

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

PHÓ THỊ THUYẾT HẰNG

**NGHIÊN CỨU BẢO TỒN VỐN GEN CÂY NGƯỜU TẮT
(*ACHYRANTHES BIDENTATA BLUME*) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI
CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, 2010

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

PHÓ THỊ THUYẾT HẰNG

**NGHIÊN CỨU BẢO TỒN VỐN GEN CÂY NGƯỜU TẮT
(*ACHYRANTHES BIDENTATA BLUME*) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI
CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT**

**Chuyên ngành: Di truyền học
Mã số: 60.42.70**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

***Hướng dẫn khoa học:* TS. NGUYỄN THỊ TÂM**

Thái Nguyên, 2010

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới TS. Nguyễn Thị Tâm đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn tốt nghiệp này.

Tôi xin trân thành cảm ơn Th.S. Vũ Anh Tuấn, KTV Lương Thị Hồng Vân - bộ môn Hoá hữu cơ - Khoa Hoá học trường Đại học Sư phạm đã tận tình hướng dẫn tôi thực hiện một số thí nghiệm trong luận văn. Tôi xin cảm ơn KTV Đào Thu Thủy (PTN Công nghệ Tế bào thực vật), KTV Trần Thị Hồng (PTN Di truyền học), đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi tiến hành các thí nghiệm.

Tôi xin cảm ơn Ban chủ nhiệm cùng các thầy cô giáo, cán bộ Khoa Sinh - KTNN, Khoa Hoá học - Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận văn này.

Tác giả

Phó Thị Thuý Hằng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố.

Tác giả

Phó Thị Thúy Hằng

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	
Lời cảm ơn	
Mục lục	
Những chữ viết tắt	
Danh mục các bảng	
Danh mục các hình vẽ, đồ thị	
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
3. Nội dung nghiên cứu.....	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Giới thiệu chung về cây Nguru tất.....	4
1.1.1. Đặc điểm phân loại.....	4
1.1.2. Một số đặc điểm nông sinh học của cây Nguru tất.....	4
1.1.3. Kỹ thuật trồng, chăm sóc, thu hái và bảo quản sau thu hoạch....	5
1.2. Tình hình sản xuất Nguru tất trên thế giới và ở Việt Nam.....	6
1.3. Ứng dụng cây Nguru tất trong y học.....	8
1.3.1. Cơ sở hoá học tính chữa bệnh của cây Nguru tất.....	8
1.3.2. Một số nghiên cứu ứng dụng cây Nguru tất trong y học.....	10
1.4. Ứng dụng của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực trong công tác nhân giống cây trồng.....	12
1.4.1. Ưu thế của nhân giống <i>in vitro</i>	12
1.4.2. Các phương thức nhân giống <i>in vitro</i>	14

1.4.3. Một số thành tựu trong nhân giống cây trồng bằng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i>	15
1.5. Ứng dụng kỹ thuật PCR - RAPD trong phân tích sự đa dạng di truyền.....	19
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.1. Vật liệu.....	23
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	23
2.1.2. Hoá chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu.....	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	24
2.2.1. Phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	24
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu hợp chất saponin trong rễ cây Ngưu tất.....	28
2.2.3. Phương pháp sinh học phân tử.....	29
2.2.4. Phương pháp xử lý và tính toán số liệu	33
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	34
3.1. Nghiên cứu nhân giống cây Ngưu tất và trồng thử nghiệm ngoài đồng ruộng.....	34
3.1.1. Nghiên cứu khử trùng hạt.....	34
3.1.2. Ảnh hưởng riêng rẽ của chất KTST đến khả năng nhân chồi và sự sinh trưởng của chồi Ngưu tất trong ống nghiệm.....	36
3.1.3. Ảnh hưởng của α -NAA tới sự tạo rễ của cây Ngưu tất trong ống nghiệm.....	42
3.1.4. Ảnh hưởng của tổ hợp chất KTST đến khả năng nhân chồi và sự sinh trưởng của cây Ngưu tất trong ống nghiệm.....	44
3.1.5. Kết quả đưa cây ra môi trường tự nhiên.....	49

3.2. Hàm lượng saponin tổng số trong rễ cây Ngưu tất <i>in vitro</i> trồng ngoài đồng ruộng và cây trồng bằng hạt.....	51
3.3. Sử dụng kĩ thuật RAPD đánh giá hệ gen cây Ngưu tất <i>in vitro</i> và cây trồng bằng hạt.....	53
3.3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số	53
3.3.2. Kết quả phản ứng RAPD	54
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	59
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	60
PHỤ LỤC.....	64

