

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

Phan Hải Cường

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *DEFENSIN* PHÂN LẬP
TỪ CÂY ĐẬU XANH (*Vigna radiata* L. Wilczek)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan những kết quả trình bày trong luận văn là do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS Chu Hoàng Mậu. 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.

Thái Nguyên, ngày 29 tháng 9 năm 2014

Tác giả luận văn

Phan Hải Cường

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới GS.TS Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn và chỉ bảo để tôi có thể hoàn thành bản Luận văn thạc sĩ Công nghệ sinh học này.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô và Chương trình đào tạo nghiên cứu sinh, cao học của 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 hỗ trợ, 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 chân thành cảm ơn TS Lê Văn Sơn và đồng nghiệp Phòng Công nghệ DNA ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô Khoa Khoa học sự sống, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành chương trình khóa học.

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.

Thái Nguyên, ngày 29 tháng 9 năm 2014

Tác giả luận văn

Phan Hải Cường

MỤC LỤC

| | |
|---|-----------|
| LỜI CAM ĐOAN | i |
| LỜI CẢM ƠN | iii |
| MỤC LỤC | iv |
| DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT | vi |
| MỞ ĐẦU | 1 |
| 1. Đặt vấn đề..... | 1 |
| 2. Mục tiêu của đề tài | 2 |
| 3. Nội dung nghiên cứu..... | 2 |
| Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 3 |
| 1.1. CÂY ĐẬU XANH..... | 3 |
| 1.2. MỘT HẠI ĐẬU XANH..... | 9 |
| 1.2.1. Đặc điểm của một gây hại hạt đậu xanh | 9 |
| 1.2.2. Thiệt hại do một và biện pháp phòng trị một ở đậu xanh | 11 |
| 1.3. DEFENSIN VÀ GEN DEFENSIN | 16 |
| Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 22 |
| 2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .. | 22 |
| 2.1.1. Vật liệu..... | 22 |
| 2.1.2. Hóa chất, thiết bị | 22 |
| 2.1.3. Địa điểm nghiên cứu | 23 |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 24 |
| 2.2.1. Phương pháp sinh học phân tử..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.2. Phương pháp xác định trình tự nucleotide và xử lý số liệu | 31 |
| Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN | 32 |
| 3.1. KẾT QUẢ NHẬN GEN <i>DEFENSIN 1</i> TỪ CÂY ĐẬU XANH | 32 |
| 3.2. TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE CỦA cDNA <i>DEF 1</i> | 33 |
| 3.2.1. Tách dòng cDNA <i>DEF 1</i> từ giống đậu xanh VN6..... | 33 |
| 3.2.2. Kết quả giải trình tự cDNA <i>DEF1</i> | 35 |
| 3.3. PHÂN TÍCH SỰ ĐA DẠNG VỀ TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÀ TRÌNH TỰ AMINO ACID SUY DIỄN CỦA GEN <i>DEF 1</i> | 39 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ | 44 |
| 1. Kết luận | 44 |
| 2. Đề nghị | 44 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 45 |

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|---------|---|
| ABA | Abscisic 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) |
| DEF1 | Defensin 1 |
| DEPC | diethyl pyrocarbonate |
| DNA | deoxyribosenucleic acid |
| dNTP | deoxynucleoside triphosphate |
| EDTA | Ethylen Diamin Tetraacetic Acid |
| E. coli | Escherichia coli |
| et al. | Đồng tác giả |
| IPTG | Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside |
| kb | Kilo base |
| kGy | Kilogray |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase) |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| TAE | Tris acetat EDTA |
| VSV | Vi sinh vật |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | |
|--|----|
| Bảng 2.1. Đặc điểm của các giống đậu xanh nghiên cứu..... | 22 |
| Bảng 2.2. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA | 25 |
| Bảng 2.3. Trình tự nucleotide của cặp môi nhân gen DEF1 | 26 |
| Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen | 26 |
| Bảng 2.5. Thành phần phản ứng gắn gen vào vector | 29 |
| Bảng 2.6. Thành phần phản ứng colony - PCR | 31 |
| Bảng 3.1. Sự sai khác về trình tự nucleotide của gen DEF1 của giống đậu xanh VN6 và các trình tự có mã số AY437639 trên ngân hàng gen Quốc tế | 37 |
| Bảng 3.2. Sự sai khác về trình tự amino acid suy diễn của protein DEF1 ở giống đậu xanh VN6 và trình tự mang mã số AY437639 trên ngân hàng gen Quốc tế ... | 38 |
| Bảng 3.3. Trình tự đoạn mã hóa của gen DEF1 phân lập từ giống đậu xanh VN6 -Việt Nam và các trình tự đoạn mã hóa của gen DEF1 mang mã số trên Ngân hàng gen quốc tế được sử dụng trong phân tích..... | 39 |
| Bảng 3.4. Hệ số tương đồng và sai khác di truyền giữa trình tự gen VN6 với các giống đậu xanh dựa trên trình tự nucleotide đoạn mã hóa của gen DEF1 (%) | 40 |
| Bảng 3.5. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác nhau giữa giống đậu xanh dựa trên trình tự amino acid suy diễn từ trình tự gen DEF1 (%)..... | 41 |

