

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

PHẠM THỊ THANH NHÀN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM MỘT SỐ GEN ĐIỀU HÒA
SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN LIÊN QUAN ĐẾN
TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY NGÔ NẾP ĐỊA PHƯƠNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

PHẠM THỊ THANH NHÀN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM MỘT SỐ GEN ĐIỀU HÒA
SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN LIÊN QUAN ĐẾN
TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY NGÔ NẾP ĐỊA PHƯƠNG**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 62 42 01 21

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. LÊ TRẦN BÌNH

THÁI NGUYÊN - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cộng tác với các tác giả khác. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực, một phần đã được đăng trên các Tạp chí khoa học chuyên ngành, trong Kỷ yếu hội nghị Công nghệ sinh học và trên GenBank, với sự đồng ý cho phép của các đồng tác giả. Phần kết quả còn lại chưa được ai công bố.

Tác giả

NCS. Phạm Thị Thanh Nhân

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS. Lê Trần Bình đã tận tình hướng dẫn, tạo điều kiện giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

Tôi xin được trân trọng cảm ơn tập thể cán bộ, đặc biệt là PGS.TS. Chu Hoàng Hà, TS. Lê Văn Sơn, ThS. Hoàng Hà và ThS. Lê Hoàng Đức thuộc Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện tốt nhất, hướng dẫn kỹ thuật thí nghiệm và góp ý chuyên môn để tôi hoàn thành được đề tài này. Tôi xin cảm ơn sự giúp đỡ của các đồng tác giả.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban chủ nhiệm khoa Sinh- Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên, cùng các cán bộ trong khoa đã tạo điều kiện, động viên tôi trong học tập và hoàn thiện luận án, đặc biệt là sự giúp đỡ của các Thầy, Cô trong Bộ môn Di truyền- SHHĐ như GS.TS. Chu Hoàng Mậu, PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm, CN. Nguyễn Thị Hồng Chuyên (Phòng thí nghiệm Hóa Sinh), CN. Nguyễn Ích Chiến (Phòng thí nghiệm Di truyền & Công nghệ gen).

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Trường, Phòng Quản lý đào tạo Sau Đại học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành đề tài này.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban lãnh đạo cùng các cán bộ của Viện Nghiên cứu Ngô Đan Phượng- Hà Nội đã tạo điều kiện cung cấp các giống ngô nếp địa phương và những thông tin cơ bản về giống.

Cuối cùng, tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè đã đồng hành, chia sẻ cùng tôi, khuyến khích tôi hoàn thành luận án Tiến sĩ này.

Thái Nguyên, tháng 05 năm 2014

Nghiên cứu sinh

Phạm Thị Thanh Nhân

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Mục lục	i
Danh mục các kí hiệu và chữ viết tắt	iv
Danh mục các bảng	vii
Danh mục các hình	ix
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu của đề tài	2
3. Nội dung nghiên cứu	3
4. Những đóng góp mới của luận án	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Cây ngô	5
1.1.1. Sơ lược về cây ngô	5
1.1.2. Giá trị dinh dưỡng và kinh tế của ngô	7
1.1.3. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới và Việt Nam	8
1.2. Phản ứng của cây ngô trước tác động của hạn	10
1.2.1. Mối liên quan giữa tác động của hạn và tính chống chịu stress ôxy hóa	10
1.2.1.1. Mối liên quan giữa hạn và stress oxy hóa	10
1.2.1.2. Các dạng oxy hoạt hóa	12
1.2.1.3. Hệ thống bảo vệ cây trồng khỏi tác động của oxy hóa	13
1.2.2. Cơ sở sinh lý, sinh hoá và sinh học phân tử của tính chịu hạn ở cây ngô.	14
1.2.2.1. Cơ sở hình thái, sinh lý, hóa sinh của tính chịu hạn	14
1.2.2.2. Cơ sở sinh học phân tử của tính chịu hạn ở cây ngô	17
1.3. Anthocyanin và vai trò chuyển hóa các dạng oxy hoạt hóa	20
1.3.1. Vai trò của anthocyanin khi thực vật bị hạn	20
1.3.2. Gen điều hoà tổng hợp anthocyanin ở cây ngô	27
1.3.2.1. Nhân tố phiên mã và điều hòa biểu hiện gen	27

1.3.2.2. Nhân tố phiên mã tham gia quá trình tổng hợp anthocyanin	30
1.4. Ứng dụng real- time PCR nghiên cứu mức độ biểu hiện gen tham gia sinh tổng hợp anthocyanin	34
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Vật liệu nghiên cứu	40
2.2. Địa điểm nghiên cứu, hoá chất và thiết bị	40
2.3. Phương pháp nghiên cứu	41
2.3.1. Nhóm phương pháp hoá sinh	41
2.3.2. Đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của một số giống ngô địa phương.....	45
2.3.3. Nhóm phương pháp sinh học phân tử	47
2.3.3.1. Phương pháp tách RNA tổng số theo kit Trizol (Invitrogen)	47
2.3.3.2. Phương pháp RT- PCR	47
2.3.3.3. Tạo vector tái tổ hợp	49
2.3.3.4. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến chủng <i>E.coli</i> DH5 α	49
2.3.3.5. Kiểm tra sản phẩm chọn dòng	49
2.3.3.6. Tách plasmid	49
2.3.3.7. Xác định trình tự gen	51
2.3.3.8. Phương pháp real- time PCR	51
2.3.4. Phương pháp xử lý kết quả và tính toán số liệu	53
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	54
3.1. Đánh giá khả năng chịu hạn của 10 giống ngô nếp địa phương	54
3.1.1. Khả năng chịu hạn của 10 giống ngô nếp địa phương giai đoạn hạt nảy mầm	54
3.1.1.1. Ảnh hưởng của hạn đến hàm lượng đường và hoạt độ α - amylase.....	54
3.1.1.2. Ảnh hưởng của hạn đến sự biến đổi hoạt độ protease	57
3.1.2. Đánh giá khả năng chịu hạn của 10 giống ngô giai đoạn cây non 3 lá	59
3.1.2.1. Tỷ lệ thiệt hại của 10 giống ngô khi bị hạn	59
3.1.2.2. Chỉ số chịu hạn tương đối của kiểu gen 10 giống ngô trong điều kiện hạn nhân tạo	61

