

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

TẠ THỊ ĐÔNG

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *codA* MÃ HÓA ENZYME SINH TỔNG
HỢP GLYCINE BETAIN DƯỚI SỰ ĐIỀU KHIỂN CỦA PROMOTER
CẢM ỨNG KHÔ HẠN rd29A VÀO CÂY ĐẬU TƯƠNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC
(Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm)

Mã số: 60 42 01 14

Người hướng dẫn: PGS. TS. CHU HOÀNG HÀ

**Đơn vị: Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học
và Công nghệ Việt Nam**

Hà Nội, 10/2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Chu Hoàng Hà. Các nội dung nghiên cứu, kết quả trong đề tài này là trung thực và chưa từng được ai công bố dưới bất kỳ hình thức nào.

Luận văn sử dụng thông tin, số liệu và hình ảnh từ các bài báo và nguồn tài liệu của các tác giả khác đều được chú thích và trích dẫn đầy đủ.

Nếu có bất kỳ sự gian lận nào, tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về nội dung luận văn.

Hà Nội, tháng 10 năm 2017

Học viên

Tạ Thị Đông

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn tới PGS.TS Chu Hoàng Hà đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, làm việc và hoàn thành luận văn.

Xin chân thành cảm ơn TS. Phạm Bích Ngọc, Ths. Nguyễn Văn Đoài, cùng tập thể cán bộ, nghiên cứu sinh, học viên Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ, truyền đạt kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các thầy cô giáo và Ban đào tạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã hướng dẫn, truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn đến bạn bè và gia đình đã giúp đỡ và chia sẻ, động viên trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện luận văn.

Hà Nội, tháng 10 năm 2017

Học viên

Tạ Thị Đông

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU.....	vi
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH	viii
MỞ ĐẦU	1
NỘI DUNG.....	2
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	2
1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG (<i>GLYCINE MAX</i>) GIÁ TRỊ KINH TẾ VÀ GIÁ TRỊ SỬ DỤNG.....	2
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại	2
1.1.2. Đặc điểm sinh học	3
1.1.3. Giá trị kinh tế và giá trị sử dụng của cây đậu tương.....	4
1.1.4. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và ở Việt Nam	5
1.2. HẠN VÀ TÁC ĐỘNG CỦA HẠN ĐẾN CÂY ĐẬU TƯƠNG	7
1.2.1. Tác động của hạn đến hệ rễ	8
1.2.2. Tác động của hạn đến khả năng cố định đạm.....	8
1.2.3. Tác động của hạn đến hình thái lá.....	10
1.3. GLYCINE BETAINE (GB) VÀ CON ĐƯỜNG SINH TỔNG HỢP GB	10
1.3.1. Cơ chế chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường ở thực vật	10
1.3.2. Các con đường sinh tổng hợp GB	12
1.3.3. Cây trồng chuyển gen sinh tổng hợp GB tăng cường khả năng chống chịu điều kiện môi trường bất lợi	14
1.4. PROMOTER VÀ PROMOTER CẢM ỨNG KHÔ HẠN RD29A	20
1.4.1. Cấu trúc và chức năng của promoter	20
1.4.2. Promoter cảm ứng khô hạn RD29A	20
1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TẠO CÂY ĐẬU TƯƠNG BIẾN ĐỔI GEN	21
CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....	28

2.1.1. Vật liệu thực vật.....	28
2.1.2. Chủng vi khuẩn và vector.....	28
2.1.3. Hóa chất thiết bị.....	29
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	29
2.2.1. Các phương pháp thiết kế vector chuyển gen pIBTII- rd29A-codA.....	29
2.2.2. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua <i>Agrobacterium</i>	34
2.2.3. Phương pháp đánh giá cây thuốc lá chuyển gen <i>codA</i>	34
2.2.4. Phương pháp tạo cây đậu tương chuyển gen.....	34
2.2.5. Phương pháp phân tích cây đậu tương chuyển gen bằng phản ứng PCR.....	36
2.2.6. Phương pháp phân tích cây đậu tương chuyển gen bằng Phosphinothricin.....	36
2.2.7. Xây dựng đường chuẩn xử lý hạn ở giống đậu tương ĐT22.....	37
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	38
3.1. KẾT QUẢ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN <i>CODA</i> DƯỚI SỰ ĐIỀU KHIỂN CỦA PROMOTER CẢM ỨNG KHÔ HẠN RD29A.....	38
3.1.1. PCR nhân promoter <i>rd29A</i> từ cây <i>Arabidopsis</i> với môi <i>RD29A-HindIII-F</i> và <i>RD29A-XbaI-R</i>	38
3.1.2. Tách dòng <i>rd29A</i> bằng vector pBT, cắt pBT- <i>rd29A</i> và pIBTII-35S- <i>codA</i> với <i>HindIII</i> và <i>XbaI</i>	38
3.1.3. Nối <i>rd29A</i> với pIBTII- <i>codA</i> , biến nạp vào <i>E.coli</i> , chọn dòng bằng phản ứng cloni PCR với môi <i>RD29A-HindIII-F</i> và <i>RD29A-XbaI-R</i>	39
3.1.4. Biến nạp pIBTII- <i>rd29A-codA</i> vào <i>Agrobacterium</i> chọn dòng bằng phản ứng colony PCR với môi <i>RD29A-HindIII-F</i> và <i>RD29A-XbaI-R</i>	40
3.2. KẾT QUẢ CHUYỂN GEN <i>CODA</i> VÀO THUỐC LÁ THÔNG QUA VI KHUẨN <i>AGROBACTERIUM</i>	41
3.2.1. Kết quả chuyển cấu trúc pIBTII- <i>rd29A-codA</i> vào giống thuốc lá K326.....	41
3.2.2. Kết quả đánh giá và phân tích các dòng thuốc lá chuyển gen.....	42
3.2.3. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu của các dòng thuốc lá chuyển gen.....	43
3.3. KẾT QUẢ CHUYỂN GEN <i>CODA</i> VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22.....	44
3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn <i>A. Tumefaciens</i> sử dụng cho biến nạp đến khả năng cảm ứng tạo chồi.....	44
3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ ppt (Phosphinothricin) đến hiệu quả chuyển gen.....	45

3.3.3. Kết quả chuyển cấu trúc pIBTII-rd29A- <i>codA</i> vào đậu tương.....	46
3.4. PHÂN TÍCH VÀ ĐÁNH GIÁ CÁC DÒNG ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN..	49
3.4.1. Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T0, T1 chuyển cấu trúc rd29A - <i>codA</i> bằng phản ứng PCR.....	49
3.4.2. Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T0 và T1 chuyển cấu trúc rd29A- <i>codA</i> bằng ppt	50
3.4.3. Kết quả xây dựng đường xử lý hạn ở giống đậu tương DT22	52
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	57
TÀI LIỆU THAM KHẢO	58
PHỤ LỤC	68

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU

AS	Acetosyrigone
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-benzyladenine purin
GB	Glycine Betain
bp	Base pair
CCM	Cocultivation medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GA3	Gibberellic acid
GM	Germination medium - Môi trường nảy mầm
IAA	Indoleacetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
NAA	α -Naphthaleneacetic acid
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPT	Phosphinothricin
RM	Rooting medium - Môi trường ra rễ
SIM	Shoot induction medium - Môi trường tạo chồi
SEM	Shoot elongation medium - Môi trường kéo dài chồi
T-DNA	Vùng DNA plasmid chuyển vào thực vật
T0, T1	Các thế hệ cây đậu tương chuyển gen
YEP	Yeast extract peptone

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Sản lượng đậu tương Việt Nam (2011-2015).....	6
Bảng 1.2. Một số loài cây trồng chuyển gen mã hóa enzyme tham gia sinh tổng hợp GB, tăng khả năng chống chịu với điều kiện môi trường bất lợi.	18
Bảng 1.3 Tổng hợp nghiên cứu chuyển gen vào nốt lá mầm đậu tương trên thế giới..	23
Bảng 1.4 Tổng hợp nghiên cứu chuyển gen vào nốt lá mầm đậu tương ở Việt Nam..	26
Bảng 2.1 Các cặp môi dung cho phản ứng PCR đậu tương.....	28
Bảng 2.2 Thành phần phản ứng PCR.....	29
Bảng 2.3 Thành phần phản ứng PCR nhân promoter rd29A.....	30
Bảng 2.4 Thành phần phản ứng ghép nối promoter rd29A với vector tách dòng <i>pBT</i> ..	30
Bảng 2.5 Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme <i>HindIII</i> và <i>XbaI</i>	31
Bảng 2.6 Thành phần phản ứng nối với nhờ enzyme T4 ligase	31
Bảng 2.7 Thành phần phản ứng phản ứng colony PCR.....	32
Bảng 2.8 Thành phần dung dịch đệm tách chiết.....	33
Bảng 2.9 Chu trình nhiệt của PCR.....	33
Bảng 3.1. Tỷ lệ sống sót của các mảnh thuốc lá biến nạp qua các giai đoạn chọn lọc	41
Bảng 3.2 Kết quả gây hạn nhân tạo các dòng thuốc lá chuyển gen.....	43
Bảng 3.3 Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi.....	45
Bảng 3.4 Ảnh hưởng của nồng độ ppt đến khả năng tạo chồi	46
Bảng 3.5. Kết quả biến nạp vector chuyển gen vào mảnh lá mầm đậu tương.....	47
Bảng 3.6 Kết quả kiểm tra các dòng T1 bằng Phosphinothricin 250mg/l.....	52
Bảng 3.7 Sự phát triển của thân và rễ các cây đậu tương ĐT22 thí nghiệm	54

