

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

-----❖-----

LÊ THỊ MẠN

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH TÁI SINH VÀ
CHUYỂN GEN SỬ DỤNG *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* CHO
ĐỐI TƯỢNG CÂY BẠCH ĐÀN URÔ (*EUCALYPTUS UROPHYLLA*)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

HÀ NỘI, 2013

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Chu Hoàng Hà - Phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện công nghệ sinh học đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới ThS. Bùi Văn Thắng - Viện Công nghệ sinh học lâm nghiệp - Trường đại học Lâm nghiệp đã tạo mọi điều kiện, chỉ bảo và hướng dẫn tận tình giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới GS. TS. Lê Trần Bình, TS. Lê Văn Sơn, TS. Phạm Bích Ngọc cùng toàn thể các cán bộ, chuyên viên nghiên cứu trong phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện và đóng góp những ý kiến quý báu cho tôi trong thời gian thực tập.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới ThS. Phạm Thị Đỗ Loan - Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật đã tạo mọi điều kiện và tận tình giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, thực hiện luận văn này.

Cùng với lòng biết ơn sâu sắc gửi tới gia đình và bạn bè đã giúp đỡ, động viên và khích lệ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Đề tài luận văn được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn Urô (*Eucalyptus urophylla*) sinh trưởng nhanh bằng công nghệ chuyển gen” do ThS. Bùi Văn Thắng làm chủ nhiệm, thuộc Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020. Xin trân trọng cảm ơn.

Hà Nội, ngày 12 tháng 11 năm 2013

Học viên

Lê Thị Mận

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU	1
Đặt vấn đề.....	1
Mục tiêu.....	2
Ý nghĩa của đề tài.....	2
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về bạch đàn nói chung và bạch đàn Urô nói riêng.....	4
1.2. Tình hình trồng và năng suất bạch đàn Urô ở Việt Nam.....	6
1.2.1. Tình hình phát triển diện tích trồng bạch đàn Urô ở Việt Nam.....	6
1.2.1. Năng suất của cây bạch đàn Urô ở Việt Nam.....	8
1.3. Các hướng cải thiện giống bạch đàn bằng ứng dụng Công nghệ sinh học.....	10
1.3.1. Nhân giống vô tính <i>in vitro</i> cây bạch đàn.....	10
1.3.2. Nghiên cứu phát triển và sử dụng các chỉ thị phân tử trong chọn tạo và lai giống.....	11
1.3.3. Nghiên cứu tạo giống bạch đàn chuyển gen.....	12
1.4. Gen <i>GA20</i> trong chu trình sinh tổng hợp gibberellin và ứng dụng trong cải tiến giống cây trồng sinh trưởng nhanh.....	18
1.4.1. Vai trò của gibberellin trong đời sống thực vật.....	18
1.4.2. Sinh tổng hợp gibberellin và vai trò của gen <i>GA20</i> trong sự sinh tổng hợp gibberellin....	19
1.4.3. Ứng dụng của chuyển gen <i>GA20</i> trong việc cải tiến giống cây trồng sinh trưởng nhanh....	23
Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	24
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	24
2.1.2. Vật liệu di truyền và các chủng vi khuẩn.....	24
2.2. Nội dung nghiên cứu.....	24
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.3.1. Nuôi cấy mô.....	25
2.3.2. Chuyển gen vào cây bạch đàn Urô thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.3.3. Phân tích thể nhận gen, mô sẹo, chồi và cây chuyển gen bằng phương pháp hóa sinh.....	29
2.3.4. Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp phân tử.....	29
2.3.5. Phương pháp bố trí thí nghiệm.....	31
2.3.6. Các chỉ tiêu theo dõi.....	31
2.3.7. Xử lý số liệu.....	32

Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	33
3.1. Xây dựng quy trình tái sinh cây bạch đàn Urô thông qua mô sẹo	33
3.1.1. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng tạo mô sẹo	33
3.1.2. Ảnh hưởng của BAP, NAA và Kinetin đến khả năng tạo chồi từ mô sẹo	36
3.1.3. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng ra rễ	39
3.2. Xây dựng quy trình chuyển gen vào cây bạch đàn Urô thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	43
3.2.1. Xác định ngưỡng nồng độ chất chọn lọc kanamycin.....	43
3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy tới khả năng biến nạp gen.....	47
3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn tới khả năng biến nạp gen.....	49
3.2.4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy tới khả năng biến nạp gen.....	51
3.2.5. Ảnh hưởng của chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> đến khả năng biến nạp gen..	53
3.2.6. Ảnh hưởng của nguồn mẫu tới khả năng biến nạp gen	54
3.3. Chuyển gen <i>GA20</i> vào cây bạch đàn Urô thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
3.3.1. Đánh giá khả năng tái sinh chồi sau chuyển gen	59
3.3.2. Đánh giá khả năng ra rễ và kiểm tra PCR cho chồi sau chuyển gen	61
Chương 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	64
4.1. Kết luận	64
4.2. Kiến nghị.....	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO	65
PHỤ LỤC	72

