

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NÔNG LỆ THÙY

**NGHIÊN CỨU THU THẬP VÀ LƯU TRỮ
NGUỒN GEN CÂY THẮT DIỆP NHẤT CHI HOA
(*PARIS POLYPHYLLA SM.*)**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 60.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. VŨ THỊ THU THỦY

THÁI NGUYÊN - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được sử dụng để bảo vệ cho bất kỳ một học vị nào.

Tác giả

NÔNG LỆ THÙY

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Vũ Thị Thu Thủy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ để tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn GS.TS Chu Hoàng Mậu, Ban lãnh đạo Trường Đại học sư phạm Thái Nguyên, Ban chủ nhiệm khoa Sinh học và các thầy cô giáo, cán bộ của Khoa, sự giúp đỡ tận tình của TS. Nguyễn Thị Thu Nga, KTV Trần Thị Hồng đã giúp tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài NCKH cấp Bộ có mã số B2015-15-11-GEN do Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên chủ trì.

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

Tác giả

NÔNG LỆ THÙY

MỤC LỤC

Trang

Trang bìa phụ	
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục các bảng	v
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. Đặc điểm chung về cây Thất diệp nhất chi hoa	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại	3
1.1.2. Đặc điểm nông sinh học	4
1.1.3. Thành phần hóa học và công dụng	5
1.1.4. Một số bài thuốc sử dụng cây Thất diệp nhất chi hoa	7
1.2. Một số phương pháp định danh thực vật	8
1.3. Một số phương pháp lưu trữ và bảo tồn giống cây trồng	10
1.3.1 Bảo tồn nội vi(in – situ)	11
1.3.2 Bảo tồn ngoại vi (Ex – situ)	12
1.3.3 Bảo tồn giống bằng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i>	13
1.3.3.1 Cơ sở lý luận của phương pháp bảo quản và nhân giống <i>in vitro</i>	13
1.3.3.2. Ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i>	15
1.3.3.3. Các đường hướng trong nhân giống <i>in vitro</i>	18
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. Vật liệu nghiên cứu	22
2.1.1. Vật liệu	22

2.1.2. Hóa chất, thiết bị.....	22
2.2. Phương pháp nghiên cứu	23
2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu	23
Thu thập mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa trong tự nhiên, mô tả và chụp ảnh.....	23
2.2.2. Phương pháp bảo tồn cây Thất diệp nhất chi hoa tại Thái Nguyên	23
2.2.3. Phương pháp phân lập gen <i>rpoC1</i>	23
2.2.4. Phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	24
2.2.5. Phương pháp xử lí số liệu	26
2.3. Địa điểm tiến hành thí nghiệm	26
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1. Kết quả thu thập mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa tại một số tỉnh miền núi phía Bắc của Việt Nam.....	27
3.1.1. Đặc điểm mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa thu thập tại huyện Bình Gia-Lạng Sơn	27
3.1.2. Đặc điểm mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa thu thập tại huyện Quản Bạ-Hà Giang.....	29
3.1.3. Đặc điểm mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa thu thập tại huyện Sa Pa- Lào Cai	30
3.2. Kết quả phân tích gen <i>rpoC1</i> của cây Thất diệp nhất chi hoa.....	32
3.3. Kết quả nghiên cứu bảo tồn cây Thất diệp nhất chi hoa trồng tại tỉnh Thái Nguyên	34
3.4. Kết quả bảo tồn cây Thất diệp nhất chi hoa <i>in vitro</i>	37
3.4.1. Kết quả khử trùng mẫu	37
3.4.2. Kết quả thăm dò môi trường nảy mầm và phát sinh hình thái của các mẫu nghiên cứu.....	42
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	47

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

2,4D	2,4 Dichlorphenoxyacetic acid
Cs	Cộng sự
CT	Công thức
ĐHST	Điều hòa sinh trưởng
IBA	Indole-3-butyric acid
BAP	6-Benzylaminopurine
IAA	Indole . 3 . acetic . acid
MS	Murashige and Skoog
NAA	1-Naphthalene acetic acid
GA3	Gibberellic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Mẫu cây thu được tại huyện Bình Gia - Lạng Sơn	27
Bảng 3.2. Số lượng mẫu Thất diệp nhất chi hoa thu tại Hà Giang.....	29
Bảng 3.3. Số lượng mẫu Thất diệp nhất chi hoa thu tại Sa Pa	31
Bảng 3.4. Tên loài và mã số trình tự gen <i>rpoC1</i>	33
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của giá thể tới tỉ lệ sống của cây Thất diệp nhất chi hoa.....	35
Bảng 3.6. Đặc điểm sinh trưởng của cây Thất diệp nhất chi hoa trong phòng sinh trưởng tại Thái Nguyên.....	36
Bảng 3.7. Kết quả khử trùng hạt cây Thất diệp nhất chi hoa	38
Bảng 3.8. Kết quả khử trùng lá cây Thất diệp nhất chi hoa	40
Bảng 3.9. Kết quả khử trùng củ Thất diệp nhất chi hoa.....	41
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của các chất ĐHST đến hệ số nảy mầm của củ	44

