

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

VŨ THỊ HƯỜNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC GEN DREB5 PHÂN LẬP
TỪ HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐỊA PHƯƠNG XUÂN LẠNG SƠN
VÀ LỢ BẮC GIANG**

Chuyên ngành: Di truyền học
Mã số: 60.42.70

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn: PGS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên, 2012

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ chuyên ngành Di truyền học, Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên, tôi đã nhận được sự ủng hộ, giúp đỡ của các thầy cô giáo, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô khoa Sinh- KTNN và khoa Sau đại học, Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên. Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ Bộ môn Di truyền và Sinh học hiện đại đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới toàn thể gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn cổ vũ, động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 4 năm 2012

Tác giả

Vũ Thị Hương

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	3
3. Nội dung nghiên cứu	3
Chương 1	4
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1.CÂY ĐẬU TƯƠNG	4
1.1.1.Đặc điểm sinh học cây đậu tương	4
1.1.2. Giá trị kinh tế của cây đậu tương.....	6
1.1.3. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và ở Việt Nam	7
1.2. GEN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG	11
1.2.1. Nhóm gen chức năng liên quan trực tiếp đến tính chịu hạn của cây đậu tương.....	12
1.2.2. Nhóm gen điều khiển quá trình phiên mã của nhóm gen chịu hạn.....	15
1.3. NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB5 VÀ GEN <i>DREB5</i>	20
1.3.1. Nhân tố phiên mã DREB5	20
1.3.2. Gen <i>DREB5</i>	21
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	27
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	27
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ	28
2.2.1. Hóa chất.....	28
2.2.2 Thiết bị	28
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.3.1. Phương pháp sinh học phân tử.....	30
2.3.2. Phương pháp phân tích trình tự gen.....	36

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	37
3.1. KẾT QUẢ NHÂN BẢN GEN <i>DREB5</i> TỪ HỆ GEN CỦA HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG XLS VÀ LBG.....	37
3.1.1. Tách chiết DNA từ lá non hạt đậu tương	37
3.1.2. Kết quả nhân bản gen <i>GmDREB5</i> bằng phản ứng PCR	38
3.2. TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN <i>GmDREB5</i>	40
3.3. SO SÁNH TRÌNH GEN <i>GmDREB5</i> PHÂN LẬP TỪ HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG XLS VÀ LBG VỚI CÁC TRÌNH TỰ ĐÃ CÔNG BỐ	43
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	46
TÀI LIỆU THAM KHẢO	53

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

2,4 D	2,4- Diclorophenoxyacetic acid
ABA	Abscisis acid
bp	Cặp base
BAP	6- Bezyl amino purin
đtg	Cộng sự
DNA	Deoxiribonucleic acid
DREB	Dehydration- Responsive Element Binding
EDTA	Ethyen Diamin Tetraacetic Acid
HSP	Heat shock protein
kb	Kilo base
LEA	Late Embryogenesis Abundant protein (Protein tích lũy với số lượng lớn ở giai đoạn cuối của quá trình hình thành phôi)
LTP	Lipid Tranfer protein (Protein vận chuyển lipid)
LBG	Lơ Bắc Giang
MGPT	Môi giới phân tử
MS	Murashige- Skoog
NAA	Naphtyacetic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase)
P5CS	Pyrroline- 5- Carboxylate Synthetase
TAE	Tris acetat EDTA
TBE	Tris borat EDTA
XLS	Xuân Lạng Sơn

DANH MỤC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1	Tình hình sản xuất đậu tương ở Việt Nam từ 2005- 2011	9
Bảng 2.1	Nguồn gốc của các giống đậu tương nghiên cứu.	27
Bảng 2.2	Danh mục các thiết bị đã sử dụng	29
Bảng 2.3	Trình tự cặp mồi nhân gen <i>DREB5</i>	31
Bảng 2.4	Thành phần phản ứng PCR	32
Bảng 2.5	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR	32
Bảng 2.6	Thành phần phản ứng gắn gen vào vector tách dòng pBT	34
Bảng 3.1	Giá trị mật độ quang của phổ hấp thụ DNA ở bước sóng 260nm và 280nm của giống đậu tương XLS và LBG	38
Bảng 3.2	Hệ số tương đồng và hệ số sai khác của trình tự gen <i>GmDREB5</i> của 2 giống đậu tương LBG và XLS với trình tự gen <i>GmDREB5</i> của 6 giống đậu tương công bố trên ngân hàng gen quốc tế	46
Bảng 3.3	Hệ số tương đồng và hệ số sai khác của trình tự amino acid của Protein DREB5 của 2 giống đậu tương LBG và XLS với trình tự amino acid của Protein DREB5 của 6 giống đậu tương công bố trên ngân hàng gen quốc tế	52

DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Sản xuất đậu tương của Việt Nam	10
Hình 1.2	Sơ đồ mô tả gen và vùng mã hóa của gen <i>GmDREB5</i> ở đậu tương	22
Hình 1.3	Sơ đồ mô tả protein <i>GmDREB5</i> ở đậu tương	22
Hình 1.4	Trình tự amino acid của vùng AP2 của protein DREB5 ở đậu tương	23
Hình 1.5	Mô hình cấu trúc của miền AP2 của protein DREB5	23
Hình 1.6	Điểm liên kết với DNA của protein DREB5 (DNA binding site)	24
Hình 1.7	Sơ đồ các điểm DNA- Binding của protein DREB5 ở đậu tương	24
Hình 1.8	Sự đa dạng và mối quan hệ của vùng AP2 của protein DREB5 ở đậu tương	25
Hình 2.1	Hình ảnh các giống đậu tương nghiên cứu	27
Hình 2.2	Sơ đồ vector pBT	34
Hình 3.1	Hình ảnh điện di DNA tổng số của 2 giống XLS và LBG	38
Hình 3.2	Hình ảnh điện di sản phẩm nhân gen <i>GmDREB5</i>	39
Hình 3.3	Đĩa nuôi cấy dòng tế bào khả biến <i>E.coli</i> chủng DH5 α chứa vector tái tổ hợp mang gen <i>GmDREB5</i>	40
Hình 3.4	Plasmid mang gen <i>GmDREB5</i>	41
Hình 3.5	So sánh trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB5</i> phân lập từ hai giống đậu tương LBG và XLS	42

Hình 3.6	So sánh trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB5</i> phân lập từ hai giống đậu tương LBG và XLS với sáu trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB5</i> đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế	45
Hình 3.7	Biểu đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng gen <i>GmDREB5</i> của 8 giống đậu tương	47
Hình 3.8	So sánh trình tự amino acid mã hoá bởi gen <i>DREB5</i> phân lập từ 2 giống đậu tương LBG và XLS	49
Hình 3.9	So sánh trình tự amino acid mã hoá bởi gen <i>GmDREB5</i> phân lập từ 2 giống đậu tương LBG và XLS với trình tự amino acid mã hoá bởi gen <i>GmDREB5</i> của 6 giống đậu tương đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế	50
Hình 3.10	Biểu đồ hình cây so sánh mức độ tương đồng Protein <i>DREB5</i> của 8 giống đậu tương	52

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây công nghiệp ngắn ngày có vị trí quan trọng trong cơ cấu cây trồng nông nghiệp, là loại cây trồng chiến lược của nhiều quốc gia trên thế giới bởi có tác dụng nhiều mặt và có hiệu quả kinh tế cao, có thời gian sinh trưởng ngắn lại dễ trồng. Sản phẩm từ cây đậu tương được sử dụng cho người và gia súc do đáp ứng được nhu cầu đạm trong khẩu phần ăn hằng ngày của người cũng như gia súc [1], [3].

Hạt đậu tương được dùng làm thực phẩm cho con người, thức ăn cho gia súc, nguyên liệu cho công nghiệp, là mặt hàng xuất khẩu. Trong hạt đậu tương có hàm lượng dinh dưỡng cao, chứa 35%- 52% protein, 18%- 25% lipit, 20% glucid và nhiều loại axit amin cần thiết như: leucin, isoleucin, lysin, metionin, phenylalanin, tryptophan, valin. Ngoài ra, trong hạt đậu tương còn chứa nhiều vitamin (B1, B2, A, D, E, K...) là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao rất cần thiết cho cơ thể người và động vật. Đặc biệt, protein của đậu tương được coi là một nguồn cung cấp protein hoàn chỉnh vì chứa một lượng đáng kể các amino acid không thay thế cần thiết cho cơ thể, dễ tiêu hoá và không có các thành phần tạo cholesterol. Lipit của đậu tương chứa tỉ lệ lớn các axit béo chưa no, có hệ số đồng hoá lớn (98%), chỉ số iot cao (120-137). Sử dụng protein và lipit của hạt đậu tương còn có tác dụng chữa một số bệnh như: đái tháo đường, béo phì, huyết áp cao, chảy máu não... [3].

Ngoài ra, ở rễ cây đậu tương có các nốt sần, đó là kết quả của sự cộng sinh giữa vi khuẩn *Rhizobium japonicum* với rễ. Vì vậy, đậu tương là loại cây trồng có tác dụng cải tạo đất, làm cây trồng vụ sau phát triển tốt hơn, góp