ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

TRẦN THỊ THÙY LINH

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ GEN *matK, ITS* CỦA CÂY LAN MỘT LÁ *(Nervilia fordii)*

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2019

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

TRẦN THỊ THÙY LINH

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ GEN *matK, ITS* CỦA CÂY LAN MỘT LÁ *(Nervilia fordii)*

Ngành: Di truyền học
Mã số: 8 42 01 21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. NguyễnThị Tâm

Thái Nguyên - 2019

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa từng ai công bố trong một công trình nào khác.

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2019

Tác giả luận văn

Trần Thị Thùy Linh

XÁC NHẬN	XÁC NHẬN
CỦA KHOA CHUYÊN MÔN	CỦA GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN
	PGS. TS. Nguyễn Thị Tâm

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Thị Tâm đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn thạc sĩ này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các thầy cô và cán bộ Bộ môn Di truyền học hiện đại, Khoa Sinh học, Bộ phận Sau đại học thuộc Phòng Đào tạo, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình và bạn bè trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận văn.

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2019

Tác giả luận văn

Trần Thị Thùy Linh

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC BẢNG iv
DANH MỤC CÁC HÌNH v
MỞ ĐẦU v
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu nghiên cứu 2
3. Nội dung nghiên cứu 3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 4
1.1. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm sinh học của lan Một lá 4
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại 4
1.1.2. Đặc điểm sinh học 4
1.1.3. Phân bố 5
1.1.4. Thành phần hóa học của cây lan Một lá 6
1.1.5. Công dụng của cây lan Một lá 7
1.2. Mã vạch DNA (DNA barcode) 8
1.3. Sử dụng mã vạch DNA trong nhận biết cây dược liệu 10
1.3.1. Đặc điểm vùng *ITS* 10
1.3.2. Đặc điểm gen *matK* 11
1.4. Tình hình nghiên cứu về gen *matK*, *ITS* của Việt Nam và trên thê giới.. 11
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 14
2.1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu 15
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu 15
2.1.2 Hóa chất, thiết bị 15
2.1.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu 15

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

2.2. Phương pháp nghiên cứu 15
2.2.1. Phương pháp thu mẫu 15
2.2.2. Phương pháp đánh giá một số đặc điểm hình thái 16
2.2.3. Các phương pháp sinh học phân tử 16
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 20
3.1. Đặc điểm hình thái của mẫu lan Một lá thu thập tại Thái Nguyên và Cao Bằng 20
3.2. Đặc điểm của gen *matK* và *ITS* phân lập từ cây lan Một lá 22
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA từ lá cây lan Một lá 22
3.2.2. Kết quả nhân gen *matK* và *ITS* bằng phản ứng PCR 23
3.2.3. Kết quả xác định trình tự nucleotit đoạn gen *matK* và *ITS* phân lập từ các mẫu lan Một lá 24
3.3. Sự đa dạng về trình tự nucleotit của vùng *ITS* và *matK* của cây lan Một lá 32
3.3.1. Sự đa dạng về trình tự nucletotit của vùng *ITS* của cây lan Một lá 32
3.3.2. Sự đa dạng về trình tự nucletotit của đoạn gen *matK* của cây lan Một lá. 34
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 37
1. Kết luận 37
2. Đề nghị 37
TÀI LIỆU THAM KHẢO 38

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại khoa học Chi lan Một lá (*Nervilia fordii*)..... 4
Bảng 2.1.Trình tự các cặp mồi nhân bản gen *ITS* và *matK* 17
Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng PCR 17
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt của phản ứng nhân gen *ITS* và *matK*..... 18
Bảng 3.1. Số lượng và tỉ lệ từng loại nucleotit của vùng *ITS* từ mẫu LML-01-TN (ITS-01-TN) và mẫu LML-02-CB (ITS-02-CB)..... 24
Bảng 3.2. Các vị trí nucleotit sai khác giữa trình tự nucleotit của đoạn gen *matK* của mẫu lan Một lá matK-02-CB với JX865503 và JN004498. 32
Bảng 3.3. Mã số, năm công bố, quốc gia và tác giả của 5 trình tự vùng *ITS* trên GenBank..... 33
Bảng 3.4. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly dựa trên trình tự vùng *ITS* từ mẫu LML-01-TN và LML-02-CB với trình tự vùng *ITS* trên GenBank. 33
Bảng 3.5. Mã số, năm công bố, quốc gia và tác giả của 5 trình tự gen *matK* trên GenBank..... 35
Bảng 3.6. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly dựa trên trình tự đoạn gen *matK* từ mẫu LML-02-CB với các trình tự đoạn gen *matK* trên GenBank. 35

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cây lan Một lá (*Nervilia fordii*) thu thập ở Hòa An - Cao Bằng và Định Hóa - Thái Nguyên. 5
Hình 3.1. Hình ảnh thân, rễ, lá của mẫu cây lan Một lá thu tại huyện Hòa An tỉnh Cao Bằng (LML-02-CB)..... 21
Hình 3.2. Hình ảnh thân, rễ, lá của mẫu cây lan Một lá thu tại huyện Định Hóa tỉnh Thái Nguyên (LML-01-TN)..... 21
Hình 3.3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm DNA tổng số 23
Hình 3.4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *matK* và *ITS* từ hai mẫu lan Một lá..... 24
Hình 3.5. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng gen *ITS* mẫu lan Một lá mẫu LML-02-CB với một số trình tự vùng *ITS* trên GenBank bằng BLAST trong NCBI 26
Hình 3.6. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng gen *ITS* mẫu lan Một lá LML-01-TN với một số trình tự vùng *ITS* trên GenBank bằng BLAST trong NCBI..... 26
Hình 3.7. Trình tự vùng *ITS* của mẫu LML-01-TN, LML-02-CB và hai trình tự mang mã số JX011630 và JX011631 trên GenBank..... 28
Hình 3.8. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự gen *matK* của mẫu lan Một lá LML-02-CB với một số trình tự gen *matK* trên GenBank bằng BLAST trong NCBI. 29
Hình 3.9. Trình tự đoạn gen *matK* của mẫu LML02-CB và hai trình tự mang mã số JX865503 và JN004498 trên GenBank 31
Hình 3.10. Mối quan hệ di truyền của mẫu lan Một lá dựa trên phân tích trình tự nucleotit của vùng *ITS*. 34
Hình 3.11. Mối quan hệ di truyền của mẫu lan Một lá dựa trên phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen *matK*..... 36

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng nhiệt đới có hệ thực vật vô cùng đa dạng và phong phú. Theo thống kê, ở nước ta hiện có gần 12.000 loài thực vật bậc cao có mạch thuộc hơn 2.256 chi, 305 họ, 69 loài thực vật hạt trần, 12.000 loài thực vật hạt kín, 2.200 loài nấm, 2.176 loài tảo, 481 loài rêu, 368 loài vi khuẩn lam, 691 loài dương xỉ và 100 loài khác [1], [7]. Trong số các loài thực vật ở nước ta có nhiều loài được sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Trải qua nhiều năm điều tra nghiên cứu, thống kê cho thấy ở Việt Nam có khoảng hơn 3.800 loài thực vật được dùng làm thuốc. Đó là nguồn tài nguyên vô cùng quý giá [2],[8]. Hiện nay nhiều loài có giá trị đang bị người dân khai thác và thu hái để bán vì lợi ích kinh tế. Trong đó, loài lan Một lá (*Nervilia fordii*) thuộc họ Lan (*Orchidaceae*) có nhiều công dụng như: làm thuốc giải độc nhất là ngộ độc nấm, làm mát phổi, chữa ho lao, ho lâu năm, viêm phế quản...[2]. Ở nước ta hiện có 5 loài thuộc chi *Nervilia* đó là: *Nervilia aragoana, Nervilia crispata, Nervilia fordii, Nervilia plicata và Nervilia prainiana* mang một số đặc điểm hình thái tương tự nhau [2],[6].

Trước đây, việc phân biệt các giống, loài chủ yếu thông qua đặc điểm hình thái. Tuy nhiên, một số loài có đặc điểm hình thái rất giống nhau, do vậy khó có thể nhận biết và phân biệt một cách chính xác nếu chỉ dựa trên các đặc điểm hình thái giải phẫu. Để khắc phục được khó khăn trong phân loại hình thái thì phương pháp phân loại học phân tử là phương pháp mang lại hiệu quả.

Phân loại học phân tử (Molecular taxonomy) là phương pháp phân loại chủ yếu dựa trên các kỹ thuật phân tích DNA cho những kết quả chính xác, giúp cho việc phát hiện loài mới, giải quyết các mối nghi ngờ về vị trí phân loại. So với chỉ thị hình thái, chỉ thị DNA cho độ chính xác cao mà không lệ thuộc vào các yếu tố môi trường.

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu và Công nghệ thông tin – ĐHTN http://lrc.tnu.edu.vn

Trong các phương pháp phân loại phân tử, mã vạch DNA (DNA barcode) là phương pháp phổ biến nhất dựa trên những đoạn trình tự DNA ngắn có tốc độ tiến hóa đủ nhanh để hỗ trợ giải quyết những khó khăn trong phân loại hình thái. Trên đối tượng thực vật, các vùng mã vạch DNA thường được sử dụng trong phân loại phân tử thường là các trình tự thuộc hệ gen nhân như *ITS* (Internal transcribed spacer) và hệ gen lục lạp như *psbAtrnH, matK, rbcL, rpoC1*...

Đối với các loài thuộc chi *Nervilia*, các nhà nghiên cứu đã chỉ ra xu thế phân loại của vùng gen *matK* so với 3 vùng gen *ITS2, rbcL* và *LSU D1-D3*. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu về mã vạch DNA đã chỉ ra rằng việc sử dụng kết hợp hai mã vạch DNA cho kết quả phân loại tốt hơn so với từng mã vạch đơn lẻ. Cho đến nay, ở Việt Nam vẫn chưa có công trình nào nghiên cứu đặc điểm hình thái chi tiết và mã vạch DNA của loài lan Một lá *Nervilia fordii*.

Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi chọn đề tài nghiên cứu: ***"Nghiên cứu đặc điểm hình thái và trình tự gen matK, ITS của cây Lan một lá (Nervilia fordii)"*** nhằm mô tả, xác định các đặc điểm hình thái đặc trưng và phân tích trình tự hai vùng gen có độ biến thiên cao, thích hợp cho định loại phân tử là *ITS* và *matK* của loài Lan một lá (*Nervilia fordii*) ở Việt Nam, góp phần tư liệu hóa nguồn gen của cây Lan một lá và xây dựng mã vạch DNA.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Phân tích được đặc điểm hình thái của một số mẫu lan Một lá thu thập ở địa phương khác nhau.

- Dựa trên phân tích trình tự gen *ITS* và *matK* để xác định được mối quan hệ di truyền giữa các mẫu nghiên cứu và phục vụ xây dựng mã vạch DNA cho lan Một lá *(Nervilia fordii).*