

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

-----o0o-----

NGÔ MẠNH DŨNG

**NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN
VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA
(*Oryza sativa* L.)**

**Chuyên ngành : Di truyền học
Mã số : 60.42.70**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học : PGS. TS. Chu Hoàng Mậu

Thái Nguyên - 2008

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

-----o0o-----

NGÔ MẠNH DŨNG

**NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN
VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LÚA
(*Oryza sativa* L.)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2008

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố.

Tác giả

Ngô Mạnh Dũng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, động viên và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Thị Tâm (Trưởng bộ môn Di truyền và Sinh học hiện đại), TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh (Khoa khoa học tự nhiên- Đại học Thái Nguyên), Th.S. Nguyễn Thị Ngọc Lan (Khoa Sinh- KTNN), CN Nguyễn Ích Chiến (Phòng thí nghiệm Sinh học hiện đại), KTV Nguyễn Thị Thuỷ (Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào) Khoa Sinh- KTNN -Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn Th.S. Chu Thị Minh Phương (Trường Đại học Sư phạm Hà Nội) đã cung cấp các giống lúa có chất lượng tốt làm nguyên liệu cho các thí nghiệm trong đề tài luận văn của tôi.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên, Khoa Sau đại học, Ban chủ nhiệm khoa Sinh - KTNN và các thầy cô giáo, cán bộ trong khoa đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình, bạn bè và đồng nghiệp trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tác giả

Ngô Mạnh Dũng

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	
Lời cảm ơn	
Những chữ viết tắt	
Danh mục các bảng	
Danh mục các hình	
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cây lúa	3
1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm sinh học của cây lúa	3
1.1.2. Giá trị kinh tế và tình hình sản xuất lúa ở Việt Nam và trên thế giới.....	5
1.2. Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của cây lúa	6
1.2.1. Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	6
1.2.2. Những nghiên cứu về tính đa dạng di truyền của cây lúa bằng kỹ thuật RAPD....	7
1.3. Đặc tính chịu hạn và nghiên cứu tính chịu hạn của cây lúa	8
1.3.1. Tác động của hạn đối với cây lúa	8
1.3.2. Cơ sở sinh lý, hoá sinh và sinh học phân tử của tính chịu hạn.....	9
1.3.3. Nghiên cứu, đánh giá khả năng chịu hạn của cây lúa	12
1.4. Cystatin và gen mã hoá cystatin ở thực vật	16
1.4.1. Cysteine protease	16
1.4.2. Cystain – chất ức chế cysteine protease.....	17
1.4.3. Gen mã hoá cystatin và nghiên cứu phân lập gen mã hoá cystatin	18
Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	19
2.1. Nguyên liệu	19
2.2. Hoá chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu	20
2.2.1. Hoá chất.....	20

2.2.2. Thiết bị.....	21
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu.....	21
2.3. Phương pháp nghiên cứu	21
2.3.1. Nhóm phương pháp sinh lý, hoá sinh	21
2.3.2. Phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	25
2.3.3. Phương pháp sinh học phân tử.....	26
2.3.4. Các phương pháp xử lý số liệu	31
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	32
3.1. Phân tích sự đa hình ADN của các giống lúa có khả năng chịu hạn khác nhau.....	32
3.1.1. Tách chiết ADN từ lá của các giống lúa nghiên cứu	32
3.1.2. Kết quả phân tích đa hình ADN của các giống lúa nghiên cứu bằng kỹ thuật RAPD.....	33
3.1.3. Nhận xét về sự đa hình ADN hệ gen của 7 giống lúa nghiên cứu.....	38
3.2. So sánh khả năng chịu hạn của các giống lúa nghiên cứu.....	38
3.2.1. Khả năng chịu hạn của các giống ở giai đoạn mô sẹo.....	38
3.2.2. Khả năng chịu hạn của các giống ở giai đoạn hạt nảy mầm	43
3.2.3. Khả năng chịu hạn của các giống ở giai đoạn cây mạ.....	52
3.2.4. Sự phân nhóm của các giống lúa dựa trên sự biểu hiện của các đặc điểm sinh lý, hóa sinh.	57
3.3. Kết quả phân lập gen cystatin ở các giống lúa nghiên cứu	58
3.3.1. Kết quả nhân gen cystatin từ các giống lúa nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR	58
3.3.2. Kết quả tách dòng gen cystatin.....	59
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	62
1. Kết luận.....	62
2. Đề nghị	62
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN	63
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	64