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

AS	:	Acetosyringone
BAP	:	6 - Benzylaminopurine
cs	:	Cộng sự
ĐC	:	Đối chứng
GA	:	Gibberellin
GA20	:	Gen mã hóa cho enzym GA20 - oxidase
<i>gus</i>	:	Gen mã hóa cho enzym β - glucuronidase
IAA	:	Indole - 3 acetic acid
IBA	:	Indole - 3 butyric acid
Km	:	Kanamycin
MS	:	Murashige và Skoog (1962)
NAA	:	α - naphthaleneacetic acid
ND	:	Nước dừa
TNC	:	Tiền nuôi cấy

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Danh sách các nghiên cứu về chuyển gen trên đối tượng <i>Eucalyptus</i>	14
Bảng 2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	28
Bảng 2.2: Thành phần dung dịch đậm tách chiết.....	30
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng nhân gen <i>GA20</i>	31
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng tạo mô sẹo	35
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP, NAA và Kinetin	37
Hình 3.2. Chồi tái sinh từ mô sẹo trên môi trường C1	38
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của NAA và IBA tới hiệu quả ra rễ	40
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của kanamycin tới khả năng sống của thân mầm.....	44
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của kanamycin đến khả năng ra rễ.....	46
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng biến nạp gen	48
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến khả năng biến nạp gen	50
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến khả năng biến nạp gen	52
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của chủng <i>A. tumefaciens</i> đến khả năng biến nạp gen	54
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của nguồn mẫu đến hiệu quả chuyển gen	55
Bảng 3.11. Khả năng tái sinh của mẫu chuyển gen	60
Bảng 3.12. Kết quả kiểm tra khả năng ra rễ của chồi sau chuyển gen.....	62

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Rừng bạch đàn Urô tại Brazil.....	5
Hình 1.2. Con đường sinh tổng hợp GA và vị trí hoạt động của enzym	21
Hình 2.1. Vectơ pBI121	24
Hình 3.1. Hình thái các loại mô sẹo	36
Hình 3.2. Chồi tái sinh từ mô sẹo trên môi trường C1.....	38
Hình 3.3. Chồi tái sinh trên các công thức môi trường sau 4 tuần nuôi cấy.....	38
Hình 3.4. Chồi tái sinh từ mô sẹo trên môi trường C1 và trên môi trường C4 sau 4 tuần nuôi cấy	39
Hình 3.5. Chồi ra rễ trên các môi trường sau 4 tuần nuôi cấy	41
Hình 3.6 Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin đến sức sống	46
Hình 3.7. Biểu hiện gen <i>gus</i> trên các mẫu thí nghiệm	57
Hình 3.8. Chồi chuyển gen <i>gus</i> tái sinh	57
Hình 3.9. Chồi chuyển gen <i>GA20</i> tái sinh trên môi trường chứa Km 150 mg/l	61
Hình 3.10. Cây chuyển gen <i>GA20</i> trên môi trường ra rễ	62
Hình 3.11. Cây chuyển gen được trồng ngoài nhà lưới	63
Hình 3.12. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen <i>GA20</i>	63

MỞ ĐẦU

Đặt vấn đề

Bạch đàn Urô (*Eucalyptus urophylla*) là một trong những loài bạch đàn chính được trồng chủ yếu ở Việt Nam. Đây cũng là loài cây chủ lực trong dự án trồng mới 5 triệu hecta rừng đã được triển khai trong cả nước giai đoạn 1998 - 2010. Các nghiên cứu về tỷ trọng gỗ, hàm lượng xenlulozơ, chiều dài sợi gỗ, ... đã được thực hiện, kết quả thu được cho thấy các tính trạng sinh trưởng và chất lượng gỗ ảnh hưởng lớn đến hiệu suất bột giấy cho ngành công nghiệp giấy. Các đánh giá về sinh trưởng của bạch đàn Urô tại Việt Nam cũng cho thấy tỷ lệ sinh trưởng của bạch đàn Urô tại Việt Nam chậm hơn so với các nước khác như Trung Quốc, Brazil. Vì vậy, các chương trình chọn giống bạch đàn ở Việt Nam tập trung chủ yếu vào tăng khả năng sinh trưởng, cải thiện chất lượng gỗ và tăng sức chống chịu với điều kiện môi trường bất lợi.

