

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ MINH HỒNG

**ĐÁNH GIÁ HOẠT ĐỘNG CỦA MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN
ĐẾN TỔNG HỢP, TÍCH LŨY TINH BỘT VÀ THỬ
NGHIỆM CHUYỂN GEN SSIV VÀO CÂY SẮN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2018

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN THỊ MINH HỒNG

**ĐÁNH GIÁ HOẠT ĐỘNG CỦA MỘT SỐ GEN LIÊN QUAN
ĐẾN TỔNG HỢP, TÍCH LŨY TINH BỘT VÀ THỬ
NGHIỆM CHUYỂN GEN SSIV VÀO CÂY SẮN**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 9 42 01 21

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **1. PGS.TS. Phạm Bích Ngọc**
Viện Công nghệ sinh học
2. PGS.TS. Chu Hoàng Hà
Viện Công nghệ sinh học

HÀ NỘI - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của bản thân tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Phạm Bích Ngọc và PGS.TS. Chu Hoàng Hà.

Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả; phần còn lại chưa ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về các số liệu, nội dung đã trình bày trong luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm 2018

Tác giả

Nguyễn Thị Minh Hồng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Phạm Bích Ngọc và PGS.TS. Chu Hoàng Hà đã hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án. Bên cạnh đó, tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ nghiên cứu của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, phòng Công nghệ ADN ứng dụng của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Trung tâm tài nguyên thực vật, Trung tâm nghiên cứu thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc, Trại thực nghiệm sinh học Cổ Nhuế đã tạo điều kiện cho tôi được tiến hành đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về tài chính và điều kiện làm việc trong khuôn khổ đề tài: *“Khai thác và phân lập nguồn gen có sẵn của tập đoàn giống sắn Việt Nam nhằm phát triển các giống sắn có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen”* thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ; thời gian thực hiện từ 6/2012 đến 6/2015 do PGS.TS. Phạm Bích Ngọc làm chủ nhiệm.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, và Bộ phận phụ trách đào tạo đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi được học tập, nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Hồng Đức Thanh Hóa, Lãnh đạo khoa và cán bộ trong bộ môn Khoa học cây trồng, Bảo vệ thực vật, khoa Nông Lâm Ngư nghiệp, ĐH Hồng Đức đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi yên tâm công tác, học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quý báu đó!

Hà Nội, ngày tháng năm 2018

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Minh Hồng

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Cây sắn và một số yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng tinh bột ở sắn	4
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	4
1.1.2. Đặc điểm hình thái, sinh thái và di truyền	5
1.1.3. Giá trị của cây sắn	8
1.1.4. Tình hình sản xuất sắn trên thế giới và Việt Nam.....	9
1.1.5. Một số yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng tinh bột ở sắn.....	13
1.1.6. Một số hướng cải tạo giống sắn hiện nay	15
1.2. Quá trình hình thành và tích lũy tinh bột ở cây sắn	19
1.2.1. Cấu tạo và vai trò của tinh bột ở thực vật	19
1.2.2. Cơ chế sinh tổng hợp tinh bột và các gen liên quan	20
1.3. Ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống sắn biến đổi gen ..	27
1.3.1. Hệ thống nuôi cấy <i>in vitro</i> cây sắn.....	27
1.3.2. Một số phương pháp chuyển gen ở sắn.....	32
1.3.3. Một số nghiên cứu tạo cây sắn biến đổi gen	35
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	43
2.1. Vật liệu nghiên cứu	43
2.1.1. Vật liệu thực vật	43
2.1.2. Chủng vi khuẩn, vector	43
2.1.3. Hoá chất và thiết bị thí nghiệm	43
2.1.4. Môi trường nuôi cấy.....	44
2.1.5. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	45
2.2. Phương pháp nghiên cứu	45
2.2.1. Lựa chọn giống sắn và phân nhóm các giống sắn dựa vào các chỉ tiêu đánh giá	45
2.2.2. Các phương pháp sinh học phân tử.....	45
2.2.3. Phương pháp phân lập gen và promoter	51
2.2.4. Các phương pháp thiết kế vector chuyển gen	52
2.2.5. Kỹ thuật canh tác, chăm sóc các giống sắn phục vụ cho nghiên cứu	54

2.2.6. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật	54
2.2.7. Phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	55
2.2.8. Phương pháp phân tích sự có mặt của gen chuyển	56
2.2.9. Phương pháp phân tích sự biểu hiện của cây chuyển gen.....	57
2.2.10. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu.....	60
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	61
3.1. Lựa chọn giống sắn và phân tích sự biểu hiện của các gen liên quan đến trao đổi chất tinh bột	61
3.1.1. Lựa chọn các giống sắn sử dụng	61
3.1.2. Thu mẫu và xử lý mẫu sắn	62
3.1.3. Tách chiết ARN tổng số.....	63
3.1.4. Tổng hợp cDNA từ ARN tổng số của lá, củ sắn trong các giai đoạn phát triển khác nhau và đánh giá chất lượng cDNA	64
3.1.5. Thu thập thông tin, thiết kế các cặp mồi thích hợp để phân tích sự biểu hiện của một số gen liên quan tới sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột	65
3.1.6. Phân tích cơ sở dữ liệu về biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp đường và các tiền chất cho tổng hợp tinh bột trên lá và củ sắn.....	66
3.2. Phân lập gen SSIV liên quan đến khả năng tổng hợp tinh bột và thiết kế vector chuyển gen	75
3.2.1. Thiết kế cặp mồi đặc hiệu	75
3.2.2. Phân lập gen SSIV ở sắn.....	76
3.2.3. Thiết kế vector chuyển gen	82
3.3. Đánh giá hoạt động của các vector chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột trên cây thuốc lá.....	87
3.3.1. Chuyển gen SSIV vào cây thuốc lá và đánh giá hoạt động của gen chuyển	87
3.3.2. Đánh giá hoạt động các gen chuyển.....	91
3.3. Đánh giá hoạt động của các vector chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột trên cây thuốc lá	87
3.3.1. Chuyển gen SSIV vào cây thuốc lá và đánh giá hoạt động của gen chuyển	87
3.3.2. Đánh giá hoạt động các gen chuyển.....	92

3.4. Chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột vào cây sắn.....	99
3.4.1. Xây dựng hệ thống tái sinh <i>in vitro</i> cây sắn.....	99
3.4.2. Xây dựng và tối ưu quy trình chuyển gen vào cây sắn thông qua gen GUS.....	106
3.4.3. Tạo dòng sắn chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột.....	113
Chương 4. BÀN LUẬN KẾT QUẢ.....	118
4.1. Sự biểu hiện của các gen quan trọng liên quan đến trao đổi chất tinh bột.....	118
4.2. Chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột vào cây thuốc lá.....	122
4.3. Chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột vào cây sắn.....	124
4.3.1. Hệ thống tái sinh cây sắn	124
4.3.2. Chuyển gen SSIV vào sắn thông qua <i>A. tumefaciens</i>	126
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	130
TÓM TẮT TIẾNG ANH.....	131
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ.....	136
TÀI LIỆU THAM KHẢO	137

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1	Giá trị dinh dưỡng của sắn	9
Bảng 1.2	Diện tích, năng suất, sản lượng sắn của các vùng trên thế giới trong năm 2014 – 2015	10
Bảng 1.3	Diện tích, năng suất và sản lượng sắn của Việt Nam từ năm 2010 – 2014	12
Bảng 1.4	Một số công trình nghiên cứu tái sinh invitro ở cây sắn	29
Bảng 1.5	Tổng kết một số công trình công bố về chuyển gen vào cây sắn	36
Bảng 3.1	Đặc điểm của một số giống sắn sử dụng trong phân tích biểu hiện gen	62
Bảng 3.2	Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu RNA tổng số tách chiết từ lá và củ các giống sắn	63
Bảng 3.3	Cơ sở dữ liệu các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở sắn	66
Bảng 3.4	Trình tự các cặp môi để khuếch đại các gen quan tâm	75
Bảng 3.5	Trình tự các cặp môi nhân dòng gen liên quan đến sinh tổng hợp tinh bột và thiết kế vector chuyển gen	76
Bảng 3.6	Vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen SSIV ở giống KM140 so với gen tham chiếu	78
Bảng 3.7	Vị trí sai khác trong trình tự axit amin suy diễn của protein SSIV của gen phân lập	79
Bảng 3.8	Chuyển cấu trúc gen pK7WG2D-35S: SSIV:T35S và pBI121-C54: SSIV:NOST vào thuốc lá.....	90
Bảng 3.9	Hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá và trong rễ cây thuốc lá chuyển gen cấu trúc pK7WG2D-35S:SSIV:T35S ở các dòng chuyển gen	97
Bảng 3.10	Hàm lượng tinh bột tích lũy trong rễ cây thuốc lá chuyển gen pBI121 – C54: SSIV: NOST ở các dòng chuyển gen	98
Bảng 3.11	Ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu và môi trường đến khả năng tạo mô sẹo (sau 3 tuần)	100
Bảng 3.12	Tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi trên môi trường CI	102
Bảng 3.13	Tỷ lệ phôi soma tạo cây con	104
Bảng 3.14	Khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh từ mô sẹo phôi hóa	105

Bảng 3.15	Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến hiệu quả chuyển gen giống sắn KM140	108
Bảng 3.16	Ảnh hưởng của Kanamycin đến khả năng sống sót của mô sẹo chuyển gen GUS ở giống sắn HB80 và KM140	109
Bảng 3.17	Ảnh hưởng của Kanamycin đến tỷ lệ ra rễ của chồi giống sắn HB80 và KM140	110
Bảng 3.18	Tạo cây sắn HB80 và KM140 chuyển gen GUS thông qua <i>A.tumefaciens</i>	111
Bảng 3.19	Chuyển gen pBI121- C54:SSIV:NOST vào giống sắn KM140	114

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1	Đặc điểm cây sắn (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	6
Hình 1.2	Một số phương pháp phổ biến tạo cây sắn biến đổi gen	18
Hình 1.3	Công thức hóa học của tinh bột	20
Hình 1.4	Quá trình sinh tổng hợp tinh bột và các enzyme liên quan	21
Hình 1.5	Quy trình tái sinh <i>in vitro</i> thông qua phôi soma ở cây sắn	31
Hình 1.6	Kết quả tạo mô sẹo phôi hoá ở giống sắn TME 14	32
Hình 2.1	Trình tự đoạn cmyc và vị trí của các môi PCR	53
Hình 2.2	Quá trình canh tác và thu hoạch các giống sắn quan tâm tại Trại thực nghiệm sinh học Cổ Nhuế phục vụ nghiên cứu	54
Hình 2.3	Quy trình kiểm tra hàm lượng tinh bột trong lá bằng phương pháp nhuộm iodine	58
Hình 2.4	Đồ thị xây dựng đường chuẩn đánh giá hàm lượng tinh bột từ lá cây thuốc lá chuyển gen cấu trúc pK7WG2D-35S:SSIV:T35S	59
Hình 2.5	Đồ thị xây dựng đường chuẩn đánh giá hàm lượng tinh bột từ rễ cây thuốc lá chuyển gen cấu trúc pBI121 – C54:SSIV: NOST	60
Hình 3.1	Hình ảnh minh họa vị trí lá và củ sắn	62
Hình 3.2	RNA tổng số tách chiết từ các mẫu củ (A) và lá các giống sắn (B)	63
Hình 3.3	Điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen actin từ cDNA sắn	64
Hình 3.4	Phân tích mức độ biểu hiện của gen AGPS qua các giai đoạn phát triển ở 4 giống sắn bằng real-time PCR	67
Hình 3.5	Phân tích mức độ biểu hiện của gen AGPL qua các giai đoạn phát triển ở 4 giống sắn bằng real-time PCR	68
Hình 3.6	Phân tích mức độ biểu hiện gen GBSS qua các giai đoạn phát triển ở 4 giống sắn bằng real-time PCR	69
Hình 3.7	Phân tích mức độ biểu hiện của gen SSI, SSIII, SSIV qua các giai đoạn phát triển ở 4 giống sắn bằng real-time PCR	71
Hình 3.8	Phân tích mức độ biểu hiện của gen SSII qua các giai đoạn phát triển ở 4 giống sắn bằng real-time PCR	72
Hình 3.9	Phân tích mức độ biểu hiện của gen SBE qua các giai đoạn phát triển ở 4 giống sắn bằng real-time PCR	74
Hình 3.10	Tách dòng đoạn gen SSIV từ củ sắn	77
Hình 3.11	Tách dòng promoter C54 ở sắn	81
Hình 3.12	Thiết kế vector pK7WG2D-35S:SSIV:T35S	83
Hình 3.13	Thiết kế vector pBI121/cmyc	84
Hình 3.14	Thiết kế vector pBI121-C54:SSIV-cmyc:NOST	85