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

ĐC:	Đối chứng
HS:	Hệ số
IBA:	Axit 3-indolebutiric
KLK:	Khối lượng khô
KTST:	Kích thích sinh trưởng
PCR:	Polimease Chain Reaction (phản ứng chuỗi Polimease)
TĐST:	Tốc độ sinh trưởng
TN:	Thí nghiệm

DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i>trang</i>
Bảng 2.1. Thành phần cơ bản của môi trường MS.....	23
Bảng 2.2. Trình tự nucleotit của 5 đoạn môi ngẫu nhiên.....	32
Bảng 3.1. Kết quả khử trùng hạt Ngưu tất.....	34
Bảng 3.2. Ảnh hưởng riêng rẽ của BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi của cây Ngưu tất trong ống nghiệm	38
Bảng 3.3. Ảnh hưởng riêng rẽ của BAP và kinetin đến tốc độ sinh trưởng của cây Ngưu tất trong ống nghiệm	40
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của α -NAA đến hình thành rễ của cây Ngưu tất trong ống nghiệm (sau 30 ngày).....	42
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tổ hợp chất KTST đến khả năng nhân chồi của cây Ngưu tất trong ống nghiệm.....	44
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tổ hợp chất KTST đến tốc độ sinh trưởng của cây Ngưu tất trong ống nghiệm.....	46
Bảng 3.7. Kết quả đưa cây Ngưu tất ra môi trường tự nhiên.....	49
Bảng 3.8. Theo dõi một số chỉ tiêu sau 30 ngày đưa cây ra vườn ươm ...	50
Bảng 3.9. Một số chỉ tiêu theo dõi rễ cây <i>in vitro</i> và rễ cây trồng bằng hạt khi thu hoạch.....	50
Bảng 3.10. Hàm lượng hợp chất saponin trong rễ cây <i>in vitro</i> và cây trồng bằng hạt.....	52
Bảng 3.11. Tổng số phân đoạn ADN xuất hiện của 5 mẫu ngưu tất khi phân tích với 5 môi ngẫu nhiên.....	55
Bảng 3.12. Số phân đoạn ADN đa hình thu được từ 5 mẫu Ngưu tất với tường môi nghiên cứu.....	56

DANH MỤC CÁC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 3.1. Biểu đồ so sánh ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ bình không nhiễm và tỷ lệ hạt nảy mầm của hạt Nguru tất	35
Hình 3.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ nảy mầm và sự phát triển của chồi mầm Nguru tất	36
Hình 3.3. Biểu đồ so sánh khả năng nhân chồi giữa BAP và kinetin..	39
Hình 3.4. Biểu đồ so sánh tốc độ sinh trưởng giữa BAP và kinetin...	41
Hình 3.5. Ảnh hưởng riêng rẽ của BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi và tốc độ sinh trưởng của chồi Nguru tất trong ống nghiệm	41
Hình 3.6. Hình ảnh rễ Nguru tất trong môi trường có α -NAA.....	43
Hình 3.7. Biểu đồ ảnh hưởng của tổ hợp chất KTST đến khả năng nhân chồi của cây Nguru tất trong ống nghiệm.....	45
Hình 3.8. Biểu đồ ảnh hưởng của tổ hợp chất KTST đến tốc độ sinh trưởng của cây Nguru tất trong ống nghiệm.....	47
Hình 3.9. Ảnh hưởng của tổ hợp chất KTST đến khả năng nhân chồi và tốc độ sinh trưởng của cây Nguru tất trong ống nghiệm	48
Hình 3.10. Một số hình ảnh đưa cây ra môi trường tự nhiên.....	51
Hình 3.11. Một số phản ứng định tính hợp chất saponin.....	53
Hình 3.12. Hình ảnh một số giai đoạn tách chiết hợp chất saponin	53
Hình 3.13. Hình ảnh điện di kiểm tra độ tinh sạch ADN.....	54
Hình 3.14. Điện di sản phẩm PCR-RAPD trên gel agarose 1,8% môi OPP15 và OPP19.....	57
Hình 3.15. Điện di sản phẩm PCR-RAPD trên gel agarose 1,8% môi OPH04 và OPN05.....	57
Hình 3.16. Điện di sản phẩm PCR-RAPD trên gel agarose 1,8% môi OPF10	58