

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGÔ THÙY LINH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, GIẢI PHẪU
VÀ PHÂN LOẠI CÂY BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS*)
THU THẬP Ở LAI CHÂU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, năm 2018

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

NGÔ THÙY LINH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, GIẢI PHẪU
VÀ PHÂN LOẠI CÂY BẢY LÁ MỘT HOA (*PARIS*)
THU THẬP Ở LAI CHÂU**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 8 42 01 21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Vũ Thị Thu Thủy

Thái Nguyên, năm 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Vũ Thị Thu Thủy. Các kết quả nghiên cứu là trung thực và chưa được công bố ở bất cứ công trình nào khác.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2018

Tác giả

Ngô Thùy Linh

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS. Vũ Thị Thu Thủy, khoa Sinh học trường Đại học sư phạm Thái Nguyên là người đã chỉ bảo, hướng dẫn em suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn cảm ơn sâu sắc tới các thầy cô khoa Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm - ĐH Thái Nguyên đã tận tình hướng dẫn, truyền dạy kiến thức cho em trong suốt khóa học.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các thầy giáo, cô giáo trong Ban giám hiệu trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, thầy, cô các phòng ban chức năng đã tạo điều kiện và giúp đỡ em trong thời gian học tập tại trường.

Cuối cùng, xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới bạn bè và gia đình đã luôn quan tâm, động viên, ủng hộ và giúp đỡ em.

Luận văn là sản phẩm của đề tài cấp Bộ có mã số B2017-TNA-04-QG do PGS.TS Vũ Thị Thu Thủy bộ môn Sinh học hiện đại và Giáo dục sinh học làm chủ nhiệm.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2018

Tác giả

Ngô Thùy Linh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
MỞ ĐẦU.....	1
1. Lý do chọn đề tài	1
2. Mục tiêu của đề tài.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Giới thiệu chung về cây Bảy lá một hoa	4
1.1.1. Đặc điểm, phân loại cây Bảy lá một hoa.....	4
1.1.2. Phân bố, vai trò của cây Bảy lá một hoa	5
1.2. Các phương pháp định danh thực vật.....	6
1.2.1. Phương pháp so sánh hình thái, giải phẫu	7
1.2.2. Phương pháp sinh học phân tử	8
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	14
2.1. Vật liệu thực vật.....	14
2.2. Địa điểm nghiên cứu, hóa chất và thiết bị.....	14
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu.....	14
2.2.2. Hóa chất, dụng cụ	14
2.3. Phương pháp nghiên cứu	14
2.3.1. Phương pháp hình thái, giải phẫu	15
2.3.2. Phương pháp sinh học phân tử	15
2.3.3. Phương pháp phân tích trình tự nucleotide	18

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	19
3.1. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái và giải phẫu cây Bảy lá một hoa .	19
3.1.1. Đặc điểm hình thái của mẫu cây Bảy lá một hoa	19
3.1.2. Đặc điểm giải phẫu của mẫu cây Bảy lá một hoa	20
3.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm mã vạch DNA của mẫu cây Bảy lá một hoa ..	23
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	23
3.2.2. Kết quả khuếch đại và phân tích trình tự nucleotide đoạn gen matK	23
3.2.3. Kết quả khuếch đại và phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS	29
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	34
1. Kết luận.....	34
2. Đề nghị.....	34
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	35

DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

CBOL	:	Consortium for the Barcode of Life
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
ITS	:	Internal Transcribed Spacer
kb	:	Kilobase
matK	:	MaturaseK
NCBI	:	The National Center for Biotechnology Information
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
rpoC	:	Retained products of conception
SH	:	Sin Hồ

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Môi <i>matK</i> sử dụng trong kỹ thuật PCR	17
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR	17
Bảng 2.3. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR.....	17
Bảng 2.4. Môi <i>ITS</i> sử dụng trong kỹ thuật PCR.....	18
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR	18
Bảng 2.6. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR.....	18
Bảng 3.1. Một số trình tự đoạn gen <i>matK</i> sử dụng để xác định độ tương đồng và sai khác với mẫu SH.....	27
Bảng 3.2. Độ tương đồng và phân ly dựa trên trình tự gen <i>matK</i>	27
Bảng 3.3. Một số trình tự vùng gen <i>ITS</i> sử dụng để xác định độ tương đồng và sai khác với mẫu SH.....	32
Bảng 3.4. Độ tương đồng và phân ly dựa trên trình tự vùng gen <i>ITS</i>	32

