

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



LÊ THỊ MAI HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC PROMOTER::*GEN - GmNAC*
(*35S::*GmNAC004**) THÔNG QUA VECTOR *pZY101-Asc* VÀ CHỦNG VI
KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS EHA101* VÀO GIỐNG
ĐẬU TƯƠNG ĐT22 VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2018

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

LÊ THỊ MAI HƯƠNG

NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC PROMOTER::*GEN - GmNAC*
(*35S::GmNAC004*) THÔNG QUA VECTOR *pZY101-Asc* VÀ CHỦNG VI
KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EHA101 VÀO GIỐNG
ĐẬU TƯƠNG ĐT22 VIỆT NAM

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số : 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS. TS. NGUYỄN VĂN ĐỒNG

Hà Nội - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận văn là trung thực, khách quan và chưa từng dùng để bảo vệ một học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận văn đã được cảm ơn, các thông tin trích dẫn trong luận văn này đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày... tháng... năm 2018

Tác giả luận văn

Lê Thị Mai Hương

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành bản luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Văn Đồng đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới các thầy cô giáo phòng Sau Đại học, thầy cô giáo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã giúp đỡ nhiệt tình và tạo mọi điều kiện thuận lợi trong thời gian học tập cũng như khi hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể cán bộ Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ tế bào Thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp về sự giúp đỡ nhiệt tình trong suốt thời gian tôi thực hiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ Chương trình Khoa học và Công nghệ độc lập cấp nhà nước trong đề tài mã số 03/2012/HĐ-ĐTĐL.

Cuối cùng tôi xin gửi tới bố mẹ, anh chị cùng bạn bè lời cảm ơn thân thương nhất - những người đã luôn quan tâm, ủng hộ và là chỗ dựa cho tôi trong suốt thời gian tôi làm khóa luận này, cũng như trong cuộc sống.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày ... tháng ... năm 2018

Học viên

Lê Thị Mai Hương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC BẢNG.....	vi
DANH MỤC HÌNH.....	vii
CHƯƠNG 1: MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích và yêu cầu của đề tài.....	3
1.3. Ý nghĩa khoa học, thực tiễn và tính mới của đề tài.....	3
CHƯƠNG 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
2.1. Tình hình sản xuất đậu tương trong và ngoài nước.....	4
2.1.1. Giới thiệu chung về cây đậu tương.....	4
2.1.2. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới.....	7
2.1.3. Tình hình sản xuất đậu tương ở Việt Nam.....	9
2.1.4. Tình hình phát triển và ứng dụng cây đậu tương chuyển gen trên thế giới và tại Việt Nam.....	10
2.2. Nghiên cứu chuyển gen vào đậu tương.....	15
2.2.1. Chuyển gen vào đậu tương thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	15
2.2.2. Đặc tính chịu hạn và một số gen liên quan đến khả năng chịu hạn ở cây đậu tương.....	19
CHƯƠNG 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	27
3.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	27
3.2. Nội dung nghiên cứu.....	27
3.3. Vật liệu nghiên cứu.....	27
3.4. Phương pháp nghiên cứu.....	30
3.4.1. Phương pháp biến nạp.....	30
3.4.2. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây ở thế hệ T ₀	32
3.4.3. Chọn lọc dòng chuyển gen đồng hợp tử bằng phun Basta.....	35
3.4.4. Phương pháp thu thập và phân tích số liệu thống kê.....	36

CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	37
4.1. Kết quả biến nạp cấu trúc 35S:: <i>GmNAC004</i> vào giống đậu tương ĐT22.....	37
4.2. Kết quả chọn lọc cây chuyển gen bằng phun Basta.....	40
4.3. Kết quả phân tích PCR cây chuyển gen thế hệ T0.....	42
4.3.1. Phân tích PCR kiểm tra sự có mặt của gen <i>bar</i>	42
4.3.2. Phân tích PCR kiểm tra sự có mặt của cấu trúc 35S:: <i>GmNAC004</i>	43
4.4. Kết quả chọn lọc dòng chuyển gen đồng hợp tử.....	45
 CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	 51
5.1. Kết luận.....	51
5.2. Đề nghị.....	51
 DANH MỤC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	 52
 TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	 53
 PHỤ LỤC.....	 60

