

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

**LƯƠNG THỊ TRANG**

**PHÂN LẬP GEN DEFENSIN LIÊN QUAN ĐẾN  
KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT Ở CÂY ĐẬU XANH**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**THÁI NGUYÊN - 2015**

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

**LƯƠNG THỊ TRANG**

**PHÂN LẬP GEN DEFENSIN LIÊN QUAN ĐẾN  
KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT Ở CÂY ĐẬU XANH**

**Chuyên ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**  
**Mã số: 60.42.01.14**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: TS. NGUYỄN THỊ NGỌC LAN**

**THÁI NGUYÊN - 2015**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực, mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

*Thái Nguyên, tháng 5 năm 2015*

**Tác giả luận văn**

**Lương Thị Trang**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan đã định hướng khoa học, tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình tôi tiến hành nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn GS.TS. Chu Hoàng Mậu, TS. Hoàng Phú Hiệp và các thầy cô Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Ban chủ nhiệm Khoa Sinh - KTNN, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi, tận tình chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi bày tỏ lời cảm ơn đến bạn bè cùng toàn thể gia đình đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt thời gian học tập.

*Thái Nguyên, tháng 5 năm 2015*

**Tác giả luận văn**

**Lương Thị Trang**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vi
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
1. Lý do chọn đề tài .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu .....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Đặc điểm chung của cây đậu xanh .....	3
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây đậu xanh.....	3
1.1.2. Đặc điểm nông sinh và vai trò của cây đậu xanh.....	3
1.1.3. Đặc điểm hóa sinh của hạt đậu xanh .....	7
1.2. Một hại đậu xanh .....	8
1.2.1. Đặc điểm của một hại hạt đậu xanh .....	8
1.2.2. Tác hại do một đậu xanh .....	13
1.2.3. Biện pháp phòng trừ một đậu <i>C. chinensis</i> gây hại.....	13
1.3. Đặc điểm của defensin và gen <i>defensin</i> .....	19
1.3.1. Đặc điểm chung của defensin ở thực vật.....	19
1.3.2. Các nghiên cứu về defensin ở đậu xanh .....	22
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>26</b>
2.1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu .....	26
2.1.1. Vật liệu .....	26
2.1.2. Hóa chất, thiết bị.....	26

2.1.3. Địa điểm nghiên cứu.....	27
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	27
2.2.1. Đánh giá khả năng kháng mọt của các giống đậu xanh .....	27
2.2.2. Phương pháp sinh học phân tử .....	27
2.2.3. Phương pháp xác định trình tự nucleotide.....	33
2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu .....	34
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>35</b>
3.1. Đặc điểm của các giống đậu xanh nghiên cứu .....	35
3.2. Khả năng kháng mọt của các giống đậu xanh nghiên cứu .....	36
3.2.1. Xác định khả năng kháng mọt dựa trên tỷ lệ số lượng hạt bị hại.....	36
3.2.2. Xác định khả năng kháng mọt dựa trên tỷ lệ khối lượng hạt bị hại ....	38
3.3. Kết quả phân lập gen <i>defensin1</i> từ đậu xanh.....	41
3.3.1. Kết quả nhân bản gen <i>defensin1</i> từ đậu xanh.....	41
3.3.2. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến E.coli.....	43
3.3.3. Kết quả giải trình tự cDNA <i>DEF1</i> .....	44
3.4. Phân tích sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen <i>defensin1</i> .....	47
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>50</b>
1. Kết luận.....	50
2. Đề nghị.....	50
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>51</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

ABA	Abscisic acid
bp	Cặp base
cDNA	Complementary DNA (Sợi DNA bổ sung được tổng hợp từ RNA thông tin nhờ enzym phiên mã ngược)
cs	Cộng sự
DEF1	Defensin 1
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DNA	deoxyribosenucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
IPTG	Isopropyl $\beta$ -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 Ethylen Diamin Tetraacetic Acid