Hiện nay, diện tích rừng tự nhiên ngày càng bị thu hẹp do nạn khai thác bừa bãi, đất đai bị hoang hóa và tác động tiêu cực gây ra bởi biến đổi khí hậu. Trong khi nhu cầu nguyên liệu cho ngành chế biến gỗ và công nghệ bột giấy đang dần gia tăng và tương lai có thể thiếu hụt trầm trọng nếu không có những giải pháp cụ thể và tích cực. Do đó, vấn đề cải thiện giống cây trồng lấy gỗ phục vụ ngành chế biến gỗ và công nghệ bột giấy đang là vấn đề cấp bách.

Công nghệ gen là một giải pháp quan trọng và rất hữu hiệu trong trường hợp này. Thông qua việc sử dụng các kỹ thuật trong công nghệ gen cho phép tạo ra những giống cây trồng mới; đột phá về năng suất, chất lượng cũng như khả năng chống chịu. Không những thế cây trồng tạo ra từ công nghệ gen có nhiều đặc tính ưu việt mà cây trồng hoang dại ban đầu không có được.

Để chuyển thành công các gen có giá trị vào cây bạch đàn Urô cần phải có một quy trình tái sinh cây hiệu quả cao từ mô sẹo thông qua tạo đa chồi trực tiếp hoặc tạo phôi soma. Quy trình tái sinh cây một số loài bạch đàn phục vụ chuyên gen đã được các nhà khoa học đầu tư nghiên cứu: Bandyopadhyay và cs (1999) tiến hành tái sinh thành công hai loài bạch đàn *E. nitens* và *E. globules* từ vật liệu mảnh cây của cây mầm [26]; Cid và cs (1999) đã tiến hành tái sinh loài bạch đàn lai *E. grandis* x *E. urophylla* từ vật liệu cuống lá cây mầm [36]; nghiên cứu tái sinh loài bạch đàn *E. tereticornis* thông qua phôi soma cũng đã được Parakash và cs (2005)

công bố. Dibax và cs (2010) tái sinh loài bạch đàn *E. camaldulensis*; Huang và cs (2010) đã xây dựng thành công quy trình tái sinh cho loài bạch đàn *E. urophylla* từ đỉnh thân mầm [41], [52]. Cho đến nay, nhiều loài bạch đàn đã được nghiên cứu tái sinh thành công thông qua tạo đa chồi hoặc phôi soma từ các vật liệu là mảnh lá, thân cây mầm. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu thu được cho thấy ở mỗi loài bạch đàn, thậm chí ở các dòng trong cùng một loài thì khả năng tái sinh là rất khác nhau (Ho và cs, 1998; Dibax và cs, 2005; Gonzales và cs, 2002; Tournier và cs, 2003) [40], [84].

Trên cơ sở các quy trình tái sinh được xây dựng, một số quy trình chuyển gen vào nhiều loài bạch đàn đã được các nhà khoa học thực hiện thành công bằng việc chuyển các gen chỉ thị, gen chọn lọc và đang áp dụng hiệu quả để chuyển các gen có giá trị. Tetsukawazu và cs (2003) đã được cấp bằng sáng chế về quy trình chuyển gen vào loài bạch đàn *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* và *E. urophylla* từ các mẫu cây sinh dưỡng lấy từ cây bạch đàn trưởng thành; Cheng và cs (2006) cũng đã được cấp bằng sáng chế về quy trình chuyển gen và chọn lọc cây chuyển gen cho loài bạch đàn *E. urophylla*. Các kết quả nghiên cứu cho thấy khi sử dụng các loài bạch đàn, dòng bạch đàn khác nhau thì cho hiệu suất chuyển gen khác nhau. Do vậy để chuyển gen hiệu quả vào từng loài bạch đàn và từng dòng bạch đàn cụ thể cần có một quy trình thích hợp.

Xuất phát từ cơ sở trên tôi thực hiện đề tài “*Nghiên cứu xây dựng quy trình tái sinh và chuyển gen sử dụng Agrobacterium tumefaciens cho đối tượng cây bạch đàn Urô (Eucalyptus urophylla)*” nhằm cung cấp cơ sở cho việc tạo giống bạch đàn Urô biến đổi gen sinh trưởng nhanh.

Mục tiêu

- Xây dựng được quy trình tái sinh cây bạch đàn Urô thông qua mô sẹo.
- Xây dựng được quy trình chuyển gen vào cây bạch đàn Urô thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.
- Tạo được cây bạch đàn Urô chuyển gen mang gen *GA20*.

Ý nghĩa của đề tài

Ý nghĩa khoa học: Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp các dẫn liệu khoa học có giá trị về khả năng tạo cây bạch đàn Urô biến đổi gen, sinh trưởng nhanh ở Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu tham khảo cho việc giảng dạy về phương pháp chuyển gen gián tiếp ở bạch đàn.

Ý nghĩa thực tiễn: Xây dựng thành công quy trình chuyển gen ở bạch đàn thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* sẽ làm cơ sở cho việc tạo giống bạch đàn biến đổi gen sinh trưởng nhanh.