

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

HOÀNG THỊ TRANG

**SỬ DỤNG CHỈ THỊ SSR ĐỂ PHÂN TÍCH TÍNH ĐA DẠNG DI
TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÓ KHẢ
NĂNG KHÁNG BỆNH GỈ SẮT KHÁC NHAU**

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học**

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **GS.TS. Chu Hoàng Mậu**

Thái Nguyên - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực, được sự đồng ý của cán bộ hướng dẫn và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Hoàng Thị Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS Chu Hoàng Mậu đã định hướng khoa học, tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình tôi tiến hành nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS Vũ Thanh Trà đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành các thí nghiệm. Tôi xin cảm ơn ThS Hoàng Phú Hiệp và các thầy, cô Bộ môn Di truyền và Sinh học hiện đại, trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình tiến hành các thí nghiệm nghiên cứu tại phòng thí nghiệm.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy cô và cán bộ khoa Khoa học sự sống, trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên đã tận tình dạy dỗ, chỉ bảo và truyền cho tôi niềm đam mê nghiên cứu khoa học.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã nhiệt tình động viên cho tôi thêm động lực hoàn thành tốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2014

Tác giả

Hoàng Thị Trang

MỤC LỤC

| | |
|--|------|
| LỜI CAM ĐOAN..... | i |
| LỜI CẢM ƠN..... | iii |
| MỤC LỤC..... | iv |
| DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT..... | vi |
| DANH MỤC CÁC BẢNG..... | viii |
| DANH MỤC CÁC HÌNH..... | ix |
| 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. NGUỒN GỐC, PHÂN LOẠI VÀ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG..... | 3 |
| 1.1.1. Cây đậu tương..... | 3 |
| 1.1.2. Đặc điểm hóa sinh của cây đậu tương..... | 8 |
| 1.2. BỆNH GỈ SẮT VÀ TÍNH KHÁNG BỆNH GỈ SẮT Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG..... | 9 |
| 1.2.1. Bệnh gỉ sắt ở cây đậu tương..... | 9 |
| 1.2.2. Tính chống chịu bệnh gỉ sắt của cây đậu tương..... | 11 |
| 1.2.3. Tình hình nghiên cứu bệnh gỉ sắt và tính kháng bệnh gỉ sắt ở cây đậu tương..... | 12 |
| 1.3. MỘT SỐ CHỈ THỊ SỬ DỤNG TRONG PHÂN TÍCH ĐA DẠNG DI TRUYỀN Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG..... | 15 |
| 1.3.1. Chỉ thị hình thái..... | 15 |
| 1.3.2. Chỉ thị hóa sinh..... | 16 |

| | |
|---|----|
| 1.3.3. Chỉ thị phân tử..... | 17 |
| 1.3.4. Bản đồ QTL..... | 21 |
| Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 23 |
| 2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU..... | 23 |
| 2.1.1. Vật liệu..... | 23 |
| 2.1.2. Hóa chất..... | 24 |
| 2.1.3. Thiết bị và địa điểm nghiên cứu..... | 25 |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 25 |
| 2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu và tách chiết DNA tổng số | 25 |
| 2.2.2. Tuyển chọn và tổng hợp các cặp mồi SSR cho phân tích mẫu..... | 26 |
| 2.2.3. Phản ứng PCR-SSR..... | 27 |
| 2.2.4. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose..... | 28 |
| 2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý dữ liệu PCR-SSR..... | 28 |
| Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 29 |
| 3.1. NHÂN BẢN CÁC PHÂN ĐOẠN DNA BẰNG PHẢN ỨNG PCR-SSR..... | 29 |
| 3.1.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ mầm đậu tương | 29 |
| 3.1.2. Kết quả nhân bản các phân đoạn DNA bằng phản ứng PCR- SSR | 30 |
| 3.2. PHÂN TÍCH TÍNH ĐA DẠNG TRUYỀN CỦA CÁC GIỐNG ĐẬU TƯƠNG KHÁNG BỆNH GỈ SẮT KHÁC NHAU | 36 |
| 3.3. THẢO LUẬN CHUNG | 40 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ | 44 |
| 1. Kết luận..... | 44 |
| 2. Đề nghị..... | 44 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 45 |

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|-------|---|
| 2-DE | Two dimensional electrophoresis - điện di hai chiều |
| ABC | ATP - binding cassette |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism - Đa dạng chiều dài các phân đoạn được nhân bản |
| ASM | Acibenzolar-S-methyl benzo-(1,2,3)- thiadiazole-7-carboxylic acid S-methyl ester |
| AVRDC | Asian Vegetable Research Development Center - Trung tâm phát triển rau màu Châu Á, Đài Loan |
| AUDPC | Area Under Disease Progress Curve |
| Bp | Base pair |
| cs | Cộng sự |
| CTAB | Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| ĐVT | Đơn vị tính |
| EDTA | Ethylene Diamin Tetraaxetic Acid |
| EtBr | Ethidium bromide |
| FAO | Food and Agriculture Organisation – Tổ chức Nông Lương thế giới |
| ISSR | Inter - Simple Sequence Repeat |
| kb | Kilo base |
| MAS | Marker Assisted Selection – Chỉ thị phân tử |
| PCR | Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi trùng hợp polymerase |
| QTL | Quantitative Trait Loci - Bản đồ các locus kiểm soát tính trạng số lượng |
| RAPD | Random Amplified Polymorphism DNA - DNA đa hình được nhân bản ngẫu nhiên |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism - đa hình về chiều dài phân đoạn cắt hạn chế |