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình thái cây Bảy lá một hoa.....	3
Hình 3.1. Cây Thất diệp nhất chi hoa tại Hồng Phong - Bình Gia - Lạng Sơn.....	28
Hình 3.2. Mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa tại xã Hội Hoan, huyện Bình Gia ..	28
Hình 3.3. Mẫu củ thu được tại Quán Bạ - Hà Giang	29
Hình 3.4. Quả và hạt cây Thất diệp nhất chi hoa thu tại Hà Giang.....	30
Hình 3.5. Cây Thất diệp nhất chi hoa tại Sa Pa.....	31
Hình 3.6. Cây Thất diệp nhất chi hoa trong phòng sinh trưởng của cây <i>in vitro</i> tại Thái Nguyên	37
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm nhân gen <i>rpoC1</i>	32
Hình 3.8. Trình tự gen <i>rpoC1</i> phân lập từ mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa thu tại Lạng Sơn, Việt Nam.....	34
Hình 3.9. Mẫu hạt sạch cây Thất diệp nhất chi hoa cấy trên môi trường MS cơ bản..	39
Hình 3.10. Mẫu sạch khử trùng củ Thất diệp nhất chi hoa	42
Hình 3.11. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến sự phát sinh hình thái mô lá.....	43
Hình 3.12. Mẫu sạch từ củ cây Thất diệp nhất chi hoa trên môi trường MS có bổ sung thêm các chất kích thích sinh trưởng	44
Hình 3.13. Mẫu củ bật chồi có bổ sung BAP 0,5mg/l + Than hoạt tính.....	45
Hình 3.14. Mẫu củ bật chồi bổ sung BAP 0.5mg/l	45

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Thất diệp nhất chi hoa có tên khoa học là *Paris polyphylla* Sm., hay còn gọi là cây Bảy lá một hoa, độc cước liên, thiết đặng đài, chi hoa đầu, tảo hưu, thảo hà xà...[9]. Chi *Paris* gồm 27 loài phân bố rộng khắp ở Châu Âu và Châu Á trong đó tập trung nhiều nhất ở Trung Quốc. Chi *Paris* gồm các loài từ 03lá đến 11 lá. Loài *Paris Polyphylla* có 13 giống [52].

Tại Việt Nam, cây Thất diệp nhất chi hoa được phát hiện tại các vùng núi Cúc Phương (Ninh Bình), Sapa (Lào Cai), Đà Bắc (Hòa Bình), Hà Giang, Lạng Sơn, Lai Châu... Cây Thất diệp nhất chi hoa được Pectelot phát hiện đầu tiên vào năm 1934 tại Sapa với nhiều loài khác nhau [9]. Theo y học cổ truyền, cây Thất diệp nhất chi hoa có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, trị rắn cắn, trị viêm tuyến vú, trị sốt rét, trị ho lâu ngày [9]. Trong những năm gần đây, cây Thất diệp nhất chi hoa còn được phát hiện có tác dụng diệt khuẩn, kháng viêm mạnh, ức chế các virus, tăng cường chức năng của tuyến thượng thận, an thần, trấn tĩnh, chống ho. Đặc biệt, cây có tác dụng ức chế tế bào ung thư phổi và ung thư dạ dày, kéo dài tuổi thọ cho người bệnh [11], [42], [43], [46].

Với nhiều tác dụng chống lại bệnh nên cây Thất diệp nhất chi hoa đang là đối tượng được thu mua và khai thác với số lượng lớn. Bên cạnh đó, nạn phá rừng làm nương rẫy dẫn đến giảm khả năng tái sinh và phân bố của cây Thất diệp nhất chi hoa trong tự nhiên bị thu hẹp.

Theo phân hạng về độ góc bảo tồn, cây Thất diệp nhất chi hoa được xếp hạng EN A1 c,d, và cấp đánh giá ở mức hiếm (R). Cây cũng được khuyến cáo khai thác, sử dụng hợp lí và cần thiết phải lưu giữ và bảo vệ nguồn gen [6].

Việc lưu giữ và bảo tồn giống cây trồng có thể được thực hiện bằng nhiều cách khác nhau như: bảo tồn tại chỗ, bảo tồn chuyên chỗ và bảo tồn *in vitro*. Công tác tái sinh và nhân giống vô tính cây Thất diệp nhất chi hoa đã được thực

hiện tại một số tỉnh miền núi phía bắc Việt Nam như: Hà Giang, Sơn La, Lai Châu. Tuy nhiên, kết quả tái sinh cây chưa được như mong muốn.

Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu thu thập và lưu trữ nguồn gen của cây Thất diệp nhất chi hoa (*Paris polyphylla Sm.*)** nhằm bảo tồn nguồn gen và phục vụ cho công tác phục tráng giống sau này.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Thu thập được một số cây Thất diệp nhất chi hoa ở một số miền núi phía Bắc Việt Nam

Bước đầu sử dụng được kỹ thuật sinh học phân tử trong nghiên cứu định loại mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa .

Lưu trữ được một số mẫu cây Thất diệp nhất chi hoa trong phòng sinh trưởng và nuôi cấy *in vitro*.

3. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm và thu thập mẫu của Thất diệp nhất chi hoa ở một số địa phương miền núi phía Bắc Việt Nam.

Phân lập và xác định trình tự nucleotit của gen *rpoC1*

Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh lý, sinh trưởng của cây Thất diệp nhất chi hoa trong phòng sinh trưởng cây *in vitro* của phòng công nghệ tế bào tại trường Đại học sư phạm Thái Nguyên.

Nghiên cứu bảo tồn cây Thất diệp nhất chi hoa bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.