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

2,4D	: 2,4D – Dichlorophenoxyacetic acid
ABA	: Absciscic Acid
ADN	: Axit deoxyribonucleic (Deoxyribonucleic acid)
ARN	: Axit ribonucleic (Ribonucleic acid)
ASTT	: Áp suất thẩm thấu
BAP	: 6-Benzilaminopurine
bp	: Base pair - cặp bazơ
cs	: Cộng sự
cADN	: Complementary ADN- ADN bổ sung được tổng hợp nhờ enzyme phiên mã ngược từ ARN thông tin
ĐC	: Đối chứng
ĐVHĐ	: Đơn vị hoạt độ
EDTA	: Ethylendiamine tetra acetic acid
HSP	: Heat shock protein (Protein sốc nhiệt)
HSPL	: Hệ số pha loãng
KLK	: Khối lượng khô
LEA	: Late Embryogenesis Abundant protein (Protein tổng hợp với số lượng lớn ở giai đoạn cuối của quá trình phát triển phôi)
MS	: Murashige & Skoog- Môi trường cơ bản sử dụng trong nuôi cấy <i>In vitro</i>
MGPT	: Môi giới phân tử
NTSYS	: Numerical Taxonomy System - hệ thống phân loại số
OD	: Optical density – Mật độ quang
PCR	: Polymerase Chain Reaction - phản ứng chuỗi polymerase
QTL	: Quantitative trait locus - locut tính trạng số lượng
RAPD	: Random Amplified Polymorphism DNA - đa hình các đoạn ADN nhân bản ngẫu nhiên
TAE	: Tris – Acetic acid - EDTA

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên các bảng trong luận văn	Trang
2.1.	Nguồn gốc và đặc điểm của các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu	19
2.2.	Trình tự nucleotide của 6 môi ngẫu nhiên sử dụng phân tích RAPD	27
2.3.	Thành phần của phản ứng nhân gen cystatin	28
2.4.	Thành phần phản ứng gắn gen vào vector pBT	30
3.1.	Hàm lượng ADN của 7 mẫu lúa	32
3.2.	Thống kê các phân đoạn ADN được nhân bản trong phản ứng RAPD với 6 môi ngẫu nhiên	33
3.3.	Các phân đoạn ADN đặc trưng được nhân bản trong phản ứng RAPD	34
3.4.	Hệ số đồng dạng di truyền của các giống lúa nghiên cứu	36
3.5	Khả năng tạo mô sẹo và khả năng tái sinh của 7 giống lúa	38
3.6.	Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hàm lượng đường tan của 7 giống lúa ở giai đoạn hạt nảy mầm	44
3.7.	Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hoạt độ của α - amylase trong giai đoạn hạt nảy mầm	46
3.8.	Tương quan giữa hoạt độ của α - amylase và hàm lượng đường tan ở giai đoạn hạt nảy mầm	48
3.9.	Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hoạt độ của protease ở giai đoạn hạt nảy mầm	49
3.10.	Ảnh hưởng của hạn sinh lý đến hàm lượng protein tan ở giai đoạn hạt nảy mầm	50
3.11.	Tương quan giữa hoạt độ của protease và hàm lượng protein tan ở giai đoạn hạt nảy mầm	51
3.12.	Chiều dài, khối lượng tươi, khối lượng khô của rễ và thân, tỷ lệ khối lượng khô của rễ và khối lượng khô của thân lá của 7 giống lúa	53
3.13.	Chỉ số chịu hạn tương đối	54
3.14.	Hàm lượng proline của các giống lúa nghiên cứu ở thời điểm trước và sau khi gây hạn nhân tạo	56

