

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN VĂN TƯỜNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GEN NAC LIÊN QUAN
ĐẾN KHẢ NĂNG CHỊU HẠN Ở MỘT SỐ GIỐNG NGÔ
ĐỊA PHƯƠNG HÀ GIANG - VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2013

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN VĂN TƯỜNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GEN NAC LIÊN QUAN
ĐẾN KHẢ NĂNG CHỊU HẠN Ở MỘT SỐ GIỐNG NGÔ
ĐỊA PHƯƠNG HÀ GIANG - VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**Người hướng dẫn khoa học:
PGS.TS. NGUYỄN VŨ THANH THANH**

THÁI NGUYÊN - 2013

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 được ai công bố.

Thái Nguyên, ngày 10 tháng 05 năm 2013

Tác giả

Nguyễn Văn Trường

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành đề tài này.

Tôi xin cảm ơn các kỹ thuật viên phòng thí nghiệm Sinh học, Khoa Khoa học Sự sống, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên và các cán bộ phòng DNA ứng dụng - Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành một số thí nghiệm.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã động viên khuyến khích và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và làm đề tài.

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

Thái Nguyên, ngày 10 tháng 05 năm 2013

Tác giả luận văn

Nguyễn Văn Tường

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục.....	iii
Những chữ viết tắt trong luận văn.....	v
Danh mục các bảng trong luận văn.....	vi
Danh mục các hình trong luận văn.....	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu của đề tài	2
3. Nội dung của đề tài	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CÂY NGÔ	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây ngô.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của cây ngô.....	3
1.1.3. Đặc điểm hóa sinh hạt ngô	5
1.1.4. Giá trị kinh tế của cây ngô	6
1.1.5. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới và Việt Nam.....	7
1.2. HẠN VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY NGÔ	11
1.2.1. Hạn và ảnh hưởng của hạn đối với cây trồng	11
1.2.2. Đặc tính chịu hạn của cây ngô	12
1.2.3. Tình hình nghiên cứu đặc tính chịu hạn của cây ngô.....	14
1.2.4. Cơ sở sinh lý, hóa sinh và di truyền của tính chịu hạn của cây ngô	16
1.2.5. Các gen điều khiển phiên mã	19
1.2.6. NAC và vai trò của NAC với tính chịu hạn của cây ngô.....	21
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. VẬT LIỆU	25
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....	25
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	26

2.3.1. Phương pháp sinh lí, hóa sinh	26
2.3.2. Phương pháp sinh học phân tử.....	33
2.3.3. Phương pháp xác định trình tự nucleotide	38
2.3.4. Phương pháp xử lí trình tự gen	38
2.3.5. Phương pháp xử lý kết quả và tính toán số liệu	38
2.4. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	38
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	39
3.1. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, HOÁ SINH HẠT CỦA 5 MẪU NGÔ ĐỊA PHƯƠNG NGHIÊN CỨU	39
3.1.1. Đặc điểm hình thái và khối lượng hạt	39
3.1.2. Hàm lượng protein và lipid	39
3.1.3. Hoạt tính α - amylase	41
3.1.4. Hoạt tính protease	41
3.1.5. Chiều dài rễ của 5 mẫu ngô địa phương ở giai đoạn cây non	42
3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA 5 MẪU NGÔ ĐỊA PHƯƠNG Ở GIAI ĐOẠN CÂY NON	43
3.3. KẾT QUẢ PHÂN LẬP GEN NAC	46
3.3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số	46
3.3.2. Kết quả nhân gen NAC	47
3.3.3. Kết quả tách dòng gen NAC	48
3.3.4. Kết quả tách plasmid tái tổ hợp.....	49
3.3.5. Kết quả xác định trình tự gen NAC	49
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN

ABA	Absciscic Acid (Axit abxiscic)
DNA	Axit deoxyribonucleic (Deoxyribonucleic acid)
ASTT	Áp suất thẩm thấu
Bp	Base pair (Cặp base)
CTAB	Cetyltrimethyl – amonium bromide
Đtg	Đồng tác giả
CYS	Cystatin
NAC	NAM - ATAF – CUC
HSP	Heat shock protein (Protein sốc nhiệt)
LEA	Late embryogenesis abundant protein (Protein tích lũy với số lượng lớn ở giai đoạn cuối của quá trình hình thành phôi)
LTP	Lipid transfer protein (Protein vận chuyển lipid)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase)
TAE	Tris Acetate EDTA
P5CS	Pyroline – 5 – carboylate synthase
MX	môi xuôi
MN	môi ngược
NAM	No Apical Merstem
CUC	Cup Shaped Cotyledon
JA	Jasmonic acid

DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Tình hình sản xuất ngô ở một số khu vực trên thế giới giai đoạn 2009 - 2011	8
Bảng 1.2. Tình hình sản xuất ngô của một số quốc gia trên thế giới năm 2011	9
Bảng 1.3. Diện tích, năng suất, sản lượng ngô của Việt Nam từ 2008 - 2011	10
Bảng 2.1. Nguồn gốc 5 mẫu ngô nghiên cứu	25
Bảng 2.2. Danh mục các thiết bị sử dụng	26
Bảng 2.3. Cặp môi nhân gen NAC	34
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen NAC	35
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng gắn gen NAC vào vector	36
Bảng 3.1. Hình thái và khối lượng hạt của 5 mẫu ngô địa phương	39
Bảng 3.2. Hàm lượng protein và lipid của 5 mẫu ngô địa phương	40
Bảng 3.3. Hoạt tính enzyme α – amylase của 5 mẫu ngô địa phương	41
Bảng 3.4. Hoạt tính protease của 5 mẫu ngô địa phương	42
Bảng 3.5. Chiều dài rễ của 5 mẫu ngô địa phương	43
Bảng 3.6. Khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non của 5 mẫu ngô địa phương	44
Bảng 3.7. Phổ hấp phụ DNA ở bước sóng 260 nm và 280 nm của 5 mẫu ngô nghiên cứu	46
Bảng 3.8. Hệ số tương đồng di truyền gen NAC ở 3 mẫu QB, VX, EU810024	51

DANH SÁCH CÁC HÌNH TRONG LUẬN VĂN

	<i>Trang</i>
Hình 2.1. Hình thái hạt của 5 mẫu ngô địa phương	25
Hình 3.1. Đồ thị rada biểu diễn khả năng chịu hạn của 5 mẫu ngô nghiên cứu	45
Hình 3.2. Hình ảnh của 5 mẫu ngô nghiên cứu sau 7 ngày gây hạn	45
Hình 3.3. Hình ảnh điện di DNA tổng số của 5 mẫu ngô địa phương	46
Hình 3.4. Hình ảnh điện di kết quả PCR nhân gen NAC ở 2 mẫu ngô VX, QB	47
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm colony – PCR gen NAC ở 2 mẫu ngô VX và QB..	48
Hình 3.6. Hình ảnh điện di tách plasmid tái tổ hợp mang gen NAC	49
Hình 3.7. Kết quả so sánh gen NAC của 3 mẫu QB, VX và EU810024	50
Hình 3.8. Kết quả so sánh đoạn mã hóa của gen NAC ở 2 mẫu nghiên cứu QB và VX...	52
Hình 3.9. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của protein NAC ở 2 mẫu nghiên cứu QB, VX và EU810024.....	53

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong ba cây lương thực quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu, góp phần nuôi sống gần 1/3 dân số trên toàn thế giới. Ngô là thức ăn xanh và ủ chua rất tốt cho chăn nuôi gia súc, gia cầm. Ngoài ra, ngô còn là nguyên liệu của các nhà máy sản xuất rượu, cồn, tinh bột dầu, đường glucose, bánh kẹo. Theo ước tính có khoảng 670 mặt hàng khác nhau trong các ngành lương thực, thực phẩm, dược phẩm và công nghiệp nhẹ được sản xuất từ ngô.

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng thứ hai sau lúa gạo của nông dân vùng trung du và miền núi phía Bắc và là cây lương thực chính của đồng bào các dân tộc thiểu số ở các vùng núi cao. Ngô được trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau, đa dạng về mùa vụ gieo trồng và hệ thống canh tác. Ngày nay các giống ngô lai có năng suất cao trên cơ sở ứng dụng các thành tựu khoa học kỹ thuật, đang được trồng phổ biến ở các vùng miền trong cả nước. Trong khi đó các giống ngô địa phương hạt dẹt, thơm ngon, có khả năng chịu hạn tốt nhưng do có năng suất thấp nên ít được quan tâm phát triển. Mặt khác, nước ta có 75% diện tích là đồi núi, lượng mưa hàng năm không đồng đều giữa các vùng, tình trạng hạn hán thường xuyên xảy ra. Do đó, diện tích trồng các giống ngô địa phương có xu hướng giảm, nhiều giống ngô quý hiếm đã bị mất dần. Hơn thế nữa, tại một số tỉnh miền núi như: Lào Cai, Yên Bái, Lai Châu, Sơn La, Điện Biên, Cao Bằng... đặc biệt là ở Hà Giang do khó khăn về sản xuất lúa nước nên phần lớn đồng bào dân tộc ít người như: dân tộc H.Mông, Dao, Tày, Nùng... đã sử dụng ngô làm lương thực, thực phẩm chính thay gạo. Nhưng do tập quán canh tác lạc hậu nên năng suất của các giống ngô này còn thấp.

Nhân tố phiên mã *NAC* là một họ protein có chức năng rất đa dạng, giữ vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, quá trình lão hóa, phát triển hình thái, con đường truyền tín hiệu, điều chỉnh nội tiết tố và phản ứng với những tác động khác nhau từ ngoại cảnh