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Danh sách các giống đậu xanh nghiên cứu .....	26
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA .....	28
Bảng 2.3. Trình tự cặp môi nhân gen <i>DEF1</i> .....	29
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng nhân gen <i>DEF1</i> .....	29
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân gen <i>DEF1</i> .....	30
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng ghép nối gen vào vector pBT .....	31
Bảng 3.1. Một số đặc điểm hình thái của 10 giống đậu xanh nghiên cứu .....	35
Bảng 3.2. Tỷ lệ số hạt đậu xanh nghiên cứu bị hại .....	37
Bảng 3.3. Tỷ lệ khối lượng hạt bị hại .....	39
Bảng 3.4. Sự sai khác về trình tự nucleotide của cDNA <i>DEF1</i> của giống đậu xanh DX16 và trình tự có mã số AY437639.....	45
Bảng 3.5. Sự sai khác về trình tự amino acid suy diễn của protein DEF1 ở giống đậu xanh DX16 và trình tự mang mã số AY437639.....	47
Bảng 3.6. Hệ số tương đồng và sai khác di truyền giữa các trình tự cDNA <i>DEF1</i> của 3 giống đậu xanh.....	47
Bảng 3.7. Hệ số tương đồng và hệ số sai khác giữa 3 giống đậu xanh dựa trên trình tự amino acid suy diễn từ trình tự gen <i>DEF1</i> .....	48



## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cặp một trưởng thành ( <i>C. chinensis</i> ).....	11
Hình 1.2. Cấu trúc defensin thực vật.....	20
Hình 1.3. Mô hình cấu trúc defensin đậu xanh ( <i>VrD1</i> ).....	22
Hình 2.1. Sơ đồ vector pBT.....	31
Hình 3.1. Hình ảnh các giống đậu xanh nghiên cứu .....	35
Hình 3.2. Đồ thị mô tả tỷ lệ thiệt hại về số lượng hạt 10 giống đậu xanh .....	37
Hình 3.3. Tỷ lệ khối lượng hạt bị hại của 10 giống đậu xanh nghiên cứu .....	39
Hình 3.4. Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân cDNA <i>DEF1</i> từ giống đậu xanh DX123 và DX16.....	42
Hình 3.5. So sánh trình tự nucleotide của cDNA <i>DEF1</i> ở giống đậu xanh DX16 với trình tự gen trên Ngân hàng gen Quốc tế .....	45
Hình 3.6. So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein DEF1 của giống đậu xanh DX16 với trình tự mang mã số AY437639 .....	46
Hình 3.7. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ giữa 3 giống đậu xanh dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>DEF1</i> .....	48

## MỞ ĐẦU

### 1. Lý do chọn đề tài

Đậu xanh [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] là cây trồng có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Đậu xanh có thời gian sinh trưởng ngắn so với nhiều loại cây ăn hạt khác, chế độ chăm sóc đơn giản. Đậu xanh còn được xem như là một thứ dược liệu quý có tác dụng giải độc, thanh nhiệt, bớt sưng phù, điều hoà ngũ tạng, chữa bệnh cho con người. Hạt đậu xanh còn là một mặt hàng nông sản xuất khẩu có giá trị. Ngoài ra, sản phẩm phụ của cây đậu xanh được dùng làm thức ăn cho gia súc. Trồng đậu xanh còn có tác dụng chống xói mòn, cải tạo đất. Hệ rễ của cây đậu xanh có nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm. Trồng đậu xanh không những mang hiệu quả về mặt kinh tế và dinh dưỡng mà còn có tác dụng cải tạo đất.

Việt Nam nằm trong khu vực nhiệt đới, đặc điểm khí hậu thường nóng ẩm, đây là điều kiện tốt để phát triển sản xuất nông nghiệp. Tuy nhiên, cũng là yếu tố thuận lợi cho sâu hại phát sinh phát triển gây tổn thất nghiêm trọng tới năng suất và phẩm chất của nông sản. Đối với nhóm nông sản là hạt, một trong những nguyên nhân chính gây tổn thất đến số lượng và chất lượng hạt là côn trùng, chủ yếu là Bộ cánh cứng (thường gọi là mọt). Mọt có thể gây thành dịch từ một số lượng nhỏ cá thể, do khả năng sinh sản lớn và thời gian phát triển cá thể ngắn. Sự tổn hại do mọt gây ra là rất lớn, do đó công tác phòng trừ mọt đậu nói chung và mọt đậu xanh nói riêng đang là một vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu. Vì vậy, trong công tác chọn tạo giống thì bên cạnh yếu tố năng suất cao và chất lượng tốt thì khả năng chống chịu với điều kiện ngoại cảnh trong đó có khả năng kháng mọt ở hạt là vấn đề cần thiết trong lĩnh vực chọn giống đậu đỗ nói chung và chọn giống đậu xanh nói riêng.

Hiện nay, đã có các công trình nghiên cứu về cây đậu xanh trên phương diện hình thái, năng suất, đánh giá sự đa dạng về kiểu gen, kiểu hình và đa hình protein... của các giống đậu xanh địa phương. Một số nghiên cứu bước đầu