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	Dichlorophenoxyacetic acid
ADN	Acid deoxyribonucleic
ARN	Acid ribonucleic
AS	Acetosyringone
BDG	Biến đổi gen
CCM	Cocultivation medium - Môi trường đồng nuôi cấy
cDNA	Complementary DNA
CNSH	Công nghệ Sinh học
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
CS	Cộng sự
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DW	Dry weight - Trọng lượng khô
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetic Acid
GM	Germination medium - Môi trường nảy mầm hạt
IBA	Indol butyric acid
LB	Luria-Bertani
NBT	Nitrotetrazolium Blue chloride
OD ₆₀₀	Mật độ vi khuẩn đo ở bước sóng 600 nm bằng quang phổ kế
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT PCR	Real-time PCR
RM	Rooting medium - Môi trường ra rễ
RWC	Relative water content - Hàm lượng nước tương đối
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Shoot elongation medium - Môi trường kéo dài chồi
SIM	Shoot induction medium - Môi trường tạo đa chồi
SSC	Saline-sodium citrate
TL	Trọng lượng
TT	Thứ tự
TW	Turgid weight - Trọng lượng trương
v/ p	vòng/ phút
W	Weight - Trọng lượng
YEP	Yeast extract peptone - Môi trường nuôi khuẩn

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Các giai đoạn sinh trưởng phát triển của cây đậu tương.....	4
Bảng 2.2. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới	8
Bảng 2.3. Tình hình sản xuất đậu tương của 4 nước đứng đầu trên thế giới.....	8
Bảng 2.4. Tình hình sản xuất đậu tương ở Việt Nam	9
Bảng 2.5. Một số nghiên cứu về vai trò của các gen <i>GmNAC</i>	23
Bảng 3.1. Thông tin về vector <i>pZY101::35S::GmNAC004</i>	28
Bảng 3.2. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.....	35
Bảng 3.3. Thành phần phản ứng PCR.....	35
Bảng 4.1. Kết quả tạo đa chồi của các thí nghiệm chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vector <i>pZY101-Asc</i> và chủng khuẩn <i>A.tumefaciens</i> EHA101.....	38
Bảng 4.2. Kết quả chọn lọc mẫu biến nạp của các thí nghiệm chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vector <i>pZY101-Asc</i> và chủng khuẩn <i>A.tumefaciens</i> EHA101.....	39
Bảng 4.3. Kết quả chuyển cây đậu tương sau biến nạp ra bầu đất của các thí nghiệm chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vector <i>pZY101-Asc</i> và chủng khuẩn <i>A.tumefaciens</i> EHA101.....	40
Bảng 4.4. Kết quả phun basta các cây đậu tương chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i>	41
Bảng 4.5. Kết quả phân tích PCR các cây đậu tương chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> thế hệ T0.....	44
Bảng 4.6. Kết quả sàng lọc và đánh giá các dòng đậu tương sau chuyển gen bằng phun Basta đến thế hệ T3.....	45
Bảng 4.7. Kết quả phân tích sự phân ly ở thế hệ T1.....	46
Bảng 4.8. Kết quả phân tích sự phân ly ở thế hệ T2.....	46
Bảng 4.9. Kết quả phân tích sự phân ly ở thế hệ T3.....	47

DANH MỤC HÌNH

Hình 3.1. Hạt đậu tương giống ĐT22.....	28
Hình 3.2. Cấu trúc vector <i>pZY101::35S::GmNAC004</i>	30
Hình 4.1. Kết quả biến nạp cấu trúc <i>35S::GmNAC004</i> vào nốt lá mầm của giống đậu tương ĐT22 thông qua vector <i>pZY101-Asc</i> và chủng khuẩn <i>A.tumefaciens</i> EHA101	37
Hình 4.2. Kết quả mẫu tạo đa chồi trên môi trường SIM.....	38
Hình 4.3. Kết quả mẫu biến nạp kéo dài chồi trên môi trường SEM.....	39
Hình 4.4. Cây đậu tương chuyển gen thu được sau quá trình biến nạp sử dụng cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> và chủng khuẩn <i>A.tumefaciens</i> EHA101.....	40
Hình 4.5. Kết quả chọn lọc bằng thuốc diệt cỏ Basta cây đậu tương chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i>	41
Hình 4.6. Kết quả kiểm tra chất lượng ADN tổng số của các cây đậu tương chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i>	42
Hình 4.7. Phân tích PCR gen <i>bar</i> trên các cây đậu tương chuyển cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i>	43
Hình 4.8. Kết quả phân tích PCR cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> trên các cây đậu tương chuyển gen T0.....	44
Hình 4.9. Kết quả chọn lọc cây chuyển gen đồng hợp đến thế hệ T3.....	48
Hình 4.10. Các dòng đậu tương được chuyển gen <i>35S::GmNAC004</i> sống sót sau phun basta được chăm sóc đến khi ra hoa, kết quả.....	49
Hình 4.11. Phân tích PCR gen <i>bar</i> trên các cây đậu tương chuyển gen T1.....	49
Hình 4.12. Phân tích PCR cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> trên các cây đậu tương chuyển gen thế hệ T1.....	50
Hình 4.13. Phân tích PCR cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> trên các cây đậu tương chuyển gen thế hệ T2.....	50
Hình 4.14. Phân tích PCR cấu trúc gen <i>35S::GmNAC004</i> trên các cây đậu tương chuyển gen thế hệ T3.....	50

CHƯƠNG 1

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glicine max* (L.) Merr.) thuộc họ Đậu (*Fabacea*), bộ Fabales, là cây trồng lấy hạt và là cây cho dầu quan trọng bậc nhất trên thế giới, do khả năng thích ứng rộng nên cây đậu tương được trồng khắp các châu lục, nhưng tập trung nhiều nhất ở Châu Mỹ với sản lượng đậu tương thu được chiếm 85,4% tổng sản lượng đậu tương trên toàn thế giới, tiếp đến là Châu Á đạt 12,1% (FAOSTAT, 2016). Tại Việt Nam, đậu tương là cây thực phẩm có vai trò quan trọng nhưng năng suất cây trồng này còn thấp, chưa thể đáp ứng được nhu cầu tiêu dùng trong nước. Nguyên nhân gây ảnh hưởng lớn đến năng suất và sản lượng đậu tương của Việt Nam là do các bệnh dịch hại, sâu bệnh và chủ yếu là do hạn hán.

Trong bối cảnh khí hậu trái đất thay đổi dẫn đến diện tích khô hạn, nhiễm mặn ngày một tăng. Việc nghiên cứu các đáp ứng của cây lương thực, bao gồm cây đậu tương, trồng trong điều kiện môi trường thiếu nước, mặn, lạnh... ngày càng trở nên quan trọng (Petit và cộng sự, 1999; Manavalan và cộng sự, 2009; Tran và Mochida, 2010). Một trong những kỹ thuật luôn mang lại nhiều kỳ vọng đó là nghiên cứu, phát triển giống đậu tương biến đổi gen dựa trên việc phân lập các gen có lợi và thiết kế các véc tơ hiệu năng cao để chuyển các gen mục tiêu vào giống đậu tương xác định.

Các yếu tố phiên mã NAC (NAM, ATAF và CUC) đã được báo cáo là tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng đối với các điều kiện bất thuận như hạn, mặn và lạnh (Tran *et al.*, 2010). Theo nghiên cứu mới nhất của Reem M. Hussain và cộng sự (2017), đã xác định được 139 gen *GmNAC*, nghiên