

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN MINH PHƯƠNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GEN CYSTATIN Ở
MỘT SỐ GIỐNG LÚA CÓ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN
KHÁC NHAU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN MINH PHƯƠNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GEN CYSTATIN Ở
MỘT SỐ GIỐNG LÚA CÓ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN
KHÁC NHAU**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60 04 02 01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

THÁI NGUYÊN - 2014

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 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 1 tháng 03 năm 2014

Tác giả luận văn

Nguyễn Minh Phương

MỤC LỤC

Trang

LỜI CẢM ƠN	i
MỤC LỤC.....	ii
NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vi
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. CÂY LÚA	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học của cây lúa.....	4
1.1.3. Giá trị kinh tế của cây lúa	5
1.1.4. Đặc điểm hóa sinh hạt gạo	6
1.1.5. Tình hình sản xuất lúa trên thế giới và Việt Nam.....	6
1.2. HẠN VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY LÚA.....	9
1.2.1. Hạn và ảnh hưởng của hạn tới cây trồng	9
1.2.2. Tình hình nghiên cứu đặc tính chịu hạn của cây lúa	
1.2.3. Cơ sở sinh lý, hóa sinh và di truyền của tính chịu hạn của cây lúa.....	11
1.2.4. Cystatin và vai trò của cystatin với tính chịu hạn	18
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. VẬT LIỆU	24
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ.....	25
2.2.1. Hóa chất	25
2.2.2. Thiết bị	26
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	39
2.3.4. Phương pháp xử lí trình tự gen	39
2.3.5. Phương pháp xử lý kết quả và tính toán số liệu.....	39

2.4. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	39
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	41
3.1. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, HOÁ SINH HẠT CỦA 9 MẪU LÚA NGHIÊN CỨU.....	41
3.1.1. Đặc điểm hình thái và khối lượng hạt.....	41
3.1.2. Hàm lượng protein và lipid	42
3.1.3. Hoạt tính α – amylase.....	43
3.1.4. Hoạt tính protease	44
3.1.5. Chiều dài rễ của 9 giống lúa nghiên cứu ở giai đoạn cây non	44
3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA 9 GIỐNG LÚA Ở GIAI ĐOẠN CÂY MẠ.....	46
3.3. KẾT QUẢ PHÂN LẬP GEN CYSTATIN.....	48
3.3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số	48
3.3.2. Kết quả nhân gen Cystatin	49
3.3.3. Kết quả xác định trình tự gen Cystatin	50
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	54
1. Kết luận	54
2. Đề nghị.....	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

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

DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Tình hình sản xuất lúa trên thế giới từ năm 2000 – 2012.....	7
Bảng 1.2. Tình hình sản xuất lúa ở Việt Nam từ năm 2000 – 2012	9
Bảng 2.1. Đặc điểm của 09 giống lúa nghiên cứu	24
Bảng 2.2. Danh mục các thiết bị sử dụng	26
Bảng 2.3. Cặp môi nhân gen cystatin.....	35
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen cystatin	35
Bảng 2.5 . Thành phần phản ứng gắn gen vào vector.....	36
Bảng 3.1. Hình thái và khối lượng hạt của 9 giống lúa	41
Bảng 3.2. Hàm lượng protein và lipid của 9 giống lúa.....	42
Bảng 3.3. Hoạt tính enzyme α – amylase của 9 giống lúa.....	43
Bảng 3.4. Hoạt tính protease của 9 giống lúa	44
Bảng 3.5. Chiều dài rễ của 9 giống lúa	45
Bảng 3.6. Khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non của 9 giống lúa.....	46
Bảng 3.7. Phổ hấp phụ DNA ở bước sóng 260 nm và 280 nm của 2 giống lúa nghiên cứu	49

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1 Hình ảnh hạt của 9 giống lúa nghiên cứu.....	25
Hình 2.2. Vector pBT.....	37
Hình 3.1. Đồ thị rada biểu diễn khả năng chịu hạn của 9 giống lúa nghiên cứu	47
Hình 3.2. Hình ảnh điện di DNA tổng số của 2 giống lúa nghiên cứu.....	48
Hình 3.3. Hình ảnh điện di kết quả PCR nhân gen Cystatin ở 2 mẫu lúa LH và Sym6.....	50
Hình 3.4. Kết quả điện di tách plasmid tái tổ hợp mang gen cystatin	50
Hình 3.5. Trình tự nucleotide của gen cystatin ở hai giống LH và Sym6...521	
Hình 3.6. So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein cystatin ở hai giống lúa nghiên cứu và AF435976.....	53

