

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

PHẠM THỊ NHẬT ANH

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC
MANG GEN *CODA* VÀO CÂY CÀ CHUA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2015

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

PHẠM THỊ NHẬT ANH

NGHIÊN CỨU CHUYÊN CẤU TRÚC
MANG GEN *CODA* VÀO CÂY CÀ CHUA

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. CHU HOÀNG HÀ

THÁI NGUYÊN - 2015

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu, Phòng Đào tạo, Ban chủ nhiệm Khoa Khoa học sự sống – Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình đến PGS.TS. Chu Hoàng Hà – Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam, người thầy đã dành nhiều thời gian, tâm huyết, tận tình giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự quan tâm, chỉ bảo của TS. Phạm Bích Ngọc – Phó trưởng phòng Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học, đồng cảm ơn các cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Phòng Công nghệ trọng điểm gen – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè, các đồng nghiệp và tập thể lớp Cao học công nghệ sinh K6A đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2015

Học viên

Phạm Thị Nhật Anh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn này hoàn toàn được hoàn thiện bằng sự say mê nghiên cứu khoa học của bản thân dưới sự hướng dẫn trực tiếp của PGS.TS Chu Hoàng Hà – Viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học, cùng với cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học. Các số liệu hình ảnh, kết quả được trình bày, trong luận văn này là trung thực, không sao chép bất cứ tài liệu, công trình nghiên cứu của người khác mà không chỉ rõ nguồn tham khảo. Tôi xin chịu trách nhiệm về lời cam đoan của mình trước hội đồng nhà trường.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2015

Học viên

Phạm Thị Nhật Anh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về cây cà chua	3
1.1.1. Nguồn gốc, phân loại, giá trị của cây cà chua.....	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học	6
1.1.3. Một số nghiên cứu về chọn tạo giống cà chua trên thế giới và ở Việt Nam.....	7
1.2. Gen <i>codA</i> mã hóa choline oxydase	12
1.2.1. Giới thiệu về gen <i>codA</i>	12
1.2.2. Giới thiệu về glycine betaine	13
1.2.3. Cây trồng chuyển gen sinh tổng hợp glycine betain tăng cường khả năng chống chịu điều kiện môi trường bất lợi	17
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. Vật liệu nghiên cứu	21
2.1.1. Vật liệu thực vật	21
2.1.2. Chủng khuẩn	21
2.1.3. Hóa chất và thiết bị thí nghiệm	21
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	22
2.2.1. Phương pháp tạo cây cà chua chuyển gen	22
2.2.2. Phương pháp phân tích và đánh giá cây chuyển gen	26
2.2.3. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu.....	32
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	33
3.1. Kết quả chuyển gen, tái sinh và chọn dòng cà chua chuyển gen <i>codA</i>	33
3.1.1. Kiểm tra sự có mặt của cấu trúc mang gen <i>codA</i> trong vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	33
3.1.2. Kết quả chuyển gen, tái sinh và chọn dòng cà chua chuyển gen <i>codA</i>	34
3.1.3. Phân tích cây cà chua chuyển gen <i>codA</i> bằng kỹ thuật PCR.....	37
3.1.4. Phân tích cây cà chua chuyển gen <i>codA</i> bằng kỹ thuật RT-PCR.....	38
3.2. Đánh giá khả năng chịu mặn của dòng cà chua chuyển gen trong <i>in vitro</i>	41
3.2.1. Chọn lọc ngưỡng chịu mặn của cà chua trong <i>in vitro</i>	41
3.2.2. Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của cây cà chua chuyển gen.....	42
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO	47

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Một số loài cây trồng chuyển gen <i>codA</i> mã hóa enzyme tham gia sinh tổng hợp glycine betaine, tăng khả năng chống chịu với điều kiện môi trường bất lợi.....	19
Bảng 2.1: Môi trường nuôi và chọn lọc cây cà chua chuyển gen	23
Bảng 2.2: Thành phần môi trường LB đặc.....	23
Bảng 2.4: Thành phần phản ứng PCR nhân gen	27
Bảng 2.5: Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA ở ống 1	29
Bảng 2.6: Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA ở ống 2	30
Bảng 2.7: Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>actin</i> từ cDNA	31
Bảng 2.8: Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>codA</i> từ cDNA	31
Bảng 3.1: Tổng hợp kết quả chuyển gen <i>codA</i> vào cây cà chua.....	34
Bảng 3.2: Kết quả đánh giá khả năng ra rễ ở cây cà chua <i>in vitro</i> trong điều kiện bổ sung NaCl vào môi trường nuôi cấy	41
Bảng 3.3: Tổng hợp kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của cây cà chua chuyển gen..	43

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Con đường sinh tổng hợp GB ở thực vật bậc cao.....	15
Hình 1.2: Con đường sinh tổng hợp GB ở vi khuẩn <i>E. coli</i>	15
Hình 1.3: Con đường sinh tổng hợp GB ở vi khuẩn <i>A. globiformis</i>	16
Hình 1.4: Sinh tổng hợp GB ở <i>Actinopolyspora halophilia</i>	16
Hình 2.1: Sơ đồ thí nghiệm tổng quát	22
Hình 3.1: Sơ đồ thiết kế cấu trúc đoạn T-DNA của vector chuyển gen pBI121/ <i>codA</i> ..	33
Hình 3.2: Kết quả colony-PCR khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	33
Hình 3.3: Một số hình ảnh chuyển gen <i>codA</i> vào cây cà chua PT18.....	35
Hình 3.4: Kết quả tách chiết DNA tổng số của các dòng cà chua chuyển gen.....	37
Hình 3.5: Sản phẩm PCR nhân gen <i>codA</i> từ DNA tổng số tách chiết từ một số dòng cà chua chuyển gen và không chuyển gen	37
Hình 3.6: Kết quả tách chiết RNA từ mẫu cây cà chua	38
Hình 3.7: Kết quả tách RNA khi loại DNA bằng DNase	39
Hình 3.8: Điện di đồ kiểm tra sản phẩm RT-PCR xác định hoạt động của gen <i>actin</i> trong các dòng cà chua PT18 chuyển gen	40
Hình 3.9: Điện di đồ kiểm tra sản phẩm RT-PCR xác định hoạt động của gen <i>codA</i> trong các dòng cà chua PT18 chuyển gen	40
Hình 3.10: Cây cà chua không chuyển gen trên môi trường ra rễ ở các nồng độ muối NaCl	42
Hình 3.11: Các dòng cà chua chuyển gen <i>codA</i> và không chuyển gen trên môi trường ra rễ có bổ sung 200mM NaCl	44
Hình 3.12: Mảnh lá cà chua tái sinh trên môi trường có bổ sung 200 mM NaCl	45

DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
μ l	micro lit	
μ M	micro mol	
AS	Acetosyringone	Chất dẫn dụ
BAP	6-Benzyl amino purine	
Bp	Base pair	
cDNA	Complementary DNA	Sợi DNA bổ sung được tổng hợp từ RNA thông tin nhờ enzyme sao mã ngược
Cefo	Cefotaxime	
CodA	Choline oxidase gene	
Cs		Cộng sự
DNA	Deoxirionucleic Acid	
GB	Glycine betaine	
IBA	Indolyl acetic acid	
Kb	Kilo base	
MS	Murashige and Skoog, 1962	Môi trường cơ bản
M	Marker	Thang Marker chuẩn
mM	Milimol	
NAA	Naphtyl acetic acid	
NOS	Nopaline synthase terminator	
OD	Optical density	
PCR	Polymerase Chain Reaction	
RT – PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược
WT	Wild type	Cây không chuyển gen

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Cây cà chua có tên khoa học là *Lycopersicon esculentum*, có nguồn gốc từ Nam Mỹ, là loại rau ăn quả, họ Cà (Solanaceae). Quả có chứa nhiều vitamin C nên có vị chua. Quả cà chua mọng, khi chín có màu vàng hoặc đỏ, có nhiều hình dạng: tròn, dẹt, có cạnh, có múi, v.v. Cà chua được dùng trong chế biến thực phẩm, tạo vị ngon và màu sắc hấp dẫn. Ngoài ra cà chua còn có tác dụng khá tốt trong việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe. Lá cà chua có nơi dùng chữa bệnh về huyết áp và các bệnh ngoài da.

Ở nước ta việc phát triển trồng cà chua còn có ý nghĩa quan trọng về mặt luân canh, tăng vụ và tăng năng suất trên đơn vị diện tích, do đó cà chua là loại rau được khuyến khích phát triển. Diện tích trồng cà chua lên đến chục ngàn ha, tập trung chủ yếu ở đồng bằng và trung du phía Bắc. Tuy nhiên, việc trồng cà chua chưa được phát triển mạnh theo mong muốn vì cà chua trồng trong điều kiện nóng và ẩm ở nước ta dễ mắc nhiều bệnh gây hại đáng kể như héo tươi, virus,... khó phòng trị.

Các nghiên cứu trong lĩnh vực nông nghiệp đều cho thấy tổng sản lượng các cây lương thực trên thế giới chỉ đạt 20% tiềm năng di truyền. Nguyên nhân chính cho là do các stress của môi trường tác động lên cây trồng, hạn mất nước, hạn mặn và lạnh đều gây lên sự mất nước nội bào trong mô thực vật. Chính vì vậy, nhằm phục vụ công tác tạo giống cây có khả năng chống chịu những yếu tố bất lợi phi sinh học khác nhau, công nghệ gen hiện nay được cho là một phương tiện giải quyết hiệu quả nhiệm vụ trên.

Những tác động bất lợi từ môi trường như khô hạn, đất nhiễm mặn, ngập úng, nhiệt độ cực đoan thường làm mất cân bằng về áp suất thẩm thấu gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của nhiều loài cây trồng [30]. Một trong những phản ứng thường gặp nhất khi cây gặp các điều kiện bất lợi về nước đó là tăng cường tổng hợp và tích lũy các chất chuyển hóa như các loại đường tan, axit amin để tăng cường áp suất thẩm thấu cho tế bào. Glycine betaine được biết đến là một trong

những chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào khi thực vật sống trong các điều kiện bất lợi như khô, hạn, lạnh [47].

Ứng dụng kĩ thuật chuyển gen trong việc nghiên cứu nhằm tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng bằng cách kích thích cây trồng tổng hợp các chất thẩm thấu tương thích giúp tế bào có thể vượt qua các điều kiện cực đoan. Vì vai trò quan trọng của các chất tạo áp suất thẩm thấu để đáp ứng với áp lực môi trường ở thực vật, cây trồng gặp điều kiện bất lợi có thể được tăng cường bằng tích lũy các chất hòa tan tương thích thông qua nhân giống cây trồng truyền thống, lựa chọn sự trợ giúp của marker hoặc kĩ thuật di truyền. Một trong các gen được sử dụng để chuyển vào cây trồng là *codA* giúp cây tự tổng hợp và tích lũy Glycine betaine.

Xuất phát từ thực trạng đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “**Nghiên cứu chuyển cấu trúc mang gen *codA* vào cây cà chua**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu: Tạo được cây cà chua mang gen *codA*

3. Nội dung nghiên cứu

- (1) Chuyển gen *codA* vào lá mầm cà chua thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*
- (2) Tái sinh *in vitro*, chọn lọc và tạo các dòng cây cà chua chuyển gen mang gen *codA*
- (3) Phân tích và đánh giá cây chuyển gen