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên các hình trong luận văn	Trang
2.1.	Hình ảnh hạt của các giống lúa dùng trong nghiên cứu	20
3.1.	Kết quả điện di ADN tổng số tách từ 7 mẫu lúa	32
3.2.	Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với mỗi M2 và M3	34
3.3.	Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với mỗi M4 và M6	35
3.4.	Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với mỗi M7 và M10	36
3.5	Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền của các giống lúa nghiên cứu ở mức độ phân tử	37
3.6.	Tốc độ mất nước của mô sẹo sau thời khô	40
3.7.	Khả năng sống sót của mô sẹo sau khi thời khô	41
3.8.	Khả năng tái sinh cây từ mô sẹo sau khi thời khô	42
3.9.	Một số hình ảnh về nghiên cứu khả năng chịu hạn ở giai đoạn mô sẹo	43
3.10.	Biến động hàm lượng đường tan của các giống lúa ở giai đoạn hạt nảy mầm	45
3.11.	Biến động hoạt độ của α – amylase của các giống lúa	46
3.12.	Hoạt độ của α - amylase của 7 giống lúa nghiên cứu	47
3.13.	Biến động hoạt độ của protease của các giống lúa ở giai đoạn hạt nảy mầm	49
3.14.	Biến động hàm lượng protein tan của các giống lúa ở giai đoạn nảy mầm	50
3.15.	Đồ thị hình rada thể hiện khả năng chịu hạn của các giống lúa	54
3.16.	Hình ảnh mạ ba lá khi chưa gây hạn nhân tạo và nuôi phục hồi sau 5 ngày gây hạn	55
3.17.	Biểu đồ so sánh hàm lượng proline của các giống lúa nghiên cứu	56
3.18.	Sơ đồ hình cây về sự phân bố của 7 giống lúa nghiên cứu trên cơ sở đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn mô sẹo, hạt nảy mầm và cây mạ ba lá	58
3.19.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen cystatin của các giống lúa nghiên cứu	59
3.20.	Vector pBT	60
3.21.	Hình ảnh khuẩn lạc E.coli mang vector tách dòng	60
3.22.	Hình ảnh điện di sản phẩm chọn dòng gen cystatin	61
3.23.	Hình ảnh điện di sản phẩm plasmid mang gen cystatin	61

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực quan trọng nhất của con người. Trên thế giới, cây lúa được xếp vào vị trí thứ 2 sau lúa mì về diện tích và sản lượng. Năm 2004 được Tổ chức Nông Lương Liên Hợp Quốc (FAO) chọn là Năm quốc tế về lúa gạo, và khẩu hiệu “Lúa là cuộc sống” đã một lần nữa khẳng định về vai trò của lúa gạo đối với cuộc sống của con người trên trái đất. Theo Viện nghiên cứu lúa gạo quốc tế (IRRI) và Viện chính sách thức ăn quốc tế (IFPRI): yêu cầu về lúa gạo sẽ tăng thêm khoảng 1,8% trong những năm 1990-2020, nghĩa là trong khoảng 30 năm nữa nhu cầu tiêu thụ gạo sẽ tăng gần 70% và sản lượng gạo sẽ đạt tới 840 triệu tấn năm 2025 [49]. Ở Việt Nam, cây lúa là cây lương thực chính và gắn bó mật thiết với nền nông nghiệp, có khoảng 6,3 triệu ha lúa gạo được gieo trồng trên 82% vùng nông nghiệp Việt Nam. Lúa gạo không chỉ phục vụ cho việc tiêu dùng trong nước mà còn phục vụ cho xuất khẩu.

Hiện nay, thế giới cũng như Việt Nam thường xuyên phải gánh chịu những biến đổi lớn, phức tạp theo chiều hướng xấu của môi trường. Sự gia tăng nhiệt độ trái đất, hạn hán, lũ lụt, xói mòn, thoái hoá đất gây ảnh hưởng không nhỏ tới năng suất, sản lượng, chất lượng cây trồng trong đó có cây lúa. Khô hạn sẽ là yếu tố quan trọng bậc nhất ảnh hưởng đến an ninh lương thực của thế giới, nó có thể làm giảm 70% năng suất cây trồng nói chung [41]. Theo IRRI, hạn hán hán là mối đe dọa hàng đầu đối với châu Á, hạn hán nghiêm trọng lan rộng không chỉ gây ra thiệt hại hàng trăm triệu đô-la trong nông nghiệp, mà còn đẩy hàng trăm triệu người vào nạn nghèo đói [11]. Cây lúa là một loại cây chịu hạn kém, vì vậy nghiên cứu tính chịu hạn và tăng cường khả năng chịu hạn của các giống lúa nhằm nâng cao và ổn định năng suất, sản lượng lúa trong điều kiện khô hạn là một đòi hỏi của thực tiễn sản xuất nông nghiệp ở nước ta.

Trong một vài năm gần đây đã có một số công trình tập trung nghiên cứu tìm hiểu về cơ sở hoá sinh, phân tử của các đặc tính chịu hạn ở cây lúa, đó là các nghiên cứu theo hướng đánh giá khả năng chịu hạn thông qua hàm lượng đường, protein, enzyme trong hạt của các giống lúa chịu hạn khác nhau