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Diện tích trồng và sản lượng cây đậu tương tại Việt Nam (2011-2015)	6
Hình 1.2 Sinh tổng hợp GB ở thực vật bậc cao	13
Hình 1.3 Sinh tổng hợp GB ở <i>A. globiformis</i>	13
Hình 2.1 Sơ đồ khái quát thí nghiệm tái sinh cây đậu tương qua đa chồi từ nách lá mầm hạt chín	35
Hình 3.1 Kết quả PCR nhân promoter rd29A từ cây <i>Arabidopsis</i>	38
Hình 3.2 Kết quả điện di sản phẩm PCR được xử lý bởi <i>HindIII</i> / <i>XbaI</i>	39
Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm colony – PCR	40
Hình 3.4 Kết quả điện di sản phẩm colony – PCR với cặp môi đặc hiệu.....	41
Hình 3.5 Các giai đoạn của quá trình chuyển gen ở thuốc lá.	42
Hình 3.6 Kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng thuốc lá.....	42
Hình 3.7 Kết quả gây hạn nhân tạo các dòng thuốc lá chuyển gen	44
Hình 3.8 Các mảnh lá mầm trên môi trường chọn lọc với nồng độ ppt khác nhau.....	46
Hình 3.9 Các giai đoạn của quá trình chuyển gen ở đậu tương.....	48
Hình 3.10 Kết quả kiểm tra cây T0 bằng PCR	49
Hình 3.11 Kết quả kiểm tra cây T1 bằng PCR	50
Hình 3.12 Kết quả kiểm tra các dòng Đậu Tương T0 bằng Phosphinothricin	50
Hình 3.13 Kết quả kiểm tra các dòng đậu tương T1 bằng Phosphinothricin	51
Hình 3.14 Sinh trưởng của giống DT22 sau 3,6,9,12 thí nghiệm.....	53
Hình 3.15 Sự phát triển thân và rễ ở giống DT22	54
Hình 3.16 Các cây được phục hồi sau 3, 6, 9,10, 11 ngày gây hạn nhân tạo	55

MỞ ĐẦU

Đậu tương là cây trồng quan trọng cho nền nông nghiệp thế giới, là một loại cây trồng được sử dụng làm nguồn thức ăn cho con người và vật nuôi, cũng như trong công nghiệp... Hạt đậu tương có chứa hàm lượng protein và dầu cao, ngoài ra, còn có các chất khác như carbohydrate, vitamin và các khoáng chất. Do vậy, đậu tương trở thành đối tượng cho các nghiên cứu về nâng cao các tính trạng số lượng, chất lượng và khả năng chống chịu. Hiện nay, chuyển gen đang là một trong những phương pháp ứng dụng trong nghiên cứu chọn giống cây trồng nói chung và đậu tương nói riêng.

Cây đậu tương là một trong những loại cây trồng quan trọng bậc nhất ở nhiều quốc gia với vị trí chỉ đứng sau lúa, ngô và lúa mì, có khả năng thích nghi rộng với các điều kiện khí hậu và sinh thái khác nhau nên đậu tương được trồng rộng rãi trên cả năm châu lục, tập trung nhiều nhất ở Châu Mỹ tiếp đến là Châu Á. Bình quân hàng năm trên thế giới có khoảng 91 triệu ha đậu tương được gieo trồng với năng suất bình quân khá cao 22-23 tấn/ha. Mỹ là nước có diện tích gieo trồng cũng như sản lượng đậu tương lớn nhất thế giới, tiếp theo là Brazil, Argentina, Trung Quốc. Trong năm 2014 sản lượng đậu tương của Brazil đạt 90.700.000 tấn. Ngày 11/4/17, IBGE- Viện Địa lý và Thống kê Brazil dự báo sản lượng đậu tương nước này trong năm nay sẽ đạt mức kỷ lục 110,9 triệu tấn tăng 15,9% so với năm 2016

Bước vào thời kỳ hiện tại, biến đổi khí hậu đang ảnh hưởng tới năng suất và chất lượng của cây trồng, các yếu tố bất lợi của môi trường đang là những thách thức lớn cho mục tiêu duy trì phát triển bền vững cho sản xuất lương thực cho con người, trong đó hạn mặn là hai trong số những yếu tố quan trọng kìm hãm sự phát triển sản xuất nông nghiệp. Những năm gần đây, thế giới cũng như Việt Nam thường xuyên phải gánh chịu những biến động lớn. Sự gia tăng của hạn hán, lũ lụt, xói mòn, thoái hóa đất gây ảnh hưởng đến cây trồng.

Đậu tương là cây trồng chịu hạn kém khi thiếu nước ở các thời kỳ khác nhau đều có ảnh hưởng xấu đến năng suất. Như vậy, việc chọn tạo được các giống đậu tương có khả năng chống chịu hạn là một nhu cầu cần thiết trong sản xuất và được xem như định hướng nghiên cứu phát triển cây đậu tương ở Việt Nam.