ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN HẢI YẾN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC, MÃ VẠCH DNA CỦA CÂY ĐẬU NHO NHE (*Vigna umbellata*) THU TẠI TỈNH YÊN BÁI VÀ LAI CHÂU

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN HẢI YẾN

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT HỌC, MÃ VẠCH DNA CỦA CÂY ĐẬU NHO NHE (*Vigna umbellata*) THU TẠI TỈNH YÊN BÁI VÀ LAI CHÂU

Ngành: Di truyền học
Mã ngành: 8.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Hữu Quân

THÁI NGUYÊN - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. 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 được ai công bố.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2018

Tác giả luận văn

Nguyễn Hải Yến

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Nguyễn Hữu Quân, giảng viên Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ em trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Em xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của cô Trần Thị Hồng, kỹ thuật viên Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên trong quá trình làm thí nghiệm.

Em xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong Bộ môn Sinh học hiện đại và Giáo dục 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 em trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Em xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nhiệm vụ bảo tồn và lưu giữ quỹ gen cấp Bộ năm 2017 "Nghiên cứu bảo tồn nguồn gen nhóm cây đậu đỗ địa phương thu thập từ các tỉnh thuộc miền Bắc Việt Nam" Mã số B2017-TNA-10-QG.

Em xin bày tỏ lời biết ơn đến gia đình, bạn bè đã động viên, khuyến khích và giúp đỡ em trong tiến trình học tập và hoàn thành luận văn.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2018

Tác giả luận văn

Nguyễn Hải Yến

MỤC LỤC

Trang

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT iv
DANH MỤC CÁC BẢNG v
DANH MỤC CÁC HÌNH vi
MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu nghiên cứu 2
3. Nội dung nghiên cứu 2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Sơ lược về cây đậu Nho nhe 3
1.1.1. Hệ thống phân loại 3
1.1.2. Đặc điểm hình thái của đậu Nho nhe 3
1.1.3. Thành phần dinh dưỡng của đậu Nho nhe 3
1.1.4. Giá trị sử dụng của đậu Nho nhe 6
1.2. Nghiên cứu sử dụng mã vạch DNA trong phân loại thực vật 7
1.3. Tình hình nghiên cứu về nhóm cây họ đậu 10
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 14
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị 14
2.1.1. Vật liệu 14
2.1.2. Hóa chất 14
2.1.3. Thiết bị 14
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu 15
2.2. Phương pháp nghiên cứu 15
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái 15

2.2.2. Phương pháp giải phẫu thực vật 16
2.2.3. Xác định hoạt tính α-amylase 16
2.2.4. Xác định hoạt tính protease 17
2.2.5. Định lượng protein tan 19
2.2.6. Xác định sự sinh trưởng của thân mầm và rễ mầm 19
2.2.7. Xác định hàm lượng isoflavone từ mầm đậu Nho nhe 19
2.2.8. Phương pháp sinh học phân tử 21
2.2.9. Phương pháp xử lý và phân tích kết quả 22
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 23
3.1. Đặc điểm hình thái, giải phẫu của mẫu đậu Nho Nhe 23
3.2. Đặc điểm hóa sinh của mẫu đậu Nho nhe 27
3.2.1. Hàm lượng protein tan tổng số 27
3.2.2. Hoạt tính α-amylase từ mầm đậu Nho nhe 27
3.2.3. Hoạt tính protease từ mầm đậu Nho nhe 27
3.2.4. Hàm lượng isoflavone từ mầm hạt đậu Nho nhe 28
3.3. Đặc điểm của vùng gen *ITS* phân lập từ mẫu đậu Nho Nhe 30
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 36
KẾT LUẬN 36
KIẾN NGHỊ 36
TÀI LIỆU THAM KHẢO 37
TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT 37
TÀI LIỆU TIẾNG ANH 37

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
AFLP	Amplified Fragments Length Polymorphism	Đa hình độ dài các đoạn khếch đại
bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
cDNA	Complementary DNA	DNA sợi đôi được tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonucleic Axit (DNA)
EDTA	Ethylene diamine tetraa acid cetic	Etylen diamin tetraxetic Axit
ITS	Internal transcribed space	Vùng gen *ITS*
matK	*matK* maturase	Gen *matK*
mRNA	Messenger RNA	ARN thông tin
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Coenzym được sử dụng trong phản ứng đồng hóa
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA	Đa hình DNA nhân bản ngẫu nhiên
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn
RNA	Ribonucleic acid	Ribonucleic Axit
rRNA	RNA ribosome	riboxom RNA
SSR	Simple Sequence Repeats	Đa hình các đoạn lặp lại đơn giản