3.1.3. Phân nhóm 10 giống ngô nếp nghiên cứu theo mức độ chịu hạn	63
3.2. Ảnh hưởng của hạn nhân tạo đến lượng anthocyanin ở cây ngô nếp địa phương	65
3.2.1. Sự biến đổi hàm lượng anthocyanin trong rễ của 10 giống ngô qua các ngưỡng xử lý bởi hạn nhân tạo	65
3.2.2. Sự biến đổi hàm lượng anthocyanin trong lá của 10 giống ngô qua các ngưỡng xử lý bởi hạn nhân tạo	67
3.2.3. Sự biến đổi hàm lượng anthocyanin trong thân mầm và bẹ lá của 10 giống ngô qua các ngưỡng xử lý bởi hạn nhân tạo	70
3.2.4. Sự biến đổi hàm lượng anthocyanin trong thân và bẹ lá cây ngô qua các ngưỡng xử lý bởi hạn nhân tạo so với đối chứng	73
3.3. Phân tích trình tự đoạn gen <i>B</i>, <i>Lc</i> ở giống NH và BS1	78
3.3.1. Đặc điểm trình tự đoạn gen <i>B</i> của giống NH và BS1	78
3.3.2. Đặc điểm trình tự đoạn gen <i>Lc</i> của giống NH và BS1	85
3.3.3. Đặc điểm cấu trúc protein thuộc họ bHLH ở cây ngô	91
3.4. Định lượng mức độ biểu hiện của gen <i>B</i> và <i>Lc</i> bằng phản ứng real-time PCR	93
3.4.1. Định lượng mức độ biểu hiện của gen <i>B</i> giai đoạn cây con	93
3.4.2. Định lượng mức độ biểu hiện của gen <i>Lc</i> giai đoạn cây con	97
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	103
Kết luận	103
Đề nghị.....	103
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN LUẬN ÁN	104
TÀI LIỆU THAM KHẢO	105
PHỤ LỤC 1	127
PHỤ LỤC 2	128
PHỤ LỤC 3	131
PHỤ LỤC 4	132

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
ABA	Absciscic acid	Axit absciscic
ANR	Anthocyanidin reductase	Enzyme chuyển hóa flavan-3-ol
ANS	Anthocyanidin synthase	Enzyme chuyển hóa tạo anthocyanidin
APX	Ascorbate peroxidase	Enzyme chuyển hoá H ₂ O ₂ thành H ₂ O
bHLH	Binding helix- loop- helix	Protein họ bHLH
Bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
C1	Colored aleurone 1	Gen <i>C1</i>
cDNA	Complementary DNA	DNA sợi đôi được tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược
CHI	Chalcon isomerase	Enzyme chuyển hóa chalcon
CHP		Cây hồi phục
CHS	Chalcone synthase	Enzyme xúc tác tổng hợp chalcon
CSCHTĐ		Chỉ số chịu hạn tương đối
CKH		Cây không héo
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Chất ức chế enzyme phân hủy RNA
DFR	Dihydroflavonol 4 reductase	Enzyme chuyển hóa tạo leucoanthocyanidin
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic (ADN)
DNase	Deoxyribonuclease	Enzyme thủy phân liên kết photphodiester của phân tử DNA
DRE	Dehydration responsive element	Yếu tố đáp ứng với hydrat hóa

ĐC		Đối chứng
%ĐC		% so với đối chứng
F3'H	Flavonoid 3' hydroxylase	Enzyme chuyển hóa naringenin
F3'5'H	Flavonoid 3',5' hydroxylase	Enzyme chuyển hóa naringenin
HBV	Hepatitis B virus	Virus viêm gan B
HCV	Hepatitis C virus	Virus viêm gan C
HP		Hồi phục
KLK		Khối lượng khô
KLT		Khối lượng tươi
KNGN		Khả năng giữ nước
LAR	Leucoanthocyanidin reductase	Enzyme xúc tác tổng hợp flavan-3-ols
LEA	Late embryo abundant	protein trong giai đoạn muộn của quá trình hình thành phôi
Lc (LC)	Leaf colour	Gen <i>Lc</i>
mRNA	Messenger RNA	ARN thông tin
MGPT	chaperon	Môi giới phân tử
MW	Molecular weight	Khối lượng phân tử
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Coenzym được sử dụng trong phản ứng đồng hóa
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase	Chất được tạo nên khi khử NADP
PAL	Phenylalanine ammonialyase	Enzyme chuyển hóa L-phenylalanine
Pl	Purple	Gen <i>Pl</i>
Pr1	Red aleurone 1	Protein chuyên trách tổng hợp pelargonidin tạo Aleurone màu đỏ
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase