

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐINH THỊ HƯNG

SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN *GmDREB2* PHÂN LẬP
TỪ MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG TRÔNG PHỔ BIẾN
Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên – 2014

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐINH THỊ HÙNG

**SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN *GmDREB2* PHÂN LẬP
TỪ MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG TRÔNG PHỔ BIẾN
Ở MIỀN BẮC 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: GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên – 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan những nội dung trình bày trong luận văn là do tôi tìm hiểu dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu, một số kết quả cùng cộng tác và được sự giúp đỡ của các đồng nghiệp. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả

Đinh Thị Hưng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu để tôi hoàn thành Bản luận văn thạc sĩ Công nghệ sinh học này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Thị Thu Nga, ThS. Hoàng Phú Hiệp, NCS Đào Xuân Tân và các thầy cô Bộ môn Di truyền học & Sinh học hiện đại, khoa Sinh – Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình thực hiện các thí nghiệm của đề tài luận văn.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Trưởng khoa-Khoa Khoa học sự sống, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên và TS. Lê Văn Sơn, Trưởng Phòng Công nghệ DNA ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Đề tài luận văn thuộc chương trình đào tạo nghiên cứu sinh và cao học của Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh-KTNN, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên.

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

Tác giả

Đinh Thị Hưng

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bìa	
Lời cảm ơn	i
Lời cam đoan.....	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục các ký hiệu, chữ viết tắt	vi
Danh mục các bảng	vii
Danh mục các hình.....	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ TÁC ĐỘNG CỦA HẠN ĐẾN CÂY ĐẬU TƯƠNG... 3	
1.1.1. Cây đậu tương	3
1.1.2. Tác động của hạn đến cây đậu tương.....	11
1.1.3. Đặc điểm sinh học của cây đậu tương	4
1.1.4. Giá trị kinh tế của cây đậu tương.....	6
1.1.5. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và ở Việt Nam	7
1.2. GEN DREB VÀ DREB2 Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG.....	13
1.2.1. Gen DREB	13
1.2.2. DREB2 và gen <i>GmDREB2</i>	16
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ	21
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu	21
2.1.2. Hoá chất và thiết bị	22
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu.....	22
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22

2.2.1. Các phương pháp sinh học phân tử.....	22
2.2.2. Phương pháp phân tích xử lý trình tự gen	30
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	31
3.1. KẾT QUẢ KHUẾCH ĐẠI VÀ TÁCH DÒNG GEN <i>GmDREB2</i> TỪ HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CBD và DVN5.....	31
3.1.1. Kết quả nhân gen <i>DREB2</i>	31
3.1.2. Kết quả tách dòng cDNA của gen <i>GmDREB2</i>	32
3.2. SO SÁNH TRÌNH TỰ GEN <i>DREB2</i> VÀ TRÌNH TỰ AMINO ACID SUY DIỄN VỚI TRÌNH TỰ TRÊN GENBANK.....	36
3.2.1. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của <i>GmDREB2</i> ở hai giống đậu tương CBD, DVN5 với trình tự trên GenBank.....	36
3.2.2. So sánh trình tự amino acid ở hai giống đậu tương CBD, DVN5 với trình tự có mã số AAY89658.....	40
3.2.3. Kết quả so sánh vùng AP2 của protein <i>DREB2</i> ở một số giống đậu tương nghiên cứu	41
3.3. SO SÁNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÀ TRÌNH TỰ AMINO ACID SUY DIỄN CỦA GEN <i>DREB2</i> Ở MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG VIỆT NAM.....	42
3.3.1. Kết quả so sánh trình tự gen <i>DREB2</i> giữa một số giống đậu tương Việt Nam và giống có trình tự mang mã số DQ054363	42
3.3.2. So sánh trình tự amino acid suy diễn của một số giống đậu tương Việt Nam và giống có trình tự mang mã số AAY89658.....	45
3.3.3. Kết quả so sánh vùng AP2 của protein <i>DREB2</i> ở bốn giống đậu tương CBD, DVN5, BG, BS và giống có mã số AAY89658.....	46
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	48
1. KẾT LUẬN.....	48
2. ĐỀ NGHỊ	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO	50

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABA	Abscisis acid
bp	Cặp base
Cs	Cộng sự
cDNA	Complementary DNA(Sợi DNA bổ sung được tổng hợp từ RNA thông tin nhờ enzym phiên mã ngược)
DREB	Dehydration- Responsive Element Binding
EDTA	Ethyen Diamin Tetraacetic Acid
kb	Kilo base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase)
RNA	Ribonucleic Acid
TAE	Tris acetat EDTA
CBD	Cao Bằng Đen
DVN5	Giống ĐVN5

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Diện tích trồng, năng suất và sản lượng đậu tương của Việt Nam trong một số năm gần đây	9
Bảng 2.1. Nguồn gốc của các giống đậu tương nghiên cứu	21
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA	24
Bảng 2.3. Thành phần của phản ứng PCR nhân gen DREB2	25
Bảng 2.4. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR nhân gen DREB2	25
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng colony – PCR	28
Bảng 2.7. Chu trình nhiệt của phản ứng colony – PCR	29
Bảng 3.1. Các vị trí sai khác giữa trình tự đoạn gen <i>GmDREB2</i> của hai giống đậu tương CBD và DVN5 với gen <i>GmDREB2</i> có mã số DQ054363.....	39
Bảng 3.2. Sự sai khác giữa trình tự amino acid của protein DREB2 của hai giống đậu tương CBD và DVN5 với giống có mã số AAY89658 ...	41
Bảng 3.3. Sự sai khác giữa trình tự amino acid vùng AP2 của hai giống đậu tương CBD và DVN5 với giống có mã số AAY89658	42
Bảng 3.4. Các trình tự gen <i>GmDREB2</i> của một số giống đậu tương Việt Nam có mã số trên GenBank được sử dụng trong phân tích so sánh.....	42
Bảng 3.5. Sự sai khác giữa trình tự đoạn gen <i>GmDREB2</i> của các giống đậu tương Việt Nam và trình tự có mã số DQ054363.....	44
Bảng 3.6. Sự sai khác giữa trình tự amino acid của protein DREB2 của các giống đậu tương CBD, DVN5, BG, BS và giống có mã số AAY89658	46
Bảng 3.7. Sự sai khác giữa trình tự amino acid của vùng AP2 của bốn giống đậu tương Việt Nam (BD, DVN5, BG, BS) với giống có mã số AAY89658.....	47

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Sơ đồ mô tả gen và vùng mã hóa của gen <i>GmDREB2</i> ở cây đậu tương..	18
Hình 1.2. Sơ đồ mô tả protein DREB2 ở đậu tương	19
Hình 1.3. Trình tự amino acid của vùng AP2 trong protein DREB2 ở đậu tương ..	19
Hình 2.1. Hạt của hai giống đậu tương nghiên cứu	21
Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn gen GmDREB2 từ hai giống đậu tương nghiên cứu	32
Hình 3.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR tinh sạch.....	33
Hình 3.3. Hình ảnh khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy	34
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm colony- PCR từ khuẩn lạc	35
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm tách plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen GmDREB2	36
Hình 3.6. Trình tự đoạn gen DREB2 của hai giống đậu tương nghiên cứu và giống đậu tương trên GenBank có mã số DQ054363.....	38
Hình 3.7. So sánh trình tự amino acid của protein DREB2 của hai giống đậu tương nghiên cứu là CBD và DVN5 với giống có mã số AAY89658 .	40
Hình 3.8. So sánh trình tự vùng AP2 của protein DREB2 của hai giống đậu tương Việt Nam CBD và DVN5 với giống có mã số AAY89658 .	41
Hình 3.9. Trình tự nucleotide của gen GmDREB2 của 4 giống đậu tương BG, BS, CBD, DVN5 và trình tự của giống đậu tương có mã số DQ054363	44
Hình 3.10. Trình tự amino acid của protein DREB2 của 4 giống đậu tương CBD, DVN5, BG, BS và trình tự của giống đậu tương có mã số AAY89658	45
Hình 3.11. Trình tự vùng AP2 của protein DREB2 của bốn giống đậu tương Việt Nam (BD, DVN5, BG, BS) và giống có mã số AAY89658 ...	47

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là loại cây trồng thuộc họ đậu, một trong các loại cây công nghiệp ngắn ngày có vai trò quan trọng không chỉ về mặt kinh tế và dinh dưỡng mà còn trong việc cải tạo đất. Hạt đậu tương có hàm lượng protein cao, từ 20-45%, dễ tan và chứa hầu hết các loại acid amin, đặc biệt là các loại amino acid không thay thế. 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 tạo khả năng cố định nitơ trong không khí. Vì vậy, đậu tương là loại cây trồng có tác dụng cải tạo đất, làm cây trồng vụ sau phát triển tốt hơn, góp phần phá vỡ chu kỳ sâu bệnh, chống ô nhiễm môi trường do lạm dụng phân bón và thuốc trừ sâu [6].

Việt Nam là nước nông nghiệp nhiệt đới, cây đậu tương được trồng với ba mục đích giải quyết vấn đề thiếu protein cho người và gia súc, xuất khẩu và cải tạo đất. Trong những năm gần đây do biến đổi khí hậu toàn cầu, hạn hán xảy ra thường xuyên làm cho đất nông nghiệp bị hoang hóa, tác động xấu đến sự sinh trưởng, phát triển, làm giảm năng suất và sản lượng cây trồng. Đặc biệt đậu tương là loại cây trồng thuộc nhóm cây chịu hạn kém. Bên cạnh kỹ thuật canh tác, ảnh hưởng của sâu bệnh và giống thì hạn hán xảy ra là một trong những nguyên nhân làm giảm khả năng sinh trưởng, phát triển, giảm năng suất, chất lượng hạt, vì vậy chọn giống đậu tương theo định hướng về tăng cường khả năng chịu hạn cao hoặc cải thiện đặc tính chịu hạn của cây đậu tương là yêu cầu thực tiễn đặt ra cho ngành nông nghiệp nói chung và ngành sản xuất đậu tương nói riêng.

Đặc tính chịu hạn của cây đậu tương là tính trạng đa gen, trong đó có nhóm gen mà sản phẩm của chúng liên quan trực tiếp đến sự biểu hiện của