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chiếm 10% diện tích trồng trọt và là cây lương thực chính nuôi sống hơn nửa dân số thế giới. Hiện nay, lúa được xếp vào vị trí thứ hai sau lúa mì về diện tích và sản lượng. Lúa gạo là nguồn cung cấp năng lượng lớn nhất cho con người. Trên thế giới, cây lúa được khoảng 250 triệu nông dân trồng ở hơn 100 nước trên thế giới. Ở Việt Nam, lúa là cây lương thực quan trọng được trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau, đa dạng về mùa vụ gieo trồng và hệ thống canh tác

Trong những thập kỉ qua, loài người đang đứng trước nguy cơ bùng nổ về dân số và theo FAO để đảm bảo mức tiêu dùng ổn định, mức tăng sản lượng hàng năm cần gấp 2 lần so với mức tăng dân số. Trước tình hình đó cây lúa đã và đang là đối tượng nghiên cứu của nhiều nhà khoa học.

Trong những năm gần đây, quá trình biến đổi khí hậu trên trái đất diễn ra khá phức tạp, khó lường theo chiều hướng xấu của môi trường như: Hạn hán, lũ lụt, xói mòn, thoái hoá đất,... Ở Việt Nam, trong những năm qua, do còn có hạn chế về điều kiện tưới tiêu, tập quán canh tác và đặc biệt là việc chọn giống chịu hạn đưa vào sản xuất chưa được chú trọng, thêm vào đó là diễn biến thời tiết phức tạp, hạn hán thường xuyên xảy ra đã gây ảnh hưởng không nhỏ đến năng suất và chất lượng của nhiều loại cây trồng trong đó có cây lúa. Cây lúa là loài cây tương đối mẫn cảm với những điều kiện bất lợi của ngoại cảnh và thuộc nhóm cây chịu hạn kém. Vì vậy, việc tạo ra các giống lúa có năng suất cao, khả năng chống chịu tốt là yêu cầu thực tiễn đề ra cho các nhà khoa học.

Trên thế giới hiện nay, chọn tạo cây trồng theo hướng chống chịu đang là vấn đề được đặt trọng tâm nghiên cứu, trong đó chọn tạo giống lúa theo hướng chống khô hạn nhận được sự quan tâm của rất nhiều các nhà khoa học.

Nghiên cứu về gen liên quan đến tính chịu hạn cho thấy tính chống chịu khô hạn là tính trạng đa gen. Các trình tự gen liên quan đến tính chịu hạn ở cây lúa đã được công bố trên ngân hàng gen Quốc tế, trong đó có gen cystatin.

Cystatin là chất ức chế có bản chất protein, gen này thường được biểu hiện trong các điều kiện hạn, lạnh, mặn và ở các pha riêng rẽ của quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật. Mặc dù các nghiên cứu về gen liên quan đến tính chịu hạn ngày càng được quan tâm nhưng thông tin về các gen này chưa nhiều. Vấn đề đặt ra là cần tìm hiểu đặc điểm sinh lý, hoá sinh và sinh học phân tử liên quan đến tính chịu hạn của cây lúa. Trên cơ sở đó định hướng cho công tác chọn giống và cải tạo giống phù hợp có khả năng chịu hạn tốt.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn của việc chọn tạo giống lúa theo hướng nâng cao khả năng chịu hạn, chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu: **“Nghiên cứu phân lập gen cystatin ở một số giống lúa có khả năng chịu hạn khác nhau”**

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Xác định được mức độ chịu hạn của một số giống lúa ở giai đoạn cây non.
- Xác định được mối liên quan giữa hoạt tính của α – amylase, protease, chiều dài rễ với khả năng chịu hạn của một số giống lúa.
- Phân lập và xác định được trình tự gen cystatin ở một số giống lúa có khả năng chịu hạn khác nhau.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Đánh giá khả năng chịu hạn bằng phương pháp gây hạn nhân tạo ở giai đoạn 3, 5, 7, 9 ngày gây hạn.
- Xác định hoạt tính của α – amylase, protease trong hạt của 09 giống lúa nghiên cứu.
- Xác định chiều dài rễ 5 ngày tuổi ở giai đoạn cây non.
- Khuyếch đại, tách dòng và xác định trình tự gen cystatin ở 1 giống lúa có khả năng chịu hạn tốt và 1 giống lúa chịu hạn kém.