

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**



NGUYỄN THANH HOÀN

**ĐÁNH GIÁ NGUỒN GEN CÂY ĐẬU TƯƠNG CÚC BÓNG
TẠI HUYỆN VĨ NHAI TỈNH THÁI NGUYÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2019

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**



NGUYỄN THANH HOÀN

**ĐÁNH GIÁ NGUỒN GEN CÂY ĐẬU TƯƠNG CÚC BÓNG
TẠI HUYỆN VÕ NHAH TỈNH THÁI NGUYÊN**

**Ngành: Công nghệ sinh học
Mã số ngành : 8420201**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Dương Văn Cường
2. TS. Trần Minh Quân**

Thái Nguyên - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và nhóm nghiên cứu. Các số liệu có nguồn gốc rõ ràng và tuân thủ đúng quy tắc. Kết quả trình bày trong luận văn được thu thập trong quá trình nghiên cứu là trung thực, chưa từng được ai công bố trước đây.

Thái Nguyên, tháng 8 năm 2019

Tác giả

Nguyễn Thanh Hoàn

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được thực hiện tại bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ gen, Viện khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông lâm - Đại học Thái Nguyên. Để hoàn thành được luận văn này tôi đã nhận được sự động viên, giúp đỡ tận tình của rất nhiều cá nhân và tập thể.

Lời đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới PGS.TS. Dương Văn Cường và TS. Trần Minh Quân, người thầy đã trực tiếp hướng dẫn tôi rất tận tình trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các anh chị Ma Thị Trang, Vũ Hoài Nam, Hoàng Huyền Trang cán bộ tại bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ gen, và chị Vũ Thị Ánh cán bộ phòng phân tích hóa học Viện Khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến thầy Trần Văn Phùng - Viện trưởng Viện Khoa học Sự sống cùng các cán bộ nghiên cứu của viện đã tạo điều kiện cho tôi được thực tập và hoàn thành đề tài này.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Công nghệ sinh học - Công nghệ thực phẩm, các cán bộ trong Trường ĐH Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên đã giúp đỡ, trang bị kiến thức và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban giám đốc, lãnh đạo khoa Xét nghiệm-CDHA-TDCN và các anh chị đồng nghiệp thuộc Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Thái Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn đến gia đình, bạn bè và những người thân đã giúp đỡ động viên và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài này.

Xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Đối tượng nghiên cứu	2
4. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về cây đậu tương.....	3
1.1.1. Phân loại học	3
1.1.2. Sơ lược đặc điểm hình thái phân bố một số loài thuộc chi Glycine	4
1.1.3. Giá trị của cây đậu tương	5
1.2. Tổng quan về phân loại phân tử.....	6
1.2.1. Giới thiệu về phân loại phân tử	6
1.2.2. Các gen chỉ thị sử dụng trong phân loại phân tử.....	8
1.2.3. Một số gen chỉ thị trong phân loại thực vật	8
1.3. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	10
1.3.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	10
1.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước	13
Chương 2: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	16
2.2 Nội dung nghiên cứu.....	16
2.3. Vật liệu nghiên cứu.....	17
2.3.1. Môi phản ứng PCR.....	17

2.3.2. Thiết bị và hóa chất nghiên cứu	17
2.4. Phương pháp nghiên cứu	18
2.4.1. Phương pháp phân loại hình thái thực vật và phân tích sinh hóa hạt.....	18
2.4.2. Phương pháp xác định mối quan hệ di truyền.....	21
2.4.3. Đăng kí trình tự gen chỉ thị đậu tương nghiên cứu trên ngân hàng gen quốc tế	24
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái của đậu tương Cúc bóng tại huyện Võ Nhai tỉnh Thái Nguyên	25
3.2. Kết quả xác định mối quan hệ di truyền của đậu tương Cúc bóng.....	30
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA	30
3.2.2. Kết quả khuếch đại các gen chỉ thị rbcL và ITS2	32
3.2.3. Kết quả phân tích các gen chỉ thị	33
3.3. Đăng ký trình tự gen chỉ thị lên ngân hàng gen quốc tế.....	41
KẾT LUẬN	42
1. Kết luận.....	42
2. Đề nghị.....	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO	43

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

BP:	Base pair – Cặp bazơ nitơ
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
dNTP:	Deoxyribonucleotide Triphosphas
Kb:	Kilo Base – Kilo bazơ nitơ
QV:	Quality value
PCR:	Polymerase Chane Reaction
<i>rbcL</i> :	Ribulose-bisphosphate carboxylase
<i>ITS2</i> :	The internal transcribed spacer 2
matK:	Maturase K
TCVN:	Tiêu chuẩn Việt Nam

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Các mẫu đậu tương nghiên cứu	16
Bảng 2.2. Trình tự môi phản ứng PCR	17
Bảng 2.3. Danh mục thiết bị được sử dụng.....	17
Bảng 2.4. Danh mục hóa chất sử dụng.....	18
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR.....	23
Bảng 3.1. So sánh hình thái đậu tương Cúc bóng.....	28
Bảng 3.2. Hàm lượng một số chất dinh dưỡng của đậu tương Cúc bóng.....	29
Bảng 3.3. Thành phần axit amin trong protein của đậu tương Cúc bóng	29
Bảng 3.4. Kết quả đo độ tinh sạch và nồng độ DNA.....	31
Bảng 3.5: Hệ số tương đồng trình tự gen <i>rbcL</i> của mẫu đậu tương Cúc bóng với trình tự trên ngân hàng mã vạch DNA	35
Bảng 3.6: Hệ số tương đồng trình tự gen <i>ITS2</i> của mẫu đậu tương Cúc bóng với trình tự trên ngân hàng mã vạch DNA	39

DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1: Sơ đồ chu trình nhiệt PCR	23
Hình 3.1: Hình thái cây đậu tương Cúc bóng	26
Hình 3.2: Rễ và nốt sần đậu tương Cúc bóng	26
Hình 3.5: Quả đậu tương Cúc bóng	27
Hình 3.6: Hạt đậu tương Cúc bóng	27
Hình 3.7: So sánh kích thước hạt đậu tương Cúc bóng và DT 84	28
Hình 3.8. Kết quả tách chiết DNA tổng số đậu tương	31
Hình 3.9. Kết quả khuếch đại chỉ thị <i>rbcL</i>	32
Hình 3.10. Kết quả khuếch đại chỉ thị <i>ITS2</i>	32
Hình 3.11: Kết quả kiểm tra chất lượng tín hiệu giải trình tự gen <i>rbcL</i>	34
Hình 3.12. Kết quả so sánh trình tự nucleotide chỉ thị <i>rbcL</i>	35
Hình 3.13: Kết quả kiểm tra chất lượng tín hiệu giải trình tự gen <i>ITS2</i>	36
Hình 3.14. Kết quả so sánh trình tự nucleotide chỉ thị <i>ITS2</i>	38
Hình 3.15. Kết quả so sánh trình tự nucleotide chỉ thị <i>ITS2</i> của mẫu đậu tương Cúc bóng và các loài chi Glycine.....	39
Hình 3.16: Cây phát sinh chủng loại các loài thuộc chi Glycine xây dựng dựa trên trình tự <i>ITS2</i>	41

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cây đậu tương là một loại cây thân thảo thuộc họ đậu (Fabaceae), có hàm lượng dinh dưỡng cao, là cây thực phẩm quan trọng cho người và gia súc, nguyên liệu cho công nghiệp, hàng xuất khẩu và là cây cải tạo đất tốt [1].

Cây đậu tương dễ trồng và thích nghi tương đối rộng ở nhiều vùng khí hậu khác nhau. Tại Việt Nam, hình thành 6 vùng sản xuất đậu tương, vùng Đông Nam Bộ, miền núi Bắc Bộ, Đồng bằng sông Hồng, Đồng bằng sông Cửu Long. Tổng diện tích 4 vùng này chiếm 66,6% trong tổng diện tích cả nước, còn lại là các vùng Đồng bằng ven biển miền Trung và Tây Nguyên [2]. Các giống đậu tương rất đa dạng phong phú cả về kiểu hình và kiểu gen, đây là nguồn nguyên liệu để chọn tạo giống đậu tương mới cho năng suất và chất lượng phù hợp với mục tiêu chọn giống. Tuy nhiên, do tập quán canh tác phân tán, chưa có khoanh vùng định hướng phát triển, cùng với sự phát triển của các giống đậu tương mới đang làm mất dần nhiều giống đậu tương bản địa có chất lượng. Mặt khác, một giống có thể có nhiều tên gọi khác nhau hoặc cùng một tên gọi nhưng là các giống đậu tương khác nhau, điều này đã tạo ra nhưng khó khăn trong công tác phân loại và bảo tồn các nguồn gen bản địa.

Một số nghiên cứu của Trung tâm Tài nguyên thực vật cho thấy phần lớn các giống đậu tương địa phương đều tập trung ở vùng trung du miền núi phía Bắc. Một số giống đậu tương ở vùng này có nhiều đặc tính nông, sinh học tốt, tuy nhiên đang mất dần giống. Biện pháp tốt nhất để lưu giữ phát triển nguồn gen quý này là phải làm tốt công tác bảo tồn và phục tráng để phát triển ra sản xuất.

Đậu tương Cúc bóng là một giống đặc hữu của tỉnh Thái Nguyên. Đã từ lâu Cúc bóng được gieo trồng tại các xã Bình Long, Phương Giao...thuộc huyện Võ Nhai. Giống cho chất lượng thơm ngon, tạo nên thương hiệu đậu phụ An Long nổi tiếng trong vùng. Nhiều năm gần đây diện tích trồng giống đậu tương này đang bị thu hẹp, thay thế bởi các giống mới cho năng suất cao hơn. Đậu tương Cúc bóng Võ Nhai đang phải đối mặt với nguy cơ thoái hóa và mất dần giống. Chính vì vậy, việc