| | |
|-------|--|
| SDS | Sodium Dodecyl Sulphat |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SSR | Simple Sequence Repeats -trình tự lặp lại đơn giản |
| STSs | Sequence Tagged Site |
| TAE | Tris – Acetate – EDTA |
| Tris | Trioxymetylaminometan |
| XK | Xuất khẩu |
| USDA | United State Department of Agriculture - Bộ nông nghiệp Hoa Kỳ |
| UPGMA | Phương pháp phân nhóm |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 1.1. Diện tích thu hoạch đậu tương một số nước trên thế giới..... | 4 |
| Bảng 1.2. Sản lượng sản xuất đậu tương ở một số quốc gia trên thế giới..... | 5 |
| Bảng 1.3. Năng suất đậu tương một số nước trên thế giới..... | 6 |
| Bảng 1.4. Diện tích, năng suất, tổng sản lượng của đậu tương của nước ta trong năm 2011, 2012, 2013 và dự báo trong các năm tiếp theo 2014 -2015 | 7 |
| Bảng 2.1. Ký hiệu, xuất xứ và đặc điểm của các giống đậu tương nghiên cứu | 23 |
| Bảng 2.2. Trình tự các cặp mồi SSR sử dụng trong nghiên cứu..... | 27 |
| Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR-SSR..... | 28 |
| Bảng 3.1. Số phân đoạn DNA được nhân bản bằng phản ứng PCR-SRR từ 5 cặp mồi SSR..... | 35 |
| Bảng 3.2. Tỷ lệ phân đoạn đa hình khi sử dụng 5 cặp mồi SSR..... | 36 |
| Bảng 3.3. Hệ số khác nhau giữa các giống đậu tương dựa trên các dữ liệu phân tích SSR (%) | 37 |

DANH MỤC CÁC HÌNH

| | |
|--|----|
| Hình 1.1. Diện tích trồng và sản lượng cây đậu tương tại Việt Nam (2011-2015)..... | 8 |
| Hình 1.2. Lá cây đậu tương nhiễm bệnh gỉ sắt..... | 11 |
| Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra DNA tổng số tách từ mầm đậu tương của 12 giống đậu tương nghiên cứu..... | 29 |
| Hình 3.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi Satt009-F/Satt009-R | 30 |
| Hình 3.3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi Sat_640 –F /Sat_640-R..... | 31 |
| Hình 3.4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi Sct_187-F /Sct187-R..... | 32 |
| Hình 3.5. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi Satt431-F/Satt431-R | 33 |
| Hình 3.6. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi Satt460-F /Satt460-R | 34 |
| Hình 3.7. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền của 12 giống đậu tương có phản ứng khác nhau với bệnh gỉ sắt dựa trên dữ liệu phân tích SSR..... | 38 |

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây công nghiệp ngắn ngày, có giá trị kinh tế cao, mang ý nghĩa trong cải tạo đất trồng, dễ canh tác, đặc biệt có khả năng thích nghi với nhiều vùng sinh thái khác nhau. Hạt đậu tương chứa 30-55% protein, chứa nhiều loại amino acid không thay thế, 12-25% lipid và các vitamin cần thiết cho cơ thể. Các sản phẩm từ đậu tương được sử dụng rộng rãi cho các mục đích khác nhau như làm thức ăn, dầu ăn, thực phẩm chức năng, nguyên liệu cho y học và công nghiệp... Bên cạnh giá trị dinh dưỡng cao, cây đậu tương còn có khả năng cố định đạm nhờ vi khuẩn *R. japonicum* sống cộng sinh trên rễ cây tạo thành các nốt sần, giúp cải tạo đất hiệu quả. Do đó, cây đậu tương đã được quan tâm trồng và phát triển mạnh ở nhiều quốc gia trên thế giới. Ở Việt Nam, đậu tương là nhóm cây trồng chính được ưu tiên khuyến khích phát triển, sản xuất đứng sau lúa, ngô và lạc.

Việt Nam từng là một nước xuất khẩu đậu tương vào những năm 1980, tuy nhiên cho đến nay nước ta đã trở thành nước nhập khẩu đậu tương với số lượng lớn với hàng triệu tấn khô dầu đậu tương đang được nhập khẩu hàng năm. Mặc dù diện tích gieo trồng có tăng hàng năm nhưng năng suất thấp và sản lượng đạt được không ổn định, khả năng chống chịu bệnh và các stress kém. Sâu bệnh nói chung và bệnh gỉ sắt nói riêng là nguyên nhân trực tiếp ảnh hưởng tới diện tích gieo trồng và làm giảm năng suất, chất lượng hạt đậu tương, gây tổn thất lớn về kinh tế.

Bệnh gỉ sắt ở đậu tương do loài nấm *Phakopsora pachyrhizi* gây ra và đang được coi là một trong những mối đe dọa chính trên cây đậu tương gây thiệt hại đáng kể, làm giảm từ 10-80% năng suất và chất lượng đậu tương ở nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam.