Số hóa bởi trung tâm học liệu http://www.lrc.tnu.edu.vn/

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

CAO DUY PHÚC

NGHIÊN CỨU GIẢI MÃ TRÌNH TỰ HỆ GENOME CỦA CHỦNG VIRUS XOĂN LÁ THUỐC LÁ (TLCV) PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học
Mã số: 60 42 0201

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. LÊ VĂN SƠN

Thái Nguyên – 2013

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Lê Văn Sơn, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học - người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, dìu dắt, giúp đỡ tôi trong thời gian học tập và hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới PGS. TS. Chu Hoàng Hà, ThS. Phạm Thị Vân, Ks. Nguyễn Thị Thu Hiền, CN. Nguyễn Văn Đoài cùng tập thể cán bộ Phòng công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giúp đỡ, truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt thời gian làm khoá luận.

Tôi xin cảm ơn phòng đào tạo và các thầy cô giáo tại Cơ sở đào tạo sau đại học Đại học khoa học - Đại học Thái Nguyên đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin dành cho những người thân trong gia đình và bạn bè lòng biết ơn sâu sắc, những người thân yêu đã luôn bên tôi, động viên và góp ý cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành khoá luận.

Tôi chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quí báu đó./

Hà Nội, ngày tháng năm 2013

Tác giả luận văn

Cao Duy Phúc

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VIẾT TẮT

µg	microgam
µl	microlitre
bp	Base pair
CP	Coat protein (protein vỏ)
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylene Diamine tetra-acetate acid
EtBr	Ethidium Bromide
et al	Đồng tác giả
Kb	Kilobase
LB	Luria and Bertani
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris Acetate EDTA
Taq	Thermus aquaticus polymerase
v/p	vòng/phút

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1	Một số bệnh virus hại cây trồng quan trọng trên thế giới và đã được xác định có ở Việt Nam ……..	4
1.2	Một số bệnh trên cây thuốc lá do virus gây ra……..	11
2.1	Nguồn gốc các mẫu thuốc lá nghiên cứu……..	23
2.2	Trình tự và thông số của hai mồi……..	25
2.3	Thành phần phản ứng PCR cặp mồi prV324N/prC889N…….	26
2.4	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR cặp mồi prV324N/prC889N…….	26
2.5	Thành phần phản ứng PCR cặp mồi TYLCV-A-R……...	27
2.6	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR cặp mồi TYLCV-A-R……..	27
2.7	Thành phần phản ứng ghép nối…….	29
2.8	Thành phần phản ứng colony-PCR……...	31
2.9	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng colony-PCR……..	31
2.10	Thành phần phản ứng cắt vector tái tổ hợp bằng enzyme *Bam*HI	32
2.11	Mã số, nguồn gốc đất nước và cây chủ của một số thể phân lập, chủng Begomovirus trên GenBank…….....	33
3.1	Kích thước và vị trí các gen trên vòng DNA-A……...	41
3.2	Hệ số tương đồng và sai khác giữa trình tự nucleotit vòng DNA-A của 3 thể phân lập HN, BG, LS với các trình tự trên ngân hàng gen thế giới …….....	47

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Cấu trúc genome của *Begomovirrus* có một vòng DNA (A) và cấu trúc genome của TLCV có 2 vòng DNA (B)…….....	14
1.2	Cấu trúc vòng DNA-β ……..	17
1.3	Cây thuốc lá bị nhiễm bệnh xoăn lá …….	18
1.4	Bọ phấn *Bemisia tabaci*.....	20
2.1	Mô hình minh họa vị trí các mồi trên genome TLCV……...	25
2.2	Cấu tạo vector pBT ……..	28
3.1	Kết quả điện di DNA tổng số tách chiết từ lá bị bệnh xoăn lá.....	35
3.2	Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân vòng DNA-A …….……	36
3.3	Kết quả biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5α……..	38
3.4	Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR…….	38
3.5	Ảnh plasmid đã làm sạch để đọc trình tự …….……	39
3.6	Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid mang gen V1 và A bằng *Bam*HI.....	40
3.7	Kết quả so sánh trình tự nucleotit vòng DNA-A giữa 3 thể phân lập HN, BG, LS ….....	44
3.8	Kết quả BLAST trình tự vòng DNA-A của thể phân lập HN……...	45
3.9	Kết quả BLAST trình tự vòng DNA-A của thể phân lập BG……...	46
3.10	Kết quả BLAST trình tự vòng DNA-A của thể phân lập LS……	46
3.11	Cây phát sinh chủng loại ……..	49

MỤC LỤC

Trang phụ bìa

Lời cảm ơn i

Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt ii

Danh mục các bảng iii

Danh mục các hình iv

Mục lục v

MỞ ĐẦU..... 1

CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU..... 3

1.1. VIRUS THỰC VẬT..... 3

1.1.1. Các bệnh do virus thực vật gây ra hiện nay..... 3

1.1.2. Cách phòng chống bệnh do virus thực vật gây ra..... 5

1.1.3. Cấu trúc của virus thực vật..... 7

1.2. MỘT SỐ VIRUS GÂY BỆNH TRÊN CÂY THUỐC LÁ..... 8

1.2.1. Virus gây bệnh khảm thuốc lá (Tobacco mosaic virus, TMV)…….. 8

1.2.2. Virus gây bệnh khảm dưa chuột (Cucumber mosaic virus, CMV)…..... 9

1.2.3. Virus gây bệnh héo đốm cà chua (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV) 10

1.3. VIRUS XOĂN LÁ THUỐC LÁ (Tobacco leaf curl virus, TLCV)..... 12

1.3.1. Đặc điểm hình thái, cấu tạo và phân loại..... 12

1.3.2. Cấu trúc genome và chức năng của các protein..... 14

1.3.3. Triệu chứng và cơ chế lây bệnh..... 18

1.3.4. Một số nghiên cứu và ứng dụng hệ gen Begomovirus trong tạo cây trồng chuyển gen kháng Begomovirus..... 20

CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... 23

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU..... 23

2.1.1. Nguồn vật liệu..... 23

2.1.2. Chủng vi sinh vật, plasmid và các bộ kit..... 23

2.1.3. Hóa chất, máy móc và thiết bị..... 23

2.1.4. Địa điểm nghiên cứu..... 24
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... 24
2.2.1. Tách chiết DNA tổng số..... 24
2.2.2. Phản ứng PCR..... 25
2.2.3. Phương pháp điện di phân tích DNA trên gel agarose..... 27
2.2.4. Phương pháp thôi gel..... 28
2.2.5. Gắn sản phẩm PCR vào vector tách dòng pBT..... 28
2.2.6. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt..... 29
2.2.7. Phản ứng colony-PCR..... 30
2.2.8. Phương pháp tách chiết plasmid..... 31
2.2.9. Phản ứng cắt vector tái tổ hợp bằng enzyme *Bam*HI..... 32
2.2.10. Xác định trình tự và so sánh trình tự gen thu được với các trình tự tương ứng trên GenBank..... 33
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... 35
3.1. KẾT QUẢ TÁCH DÒNG GEN VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE 35
3.1.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số..... 35
3.1.2. Kết quả nhân gen bằng phản ứng PCR..... 36
3.1.3. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α..... 37
3.1.4. Kết quả chọn lọc plasmid tái tổ hợp bằng kỹ thuật colony-PCR..... 38
3.1.5. Tách plasmid tái tổ hợp và cắt kiểm tra sự có mặt của gen tách dòng.... 39
3.1.6. Kết quả xác định trình tự..... 41
3.2. ĐÁNH GIÁ SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN..... 44
3.2.1. Kết quả so sánh trình tự nucleotide..... 44
3.2.2. Đánh giá tính đa dạng của các thể phân lập BG, HN, LS thông qua cây phát sinh chủng loại..... 48
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ..... 52
TÀI LIỆU THAM KHẢO..... 53

Số hóa bởi trung tâm học liệu http://www.lrc.tnu.edu.vn/

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) là cây công nghiệp ngắn ngày được trồng nhiều nơi trên thế giới và có giá trị kinh tế cao. Không chỉ để sản xuất thuốc lá, nó còn được sử dụng làm nguyên liệu sản xuất nicotin, axit hữu cơ, dùng làm thuốc trừ sâu hay chiết xuất dầu thực vật từ hạt. Ngoài ra với khả năng dễ tái sinh và chấp nhận gen ngoại lai thuốc lá còn được xem là cây mô hình quan trọng trong nghiên cứu công nghệ sinh học cây trồng.

Tuy nhiên, với những đặc điểm sinh học của mình, thuốc lá là cây trồng mẫn cảm với nhiều bệnh hại, đặc biệt là các bệnh do virus gây nên, ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng cây thuốc lá. Trong đó có bệnh xoăn lá do virus xoăn lá thuốc lá (Tobacco leaf curl virus, TLCV) gây nên. Khi cây mắc bệnh virus, thiệt hại về năng suất có thể lên tới 95-100%. Cho đến nay chưa có một loại thuốc bảo vệ thực vật nào có khả năng chống lại bệnh do virus gây ra trên cây trồng. Con người chỉ có thể hạn chế tác hại của virus và kiểm soát nó ở mức độ nhất định.

Ở Việt Nam, cây thuốc lá đang được trồng phổ biến ở các tỉnh miền núi và trung du phía Bắc, các tỉnh Nam Trung Bộ, Tây Nguyên và miền Đông Nam Bộ và được đánh giá là một trong những cây công nghiệp ngắn ngày, đem lại hiệu quả kinh tế cao cho nông dân và thu nhập quốc gia. Song bệnh hại (đặc biệt là bệnh do virus) cũng đang đe dọa nghiêm trọng đến năng suất và phẩm chất cây thuốc lá. Nghiên cứu hiểu rõ vật liệu di truyền của virus tác nhân gây bệnh trên cây thuốc lá là vấn đề rất cần thiết, kết quả này sẽ có định hướng trong phòng chống đúng loại virus bằng việc tạo cây trồng chuyển gen kháng bệnh.

Hiện nay, với những tiến bộ trong lĩnh vực sinh học, người ta đã tạo ra được một số loại cây trồng kháng được bệnh do virus gây ra thông qua biện pháp tạo cây trồng chuyển gen mang các gen hoặc đoạn gen có nguồn gốc từ chính virus gây bệnh [15]. Cho tới những năm cuối thế kỷ 20, cấu trúc dạng kẹp tóc (ihpRNA) hay kỹ thuật RNAi được xem là một kỹ thuật hiện đại và hữu hiệu nhất trong việc chống lại các bệnh do virus gây ra ở thực vật.

Vì vậy, giải trình tự toàn bộ genome của TLCV cho từng vùng khác nhau là cần thiết. Genome của nhiều chủng TLCV được phân lập từ các vùng khác nhau trên thế giới như Hawaii, Mexico, Brazil, Thái Lan, Đài Loan,... đã được công bố chi tiết. Tuy nhiên thông tin về toàn bộ trình tự genome TLCV gây bệnh trên cây thuốc lá ở Việt Nam chưa nhiều, mà chủ yếu tập trung trên các loài cây cà chua, ớt...[20].

Xuất phát từ những cơ sở trên tôi tiến hành đề tài ***"Nghiên cứu giải mã trình tự hệ genome của chủng virus xoăn lá thuốc lá (TLCV) phân lập tại Việt Nam".***

Mục tiêu nghiên cứu

- Xác định trình tự toàn bộ genome của virus xoăn lá thuốc lá (TLCV).

Nội dung nghiên cứu

- Tách chiết DNA tổng số của TLCV
- Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu
- Tách dòng gen
- Đọc trình tự gen và phân tích trình tự

CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. VIRUS THỰC VẬT

Comment [SCD1]: VIRUS

1.1.1. Các bệnh do virus thực vật gây ra hiện nay

Cho tới nay, hơn 2000 virus đã được phát hiện và công nhận, trong đó khoảng 1000 là các virus gây hại thực vật. Các virus thực vật nhìn chung không làm chết cây nhưng chúng ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển của cây, năng suất và chất lượng nông phẩm. Nhiều trường hợp, bệnh do virus gây có thể là một trong các nguyên nhân chính cản trở sản xuất của một cây trồng nào đó. Ở cây lâu năm, một số virus sau khi gây bệnh nặng trong mùa khi có thời tiết và nhiệt độ ôn hòa, nhưng khi nhiệt độ thấp hay quá cao thường gây nên hiện tượng mất triệu chứng (latent period) làm cho người sản xuất bị nhầm lẫn, không phát hiện được cây bị bệnh và mức nguy hiểm của bệnh, chỉ đến lúc nào đó cây không còn khả năng phục hồi theo chu kỳ bệnh nữa, hoàn toàn tàn lụi, khi đó mới biết thì đã quá muộn.Virus cũng có thể gây nên những thiệt hại nặng nề và nhanh chóng ngay trong vụ trồng của các cây thường năm như *Rice grassy stunt virus* gây bệnh lùn lúa cỏ, *Rice tungro spherical virus* và *Rice tungro bacilliform virus* gây bệnh tungro (hại lúa), *Tomato yellow leaf curl virus* gây bệnh xoăn vàng lá (hại cà chua) [44]. Các virus hại khoai mì đã từng hủy diệt hàng chục vạn hecta ở châu Á và châu Phi [43] trong một thời gian ngắn chưa tới 30 ngày từ một cánh đồng xanh tươi trở thành vàng úa, chết lụi.

Thiệt hại quan trọng thứ hai của virus là ảnh hưởng của bệnh tới phẩm chất của các sản phẩm nông nghiệp. Hạt lúa bị bệnh virus thường bị lép không cho thu hoạch, trong trường hợp được thu hoạch hạt thường rất nhỏ và hạt gạo bị đen, khi ăn có vị đắng. Khoai tây bị virus gây hại làm cho cây cằn cỗi, lá khảm loang lổ, củ khoai nhỏ, hàm lượng tinh bột và các chất dinh dưỡng đều thấp. Có trường hợp bệnh do một chủng đặc biệt của virus làm vỏ quả, củ có vết loét, bẩn giảm giá trị thương phẩm, như khi khoai tây bị nhiễm một chủng *Potato virus Y* [7]. Ở cà chua bị xoăn lá, quả bé, múi khô và hoa rụng, năng suất và phẩm chất đều rất thấp.