu <i>KJ418192.1</i>	48

PHẦN I: MỞ ĐẦU

1. Lí do chọn đề tài

Tại các nước châu Á, Nhân sâm được coi là vị thuốc quý đứng đầu trong các loại thuốc quý đông y (sâm, nhung, quế và phụ). Nhân sâm có tác dụng kích thích nhẹ ở liều thấp làm tăng vận động, tăng trí nhớ nhưng tác dụng ức chế ở liều cao đối với hệ thần kinh; làm tăng sinh lực chống lại sự mệt mỏi, giúp hồi phục sức lực làm tăng sự thích nghi của cơ thể trước những bất lợi của điều kiện môi trường sống; tác dụng bảo vệ tế bào giúp hồi phục số hồng cầu, bạch cầu bị giảm; tác dụng tăng nội tiết tố sinh dục; tác dụng kháng viêm; tác dụng điều hoà hoạt động của tim; tác dụng hạ cholesterol máu, chống xơ vữa động mạch; tác dụng giải độc gan và tác dụng kháng khuẩn nhất là đối với Streptococcus gây bệnh viêm họng.

Sâm Lai Châu (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) có tên gọi khác là Tam thất hoang Mường Tè; Tam thất rừng; Tam thất đen. Năm 2013, loài cây này đã được công bố phát hiện tại Lai Châu và đăng trên các tạp chí khoa học quốc tế và đăng ký mẫu DNA vào ngân hàng Genbank. Tính đến năm 2016 thì diện tích phân bố tự nhiên của Sâm Lai Châu đã giảm đáng kể chỉ còn lại rất ít trong rừng rậm nguyên sinh mùa mưa mùa nhiệt đới chưa bị tác động hoặc tác động nhẹ thuộc vùng núi cao xã Pa Vệ Sủ, xã Ka Lăng, xã Thum Lùm, xã Tá Bạ huyện Mường Tè, cây phân bố rải rác.

Sâm Lai Châu có tác dụng tương tự như Nhân sâm: củ và thân rễ dùng làm thuốc bổ; tăng lực, chống suy nhược, hồi phục sức lực bị suy giảm, kích thích nội tiết sinh dục, tăng sức chịu đựng, giải độc và bảo vệ gan, điều hoà thần kinh trung ương, điều hoà tim mạch, chống xơ vữa động mạch, giảm đường huyết và có thể dùng làm thuốc trị viêm họng.

Hiện nay, tại Việt Nam, Sâm Lai Châu còn lại rất ít trong tự nhiên. Chính vì vậy, việc bảo tồn và phát triển loại dược liệu quý báu này không chỉ