

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO

**NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG THUỐC LÁ (*NICOTIANA
TABACUM* L.) MANG GEN *GmDREB2* PHẬN LẬP
TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 60.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS.Vũ Thị Thu Thủy

Thái Nguyên, năm 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Vũ Thị Thu Thủy, sự giúp đỡ của các thầy cô giáo, cán bộ Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại Khoa Sinh học– Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên. Các số liệu nêu trong luận văn là trung thực. Các kết quả chưa được công bố trong bất kỳ các công trình nào khác.

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

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2015

Tác giả

Nguyễn Thị Phương Thảo

**XÁC NHẬN
CỦA KHOA CHUYÊN MÔN**

**XÁC NHẬN
CỦA NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

TS. Vũ Thị Thu Thủy

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Vũ Thị Thu Thủy 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 bày tỏ lòng biết ơn tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành Bản luận văn thạc sĩ này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các thầy cô, cán bộ Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh học, trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên; xin cảm ơn chị Trần Thị Hồng - KTV phòng Công nghệ tế bào thực vật, đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, thực hiện các thí nghiệm của đề tài.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn tới bạn bè cùng toàn thể gia đình đã động viên, khuyến khích, giúp đỡ tôi, luôn quan tâm và là chỗ dựa cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2015

Tác giả

Nguyễn Thị Phương Thảo

MỤC LỤC

	Trang
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn.....	ii
Mục lục	iii
Danh mục chữ cái viết tắt	iv
Danh mục bảng.....	v
Danh mục hình.....	vi
MỞ ĐẦU	1
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Cây thuốc lá và hệ thống tái sinh cây thuốc lá	3
1.1.1 Cây thuốc lá.....	3
1.1.2 Hệ thống tái sinh và chuyển gen cây thuốc lá.	4
1.2. Tính chịu hạn và gen liên quan đến tính chịu hạn ở thực vật.....	6
1.2.1. Hạn và tác hại của hạn lên thực vật	6
1.2.2 Đặc tính chịu hạn của thực vật	8
1.2.3. Gen liên quan đến tính chịu hạn	10
1.2.4. Gen <i>DREB</i> và gen <i>DREB2</i>	12
1.3. Phương pháp tạo cây trồng chuyển gen.....	18
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. Vật liệu hoá chất và thiết bị.....	26
2.1.1. Vật liệu.....	26
2.1.2. Hóa chất.....	26
2.1.3. Thiết bị.....	26
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu.....	26
2.2. Phương pháp nghiên cứu	27
2.2.1. Phương pháp tạo nguyên liệu biến nạp	27

2.2.2. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua <i>A. tumefaciens</i>	27
2.2.3. Phân tích sự có mặt của cấu trúc mang gen <i>GmDREB2</i> bằng phương pháp PCR	29
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	32
3.1. Kết quả tạo nguyên liệu biến nạp	32
3.2. Kết quả chuyển vector mang cấu trúc <i>GmDREB2</i> vào thuốc lá	33
3.2.1. Đồng nuôi cây với dung dịch <i>A. tumefaciens</i> và cảm ứng tạo cụm chồi	34
3.2.2. Tạo rễ và chuyển cây ra môi trường tự nhiên	37
3.3. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng thuốc lá chuyển gen bằng kỹ thuật PCR	39
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO	43
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

ABA	Abscisic acid
AS	Acetosyringone
<i>A.tumefacines</i>	<i>Agrobacterium tumefacines</i>
BAP	6-Benzyl Amino Purine
bp	Base pair (cặp base)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleic triphosphate
DREB	Dehydration Responsive Binding protein
ĐC	Đối chứng
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetate Acid
IAA	Indoleacetic acid
IBA	Indole-3 butyric acid
LB	Luria and Bertani
LEA	Late Embryogenesis Abundant
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
PCR	Polymerase chain reaction
RM	Môi trường ra rễ
TAE	Tris Acetate EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Ti-plasmid	Plasmid tạo khối u
Vir	Virulence region

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 2.1. Thành phần dung dịch đệm chiết DNA tổng số.....	29
Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của cặp môi PCR khuếch đại đoạn <i>GmDREB2</i> ...	30
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu nhân gen <i>GmDREB2</i> ...	31
Bảng 2.4. Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân gen <i>GmDREB2</i>	31
Bảng 3.1. Kết quả cảm ứng chồi từ mảnh lá thuốc lá	36
Bảng 3.2. Kết quả tạo rễ và tái sinh cây thuốc lá ở thí nghiệm và đối chứng...	38

DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Cây thuốc lá giai đoạn trưởng thành và giai đoạn ra hoa.....	3
Hình 1.2 Cấu trúc Ti - Plasmid.....	22
Hình 1.3. Mô hình chuyển gen gián tiếp nhờ <i>A. tumefaciens</i>	23
Hình 3.1. Tạo nguyên liệu biến nạp	32
Hình 3.2. Vùng T-DNA của vector pBI121 - <i>GmDREB2</i>	33
Hình 3.3. Hình ảnh nhiễm khuẩn mẫu và đồng nuôi cấy	35
Hình 3.5. Hình ảnh tạo rễ trên môi trường kháng sinh chọn lọc.....	38
Hình 3.6. Các dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 trồng trên chậu trong nhà lưới.....	39
Hình 3.7. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân đoạn <i>GmDREB2</i> từ 17 dòng cây thuốc lá chuyển gen.....	40

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Một trong những hiện tượng thay đổi của môi trường ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của thực vật là tình trạng hạn. Hạn hán có ảnh hưởng xấu ở các mức độ khác nhau trong suốt quá trình hay từng giai đoạn sống của cơ thể thực vật dẫn đến làm giảm năng suất cây trồng, chậm phát triển và gây chết. Hiện nay trên thế giới diện tích đất nông nghiệp bị hạn hán ngày càng tăng. Ở Việt Nam tình trạng hạn hán trở nên báo động trong năm 2015, diện tích đất nông nghiệp không có nước để sản xuất này càng tăng cao.

Khả năng chịu hạn của thực vật là tính trạng do nhiều gen quy định. Hiện nay, người ta vẫn chưa tìm được một gen cụ thể nào thực sự quyết định tính chịu hạn, mà mới chỉ xác định được các gen liên quan đến tính chịu hạn của cây thực vật. Nhiều trình tự gen liên quan đến tính chịu hạn ở đậu tương đã được công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế, trong đó có gen *DREB*.

DREB (Dehydration Responsive Element Binding) là một họ gen sản xuất protein kích hoạt nhóm gen liên quan đến tính chịu hạn của thực vật. Việc nghiên cứu gen *DREB2* liên quan đến tính chịu hạn cho thấy đây là nhóm gen đa dạng về cấu trúc, chức năng và các tác giả khuyến cáo cần tiếp tục mở rộng nghiên cứu.

Hiện nay, nhờ những tiến bộ mới trong kỹ thuật di truyền mà người ta đã tạo ra các giống cây trồng có khả năng chịu hạn bằng cách lai giống, đột biến thực nghiệm, công nghệ tế bào, chuyển gen. Chọn tạo giống cây trồng có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau như chọn dòng biến dị soma, lai giống, gây đột biến thực nghiệm, sử dụng công nghệ tế bào và chuyển gen... Đã có nhiều giống cây trồng đã được chọn tạo như các giống lúa chịu hạn của tác giả Đinh Thị Phòng [17], các dòng lúa chịu nóng của Nguyễn Thị Tâm [19] Các dòng lạc chịu hạn cũng đã được tạo ra bằng cách gây đột biến

thực nghiệm- tác giả Vũ Thị Thu Thủy [23]... Chuyển gen là kỹ thuật cho phép đưa một hay một số gen nhất định nào đó vào hệ gen của cây chủ được quan tâm để tạo ra những cây trồng biến đổi gen nhằm cải thiện một số đặc tính hay tính trạng theo hướng có lợi cho con người . Chuyển gen đang là hướng nghiên cứu có nhiều triển vọng, đã được tiến hành thực nghiệm trên nhiều giống cây trồng như: cà chua, lúa, ngô, đậu tương... và được áp dụng ở nhiều nước trên thế giới. Trong đó chuyển gen gián tiếp thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (*A.tumefaciens*) tỏ ra ưu thế hơn cả kỹ thuật chuyển gen khác do ít tốn kém, quy trình đơn giản, nhanh chóng, dễ áp dụng trên nhiều đối tượng cây trồng.

Do hệ thống tái sinh cây thuốc lá tương đối đơn giản và thời gian phân hóa từ mô thành cây hoàn chỉnh khá ngắn nên trong những nghiên cứu về chuyển gen các nhà khoa học thường chọn cây thuốc lá làm cây mô hình.

Xuất phát từ cơ sở trên chúng tôi đã lựa chọn và tiến hành nghiên cứu đề tài: **“Nghiên cứu tạo dòng thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) mang gen *GmDREB2* phân lập từ cây đậu tương”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Tạo được dòng thuốc lá chuyển gen mang gen *GmDREB2* phân lập từ cây đậu tương.

3. Nội dung nghiên cứu

- (1) Nghiên cứu tạo nguyên liệu biến nạp từ cây thuốc lá giống K326.
- (2) Nghiên cứu lây nhiễm *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen vào mảnh lá thuốc lá. Tái sinh *in vitro*, chọn lọc và tạo các dòng cây thuốc lá chuyển gen.
- (3) Phân tích sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cây chuyển gen ở thế hệ T₀ bằng kỹ thuật PCR