

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

**ĐẶNG THỊ HOA**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GEN LIÊN QUAN  
ĐẾN KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT  
CỦA MỘT SỐ GIỐNG NGÔ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

THÁI NGUYÊN - 2015

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

ĐẶNG THỊ HOA

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP GEN LIÊN QUAN ĐẾN  
KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT CỦA MỘT SỐ GIỐNG NGÔ**

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: PGS.TS Nguyễn Vũ Thanh Thanh

THÁI NGUYÊN - 2015

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, người đã hướng dẫn, chỉ bảo tận tình và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài và hoàn chỉnh luận văn của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Khoa học sự sống - Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và có những góp ý sâu sắc cho tôi trong thời gian học tập và thực hiện đề tài này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ, kỹ thuật viên phòng Công nghệ DNA ứng dụng - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ tốt nhất để tôi có thể hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới gia đình, đồng nghiệp và bạn bè đã luôn động viên, khích lệ, chia sẻ những khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

*Thái Nguyên, ngày 1 tháng 05 năm 2015*

Tác giả luận văn

**Đặng Thị Hoa**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, sự giúp đỡ của các cán bộ Khoa Khoa học sự sống - Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các số liệu, kết quả trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận văn này.

*Thái Nguyên, ngày 1 tháng 05 năm 2015*

Tác giả luận văn

**Đặng Thị Hoa**

## MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU .....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. CÂY NGÔ .....	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học .....	4
1.1.3. Đặc điểm hóa sinh hạt ngô .....	5
1.1.4. Giá trị kinh tế của cây ngô.....	7
1.1.5. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới.....	8
1.2. MỌT NGÔ VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA NÓ TỚI QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN NÔNG SẢN .....	14
1.2.1. Thành phần côn trùng hại ngô bảo quản .....	14
1.2.2. Mọt ngô .....	16
1.2.3. Sự thiệt hại do mọt ngô gây ra .....	18
1.3. CƠ SỞ DI TRUYỀN CỦA TÍNH KHÁNG MỌT.....	19
1.3.1. Defensin thực vật.....	20
1.3.2. Proteinases và cystatin.....	22
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	29
2.1. VẬT LIỆU .....	29
2.2. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ .....	30
2.2.1. Hóa chất.....	30
2.2.2. Thiết bị.....	31
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	32
2.3.1. Phương pháp sinh lí.....	32
2.3.2. Phương pháp sinh học phân tử .....	32
2.3.3. Phương pháp xử lý kết quả và tính toán số liệu .....	40
2.4. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....	40

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	41
3.1. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT .....	41
3.1.1. Đặc điểm hình thái, khối lượng của các giống ngô nghiên cứu.....	41
3.1.2. Kết quả đánh giá khả năng kháng mọt .....	42
3.2. KẾT QUẢ PHÂN LẬP GEN CYSTATIN .....	43
3.2.1. Nhân bản gen <i>Cystatin2</i> ( <i>Cys2</i> ) từ mRNA bằng kỹ thuật RT - PCR và tinh sạch sản phẩm RT – PCR.....	43
3.2.2. Tách dòng đoạn mã hoá của gen <i>Cys2</i> .....	45
3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN CYSTATIN .....	47
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	53
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	54

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
ABA	Absciscic acid	
bp	base pair	(cặp bazơ)
cDNA	complementary DNA	
đtg		đồng tác giả
DEPC	diethyl pyrocarbonate	
DNA	Deoxyribose nucleic acid	
dNTP	deoxynucleoside triphosphate	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	
kb	kilo base	
kDa	kilo Dalton	
mRNA	messenger ribonucleic acid	
OD	Optical density	
PCR	Polymerase chain reaction	(Phản ứng chuỗi trùng hợp)
RNA	Ribonucleic acid	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
TAE	Tris-acetate-EDTA	
X-gal	5- bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside	

## DANH MỤC CÁC HÌNH TRONG LUẬN VĂN

Hình 1.1. Một gạo <i>S. oryzae</i> L. ....	17
Hình 1.2. Một ngô <i>S. zeamay</i> .....	17
Hình 1.3. Hai lớp defensin thực vật .....	21
Hình 2.1. Hình thái hạt của 10 mẫu ngô nghiên cứu.....	29
Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn mã hóa gen <i>Cys2</i> .....	44
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm tinh sạch đoạn mã hoá của gen <i>Cys2</i> .....	45
Hình 3.3. Hình ảnh khuẩn lạc mang gen <i>Cys2</i> .....	46
Hình 3.4. Hình ảnh điện di tách plasmid tái tổ hợp mang gen <i>Cys2</i> .....	47
Hình 3.5. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>Cys2</i> của mẫu ngô TQ1 với trình tự có mã D38130.....	48
Hình 3.6. So sánh trình tự amino acid suy diễn của mẫu ngô TQ1 với D38130 trên NCBI .....	49



## DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của ngô so với 3 loại hạt ngũ cốc khác [12] .....	7
Bảng 1.2. Sản xuất ngô trên thế giới giai đoạn 1961 - 2012.....	9
Bảng 1.3. Tình hình sản xuất ngô của một số nước trên thế giới năm 2012 .....	11
Bảng 1.4. Tình hình sản xuất ngô ở Việt Nam từ 1975 – 2012.....	13
Bảng 2.1. Danh sách 10 mẫu ngô làm vật liệu nghiên cứu .....	29
Bảng 2.2. Cặp môi nhân gen <i>cystatin2</i> .....	30
Bảng 2.3. Danh mục các thiết bị sử dụng .....	31
Bảng 2.4. Thành phần hóa chất cho phản ứng tổng hợp cDNA .....	33
Bảng 2.5. Thành phần hóa chất của phản ứng PCR nhân gen <i>Cystatin2</i> .....	34
Bảng 2.6. Thành phần hóa chất gắn gen <i>Cystatin2</i> vào vector tách dòng pBT .....	35
Bảng 2.7. Thành phần hóa chất tách chiết plasmid.....	37
Bảng 3.1. Hình thái và khối lượng hạt của 10 mẫu ngô nghiên cứu.....	41
Bảng 3.2. Lượng ngô hao hụt theo thời gian của 10 mẫu ngô nghiên cứu.....	43
Bảng 3.3. Sự sai khác về trình tự nucleotide của gen <i>Cys2</i> của mẫu ngô TQ1 và trình tự có mã số D38130 .....	48
Bảng 3.4. Hệ số tương đồng nucleotide của gen <i>Cys2</i> của mẫu ngô TQ1 và trình tự có mã D38130.....	48
Bảng 3.5. Sự sai khác giữa trình tự amino acid của mẫu ngô TQ1 với D38130.....	49
Bảng 3.6. Hệ số tương đồng amino acid suy diễn của protein <i>Cys2</i> của mẫu ngô TQ1 với D38130 .....	50

## MỞ ĐẦU

### 1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Trên thế giới, ngô là một trong những cây ngũ cốc quan trọng, đứng thứ ba về diện tích sau lúa mì và lúa nước, đứng thứ hai về sản lượng và đứng thứ nhất về năng suất [12].

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng không chỉ cung cấp lương thực cho người, vật nuôi mà còn là cây trồng xóa đói giảm nghèo tại các tỉnh có điều kiện kinh tế khó khăn. Do đó, cây ngô cũng là cây lương thực được chú trọng trồng ở nước ta. Và nếu trong tương lai khi đã sản xuất đủ nhu cầu nội địa, chắc chắn ngô sẽ là mặt hàng xuất khẩu của nước ta giống như lúa gạo, vì nhu cầu lương thực và chế biến của thế giới cũng ngày một tăng [13].

Cùng với sự phát triển của việc sản xuất ngô, công tác bảo quản ngô cũng là khâu quan trọng. Đặc biệt, với đặc điểm khí hậu nước ta nóng ẩm quanh năm, nấm mốc, mối mọt, côn trùng, động vật gây hại phát triển mạnh nên công tác bảo quản lại càng quan trọng. Tuy nhiên, việc bảo quản ngô sau thu hoạch ở Việt Nam hiện đang là khâu yếu. Ngô sau khi thu hoạch có thể được lưu trữ trong nông hộ làm thức ăn gia súc và chờ lên giá sau vụ thu hoạch mới bán ra thị trường. Một lượng lớn lại được một số công ty có năng lực bảo quản lớn, các cơ sở tư nhân lưu trữ với quy mô vừa và nhỏ thu mua... Các cơ sở này trực tiếp thu gom ngô hạt tươi từ các hộ nông dân trong và ngoài tỉnh với số lượng lớn, sau khi tiến hành sấy, ngô sẽ được bảo quản để phân phối dần ra thị trường. Chính vì vậy ngô bảo quản trong kho khá dài ngày, thành phần sâu mọt hại tương đối đa dạng làm hao hụt về chất lượng và khối lượng sản phẩm. Trong đó thì sự gây hại của loài mọt ngô (*Sitophilus zeamais* Motsch) là khá nghiêm trọng [3]. Mặt khác, các biện pháp phòng chống đối tượng gây hại này của các cơ sở lưu trữ ngô chưa thực sự hiệu quả. Ngày nay, sự phát triển của sinh học hiện đại với nhiều kỹ thuật mới ra đời đặt ra vấn đề ngoài việc phải tạo ra được các giống ngô