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 2.1: Mô hình thí nghiệm tổng quát	15
Hình 3.1. Hình thái cơ quan sinh dưỡng của mẫu cây Bảy lá một hoa thu thập ở huyện Sìn Hồ, tỉnh Lai Châu.....	19
Hình 3.2. Cấu tạo giải phẫu cuống lá	20
Hình 3.3. Cấu tạo giải phẫu thân	21
Hình 3.4. Cấu tạo giải phẫu rễ	22
Hình 3.5. Kết quả tách chiết DNA tổng số của cây Bảy lá một hoa	23
Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại gen <i>matK</i> bằng kỹ thuật PCR....	24
Hình 3.7. Kết quả Blast trình tự gen <i>matK</i>	25
Hình 3.8. Trình tự nucleotide của đoạn gen <i>matK</i> phân lập từ mẫu cây Bảy lá một hoa thu thập ở Sìn Hồ, Lai Châu.....	26
Hình 3.9. Sơ đồ mô tả mối quan hệ di truyền giữa các loài Bảy lá một hoa trong chi <i>Paris</i> dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen <i>matK</i>	28
Hình 3.10. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại vùng gen <i>ITS</i> bằng kỹ thuật PCR.....	29
Hình 3.11. Kết quả Blast trình tự vùng gen <i>ITS</i>	30
Hình 3.12. Trình tự nucleotide của vùng gen <i>ITS</i> phân lập từ mẫu cây Bảy lá một hoa thu thập ở Sìn Hồ, Lai Châu.....	31
Hình 3.13. Sơ đồ mô tả mối quan hệ di truyền giữa các mẫu cây Bảy lá một hoa trong chi <i>Paris</i> dựa trên trình tự nucleotide của vùng <i>ITS</i>	33

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Bảy lá một hoa là tên gọi chung của các mẫu cây thuộc chi *Paris*. Cây Bảy lá một hoa còn gọi là Thất diệp nhất chi mai, Độc cước liên, Thiết đặng đài, Chi hoa đầu, Tảo hưu, Thảo hà xa, Trọng lâu, Thất tử liên, Đặng đài thất, Cúa dô (H'Mông)... Hiện nay, chi *Paris* được công bố có 24 loài, mỗi loài gồm nhiều giống khác nhau. Chỉ riêng loài *Paris polyphylla* kết quả thống kê cho thấy đã có 8 giống. Nhiều giống được mô tả chi tiết về mặt hình thái, đó là căn cứ ban đầu để nhận dạng và phát hiện sự có mặt của các cây quý hiếm này [30].

Ở Việt Nam, cây Bảy lá một hoa được tạm gọi tên khoa học là *Paris polyphylla* Sm. [12], [30]. Đây là những loài thảo mộc có giá trị trong chữa một số bệnh như cảm ho, giảm cơn hen, cầm máu, ức chế trực khuẩn lỵ, thương hàn... Đặc biệt, chữa cả một số bệnh nan y như ung thư, rắn cắn... chính vì có nhiều giá trị mà hiện tại cây Bảy lá một hoa đang bị khai thác bừa bãi, có nguy cơ tuyệt chủng. Từ năm 1999, Phạm Hoàng Hộ mô tả đặc điểm hình thái của 5 loài [5]. Đến năm 2016, Nguyễn Quỳnh Nga và cộng sự lập khóa phân loại chi tiết cho 8 loài và 2 giống [20]. Tuy nhiên, tiềm năng của cây Bảy lá một hoa ở Việt Nam còn khá phong phú và cần thiết được khai thác thêm.

Có nhiều phương pháp có thể định danh thực vật làm thuốc đảm bảo độ chính xác và hiệu quả. Các phương pháp thường dùng như nghiên cứu và so sánh các đặc điểm về hình thái, giải phẫu, sinh lý, hóa sinh... hướng nghiên cứu này đã thành công trên một số đối tượng cây trồng như cây Ngô đồng đỏ, Rong câu chỉ, Ráng thư dục [2], [3], [4]... Tuy nhiên, khi cây không còn nguyên vẹn, hay đã được chế biến thì phương pháp nhận diện này sẽ kém hiệu quả.

Sự phát triển của công nghệ sinh học hiện đại trong những năm gần đây có bổ sung vào hệ thống phân loại sinh vật phương pháp phân loại học phân tử. Đây là phương pháp có độ chính xác cao, đặc biệt rất cần đối với thực vật dùng làm thuốc muốn xác định ở cấp độ loài, ngay cả khi đã được chế biến. Việc xác