DANH MỤC CÁC HÌNH

| | |
|---|----|
| Hình 1.1. Một đậu xanh <i>Callosobruchus chinensis</i> Linnes trưởng thành và tác hại của chúng..... | 10 |
| Hình 2.1. Sơ đồ chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR..... | 27 |
| Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc của vector tách dòng pBT..... | 28 |
| Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân cDNA <i>DEF1</i> từ 3 giống đậu xanh VN6, VN7, VN16 nghiên cứu | 33 |
| Hình 3.2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony - PCR..... | 35 |
| Hình 3.3. So sánh trình tự nucleotide của cDNA <i>DEF1</i> của giống VN6 với trình tự trên Ngân hàng gen quốc tế (mã số AY437639) | 36 |
| Hình 3.4. So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein <i>DEF1</i> của giống đậu xanh VN6 với trình tự mang mã số AY437639 trên ngân hàng gen Quốc tế..... | 38 |
| Hình 3.5. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu xanh dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>DEF1</i> | 41 |
| Hình 3.6. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa các giống đậu xanh dựa trên trình tự amino acid suy diễn từ gen <i>DEF1</i> | 42 |

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cây đậu xanh [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] là một loại cây công nghiệp quan trọng của nền nông nghiệp châu Á, có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Về mặt dinh dưỡng, hạt đậu xanh là nguồn thực phẩm giàu đạm (khoảng 24% – 28 %), chứa 1,3% lipid, glucid 60 % và các chất khoáng như Ca, Fe, Na... Cùng nhiều loại vitamin tan trong nước như A, B1, B2, C... Hệ thống rễ cây đậu xanh có những nốt sần ở rễ, trên nốt sần có chứa các vi khuẩn cố định đạm giúp tăng giá trị dinh dưỡng cho đất.

Ở nước ta, cây đậu xanh là một trong những cây trồng truyền thống, có khả năng cung cấp dinh dưỡng cao, dễ tiêu hoá, là cây phân xanh, cải tạo đất trồng xói mòn, chính vì vậy cây đậu xanh là một trong ba cây công nghiệp ngắn ngày chính, sau lạc, đậu tương. Nước ta có nhiều thuận lợi để phát triển sản xuất nông nghiệp song cũng có nhiều cơ hội tốt để sâu hại phát sinh phát triển và phá hại nghiêm trọng các loại cây trồng ngoài đồng ruộng cũng như trong kho bảo quản sau thu hoạch. Sau khi thu hoạch nếu không có sự bảo quản hoặc bảo quản không tốt sẽ làm nông sản hao hụt rất lớn cả về số lượng và chất lượng. Nguyên nhân dẫn đến sự hao hụt đó là sâu mọt hạt, chúng không những làm thiệt hại về số lượng nông sản, làm giảm chất lượng, giảm giá trị thương phẩm, gây mùi khó chịu, màu sắc không bình thường mà còn là nguyên nhân ảnh hưởng tới sức khoẻ người tiêu dùng.

Hiện nay trong các kho dự trữ đậu đỗ đang bị các loài sâu mọt gây hại như: Mọt đậu xanh *Callosobruchus chinensis* (L.), mọt đậu đỏ *Bruchus quadrimaculatus*, mọt đậu nành *Ancanthoscelides obtectus*, mọt đậu tằm *Bruchus rufimanus*. Đặc biệt là Mọt đậu xanh *Callosobruchus chinensis* (L.) thuộc họ *Bruchid*, bộ *Coleoptera*, đây là loài dịch hại chủ yếu và nguy hiểm. Chúng không những gây hại trong kho dự trữ mà chúng còn lan truyền và gây

hại cả ở ngoài đồng ruộng. Một đậu xanh gây hại trên các loại đậu: Đậu xanh, đậu tằm, đậu đũa, đậu Hà Lan, đậu đen trong đó hại nặng nhất là đậu xanh. Sự thiệt hại do chúng gây ra là rất lớn, làm ảnh hưởng đến nền kinh tế quốc dân, do đó công tác phòng trừ sâu mọt đậu nói chung và mọt đậu xanh nói riêng đang là một vấn đề cấp thiết cần được quan tâm nghiên cứu. Chính vì vậy, việc chọn tạo các giống đậu xanh có năng suất cao, chất lượng tốt, có khả năng chống chịu sâu bệnh, côn trùng đáp ứng nhu cầu thực tiễn là nhiệm vụ cần thiết đối với ngành chọn giống đậu xanh.

Trong những năm gần đây, có một số công trình nghiên cứu về khả năng kháng côn trùng, kháng nấm, kháng virus đã được tiến hành trên một số loại cây trồng khác nhau. Các nghiên cứu đều thống nhất rằng đặc tính kháng mọt hạt của cây trồng rất phức tạp và có liên quan đến gen *defensin 1 (DEF1)*. DEF1 ở thực vật ức chế sự phát triển của một loạt các loại nấm, một số loại virus, một số loại côn trùng gây hại lương thực. Tuy nhiên, các nghiên cứu về mối liên quan giữa đặc điểm sinh lí, hoá sinh và sinh học phân tử của gen DEF1 với khả năng kháng mọt gây hại ở hạt đậu xanh còn ít được công bố.

Xuất phát từ những cơ sở trên, chúng tôi lựa chọn và tiến hành nghiên cứu đề tài “**Nghiên cứu đặc điểm của gen *defensin* phân lập từ cây đậu xanh (*Vigna radiata* L. Wilczek)**”.

2. Mục tiêu của đề tài

Xác định được trình tự cDNA *DEF1* phân lập từ cây đậu xanh nhằm tạo nguyên liệu phục vụ thiết kế vector chuyển gen kháng mọt ở đậu xanh.

3. Nội dung nghiên cứu

- 3.1. Nghiên cứu nhân bản đoạn gen *DEF1* từ một số giống đậu xanh;
- 3.2. Nghiên cứu tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *DEF1* từ giống đậu xanh VN6;
- 3.3. Phân tích sự đa dạng về trình tự gen *DEF1* và trình tự amino acid suy diễn;