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm 14
Bảng 2.2. Thiết bị sử dụng trong thí nghiệm 15
Bảng 2.3. Chương trình gradient nồng độ của pha động 20
Bảng 2.4. Thông tin về cặp mồi nhân vùng gen *ITS* 21
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR nhân vùng gen *ITS* 22
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái hạt của 02 mẫu đậu Nho nhe 24
Bảng 3.2. Hàm lượng isoflavone trong hạt nảy mầm 3 ngày tuổi của 2 mẫu đậu Nho nhe 28
Bảng 3.3. Đặc điểm hóa sinh của 02 mẫu đậu Nho nhe 30
Bảng 3.4. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly dựa trên trình tự vùng gen *ITS* từ mẫu đậu Nho nhe NN01-YB và NN10-LC với trình tự vùng gen *ITS* trên GenBank 34

DANH MỤC CÁC HÌNH

Trang

Hình 2.1. Đường chuẩn nồng độ glucosamine theo phương pháp Miller..... 17

Hình 2.2. Đường chuẩn nồng độ tyrosine 19

Hình 3.1. Đặc điểm hình thái thân, lá (A), hoa (B), quả (C) và hạt (D) của mẫu đậu Nho nhe..... 23

Hình 3.2. Giải phẫu lá của đậu Nho nhe 25

Hình 3.3. Giải phẫu thân của đậu Nho nhe 26

Hình 3.4. Giải phẫu rễ của đậu Nho nhe..... 26

Hình 3.5. Sắc ký đồ phân tích daidzein và genistein từ hạt đậu Nho nhe nảy mầm 3 ngày tuổi 29

Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ khuôn DNA tổng số 30

Hình 3.7. Trình tự vùng gen *ITS* của đậu Nho nhe NN01-YB (A) và NN10-LC (B)..... 31

Hình 3.8. Kết quả phân tích sự tương đồng giữa trình tự vùng gen *ITS* của mẫu đậu Nho nhe NN10-LC (A) và NN01-YB (B) với một số trình tự vùng *ITS* trên GenBank bằng BLAST trong NCBI..... 32

Hình 3.9. Trình tự nucleotit của vùng gen *ITS* từ mẫu đậu Nho nhe NN10-LC (A) và NN01-YB (B) với trình tự vùng gen *ITS* mang mã số KX087818 trên GenBank..... 33

Hình 3.10. Sơ đồ cây phân loại dựa trên trình tự nucleotit vùng gen *ITS* từ mẫu đậu Nho nhe NN01-YB và NN10-LC với trình tự vùng gen *ITS* trên GenBank..... 35

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu đỗ là nhóm cây có giá trị dinh dưỡng cao và đóng vai trò thiết yếu để nâng cao tiêu chuẩn thực phẩm cho con người ở những nước đang phát triển trong tình trạng thiếu hụt protein. Nguồn gen các nhóm cây đậu đỗ gồm những giống và loài cây hoang dại, cùng những dạng tài nguyên thực vật đáp ứng được yêu cầu của quá trình nghiên cứu và sản xuất nông nghiệp. Nguồn gen của các nhóm cây đậu đỗ được coi là cơ sở sinh học cho vấn đề an ninh lương thực thế giới cũng như ở Việt Nam. Do vậy, nguồn gen các nhóm cây đậu đỗ cần phải được bảo tồn trong một môi trường thuận lợi, ổn định, ít có những biến đổi khắc nghiệt mang tính hủy diệt nguồn gen.

Ngày nay, do nhiều nguyên nhân như sự tăng dân số, nhu cầu lương thực và nhu cầu khác của con người ngày càng tăng dẫn đến khai thác đất rừng, đất nông nghiệp và các nguồn tài nguyên một cách quá mức, thiên tai, dịch bệnh và sự phát triển nhanh của các giống mới có năng suất cao dẫn đến nguồn tài nguyên di truyền ở nhiều vùng sinh thái đã suy giảm nghiêm trọng. Sự suy giảm nhanh và mức độ mạnh nhất là các khu vực miền núi khi mùa mưa đến. Trước tình trạng các giống đậu đỗ địa phương, đặc biệt là giống đậu nho nhe đang dần bị thoái hóa và mất dần các đặc tính quý của giống, việc thu thập nguồn gen, xác định đặc điểm sinh học và mã vạch DNA là rất cần thiết.

Đậu Nho nhe phân bố rải rác ở một số địa phương thuộc khu vực miền núi phía Bắc trong đó có tỉnh Yên Bái và Lai Châu. Vì vậy, công tác thu thập đậu Nho nhe của 2 địa phương này để có được một tập đoàn giống phục vụ công tác lưu giữ và bảo tồn nguồn gen là mục tiêu cần hướng tới. Bên cạnh việc sử dụng các phương pháp so sánh hình thái, nghiên cứu sẽ tiến hành đánh giá sự đa dạng ở mức độ DNA và mối quan hệ di truyền giữa các bộ giống nghiên cứu để làm cơ sở bước đầu phát hiện khả năng trùng lặp mẫu giống trong tập đoàn đậu Nho nhe; đồng thời phục vụ công tác bảo tồn, khai thác các nguồn gen đậu Nho nhe địa phương, tiến tới ứng dụng chọn tạo các giống đậu Nho nhe mới phù hợp với nhu cầu thực tiễn.